

Université de Montréal

**Modulation par le récepteur neurokinine-1 du mécanisme
d'action des immunosuppresseurs chez les cellules T.**

par
Khadije Jizi

Département de Pharmacologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en Pharmacologie
option pharmacologie moléculaire

Août, 2012

© Khadije Jizi, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Modulation par le récepteur neurokinine-1 du mécanisme d'action des immunosuppresseurs
chez les cellules T.

Présenté par :
Khadije Jizi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Jean-François Gauchat
Président rapporteur

Karim Maghni
Directeur de recherche

Nathalie Labrecque
Membre du jury

Résumé

Le récepteur neurokinine 1 (NK1R) est impliqué dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Cependant, les mécanismes par lesquels le NK1R modulerait ces réponses ne sont pas connus. Chez les cellules T, les voies de la calcineurine et de la mTOR constituent les cibles d'immunosuppresseurs, comme la cyclosporine A (CsA), le tacrolimus et la rapamycine. Ainsi, nous avons voulu déterminer si le NK1R pourrait agir sur ces voies et si le blocage pharmacologique du NK1R avec des antagonistes sélectifs, pourrait augmenter l'action de ces immunosuppresseurs sur l'activation des cellules T. Tout d'abord, nos résultats ont montré que les cellules Jurkat (cellules T humaines) exprimaient à la fois le gène du NK1R et de son ligand (les endokinines). Ceci suggère l'existence d'une régulation autocrine tachykinergique de la fonction des cellules T. Cette hypothèse est appuyée par nos données, où nous avons observé que le blocage du NK1R avec des antagonistes spécifiques (L-733,060 et L-703,606) chez les cellules Jurkat, inhibe la production d'IL-2 et diminue l'activation du NFAT (substrat de la calcineurine). De façon intéressante, nous avons montré un effet de combinaison entre les antagonistes du NK1R et les inhibiteurs de la calcineurine (CsA et tacrolimus) sur la production d'IL-2 et l'activation du NFAT. En revanche, le blocage du NK1R n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activation de la mTOR et la p70S6K, mais réduit la phosphorylation de S6R (Ser235/236) et Akt (Ser473). Enfin, nous n'avons observé aucun effet de combinaison avec la rapamycine et l'antagoniste NK1R sur l'activation de mTOR et de sa voie de signalisation. L'ensemble de nos résultats, démontrent la présence d'un nouveau mécanisme de régulation de NFAT impliquant le système tachykinergique NK1R/endokinines chez les cellules T. Par conséquent, nous suggérons que la combinaison des antagonistes NK1R avec les inhibiteurs de la calcineurine pourrait être une alternative thérapeutique intéressante afin de réduire les doses de CsA et le FK506 dans les protocoles de prévention de rejet de greffes.

Mots clés : cyclosporine A, tacrolimus, rapamycine, cellules Jurkat, récepteur neurokinine 1, endokinines, NFAT, L-733,060.

Abstract

There are increasing evidences for a role of the neurokinin 1 receptor (NK1R) in the regulation of innate and adaptive immune systems. However, whether NK1R regulates calcineurin/nuclear factor of activated T cell (NFAT) and mTOR pathways in T cells is unknown. These signalling pathways being targets of the immunosuppressive drugs cyclosporine A (CsA), FK506 and rapamycin respectively. We also examined whether pharmacological blockade of NK1R may be combined to those immunosuppressors to repress T cell activation. In this article, we first show that Jurkat T cells express both genes for NK1R and its ligands endokinins which suggests the existence of an autocrine tachykinergic regulation of T cells function. This hypothesis is supported by our data showing that blockade of this receptor with specific NK1R antagonists inhibits IL-2 production in Jurkat T cells which is associated with the reduction of NFAT activation. Interestingly, we show interplay between NK1R antagonists and calcineurin inhibitors to repress IL-2 production and NFAT activation. In contrast, blockade of NK1R has no inhibitory effect on mTOR and p70S6K activation but reduce S6R (Ser235/236) and Akt (Ser473) phosphorylation. However, combining rapamycin with NK1R antagonist has no enhancing effect on rapamycin-reduced mTOR activation and its signalling pathway. Our findings provide the evidence of a novel mechanism of regulation of NFAT activation-induced IL-2 production in T cells involving the tachykinergic system NK1R/endokinins. These observations may offer new application for NK1R antagonists in transplantation immunotherapy in combination with immunosuppressors.

Keywords: cyclosporin A, FK506, rapamycin, Jurkat T cells, neurokinin 1 receptor, endokinin, NFAT, L-733,06

Table des matières

Chapitre 1. Transplantation.....	1
1.1 Mécanismes principaux du rejet de greffe	1
1.2 Rôle des lymphocytes T CD4+	2
1.3 Rôle des lymphocytes T CD8+ et autres composantes du système immunitaire	5
Chapitre 2. Immunosuppresseurs.....	7
2.1 Cyclosporine A et Tacrolimus	7
2.1.1 Découverte et structure	8
2.1.2 Mécanisme d'action de la CsA et du tacrolimus	9
2.2 Structure, régulation et fonction de la calcineurine	10
2.3 NFAT : structure, fonction et rôle chez les cellules T	13
2.4 Rapamycine.....	15
2.4.1 Découverte et structure	16
2.4.2 mTOR, cible de la rapamycine	16
2.4.3 Mécanisme d'action de la rapamycine.....	20
2.4.4 Rôle de mTOR chez les cellules T.....	23
2.5 Efficacité des immunosuppresseurs et effets secondaires	25
2.6 Protocoles de prévention de rejet de greffes	27
2.7 Stratégies pour réduire les effets secondaires des immunosuppresseurs	28
Chapitre 3. Récepteur des neurokinines, tachykinines et endokinines	29
3.1 Isoformes du NK1R	31
3.2 <i>Tac1</i> : substance P	33
3.3 : <i>Tac4</i> : endokinines	34
3.4 Les antagonistes du NK1R.....	36
3.5 Rôle du système tachykinergique	38
3.6 Cellules T et NK1R.....	40
Chapitre 4. Modèle cellulaire pour l'étude des effets des immunosuppresseurs : les cellules Jurkat.....	41
Chapitre 5. Objectifs de recherche.....	42

Chapitre 6. Article.....	45
Chapitre 7. Discussion	82

Liste des figures

Figure 1 : Les trois signaux d'activation du lymphocyte T.	4
Figure 2: Différenciation des cellules T naïves CD4+.	5
Figure 3: Mécanisme d'action de la cyclosporine et du tacrolimus (FK506).	10
Figure 4: Structure de la calcineurine.	11
Figure 5: Structure et domaines du facteur de transcription NFAT.	14
Figure 6: Structure de mTOR.	17
Figure 7 : Structure et fonctions des complexes mTORC1 et mTORC2.	19
Figure 8: Activation de la p70S6K. (A) Le modèle conventionnel.	22
Figure 9: Structures des antagonistes du NK1R.	37
Figure 10 : Hypothèses de recherche.	44
Figures de l'article	
Figure 11: Expression of NK1R and its ligand in human Jurkat T cells.	57
Figure 12: Effects of immunosuppressive drugs and pharmacological blockage of NK1R in IL-2 synthesis.	60
Figure 13: Blockage of NK1R with L-703,606 increases the inhibitory effect of CsA and FK506.	61
Figure 14: Blockage of NK1R with L-733,060 increases the inhibitory effect of CsA and FK506.	62
Figure 15 : Involvement of NK1R in the regulation of NFAT activity and effects of combining NK1R with calcineurin inhibitors.	64
Figure 16 : Effects of calcineurin inhibitors and L-733,060 alone or in combination on Jurkat T cells proliferation.	66
Figure 17: Effects of FK506 and L-733,060 alone or in combination on Jurkat T cells apoptosis.	68
Figure 18: Role of NK1R in the regulation of mTOR, p70S6K, S6R and Akt activation.	69
Figure 19 : Interactions of NK1R with Rapamycin-induced inhibition of mTOR signalling pathway.	71

Liste des tableaux

Tableau I : Rôles physiologiques de la calcineurine chez l'homme.....	12
Tableau II: Membres de la famille NFAT, leur régulation et leur expression dans le système immunitaire.	13
Tableau III: Caractérisation des récepteurs NK1, NK2 et NK3.	30
Tableau IV: Les effets physiologiques de la SP	34

Liste des sigles et abréviations

4EBP1 :	<i>eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding protein 1</i>
ADCC:	<i>antibody dependant cellular toxicity</i>
ADN :	acide désoxyribonucléique.
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AP-1:	<i>activator protein-1</i>
ARN :	acide ribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
Ca ²⁺ :	calcium
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA:	cellule présentatrice d'antigène
CpN:	cyclophilin
CsA:	cyclosporine
CTL:	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
DAG	diacylglycérol
Deptor:	DEPDC6, DEP domain-containing protein 6
eEF2:	<i>eukaryotic elongation factor 2</i>
EK:	endokinine
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FKPB-12:	<i>FK binding protein-12</i>
G-CSF:	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF:	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GβL:	<i>G-protein β-subunit-like protein</i>
HK-1:	hémokinine-1
Ig:	Immunoglobuline
IL-2:	Interleukine-2
IFNγ:	Interféron gamma
IP3:	inositol 1,4,5-triphosphate
KO:	<i>knock out</i>
LPS:	lipopolysaccharide
MAPK:	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

mSin1:	<i>mammalian stress-activated protein kinase- interacting protein 1</i>
mTOR:	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NFAT:	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B:	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NK:	<i>Natural killers</i>
NK1R:	<i>neurokinin 1 receptor</i>
NK2R:	<i>neurokinin 2 receptor</i>
NK3R:	<i>neurokinin 3 receptor</i>
NKA:	neurokinine A
NKB:	neurokinine B
NPK:	neuropeptide K
NP γ :	neuropeptide gamma
PI3K:	phosphoinositide-3-kinase
PIKK:	<i>phosphatidylinositol kinase related kinase</i>
PKC α :	protéine kinase alpha
PKG :	<i>cyclic GMP dependant protein kinase</i>
PLC:	phospholipase C
PMA :	<i>cyclic AMP-dependant protein kinase</i>
PP2A:	phosphatase 2A
PP2B:	phosphatase 2B
PPR5:	<i>proline-rich protein 5</i>
PPTA :	préprotachykinine A
PRAS40:	<i>proline-rich Akt substrate 40 kDa</i>
Protor:	<i>protein observed with rector</i>
RCPG :	récepteur couplé aux protéines G
Rictor:	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
S6K1:	<i>ribosomal S6 protein kinase 1</i>
S6R:	protéine S6 ribosomale
SNC :	système nerveux central
SP :	substance P
T reg:	cellule T régulatrice

TGF β : *transforming growth factor beta*
Th1: *T cell helper 1*
TNF α : *tumor necrosis factor alpha*
TOR: *target of rapamycin*
TOS: TOR signaling
 α : alpha
 β : béta
 γ : gamma
 δ : delta

Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas vu le jour sans l'aide précieuse de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Merci Dr Maghni pour votre support et votre encadrement. Merci de m'avoir donné une chance en m'acceptant dans votre laboratoire comme stagiaire d'été d'abord et ensuite comme étudiante à la maîtrise. J'ai eu la chance d'en apprendre beaucoup sur la recherche fondamentale.

Merci de m'avoir inculquée des valeurs comme la rigueur et l'esprit critique.

Merci d'avoir cru en moi et d'avoir poussé mes limites à des niveaux que vous seul saviez que j'en étais capable.

Merci d'avoir pris le temps d'être présent pour nous soutenir et nous encourager pendant mes présentations et dans les moments difficiles.

Et surtout, merci pour les nombreuses preuves de soutien et d'engagement à ma réussite dans ma carrière future.

Pour ça, et pour beaucoup plus encore, je vous remercie.

Merci Mélanie Welman pour ta présence, ton soutien et surtout ta patience.

Merci pour ton sens de l'humour, ta franchise et de ton expérience en transfections.

Merci pour tous les moments inoubliables: les fous rires, les corrections de dyslexie, les matchs du Canadiens, les livres Twilight et tellement d'autres encore. Je garderai toujours de merveilleux souvenirs de ces années passées au laboratoire en ta compagnie.

Merci d'avoir été pendant ces trois ans une confidente, une sœur et une «maman canard » pour nous les étudiants.

Merci à toute l'équipe du laboratoire, Lucero, Myrella, Guillaume, Laetitia, Marco, Sarah, Lotfi, Lyes, Zaynab, Rajaa et Jean-Philippe. Nous avons passé des moments inoubliables ensemble. Nos chemins se sont certes séparés mais je vous souhaite de la réussite dans tout ce que vous entreprenez.

Merci à toute l'équipe de recherche de l'Hôpital du Sacré Cœur de Montréal. Surtout Grégory, Jacques et Véronique. Les lunchs sont drôlement amusants depuis qu'on les partage.

Merci à l'équipe du Dr Guy Rousseau. Kim, Mandy et Guy merci pour les conversations stimulantes et intéressantes et merci pour les statistiques.

Merci à ma famille. Merci à toi maman pour tout ce que tu as fait pour nous. Sans toi je ne serai pas la personne que je suis aujourd'hui. Il n'y a pas de mots qui pourraient expliquer la gratitude et l'amour que j'éprouve envers toi.

Merci à mes frères et sœurs : Roaa, Dany Abdallah, René Omar, Tarek et Siham. Vous êtes mes meilleurs amis et mes confidents.

Merci à toi papa pour m'avoir donné goût à la science et à aimer l'école.

Merci d'avoir nourri mes ambitions et d'avoir cru en moi.

Merci de m'avoir appris l'indépendance la débrouillardise.

Merci de m'avoir inculquée des valeurs comme l'intégrité, la responsabilité, le courage et le souci du détail.

Pour ça et pour tous tes sacrifices je te dédie ce mémoire.

A la fin, un gros merci à mon mari Louay. Sans toi je ne serais jamais arrivée à bout de ma maîtrise.

Merci d'avoir été mon roc pendant ces années, de m'avoir soutenue et encouragée.

Merci pour ton amour inconditionnel, ta patience, ta compréhension et tes tentatives pour comprendre mon projet de recherche! Je sais, ce n'est pas facile quand tu n'es pas dans le domaine!!

Merci d'être, tout simplement, toi.

Introduction

Chapitre 1. Transplantation

1.1 Mécanismes principaux du rejet de greffe

La réponse immunitaire est initiée pour protéger l'organisme contre des agressions reconnues comme étrangères ou non-soi. On distingue deux types de réponse immunitaires, la réponse immunitaire innée, et la réponse immunitaire adaptative. La réponse innée est la première réponse activée par l'organisme, celle-ci est non spécifique et généralement de courte durée. Elle implique essentiellement des cellules comme les neutrophiles, les macrophages et les cellules naturellement tueuses (NK, « natural killers »), via l'activation de plusieurs effecteurs moléculaires comme les Toll-like receptors (TLR), les Nod-like-receptor (NLD) et les protéines du complément. Cette réponse est essentielle pour activer par la suite la réponse adaptative, qui est spécifique et implique principalement les cellules T et B pour aboutir au final, entre autre mécanisme, à la formation de cellules mémoires [1].

La greffe d'organes a été sans doute l'une des avancées les plus importantes dans le domaine médical. Cette intervention chirurgicale a pu sauver jusqu'à nos jours la vie de milliers de personnes. Les progrès dans la transplantation d'organes sont très largement liés au développement d'immunosuppresseurs efficaces capables de contrôler les phénomènes de rejet. En effet, les réponses immunitaires adaptatives contre les tissus greffés représentent le principal obstacle à la réussite d'une greffe. Le rejet survient quand il y a une incompatibilité entre le donneur et le receveur au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces protéines membranaires sont présentes à la surface de toutes les cellules nucléées du corps et définissent l'identité biologique de l'individu en exprimant les antigènes du « soi » qui sont uniques à chacun. Deux classes de CMH existent : le CMH de type I (CMH-I), exprimé par toutes les cellules nucléées du corps et le CMH de type II (CMH-II) exprimé uniquement au niveau des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques. Le CMH-I est formé d'une seule chaîne lourde polypeptidique, chaîne α , ainsi qu'une chaîne légère nommée chaîne β_2 microglobuline. Le CMH-II, quant à lui, est formé de deux sous-unités peptidiques (une chaîne α et une chaîne β) liées d'une façon non-covalente [2].

Lorsque le donneur et le receveur ont un CMH différent, la réponse immunitaire dite alloréactive, (donneur et receveur étant de la même espèce) est dirigée vers les molécules du CMH du non-soi présentes sur le greffon. L'hôte développe ainsi en premier lieu une réponse à médiation cellulaire en activant les lymphocytes T contre les protéines étrangères du CMH. Par la suite, une réponse à médiation humorale est enclenchée par l'activation des lymphocytes B qui produisent des anticorps spécifiques. Le système immunitaire est ainsi activé dans le but de rejeter le greffon. Ce rejet peut se manifester rapidement (après 3 ou 4 jours) on parle de rejet aigu, ou après des années, dans le cas de rejet chronique [3]. Bien que la compatibilité des systèmes CMH augmente le taux de réussite clinique des greffes d'organes, cela ne permet pas en soi d'éviter les réactions de rejet, car d'autres facteurs interviennent comme les antigènes mineurs. Les lymphocytes T peuvent reconnaître d'autres protéines liées au CMH appelées antigènes mineurs d'histocompatibilité, qui sont des peptides dérivés des gènes présents dans le génome du donneur ou du receveur [4]. Ainsi, à moins que le donneur et le receveur ne soient des jumeaux homozygotes, tous les greffés sont traités avec des immunosuppresseurs afin d'empêcher tout rejet et prolonger la survie du greffon après la transplantation [5].

1.2 Rôle des lymphocytes T CD4+

Les cellules T CD4+ constituent une des barrières les plus importantes dans la défense de notre organisme contre des pathogènes étrangers. Cependant dans un contexte de transplantation ces cellules deviennent la première cible à limiter afin de prolonger la survie et la tolérance du greffon.

L'activation du lymphocyte naïf requiert trois signaux (voir figure 1) [6]:

- 1) Lors du 1^{er} signal, le récepteur des cellules T (TCR) reconnaît les peptides antigéniques du greffon présentés par le CMH-II des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). La reconnaissance antigénique par le TCR active les protéines kinases couplées au récepteur : lck et ZAP-70. Celles-ci activent à leur tour différentes cascades de signalisation dont les plus importantes sont celles des MAPK (mitogen-activated protein kinase), la voie de la

calcineurine et celle de la phospholipase C (PLC);

- 2) Le 2^{ème} signal correspond à l'activation des molécules de costimulation présentes à la surface des CPA comme CD80,86 et CD40 avec leurs ligands respectifs CD28 et CD40L présentes à la surface des cellules T. CD28 est exprimé d'une façon constitutive sur les cellules T, et se lie aux membres de la famille B7 présents sur la CPA : CD80/CD86. L'activation de la signalisation de CD28, induit l'expression d'autres molécules de costimulation comme CD40L. Ceci renforce le 1^{er} signal délivré par le TCR et aboutit, entre autre, à la transcription du gène de l'interleukine-2 et son récepteur (IL-2/IL-2R). Ce signal est nécessaire à l'activation complète du lymphocyte. En effet, l'absence de costimulation après l'engagement du TCR mène à une cellule T anergique.
- 3) Suite à sa liaison à son récepteur, l'IL-2 active alors le 3^{ème} signal qui active des voies de signalisation nécessaires à la prolifération des cellules T CD4+. La plus importante est la voie de la mTOR (mamalian target of rapamycin) qui sera décrite plus en détails à la section 2.4 du mémoire.

L'activation de ces cellules T CD4+ mène à la production de diverses cytokines (figure 2) dont l'IL-2 et l'IFN- γ qui contribuent à l'activation des cellules TCD8+. Les cellules B, les cellules NK, les macrophages et autres composantes du système immunitaire sont aussi activés. La réponse immunitaire contre le greffon est ainsi enclenchée dans le but de le rejeter [7].

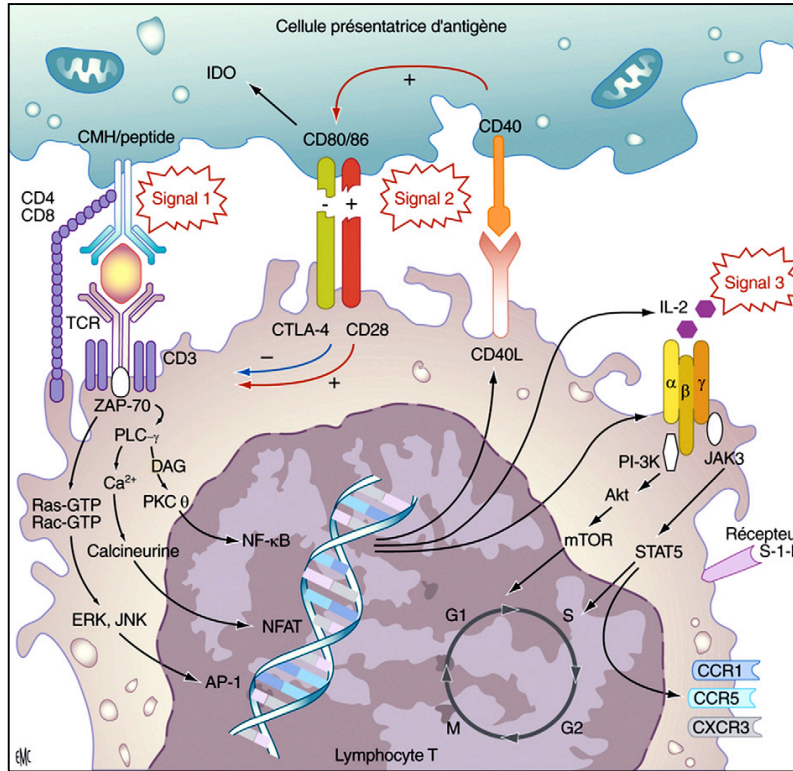


Figure 1 : Les trois signaux d'activation du lymphocyte T. La cellule présentatrice d'antigène (CPA) du receveur, portant des peptides antigéniques du donneur sur son CMH-II, va les présenter au récepteur de la cellule T (TCR). La reconnaissance de l'antigène par le TCR déclenche le premier signal. Le deuxième signal est délivré par l'engagement des molécules de costimulation : CD80/86 sur la CPA vont engager CD28 sur la cellule T. Cela induit l'activation de trois voies de transduction du signal : la voie de la calcineurine dépendante du calcium, la voie des MAP kinase (ERK, et JNK) et la voie de la phospholipase C (PLC), qui activent les facteurs de transcription NFAT, AP-1, et NFκB, respectivement. Le résultat est l'augmentation de l'expression du CD154, de la chaîne α du récepteur de l'interleukine-2 (CD25), et l'interleukine-2 (IL-2). La fixation de l'IL-2 sur son récepteur délivre un le troisième signal permettant la prolifération et la sécrétion de cytokines via l'activation de la protéine mTOR (mammalian target of rapamycine). (Figure tirée de [6]. *Tous nos remerciements à l'auteur, Éric Thévert et à l'éditeur pour la permission d'inclure cette figure dans le mémoire*)

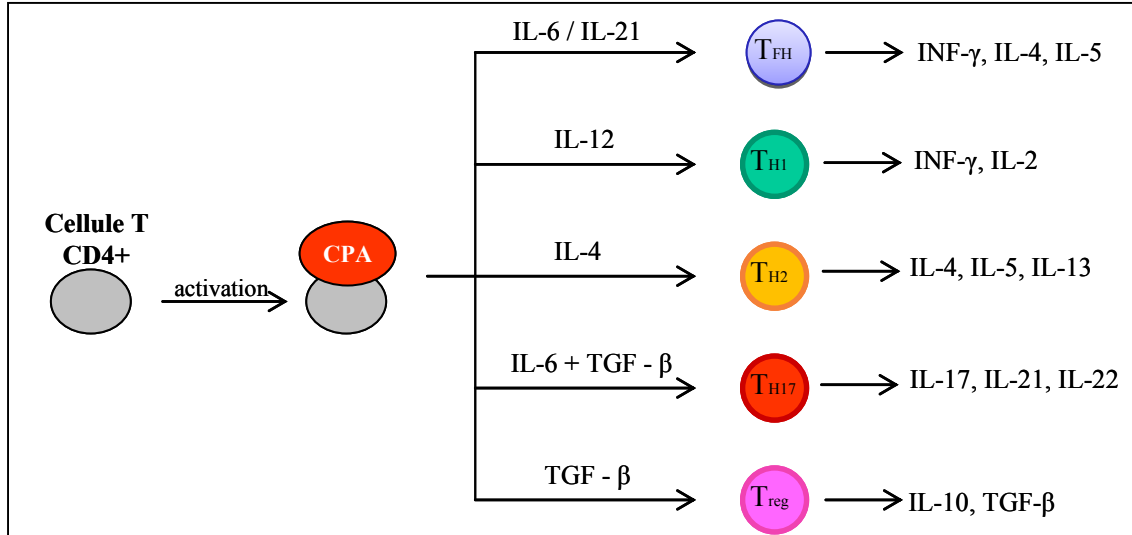


Figure 2: Différenciation des cellules T naïves CD4+. Suite à la rencontre d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) portant des antigènes du greffon, la cellule T naïve est activée grâce à l'action autocrine de l'IL-2. Ensuite a lieu une différenciation en plusieurs sous-types de cellules T qui dépend des cytokines produites par la CPA et la cellule T naïve. Les sous-types ont un profil de sécrétion de cytokines qui leur est propre. Les cellules T auxiliaires (helper) de type 1 (T_{H1}) conduisent la réponse immunitaire à médiation cellulaire en favorisant le recrutement des cellules phagocytaires dans les tissus. Les T_{H2} favorisent le recrutement des éosinophiles, basophiles et macrophages. Les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) inhibent la réponse immunitaire en induisant la tolérance du greffon, et diminuent le rejet, tandis que les cellules T_{H17} sont impliquées dans le rejet résistant aux glucocorticoïdes. Les Th folliculaires (T_{FH}), découverts récemment, migrent vers les follicules des cellules B dans les tissus secondaires et induisent la production d'anticorps [8, 9].

1.3 Rôle des lymphocytes T CD8+ et autres composantes du système immunitaire

L'activation des cellules CD4+ n'est que la première étape dans la réponse du système immunitaire face au greffon. Il est important de préciser que les lymphocytes T CD4+ ne sont

pas directement responsables du rejet de la greffe. En effet, le rejet est principalement attribuable aux lymphocytes T CD8+. Ils sont activés suite à la reconnaissance des antigènes présentés par le CMH-I qui sont exprimés par les cellules nucléées de l'organisme. Comme dans le cas des lymphocytes T CD4+, la formation d'une synapse entre le TCR et le complexe du CMH-I est observée. L'activation nécessite également des signaux de costimulation entre le lymphocyte T CD8+ et la CPA (CD28 et CD80/86) [8]. Ainsi, l'activation n'est pas directe car elle nécessite la présence de la CPA. Cependant, les CPA expriment peu de CD80/86 à l'état non activé. Ainsi, les lymphocytes T CD4, via l'interaction de leur TCR avec le CMH-II de la CPA, vont augmenter l'expression des molécules de costimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T CD8+ et leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Suite à la reconnaissance antigénique, les CTL libèrent leurs granules de granzyme et de perforine qui induisent des cascades de signalisation menant à l'apoptose des cellules du greffon. D'ailleurs des taux augmentés de perforine et de granzyme sont fortement liés au développement d'épisodes de rejet aigu [10, 11].

Les lymphocytes B, tout comme les CPA, expriment le CMH-II et les molécules de costimulation dont le CD40. Ainsi, ils peuvent interagir avec les cellules T via leur TCR. Les cytokines libérées (IL-4, IL-6) suite à l'activation des cellules T CD4+ vont contribuer à l'activation et à la différenciation des cellules B en plasmocytes [5]. Ces derniers vont produire des anticorps spécifiques de type IgG dirigés contre les protéines du greffon [12]. Ces anticorps induisent également la destruction des cellules du greffon en activant la cascade du complément et de l'ADCC (Antibody-dependant cellular toxicity). Les taux sériques d'anticorps ainsi que la présence des protéines du complément sont des indices de rejet et sont généralement un mauvais pronostic de survie du greffon [13-15].

Chapitre 2. Immunosuppresseurs

Le progrès en transplantations d'organes est fortement lié au développement de drogues qui permettent d'inhiber la réponse immunitaire orchestrée par les cellules T CD4+. Ainsi la nouvelle génération d'immunosuppresseurs vise à inhiber d'une façon spécifique les lymphocytes T CD4+ dans le but d'empêcher l'activation subséquente des CTL, des cellules B et autres composantes du système immunitaire.

Dans le cadre de ce mémoire nous décrivons les trois immunosuppresseurs suivants : la cyclosporine (CsA), le tacrolimus (FK506) et la rapamycine.

2.1 Cyclosporine A et Tacrolimus

Afin de faciliter la compréhension le mécanisme d'action de la CsA et du tacrolimus, il serait pertinent de décrire brièvement la voie de signalisation du TCR. Le TCR est associé à d'autres molécules pour permettre la transduction du signal, dont le CD3. Le CD3 contient dans sa région cytoplasmique des motifs ITAM (immunoreceptor-based tyrosine activation motif) qui suite à l'engagement du TCR deviennent rapidement phosphorylés sous l'action de protéines kinases (PTK) spécifiques LcK et Fyn. Ceci initie une cascade de signalisation qui mène l'activation de la cellule T: d'abord, elle permet le recrutement et l'activation subséquente d'une autre PTK, ZAP-70 permettant ainsi sa liaison au TCR. Ensuite ZAP-70 phosphoryle à son tour deux substrats: les protéines adaptatrices LAT (linker for activation of T cells) et SLP-76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa). La phosphorylation de LAT et SLP-76 permet le recrutement de plusieurs protéines impliquées dans l'activation de la voie MAPK, dans la mobilisation de calcium et dans la réorganisation du cytosquelette.

Une des protéines activées par LAT est la phospholipase C γ (PLC γ) qui génèrent les seconds messagers le DAG (diacylglycérol) et l'IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate). Le DAG active la protéine kinase C (PKC) et RasGRP (Ras guanyl-nucleotide-releasing protein) alors que l'IP3 se lie à son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique entraînant la libération du calcium au cytoplasme. Cet événement provoque l'ouverture des canaux calciques à la membrane plasmique, permettant un influx de calcium extracellulaire. Les niveaux augmentés de calcium activent ensuite la calcineurine ce qui permet ensuite la transcription de diverses

cytokines impliquées dans l'activation des cellules T [6, 8].

La CsA et le tacrolimus sont des inhibiteurs de la calcineurine. Nous les incluons donc dans la même section du fait de leur mécanisme d'action similaire.

2.1.1 Découverte et structure

La cyclosporine A (CsA) fut isolée d'un champignon le *Tolypocladium inflatum Gams* en 1970 [16]. C'est un polypeptide neutre cyclique formé de 11 acides aminés qui consiste en sept N-méthyl acides aminées, quatre résidus MeLeu et un D-acide aminé. L'effet immunosuppresseur de la CsA fut découvert en 1972 par le groupe de Jean-François Borel [17]. Les premiers essais cliniques furent entrepris sur des transplantés de rein en 1978 à Cambridge, Angleterre. Les résultats ont démontré que la CsA est le facteur responsable des progrès en transplantation d'organes : 80 % de survie du greffon à 3 ans pour la greffe rénale [18]. En 1983, soit 11 ans après la découverte de ses effets immunosuppresseurs, la CsA fut approuvée par la FDA (Food and drug administration) comme agent immunosuppresseur dans le traitement des rejets de greffe [17].

Le FK506 ou tacrolimus (nouvelle nomenclature depuis 1992) produit par la bactérie *Streptomyces tsukubaensis*, a été découvert en 1984 par la compagnie Fujisawa au Japon [19, 20]. Le tacrolimus est un macrolide de 23 éléments cycliques de la famille des lactones. Des propriétés immunosuppressives ont vite été attribuées à ce composé puisqu'il inhibait la réponse lymphocytaire mixte *in vitro* et la production d'IL-2 à des concentrations 32 à 100 fois inférieures à celles de la CsA [21, 22]. Le tacrolimus s'est avéré efficace dans la prévention du rejet des allogreffes hépatiques chez différentes espèces animales [23, 24]. Les premiers essais cliniques ont été réalisés à l'Université de Pittsburgh sur des transplantés du foie en 1989. Le taux de survie un an post-transplantation fut de 93%. L'efficacité et la supériorité du tacrolimus furent prouvées par la suite dans un essai clinique européen de grande ampleur sur des greffes rénales et hépatiques [25].

2.1.2 Mécanisme d'action de la CsA et du tacrolimus

La CsA et le tacrolimus sont des inhibiteurs spécifiques de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ responsables du rejet de greffe [18]. Plus précisément, la CsA et le tacrolimus bloquent le 1^{er} signal de la cascade d'activation de lymphocyte T naïf, l'empêchant d'initier une réponse adaptative contre le greffon.

La CsA, par sa nature lipophile peut facilement traverser la membrane plasmique des lymphocytes T. Elle se lie à un récepteur soluble, la cyclophiline, présent dans le compartiment cytosolique des lymphocytes T [26]. La cyclophiline (famille hautement conservée des immunophilines) est une protéine ubiquitaire et abondante dans le cytoplasme des organismes procaryotes et eucaryotes [27]. Elle lie la CsA avec une affinité élevée (constante de dissociation $K_d = 36.8$ nM) [28]. Le complexe formé interagit directement avec la calcineurine et cette liaison induit un changement de conformation qui bloquerait l'activité phosphatase de la calcineurine, l'empêchant de déphosphoryler son substrat le NFAT [29-32]. Ce dernier ne peut plus alors transloquer vers le noyau pour se lier au promoteur des gènes cibles pour initier leur transcription, dont le gène d'IL-2.

Le tacrolimus exerce son effet sur les cellules T CD4⁺ en inhibant lui aussi l'activité phosphatase de la calcineurine et l'activation subséquente du NFAT. Cependant, le tacrolimus se lie à un récepteur intracellulaire distinct de celui de la CsA [33]. En effet, le tacrolimus se lie avec une grande affinité au FKBP-12 (FK binding protein-12), une protéine de la famille des immunophilines de 12 kDa. La résultante de cette liaison est une inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine et par la suite une réduction drastique de la production de l'IL-2 nécessaire à l'activation des cellules T (voir figure 3).

Ainsi, malgré le fait que la CsA et le tacrolimus lient des récepteurs intracellulaires différents leur cible subséquente est la même : la calcineurine. La section prochaine présente un bref survol sur cette enzyme et son substrat, ainsi que son importance chez les lymphocytes T.

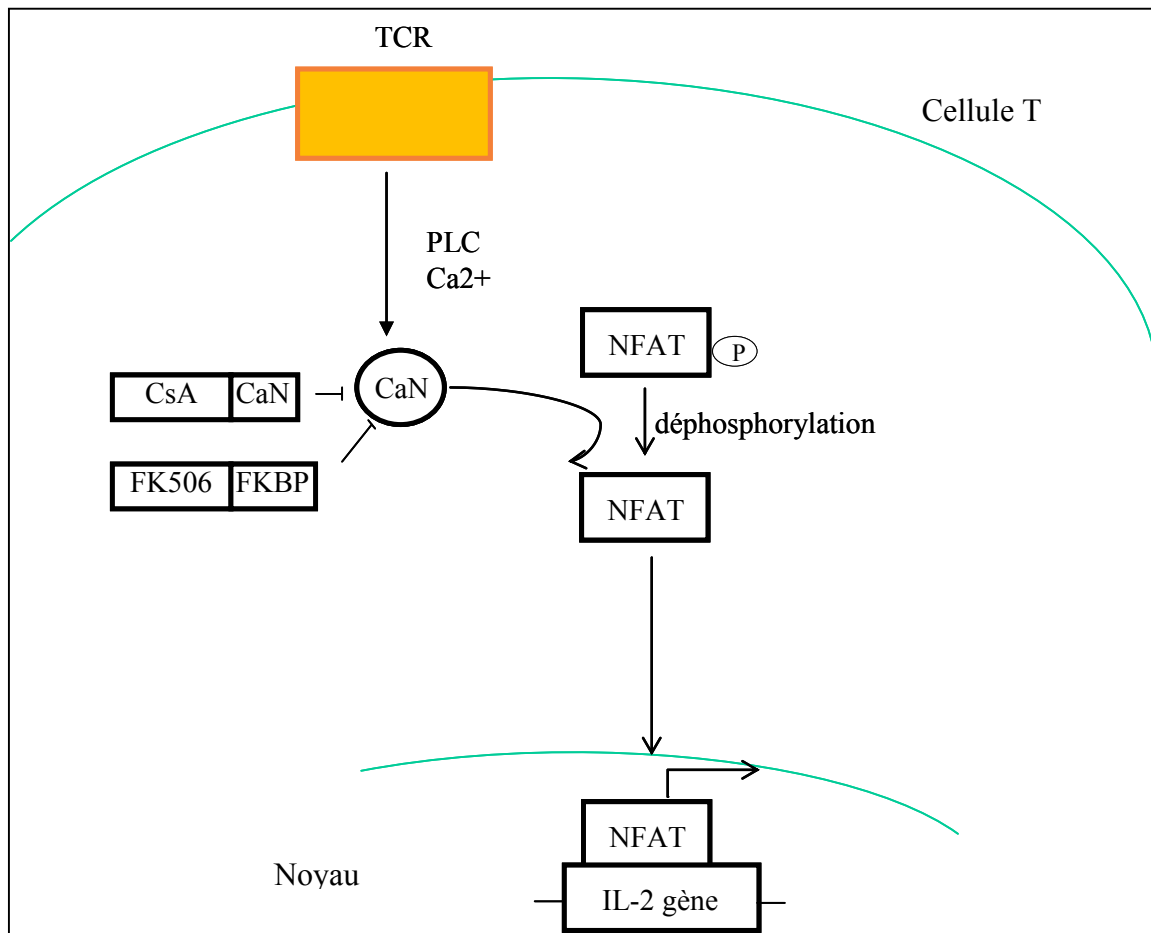


Figure 3: Mécanisme d'action de la cyclosporine et du tacrolimus (FK506). La cyclosporine (CsA) se lie à la cyclophiline (CpN), formant un complexe qui bloque la fonction phosphatase de la calcineurine (CaN). Le FK506 se lie à FKBP, formant un complexe qui, de façon analogue à la CsA, bloque l'activité de la CaN. En conséquence, la CaN est incapable de déphosphoryler le facteur de transcription NFAT cytoplasmique et sa translocation vers le noyau, l'empêchant ainsi de se lier au promoteur du gène de l'IL-2. La synthèse d'IL-2 nécessaire à l'activation des lymphocytes T est ainsi bloquée.

2.2 Structure, régulation et fonction de la calcineurine

La calcineurine, aussi connue sous le nom de phosphatase 2B (PP2B) est une enzyme de type sérine/thréonine-phosphatase dont l'activité enzymatique est régulée par le calcium

[34]. Elle est formée de deux sous-unités : la sous-unité A catalytique de poids moléculaire de 59 kDa (calcineurine A) et la sous-unité B régulatrice (calcineurine B) qui a un poids moléculaire de 19 kDa [32].

La sous-unité A est composée du site catalytique à activité phosphatase du côté N-terminal et de trois domaines du côté C-terminal (figure 4). Ces trois domaines sont : le domaine de liaison à la calcineurine B, le domaine de liaison de la calmoduline et le domaine auto-inhibiteur [35]. L'activité de la calcineurine est régulée *in vivo* via les variations de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}). Ainsi, en présence de faibles concentrations de Ca^{2+} , la sous-unité B est liée à la sous-unité A, l'enzyme possède ainsi une activité basale faible, voire inexistante. Suite à l'activation d'une voie de signalisation qui induit l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} (i.e. activation du TCR), le Ca^{2+} se lie à la calmoduline. Cette dernière va se lier à la calcineurine en déplaçant le domaine auto-inhibiteur, ce qui augmente de 20 fois l'activité phosphatase de la calcineurine [36-38].

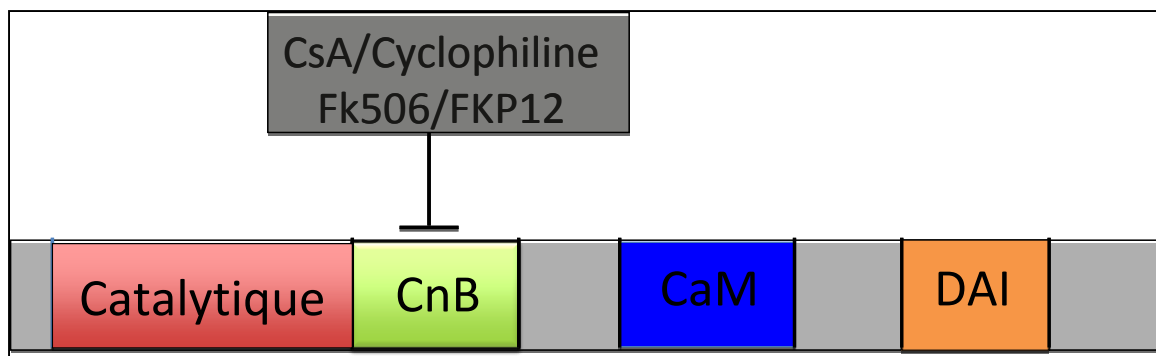


Figure 4: Structure de la calcineurine. La calcineurine est formée d'un domaine catalytique au côté N-terminal, suivi du domaine de la calcineurine B (CnB) et du domaine de liaison à la calmoduline (CaM). Du côté C-terminal se trouve le domaine auto-inhibiteur (DAI) qui inhibe l'activité du site catalytique en absence du calcium. Le site de liaison des immunosuppresseurs (FK506, CsA) avec leurs récepteurs (FKBP12, cyclophiline) est également indiqué.

La calcineurine est retrouvée dans la plupart des cellules de l'organisme. Son expression est particulièrement abondante dans les neurones [36, 39]. Son expression a également été observée dans les cellules cardiaques [40], rénales [41], hépatiques [42], les ostéoblastes [43],

le thymus [44, 45] et la thyroïde [46]. Elle est impliquée dans de nombreux processus biologiques dont l'hypertrophie cardiaque [47-49], le développement neural [50-52] et du muscle squelettique [53], dans la régulation de la pompe Na/K des cellules néphrotiques [54], dans l'apoptose [55-57] et dans la mémoire [58, 59]. La fonction de la calcineurine a longuement été étudiée dans les cellules du système immunitaire, en particulier les cellules T [60]. En effet, la calcineurine est un régulateur important de la fonction des lymphocytes T, puisqu'elle est impliquée dans la production et la régulation des gènes de plusieurs facteurs de croissance et de cytokines clés comme l'IL-2, l'IL-4 le TNF α , le TGF β [31, 36, 61]. Le tableau I [36] ci-dessous montre quelques fonctions biologiques de cette enzyme chez l'homme, qui sont attribuables, pour la plupart, à l'activité de son substrat; le NFAT.

Tableau I : Rôles physiologiques de la calcineurine chez l'homme

Organe ou système	Fonctions
Cerveau	Apoptose Endocytose des vésicules synaptiques Contrôle hormonal Ischémie Régulation des canaux ioniques
Cœur	Hypertrophie cardiaque
Système hématopoïétique	Sélection thymique
Rein	Stimulation de la pompe Na ⁺ K ⁺ ATPase dans les cellules des tubules rénaux Signalisation adrénergique, dopaminergique, glucocorticoïde et minéralocorticoïde Signalisation du récepteur de l'angiotensine
Foie	Protection hépatique Phosphorylation des protéines
Lymphocytes	Activation des lymphocytes et signalisation des cytokines Attraction des neutrophiles Dégranulation des lymphocytes apoptose
Muscle lisse	Inhibition des canaux calcium de type L
Pancréas	Sécrétion de l'insuline des cellules β

2.3 NFAT : structure, fonction et rôle chez les cellules T

NFAT est l'abréviation de Nuclear Factor of Activated T cells ou facteur nucléaire de cellules T activées. C'est un des facteurs de transcription les plus importants dans l'activation des gènes de cytokines chez les cellules T, les cellules B, les cellules NK. Son rôle ne se limite pas seulement aux cellules du système immunitaire, puisque son expression est détectée dans la plupart des tissus de l'organisme [62].

La famille NFAT comprend 5 membres : NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4 et NFAT5. Les facteurs NFAT1 à NFAT4 sont tous régulés par la calcineurine (Tableau II) [63]. Le NFAT 5 est régulé par un autre mécanisme qui ne sera pas discuté dans ce mémoire.

Tableau II: Membres de la famille NFAT, leur régulation et leur expression dans le système immunitaire.

membre de la famille de NFAT	Noms alternatifs	Mécanisme de régulation	Expression dans le système immunitaire
NFAT1	NFATc2 et NFATp	Calcium-calcineurine	oui
NFAT2	NFATc1 et NFATc	Calcium-calcineurine	oui
NFAT3	NFATc4	Calcium-calcineurine	oui
NFAT4	NFATc3 et NFATx	Calcium-calcineurine	oui
NFAT5	TonEBP et OREBP	Stress osmotique	oui

La structure primaire des protéines NFAT est formée de quatre domaines principaux ainsi que différents sous-domaines, tel que le domaine régulateur qui comprend le domaine d'homologie

à NFAT (NFAT-h). Il est composé de 300 acides aminés qui se trouvent du côté N-terminal de la structure tertiaire du NFAT [64]. Ce domaine est conservé dans les quatre isoformes de NFAT et comprend neuf résidus de sérine conservés formant les sites de phosphorylation/déphosphorylation. L'état de phosphorylation de ces résidus détermine la localisation, soit cytoplasmique ou nucléaire du NFAT [62].

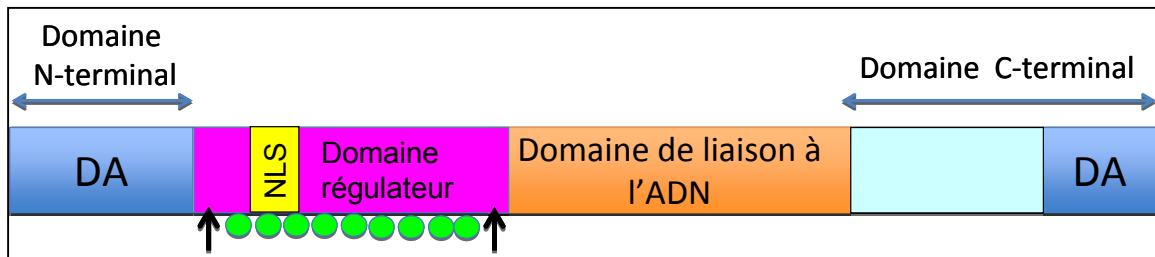


Figure 5: Structure et domaines du facteur de transcription NFAT. Les points verts indiquent les groupements phosphate qui sont enlevés par la calcineurine, les deux flèches montrent les sites d'ancrage de la calcineurine. Du côté N-terminal se trouve le domaine d'activation (DA), suivi du domaine régulateur qui contient le signal NLS de translocation nucléaire. Ensuite se trouve le domaine de liaison à l'ADN, suivi du domaine C-terminal.

L'activation du NFAT se fait par déphosphorylation de son domaine régulateur sous l'action de la calcineurine [62]. Sous sa forme phosphorylée, le NFAT est séquestré dans le cytoplasme de la cellule, la déphosphorylation lui permet de passer au noyau où il pourra se lier avec une grande affinité à l'ADN au niveau des promoteurs des gènes d'intérêts [63]. La déphosphorylation du NFAT nécessite une interaction directe avec la calcineurine [65-67]. Les facteurs NFAT1 à NFAT4 possèdent 2 sites de liaison à la calcineurine : le site A où se lie la calcineurine A, situé du côté N-terminal du domaine de régulation, et le site B où se lie la calcineurine B, situé du côté C-terminal du même domaine [68]. De plus, différentes études ont montré la localisation nucléaire de la calcineurine après liaison au NFAT [69, 70]. Ainsi, la calcineurine maintient le statut déphosphorylé du NFAT et sa localisation nucléaire. Quand le signal calcique ou la calcineurine sont inhibés, le NFAT est de nouveau phosphorylé par des kinases spécifiques, quitte rapidement le noyau et la transcription des gènes est ainsi inhibée [71, 72].

Le NFAT a longtemps été considéré spécifique au gène de l'IL-2, mais son implication dans la transcription d'autres cytokines a été démontrée notamment pour le gène de l'IL-4 [73], l'IL-8 [74], le TNF α [75] et le GM-CSF [76]. Ainsi la délétion des isoformes NFAT1 et NFAT2 des cellules T abolit complètement toute production de cytokines [77]. Ceci met en évidence le rôle clé de ce facteur de transcription dans l'activation des cellules T. De plus, le NFAT et la calcineurine seraient impliqués dans la maturation des cellules T dans le thymus. Des souris knock-out du gène NFAT ont montré une diminution drastique des cellules T simple positive et une augmentation de l'apoptose des cellules doublement positive confirmant ainsi le rôle du NFAT dans la sélection positive et dans l'étape de transition des cellules T de double à simple positive dans le thymus [78, 79]. Le NFAT joue également un rôle dans la différenciation des cellules T en Th1 ou Th2. En bref, les deux profils diffèrent par le type de cytokines produites et par le type de réponse immunitaire qu'ils activent. Par exemple, la réponse à médiation cellulaire est induite lorsque les cellules Th1 produisent de l'interféron γ (IFN- γ) et activent les cellules T CD8+ cytotoxiques afin d'éliminer les pathogènes intracellulaires, tels que les virus. Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et participent aux réactions allergiques. L'inhibition de l'expression de NFAT1 chez les souris (NFAT1 KO) diminue la différenciation en Th1 et favorise celle de Th2 [80]. De manière similaire la délétion de NFAT1 et de NFAT4 augmente le profil Th2 chez des souris conduisant à une production accrue des cytokines de type Th2 et par une augmentation des titres d'anticorps IgE et IgG. D'autre part, la délétion de NFAT2 dans les cellules T montre une diminution de la production d'IL-4 et des titres d'anticorps IgG et IgE ce qui indique une différenciation réduite en Th2 [81]. Ces résultats montrent que le NFAT2 est nécessaire à la différenciation en Th2, tandis que le NFAT1 et le NFAT4 favorisent plutôt le profil Th1.

2.4 Rapamycine

Le troisième immunosuppresseur qui fera l'objet de ce mémoire est la rapamycine. Les sections 2.4.1 et 2.4.2 présentent un bref résumé de sa découverte et de son mécanisme d'action.

2.4.1 Découverte et structure

La rapamycine (aussi nommé sirolimus depuis 1995) est un antibiotique de la famille des macrolides produit par la souche bactérienne *Streptomyces hygroscopicus*. Ce composé fut isolé dans les années 70 d'un échantillon du sol dans les îles de Pâques (Rapa Nui dans la langue natale) et fut nommé « rapamycine » d'après son lieu de découverte [82]. Sa structure de type cyclique se rapproche de celle du tacrolimus. [83].

Les propriétés immunosuppressives de la rapamycine furent rapportées en 1977. Les résultats indiquèrent que la rapamycine inhibe l'activité des cellules T chez des rats atteints de maladies auto-immunes ainsi que la production d'anticorps de type IgE [84]. Cependant, ce n'est qu'après la découverte de l'effet du tacrolimus que la rapamycine fut utilisée sur des transplantations d'organes solides [85]. En effet, l'efficacité de la rapamycine en combinaison avec la CsA et des corticostéroïdes se révéla efficace dès la phase I des essais cliniques [86, 87]. L'absence d'effets néphrotoxiques et la tolérance du produit par les patients encouragea les chercheurs à remplacer progressivement la CsA par la rapamycine [88]. Du fait de la spécificité de son mécanisme d'action et de ses propriétés pharmacocinétiques, la FDA approuva en 1999 l'utilisation de la rapamycine dans les protocoles de transplantations rénales aux États-Unis [89].

2.4.2 mTOR, cible de la rapamycine

L'élucidation du mécanisme d'action de la rapamycine commença par la purification d'un récepteur intracellulaire présent aussi bien chez les levures [90] que dans le cytoplasme des cellules T [83, 91], le FKBP12. Ainsi le tacrolimus et la rapamycine se lient tous les deux au même récepteur intracellulaire, cependant leurs cibles sont différentes. Comme mentionné dans la section 2.1.2, le tacrolimus inhibe la calcineurine, tandis que la rapamycine inhibe la mTOR.

La cible du complexe rapamycine-FKBP12 fut découverte tout d'abord dans les levures *Saccharomyces cerevisiae* en 1991 [92]. Cette protéine fut nommée TOR (target of rapamycin). Par la suite, la protéine homologue chez l'homme fut découverte et nommée

mTOR (mammalian target of rapamycin) [93]. mTOR est une protéine de 290 kDa, appartenant à la grande famille des PIKK (phosphatidylinositol kinase related kinase) caractérisée par la présence d'un domaine C-terminal avec une activité sérine/thréonine kinase [94, 95]. La structure primaire de mTOR contient 2549 acides aminés, dont les premiers 1200 consistent en des répétitions en tandem de motifs HEAT qui permettent à mTOR d'interagir avec d'autres protéines. Ces motifs sont suivis par le domaine FAT qui est commun aux PIKK, du domaine de liaison de la FKBP12 FRB (FKBP12 rapamycin binding), du domaine catalytique à activité kinase et du domaine auto-inhibiteur. À l'extrémité C-terminale de la protéine se trouve le domaine FATC (FAT carboxy terminal) [96]. Les domaines FAT et FATC se trouvent toujours simultanément dans une même protéine, c'est pour cela qu'il a été suggéré que l'interaction entre ces deux domaines modulerait l'activité kinase de mTOR [97, 98].

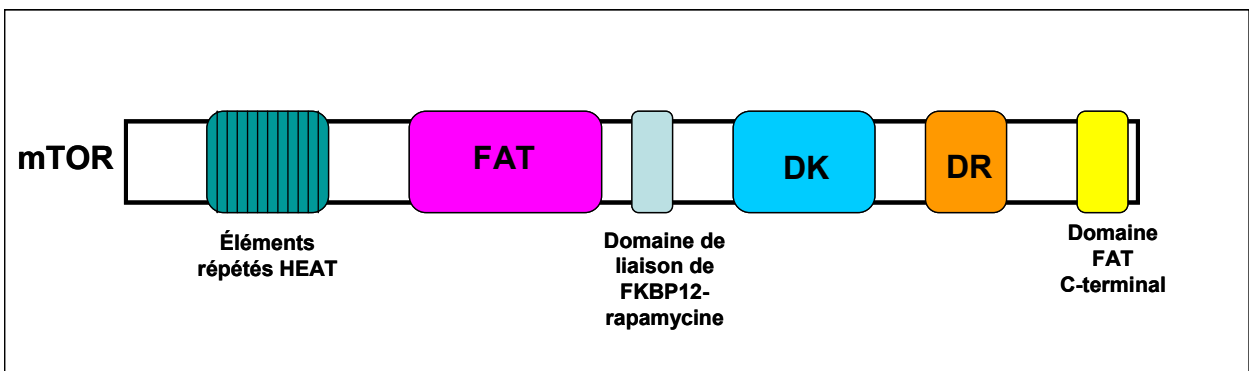


Figure 6: Structure de mTOR. La partie N-terminale de la protéine est formée de répétitions en tandem des motifs HEAT. Ces motifs sont suivis des domaines FAT, du domaine de liaison rapamycine-FKBP12, du domaine à activité kinase (DK) et du domaine répresseur (DR). Le domaine FATC se trouve à l'extrémité C-terminale de mTOR. La protéine mTOR est formée de 25649 acides aminés.

La protéine mTOR existe dans le cytoplasme sous la forme de complexes distincts mTORC1 et mTORC2, seul le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine. Ces deux complexes ont en commun la protéine mTOR mais diffèrent par leur structure et fonctions

(voir figure 7).

En bref, le complexe mTORC1 est formé par mTOR, raptor (regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (aussi nommé G β L, G-protein β -subunit-like protein), PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa) et Deptor (DEPDC6, DEP domain-containing protein 6) [96]. La fonction principale de mTORC1 est d'intégrer divers signaux intra et extracellulaires pour induire la synthèse protéique, l'activation du cycle cellulaire, la prolifération, et la croissance cellulaire (augmentation de la taille et masse de la cellule) [99] en activant plusieurs substrats spécifiques. Les mieux caractérisés sont la S6K1 (ribosomal S6 protein kinase 1) et le 4EBP1 (eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding protein 1). Le complexe mTORC1 régule également d'autres protéines comme l'eEF2 kinase (eukaryotic elongation factor 2) [100], la PP2A (phosphatase 2A) [101], la p21^{Cip1} et la p27^{Kip1} (cyclin-dépendant kinase inhibitors) [102, 103].

Le complexe mTORC2 est composé de mTOR, rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase- interacting protein 1), protor (protein observed with rictor), PPR5 (proline-rich protein 5), mLST8 et Deptor [96]. Le complexe mTORC2 est surtout impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine via la phosphorylation de la protéine kinase alpha (PKC α) et dans la régulation de la motilité cellulaire [104]. Il est aussi impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire via l'activation de l'Akt (Ser 473) [105].

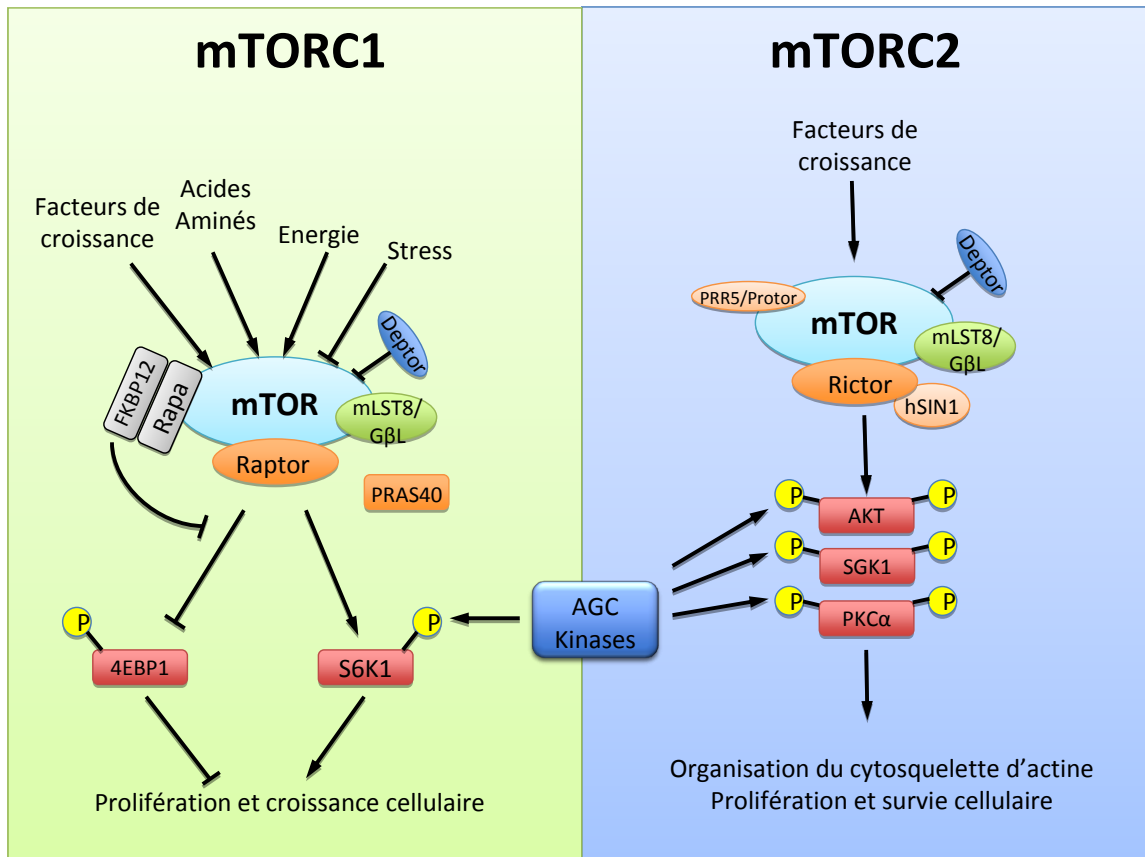


Figure 7 : Structure et fonctions des complexes mTORC1 et mTORC2. Les deux complexes que forme mTOR diffèrent par leur sensibilité à la rapamycine, par leur structure, par les substrats activés et par leurs fonctions. Le complexe mTORC1 est formé de mTOR, raptor (regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (aussi nommé GβL, G-protein β-subunit-like protein), PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa) et DEPTOR (DEPDC6, DEP domain-containing protein 6). PRAS40 et DEPTOR sont des régulateurs négatifs de l'activité mTORC1. Le complexe mTORC1 est activé par des facteurs de croissance, des acides aminés, l'état d'énergie de la cellule et le stress. Une fois activé, le complexe mTORC1 phosphoryle et active la protéine S6 kinase 1 (S6K1), et inhibe l'activité du facteur 4EPB1 (eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding protein 1) aboutissant ainsi à la croissance et à la prolifération cellulaire. Le complexe rapa-FKBP-12 inhibe l'activité kinase de la protéine. Le complexe mTORC2 est formé de mTOR, rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase- interacting protein 1), protor (protein

observed with rector), PPR5 (prolin-rich protein 5), mLST8 et Deptor. Des facteurs de croissances activent mTORC2 qui phosphoryle ses substrats comme l'Akt, la PKC α et la SGK1, qui font partie de la famille des AGC kinases. L'activation du complexe mTORC2 permet l'organisation du cytosquelette d'actine, ainsi que la prolifération et la survie cellulaire.

2.4.3 Mécanisme d'action de la rapamycine

La rapamycine inhibe la protéine mTOR dans le complexe mTORC1. La rapamycine possède deux sites de liaison importants : d'une part un site qui se lie à FKBP12 et d'autre part un site qui se lie au domaine FRB de mTOR. Afin d'être biologiquement active la rapamycine doit absolument se lier aux deux protéines : FKBP12 et mTOR [106]. Ceci signifie que la liaison de la rapamycine à son récepteur seul n'a aucun effet biologique sur l'inhibition de mTOR.

Le complexe rapamycine-FKB12 se lie sur mTORC1 au niveau de FRB [107]. Malgré la présence de ce domaine près du domaine catalytique, la rapamycine ne semble pas directement inhiber l'activité kinase de mTOR [108, 109]. En fait, le mécanisme par lequel la rapamycine inhibe mTOR n'est pas totalement connu, mais certaines hypothèses ont été proposées : la liaison semblerait déstabiliser la structure de mTORC1, ce qui préviendrait l'interaction du domaine catalytique avec ses substrats et ultimement causerait l'inhibition du complexe mTORC1 [110]. Une autre hypothèse impliquerait la protéine Raptor. En effet, cette dernière se lierait à motif particulier appelé TOS (TOR signaling) présent sur les substrats de mTORC1 [111]. Chez les levures, la liaison de raptor au motif TOS est essentielle à l'activité de TOR *in vivo* [112]. Des expériences de mutagenèse, ont montré que des mutations de TOS sur les substrats de mTORC1 empêcheraient la phosphorylation de ces derniers *in vitro* [113]. La rapamycine agirait sur Raptor en empêchant sa liaison aux substrats du complexe mTORC1.

Bref, la rapamycine en inhibant mTOR inhibe l'activation subséquente de ses substrats. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à la mesure de quelques substrats de mTORC1 comme la p70S6K et la protéine S6 ribosomale comme indicateur de l'activité kinase de la mTOR. La p70S6K est une sérine/thréonine kinase membre de la famille des AGC kinases [PMA (cyclic AMP-dependant protein kinase)/ PKG (cyclic GMP dependant protein kinase) / PKC (protein kinase C)] [114]. La p70S6K a une structure similaire à celle des autres membres de l'AGC

surtout au niveau du domaine catalytique. En bref, la protéine comprend un domaine N-terminal qui comprend le motif TOS (lieu de liaison de raptor), suivi d'un domaine kinase qui comprend la boucle d'activation (T-loop), d'un domaine de liaison et finalement le domaine C-terminal qui contient un motif auto-inhibiteur [115]. Plusieurs facteurs de croissance et signaux mitogéniques entraîne l'activation du complexe mTORC1, via la voie des PI3K/Akt, ce complexe une fois activé entraînera l'activation de la p70S6K [116]. L'activité complète de la p70S6K requiert la phosphorylation de trois sites critiques : la thréonine 229 (T229) présente sur la boucle d'activation, la sérine 371 (Ser371) présente sur le motif TM du domaine de liaison et la thréonine 389 (T389) située sur le motif hydrophobique HM, également présent sur le même domaine [117, 118].

L'activation de la p70S6K se fait en plusieurs étapes et nécessite des phosphorylations séquentielles et des changements de conformations. En se basant sur l'ordre de phosphorylation des différents résidus, deux modèles ont été proposés afin d'expliquer les étapes d'activation de la p70S6K, un modèle conventionnel, largement accepté et un modèle alternatif [115]. La figure 8 résume les principales étapes de ces deux modèles.

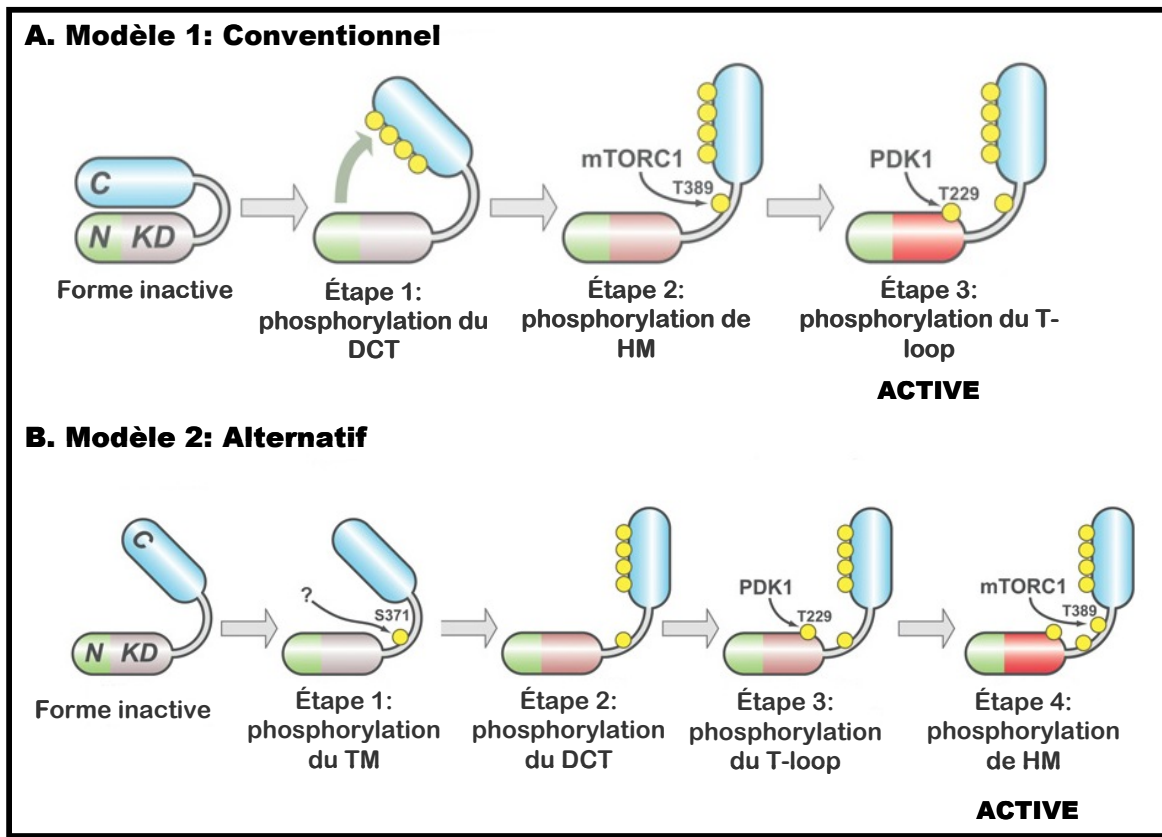


Figure 8: Activation de la p70S6K. (A) Le modèle conventionnel. L'interaction des domaines N et terminaux inactivent la p70S6K. Étape 1 : des signaux activateurs phosphorylent des résidus du domaine C-terminal (DCT) donnant à la p70S6K une conformation ouverte. Étape 2 : phosphorylation du résidu T389 par mTORC1 sur le motif HM du domaine de liaison. Étape 3 : la PDK1 phosphoryle le résidu T229 du domaine activateur (T-loop). La p70S6K est ainsi active. (B) Le modèle alternatif. Étape 1 : phosphorylation du résidu S371 par une kinase inconnue sur le motif TM. Étape 2 : phosphorylation de plusieurs résidus sur le DCT suite à des signaux mitogéniques, pour une conformation ouverte de la protéine. Étape 3 : la phosphorylation du résidu T389 par PDK1 sur le domaine activateur. Étape 4 : la phosphorylation du résidu T229 permet à mTORC1 de phosphoryler le résidu T389 sur le motif HM. (Figure modifiée de [115])

La p70S6K régule principalement la croissance cellulaire. Ceci a été mis en évidence dans des modèles animaux ainsi que dans des différentes cultures cellulaires. En effet, des souris déficientes en p70S6K (*S6K1* $-/-$) ont une plus petite taille par rapport aux souris de type sauvage [119]. Cette réduction de taille est due à une diminution de la croissance et non de la prolifération cellulaire [120]. Puisque la synthèse de protéines est un pré-requis à la croissance cellulaire, il n'est pas surprenant que les substrats de la p70S6K soient des facteurs de transcription et de traduction. La protéine S6 ribosomale (S6R) de la sous-unité 40S du ribosome est le premier substrat découvert de la p70S6K et le mieux caractérisé jusqu'à maintenant [121]. L'activation de la p70S6K permet la phosphorylation de la S6R sur cinq sites dans cet ordre: Ser 236>Ser 235>Ser 244> Ser 247 [122, 123]. La protéine S6R est essentielle à la traduction de diverses protéines nécessaires à la croissance cellulaire ainsi qu'à la production des ARN messagers nécessaires à la biogenèse des ribosomes. Ces derniers augmenteront la production protéique des cellules [124].

2.4.4 Rôle de mTOR chez les cellules T

Le rôle émergent de mTOR dans le système immunitaire a été mis en évidence dans plusieurs types cellulaires comme les monocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules B et les lymphocytes T [125]. La mTOR est nécessaire à la régulation des demandes métaboliques de la cellule T et à l'intégration des différents signaux environnementaux dans le but de diriger l'activation et la polarisation des cellules T en Th1, Th2 ou Th17 [126].

Les demandes métaboliques des cellules T sont extrêmement importantes et rivalisent même avec celles des cellules cancéreuses [127]. Ainsi, le métabolisme de ces cellules est hautement régulé. L'activation des cellules T s'accompagne d'une augmentation de la machinerie métabolique nécessaire à la synthèse de protéines, de lipides, et d'ADN. mTOR régule ces processus en contrôlant la présence d'acides aminés essentiels comme le tryptophane et la leucine, ainsi que le glucose et l'ATP (adénosine triphosphate) [128]. Le rôle des complexes de mTOR dans la différenciation des cellules T fut mis en évidence grâce à des expériences de mutagenèse effectuées chez les souris. En l'absence complète de mTOR, la différenciation des

cellules T en Th1, Th2 et Th17 est complètement abolie [128]. L'inhibition sélective du complexe mTORC1 génère des cellules T qui sont incapables de se différencier en Th1 et Th17. Étonnamment, la différenciation en Th2 reste intacte. Cependant, la délétion du complexe mTORC2 génère une déficience en Th2, mais pas en Th1 [129, 130]. Ces mécanismes suggèrent un rôle non-redondant de mTORC1 et mTORC2 dans la différenciation des cellules T.

Récemment, un rôle de la mTOR dans la formation de cellules T CD8+ mémoire a été démontré. En effet, une étude récente démontre que l'administration de faibles doses de rapamycine à des souris augmente le pool de cellules T CD8+ mémoires suite à une infection au LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) [131]. Dans une autre étude, il a été montré que mTOR inhibait les facteurs de transcription responsables de la formation des cellules mémoires et activait ceux qui forment des cellules T effectrices [132]. Ces études suggèrent que la mTOR inhiberait la formation des cellules T CD8+ mémoire et que l'ajout de la rapamycine pourrait augmenter le pool de cellules mémoires, rendant la réponse immunitaire secondaire plus efficace [131]. Les mécanismes moléculaires contrôlant ces réponses ne sont pas encore bien compris, cependant il semblerait que la rapamycine à faible dose agirait aussi comme immuno-stimulateur.

La protéine mTOR joue également un rôle dans l'activation de la cellule T suite au 1^{er} signal, qui correspond à la reconnaissance antigénique par le biais du TCR. La présence du 2^{ème} signal de co-stimulation est nécessaire à l'activation complète de la cellule T naïve. L'engagement du TCR seul, en absence du 2^{ème} signal, induit l'anergie des cellules T [133]. L'état d'anergie est défini comme un état de « non-réponse » de la cellule T aux signaux d'activation. Cependant, l'anergie des cellules T a été montrée même en présence du 2^{ème} signal lorsque la protéine mTOR est inactivée par la rapamycine [134, 135]. De plus, l'état d'anergie serait indépendant de la capacité de la rapamycine à bloquer la progression du cycle cellulaire [136]. Ainsi, mTOR serait impliquée dans la voie de signalisation activée par les facteurs de costimulation, en plus d'activer le 3^{ème} signal nécessaire à la progression du cycle cellulaire et la prolifération de la cellule T. De ce fait, l'effet immunosuppresseur de la rapamycine est de bloquer le 3^{ème} signal induit par l'activité de mTOR, menant à l'inhibition

de la prolifération des lymphocytes T responsables du rejet de greffe.

2.5 Efficacité des immunosuppresseurs et effets secondaires

La CsA fut considérée comme une molécule miracle. En effet, avant l'introduction de la CsA, la prévention du rejet de greffe consistait à administrer de fortes doses prolongées de corticostéroïdes avec des anti-métabolites qui inhibent la synthèse de l'ADN comme l'azathioprine et le méthotrexate [137]. Les patients traités aux corticostéroïdes présentaient de nombreuses complications comme le diabète, les infections bactériennes, l'ostéonécrose aseptique, la fragilisation de la peau et l'hypertension artérielle [138]. L'incidence du rejet aigu dépassait 50% dans la première année avec cette thérapie. L'introduction de la CsA a permis la diminution de l'incidence du rejet aigu ce qui se traduit par une augmentation très significative de la durée de survie du greffon à 1 an post-transplantation [139]. La CsA, par sa spécificité d'action, ne présentait aucun des effets secondaires associés à l'utilisation d'immunosuppresseurs à action non spécifique comme la myélosuppression ou une toxicité hématopoïétique et gastrique. Cependant des effets toxiques qui impliquent certains organes avec une intensité particulière sont le principal inconvénient de l'utilisation thérapeutique de la CsA. L'insuffisance rénale aiguë est la manifestation la plus commune de la néphrotoxicité de la CsA, celle-ci est dose-dépendante et elle est souvent irréversible [140]. La néphrotoxicité, les dommages aux tubules rénaux et l'hypertension qui en résulte sont parmi les effets indésirables les plus fréquents de la CsA. Le talon d'Achille du traitement avec la CsA est sans doute son effet toxique chronique sur le rein : une fibrose interstitielle, une atrophie des tubules et une fibrose des glomérules [141]. Ainsi, dix ans après un traitement à la CsA, tous les transplantés présentent ces modifications de l'architecture rénale [142]. La réduction des doses de CsA est ainsi nécessaire et la combinaison avec les immunosuppresseurs à action non spécifique est inévitable pour empêcher le rejet du greffon.

Le tacrolimus a également permis la réduction des doses de glucocorticoïdes et d'azathioprine administrées aux patients, réduisant ainsi leurs effets indésirables [143]. Un autre effet important du tacrolimus est sa capacité à reverser le rejet aigu hépatique. Une

cohorte de 96 patients transplantés du foie avec une faible réponse au traitement à la CsA, furent traités progressivement avec du tacrolimus. Les signes de rémission du rejet aigu cellulaire et des phases précoces de rejet chronique furent constatés chez la majorité de cette cohorte [144]. C'est ainsi que le tacrolimus est devenu le premier traitement administré aux transplantés hépatiques, même chez les enfants [145]. Au niveau de la transplantation rénale, aucune des nombreuses cohortes d'études n'a pu prouver la supériorité du tacrolimus par rapport à la CsA sur le taux de survie du greffon, et l'incidence des rejets aigus et chroniques [143, 146]. Néanmoins, le tacrolimus offre une efficacité similaire à celle de la CsA, mais en possédant une pharmacocinétique plus constante rendant ainsi plus facile le calcul des doses exactes à administrer aux patients [143]. Malgré cette efficacité, les effets secondaires du tacrolimus ne sont pas négligeables et similaires à ceux de la CsA, à savoir : néphrotoxicité importante, dommages aux tubules rénaux et aux glomérules [140, 147]. Cependant, une prévalence moins élevée de l'hypertension artérielle fut notée dans certaines études [148]. D'autres effets secondaires sont associés à l'utilisation du tacrolimus comme l'hypertrophie cardiaque, l'hyperkaliémie, et une neurotoxicité importante comme des encéphalopathies et des étourdissements [146, 149]. Ainsi, il est impératif de réduire progressivement les doses de tacrolimus administrées aux patients avec le temps.

La rapamycine présente un avantage majeur par rapport aux inhibiteurs de la calcineurine qui est l'absence de néphrotoxicité [150]. Ainsi, le but premier de l'introduction de la rapamycine dans les protocoles de traitement des greffés était de réduire les doses de CsA et/ou tacrolimus administrées. En effet, dans deux études cliniques de phase III à double insu (US trial et Global trial), 1295 patients furent traités avec la rapamycine, avec des doses basales de CsA et de stéroïdes. Un bénéfice net fut observé avec la rapamycine dans la réduction de l'incidence du rejet aigu sans les effets secondaires d'une immunosuppression exagérée à savoir l'absence d'infections opportunistes et une incidence faible de tumeurs malignes [83]. La rapamycine permet ainsi le retrait précoce de la CsA. Cependant, chez les greffés du rein la fonction rénale un an post-transplantation se détériore rapidement lorsque la rapamycine est combinée avec la CsA. Dans ce cas, la rapamycine semble aggraver la néphrotoxicité de la CsA, en empêchant la cicatrisation des vaisseaux sanguins. Ainsi, la combinaison de ces deux drogues ne doit pas être administrée pour plus de 3 mois, au-delà de

cette période la CsA doit être enlevée du traitement [151].

La combinaison de la rapamycine au tacrolimus présente un grand intérêt. Malgré le fait que les deux composés se lient au même récepteur intracellulaire, aucun effet de compétition a été rapporté. L'efficacité de cette combinaison fut d'abord montré dans une cohorte de 32 patients ayant reçus une greffe de rein, de foie et de pancréas, et qui ont été suivis un an post-transplantation. En utilisant des doses basales de tacrolimus (0.03 mg/kg, qui représente 33% de la dose recommandée) avec la rapamycine aucun rejet aigu fut noté. Aussi, à cause des faibles doses de tacrolimus, la néphrotoxicité et l'hypertension furent réduites [152].

L'efficacité du traitement avec la rapamycine se heurte au problème des effets secondaires toxiques comme l'hypertriglycéréémie, la cholestérolémie, la myélosuppression, la thrombocytopénie et l'hypokaliémie [153]. La thrombocytopénie cause un retard dans la cicatrisation des vaisseaux de l'organe greffé, c'est ainsi que la rapamycine ne peut pas être utilisée dans le début du traitement (traitement d'induction), mais doit être introduite plus tard [151].

2.6 Protocoles de prévention de rejet de greffes

Bien que, le but premier des protocoles d'immunosuppression est de diminuer le risque de rejet du greffon il n'existe pas de protocole d'immunosuppression unique et optimal. En effet, le protocole varie selon l'organe transplanté, le pays et même le centre hospitalier. Cependant, il existe une stratégie globale anti-rejet que partage la plupart des protocoles et qui peut être divisée en trois phases [137] :

- La phase d'induction : celle-ci correspond à l'acceptation du greffon par le receveur et consiste à utiliser des doses d'immunosuppresseurs de moyennes à fortes.
- La phase d'entretien, qui correspond à la phase de prévention du rejet par des doses d'immunosuppresseurs qui peuvent être réduites avec le temps.
- La phase de traitement du rejet, au cas où celle-ci aurait lieu, implique un traitement curatif dans lequel seront utilisées de fortes doses de corticostéroïdes.

La phase d'induction comprend une thérapie triple avec la combinaison de corticostéroïdes,

d'azathioprine et de CsA ou de tacrolimus. Le choix de l'anti-calcineurine dépend du médecin, avec néanmoins une tendance croissante pour l'utilisation du tacrolimus. Ce traitement est commun à toutes les transplantations d'organes. Plusieurs équipes s'accordent à considérer l'ajout d'un anticorps monoclonal contre l'IL-2 (basiliximab) ou le CD3 (Muromonab) dans le traitement d'induction chez les sujets à hauts risques [154].

Dans le traitement d'entretien, il existe une tendance à la réduction des doses de stéroïdes et celles de la CsA ou de tacrolimus. Ces derniers peuvent être remplacés par la rapamycine afin de réduire la néphrotoxicité [155]. La rapamycine peut être utilisée dans le traitement d'induction, à condition que la combinaison CsA/rapamycine ne dure pas plus que trois mois. L'ajout d'agents hypocholestérolémiants est essentiel lorsque la rapamycine est introduite dans le traitement [156]. Le traitement d'entretien dure à vie même si les doses sont réduites avec le temps.

2.7 Stratégies pour réduire les effets secondaires des immunosuppresseurs

L'efficacité des associations de traitements d'immunosuppresseurs a permis la réduction de l'incidence du rejet aigu et l'amélioration du succès des transplantations à court terme. Cependant, le défi reste entier pour en tirer un bénéfice à long terme. La destruction chronique du greffon est un problème majeur que les traitements actuels n'ont pas pu réduire. Ensuite, vient le problème des effets secondaires des immunosuppresseurs, qui réduisent la qualité ainsi que la durée de vie des patients greffés à cause des complications cardiovasculaires, des infections et des cancers.

Il est donc impératif de trouver de nouvelles substances immunosuppressives efficaces mais mieux tolérées par les patients ce qui favoriserait leur prise régulière.

Chapitre 3. Récepteur des neurokinines, tachykinines et endokinines

Les récepteurs des neurokinines ont pour ligands naturels des peptides de la famille des tachykinines. Cette famille comprend des peptides d'une dizaine d'acides aminés caractérisée par la présence d'une séquence avec un motif commun, Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ (FXGLM), en position carboxy-terminale. Cette séquence est déterminante de leur activité biologique puisqu'elle est nécessaire à la liaison et à l'activation des récepteurs des neurokinines [157]. La substance P (SP), la neurokinine A (NKA), la neurokinine B (NKB), le neuropeptide γ (NP γ) et plus récemment l'hémokinine-1 (HK1) et les endokinines (EK) sont parmi les membres de cette famille [158]. Les tachykinines furent longtemps considérées comme des neuropeptides exclusifs au système nerveux (cerveau et moelle épinière), mais de plus en plus d'études démontrent l'expression des tachykinines et de leurs récepteurs (système tachykinergique) en périphérie dans plusieurs systèmes et types cellulaires [157]. Jusqu'à présent, trois récepteurs ont été identifiés : le récepteur NK1 (NK1R), le NK2R et le NK3R. Ces trois récepteurs ont une grande homologie dans leur séquence et structure, mais ils sont exprimés différemment dans les tissus. De plus, ils possèdent des affinités différentes pour leurs ligands naturels et les autres membres de la famille des tachykinines (Tableau III). Le NK1R est exprimé autant dans le système nerveux central (SNC) qu'en périphérie, alors que le NK2R est surtout exprimé dans des tissus périphériques comme les bronches, la vessie, l'utérus et le système gastro-intestinal. Le NK3R, quant à lui, est surtout présent dans le CNS mais son expression a été également détectée dans quelques tissus périphériques comme la prostate et l'utérus. Le tableau III résume la distribution et les fonctions principales de ces trois récepteurs [159-161].

Tableau III: Caractérisation des récepteurs NK1, NK2 et NK3.

Récepteur	NK1R	NK2R	NK3R
Gène	Tac1R	Tac2R	Tac3R
Ligand affinité	SP=hHK-1>EK>NKA	NKA>NKB>SP	NKB>NKA>SP
Expression	Neurones	Prostate	Cerveau : cortex cérébral,
	Cellules endothéliales	Cervelet	amygdale, caudate
	Système gastro-intestinal	Poumon	putamen, hypothalamus
	Système cardiovasculaire	Bronches	Utérus
	Voies respiratoires	Vessie	Placenta
	Cellules immunitaires	Système gastrique	Prostate
	Muscles lisses	Utérus	Muscles squelettiques
Fonctions	Survie neuronale et action anti-dégénérative		Relâche d'acétylcholine des neurones
	Vasodilatation des vaisseaux via l'activation des cellules endothéliales	Bronchoconstriction	Activation des neurones dopaminergiques et noradrénergiques
	Contraction des muscles lisses intestinaux	Contraction des muscles lisses	Stimulation des hormones sexuelles
	Bronchoconstriction	Augmentation de la mobilité intestinale	Perfusion du placenta
	prolifération des lymphocytes, activation des macrophages et neutrophiles		Vasodilatation utérine
	inflammation		Pré-éclampsie (hypertension pendant la grossesse)

NK1R, récepteur neurokinine 1; NK2R, récepteur neurokinine 2; NK3R, récepteur neurokinine 3; *Tac1R*, gène codant pour le NK1R; *Tac2R*, gène codant pour le NK2R; *Tac3R*, gène codant pour le NK3R; SP, substance P; hHK-1, hémokinine-1 humaine; EK, endokinine;

NKA, neurokinine A; NKB, neurokinine B.

3.1 Isoformes du NK1R

Le gène codant le NK1R, nommé *Tac1R*, fut cloné en 1991 par l'équipe de Kraus. La séquence nucléotidiques ainsi que la structure protéique du NK1R sont conservées chez différents mammifères (rat, souris, cochon entre autres) [162]. Chez l'homme, le gène du NK1R se trouve sur le chromosome 2 et comprend 1221 paires de bases divisées en cinq exons, codant pour une protéine de 417 acides aminés [163].

Ce récepteur appartient à la classe I (Rhodopsin-like) des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et qui possède, comme tout RCPG classique, 7 passages transmembranaires (TM I-IV). De plus, la structure du NK1R est similaire à celle des deux autres récepteurs de la même famille, à savoir : trois boucles extracellulaires (EL1, EL2 et EL3), trois boucles intracellulaires (IL1, IL2, et IL3), une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique [162]. L'activation du récepteur se fait suite à la liaison de son ligand sur le domaine extracellulaire défini entre les segments II et VII.

Une des caractéristiques du NK1R est sa capacité à coupler plusieurs types de protéines G qui sont la G_{α_q} , la G_{α_s} et la G_{α_i} , [164]. Ces trois types de protéines G diffèrent par leur voie de signalisation et les effecteurs qu'ils activent.

Le couplage du NK1R avec la protéine G_{α_q} entraîne une augmentation du calcium intracellulaire attribuable à l'activation de la phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$). Celle-ci induit l'augmentation transitoire de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) qui provoque la relâche de calcium intracellulaire. L'activation de la $PLC\beta$ induit aussi la libération de diacylglycérol (DAG) qui active la protéine kinase C (PKC), laquelle active à son tour certains canaux associés aux réserves internes de Ca^{2+} [165, 166].

Le couplage avec la protéine G_{α_s} active l'adénylate cyclase (AC), cette enzyme stimule la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et l'activation subséquente de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle des substrats spécifiques [167]. Cette voie de signalisation contribue également à l'ouverture des canaux calciques et sodiques

[168]. Le couplage avec la $G_{\alpha i}$ quant à lui, inhibe l'AC diminuant par la suite la concentration d'AMPC dans la cellule [168]. Toutes ces cascades conduisent non seulement à une réponse physiologique de la cellule cible, mais aussi à la transcription de certains gènes via les éléments de réponse dépendants du calcium compris dans leur génome [169].

L'activation d'une cascade parmi ces trois serait dépendante de la conformation du NK1R lors de la liaison de son ligand. La conformation du récepteur est influencée par plusieurs facteurs extracellulaires. Ainsi, il existe actuellement aujourd'hui deux conformations actives connues : « la conformation préférentielle à la SP » (SP preferring conformer) qui active autant la voie de la PLC que l'AC, et « la conformation générale pour tachykinines » (general-tachykinin conformer) qui active principalement la voie de l'IP3 [165, 170].

Comme tout RCPG, le NK1R subit une rapide désensibilisation et internalisation, pour ensuite être recyclé en partie vers la membrane [171]. Ce mécanisme serait dépendant de l'interaction avec les vésicules de clathrine et les protéines β -arrestines [172-174].

L'existence d'un isoforme tronqué du NK1R (NK1R-TR) avec l'absence de 96 résidus à l'extrémité C-terminale fut reportée [175]. Son expression fut détectée dans des régions spécifiques du cerveau, de la moelle épinière et dans le système nerveux central. Il est également abondant dans les tissus périphériques comme la prostate, le tissu adipeux, le cœur, les poumons et la rate. Des différences fonctionnelles existent entre la forme longue et la forme tronquée du NK1R. En effet, du fait de l'absence des résidus en C-terminal, le NK1R-TR ne peut pas coupler les protéines $G_{\alpha q}$ et en conséquent serait incapable d'activer la cascade de signalisation menant à la libération du Ca^{2+} intracellulaire [176]. Cependant, une autre étude a démontré que la forme tronquée du récepteur pouvait induire une réponse calcique, cependant celle-ci serait moins importante mais plus prolongée que celle de la forme longue [177]. Cette différence de signalisation serait due à une plus faible affinité de la SP au récepteur tronqué [175]. Bien que ce résultat soit controversé, la différence de signalisation via l'un ou l'autre isoforme a été attribuée à leur mode de désensibilisation: la forme tronquée, qui ne subit pas de désensibilisation rapide, servirait à produire une réponse prolongée. En fait, le NK1R-TR n'est pas capable d'interagir avec les β -arrestines

ce qui pourrait expliquer la désensibilisation lente de ce récepteur, et par la suite la réponse prolongée mais moins importante au niveau du signal calcique [178]. Quoi qu'il en soit, la présence d'un ou de l'autre isoforme induit une différence au niveau de la réponse cellulaire. Ainsi, dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à identifier l'isoforme exprimé chez les cellules T utilisées dans notre étude.

3.2 *Tac1* : substance P

Le ligand préférentiel du NK1R est la substance P (SP), c'est un peptide de 11 acides aminés isolé en 1931 par Euler et Gadum. Le nom de SP fut donné en référence à la « préparation de poudre sèche » obtenue à partir d'extrait de cerveau de cheval. Les mêmes chercheurs avaient observé que cette substance avait des propriétés stimulatrices sur le jéjunum du lapin et provoquait aussi une hypotension. Elle fut nommée plus tard « tachykinine » à cause de la contraction rapide qu'elle induisait sur des préparations de muscles lisses [179]. Ce n'est qu'en 1971 que la séquence en acides aminés de ce peptide fut identifiée par Chang, Leeman et Niall [179, 180] (Tableau IV). La SP est codée par le gène *Tac1* (ou préprotachykinine A/ PPTA). Ce gène code également pour la NKA, le neuropeptide K (NPK) et le neuropeptide γ (NP γ) [181]. Chez l'homme, *Tac1* consiste en 7 exons qui suite à un épissage alternatif produit quatre transcrits d'ARNm : α Tac1, β Tac1, γ Tac1 et δ Tac1 [182, 183]. La SP est synthétisée à partir de ces quatre isoformes, tandis que la NKA n'est codée que par les isoformes β et γ . Le NP γ est codé par γ Tac1 et le NPK est codé uniquement par β Tac1 [158].

Le gène *Tac1* est exprimé dans tous les tissus humains en particulier dans le SNC où le rôle de la SP dans la nociception est bien connu et caractérisé [184]. En effet, la SP est associée à la transmission et à l'intégration de la douleur, un argument supporté par le fait que les terminaisons nerveuses sensibles de types C (contenant les nocicepteurs) sont riches en SP [185]. La SP est également impliquée dans de nombreux processus biologiques dans divers systèmes et organes. Le tableau IV résume les principales fonctions connues de la SP dans ces systèmes.

Tableau IV: Les effets physiologiques de la SP

Système/organe/cellule	Rôles de la SP
Système nerveux central et périphérique	Nociception et transmission de la douleur Inflammation neurogénique contrôle des vomissements migraine dépression anxiété
Système gastro-intestinal	Régulation de l'homéostasie tissulaire Sécrétion de l'eau et d'électrolytes dans la lumière du petit intestin et du colon
Système respiratoire	Contraction des muscles lisses Contrôle de la perméabilité vasculaire : rôle dans la pathogenèse de l'asthme Stimulation des glandes à mucus
Système immunitaire	Rôle pro-inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines et de prostaglandines
Artères	Vasodilatation via la production d'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales
Moelle osseuse	Stimulation des progéniteurs érythroïdiques et granulocytiques Production de facteurs de croissance et de différenciation : IL-1, IL-6 et GM-SCF
Lymphocytes	prolifération production de cytokines : IL-2 et IL-1 différenciation des lymphocytes B
Mastocytes	Stimule la dégranulation et la libération d'histamine
neutrophiles	Expression des facteurs d'adhésion : E-sélectine et ICAM-1 chimiotactisme
Monocytes/Macrophages	Activation des macrophages Production de cytokines pro-inflammatoires: TNF- α et IL-1

3.3 : *Tac4* : endokinines

En 2000, un nouveau membre de la famille des tachykinines, codé par un nouveau gène *Tac4*, fut découvert par Zhang [186]. Cette tachykinine fut d'abord clonée dans les

cellules hématopoïétiques murines et fut nommée hémokinine-1 (HK-1) à cause de son rôle dans la maturation des cellules B. Le gène *Tac4*, ou PPT-C, fut ensuite cloné chez le rat et chez l'homme [187, 188]. Contrairement aux autres gènes des tachykinines, la composition du gène *Tac4* varie d'une espèce à l'autre. En effet, chez la souris et le rat ce gène code uniquement pour l'HK-1 tandis que chez l'homme le gène *Tac4* code pour quatre tachykinines nommées endokinine (EK) A, B, C et D [188]. Les quatre isoformes d'ARNm produits par épissages alternatifs codant pour les EKs sont α , β , γ et δ Tac4. L'EKA et l'EKC sont produites par le transcrit α Tac4 ; l'EKD par β Tac4 et l'EKB étant codée par β , γ , et δ Tac4 [188]. L'EKA et l'EKB sont formés de 47 et 41 acides aminés respectivement. Toutes les deux possèdent le motif de signature classique des tachykinines (FXGLM-HN₂) contrairement à EKC et EKD (FQGLL-HN₂) [189]. Le tableau V montre la séquence C-terminale de ces tachykinines.

Le gène *Tac4* ne semble pas suivre la conservation et l'homologie des séquences des autres gènes de la même famille. A part la séquence en C-terminale qui est conservée chez les mammifères, peu d'homologie existe entre les produits de *Tac4* entre les espèces. Ainsi l'HK-1 du rat et de la souris diffèrent des endokinines humaines [190]. D'autre part, les tachykinines codées par le gène *Tac4* sont différents de la SP et la NKA ainsi que de la NKB codée par le gène *Tac3*.

Tableau V : Séquences en acides aminés de différentes tachykinines et endokinines.

Peptide	Séquence d'acides aminés
Substance P	RPKPQQ FFGLM
Hémokinine-1	SRTRQ FYGLM
Neurokinine A	HKTDS FVGLM
Neurokinine-B	DMHDF FVGLM
Endokinine A/B	GKASQ FFGLM
Endokinine C	KKAYQLEHTFQGLL
Endokinine D	VGAYQLEHTFQGLL

En outre, le profil d'expression du gène *Tac4* est différent de celui des autres tachykinines. En effet, les peptides provenant de ce gène sont localisés uniquement dans les tissus périphériques et ils sont absents de toutes structures nerveuses. En fait, leur nomenclature « endokinine » reflète leur fonction endocrine et leur expression périphérique plutôt que neuronale comme

pour les neurokinines [190]. Du fait de la présence de la séquence C-terminale caractéristique des tachykinines, l'EKA et l'EKB montrent une forte affinité de liaison pour le NK1R. Elles induisent l'activation de la cascade de signalisation menant à l'augmentation de l'influx calcique. D'ailleurs, l'EKA et l'EKB mimeraient d'une façon concentration-dépendante les effets autocrine/paracrine de la SP en périphérie. Ainsi plusieurs réponses biologiques attribuées à la SP comme la vasodilatation, l'inflammation, la contraction des muscles lisses et la stimulation des cellules système immunitaire seraient aussi attribuables à l'effet des endokinines [188, 191, 192]. De plus, une étude récente démontre que les anticorps anti-SP utilisés en immuno-histochimie pour la détection de la SP dans des tissus montraient 100% de réactivité croisée avec la séquence C-terminale de l'EKA/B humaine et 70% de réactivité avec l'HK-1 de la souris et du rat [189].

3.4 Les antagonistes du NK1R

Les antagonistes de la SP furent d'abord développés dans les années soixante. La première génération d'antagonistes appelée « peptidiques » se basait sur des modifications de la séquence de la SP qui bloquerait l'activation du NK1R par compétition avec ses ligands endogènes. Le développement de ces composés se heurta à plusieurs problèmes notamment une faible biodisponibilité, une dégradation rapide par les peptidases ainsi qu'une neurotoxicité importante [179]. Une percée dans le développement des antagonistes du NK1R fut la découverte de composés non-peptides. On se limitera ici à l'historique du développement de deux antagonistes utilisés dans ce projet, le L-733,060 et le L-703,606.

En 1991, grâce à technique de « screening » des composés chimiques, plusieurs molécules ont montré une grande affinité de liaison au NK1R. Le premier de ces composés est le CP-96,345, découvert par la compagnie Pfizer, qui montra un effet antidouleur intéressant, mais aussi une affinité très importante pour les canaux calciques ce qui engendra des effets secondaires au niveau cardiaque (torsades de pointes) [193, 194]. En parallèle, la compagnie Merck-Frost arriva à améliorer les propriétés pharmacologiques d'un composé de structure similaire au CP-99,994. Le composé obtenu fut nommé le L-733,060.

Le L-733,060 a une structure pipéridine éther. Il possède une bonne affinité sélective pour le NK1R humain ($K_d=0.87$ nM) et une faible affinité pour les canaux calciques [195]. Ce composé se montra efficace *in vivo* pour réduire la douleur chez les souris, les gerbilles, les cochons. Aucune toxicité cardiovasculaire ne fut rapportée chez les rats et les chiens à des doses inférieures à 1 mg/kg [196]. Plusieurs groupes rapportèrent également des propriétés anti-tumorales *in vitro* du L-733,060 sur plusieurs types de cellules cancéreuses d'origines neuronales comme les neuroblastomes, les gliomes, les rétinoblastomes et autres [197, 198]. Cet effet semble attribuable à l'inhibition de l'activation autocrine du système tachykinergique SP/NK1R. En améliorant les propriétés pharmacocinétique du L-733,060 la compagnie Merck Frosst développa la molécule MK860 ou aprépritant [199]. L'aprépritant (commercialisé sous le nom Emend) est le premier antagoniste du NK1R à être approuvé en 2009 par la FDA et par Santé Canada pour ses propriétés antiémétiques dans une application en triple thérapie pour la prévention des nausées et des vomissements consécutifs à l'administration d'une chimiothérapie anticancéreuse [200].

La compagnie Merck développa également un analogue iodée du CP-96,935 le L-703,606. Ce composé est un antagoniste compétitif de la SP et possède une haute affinité au récepteur NK1R humain ($K_d=0.3$ nM) et une affinité 1000 fois plus faible pour les récepteurs NK2 et NK3 [201, 202]. La présence d'un atome d'iode a permis sa substitution par un isotope radioactif afin d'étudier le profil pharmacologique et la distribution du NK1R *in vitro* et *in vivo* [203, 204].

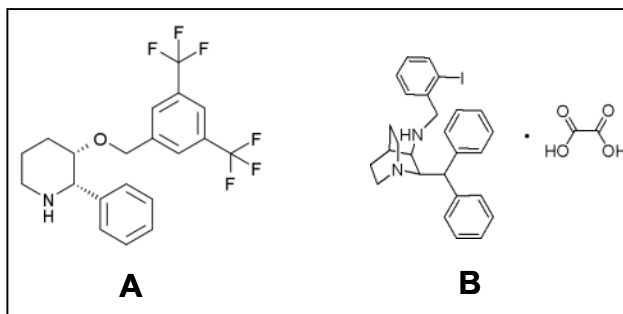


Figure 9: Structures des antagonistes du NK1R. En (A) la structure du L-733,060 et en (B) la structure du L-703,606. Ces deux antagonistes possèdent des structures différentes mais partagent une haute affinité au NK1R humain.

3.5 Rôle du système tachykinergique

Nous décrirons brièvement les effets de la SP et du NK1R dans certains processus physiologiques et pathologiques.

- a) Douleur : Au niveau du système nerveux, la SP est un neurotransmetteur impliqué dans la nociception et la perception de la douleur. L'injection intrathécale de SP chez la souris entraîne un comportement typique en réaction à une forte douleur. L'administration d'un antagoniste du NK1R ou un anticorps anti-SP bloque cette réponse [205]. De plus, des souris transgéniques avec une délétion du gène codant pour le NK1R perdent toute sensation de douleur suite à l'application répétitive de courant électrique. Des plus, les souris transgéniques avec une délétion du gène *Tac1* perdent toute perception de douleur moyenne à sévère [206]. Des études cliniques utilisant des antagonistes du NK1R comme analgésiques et antidouleurs furent entrepris, cependant l'efficacité de ces molécules fut limitée chez l'homme [207].
- b) Anxiété et dépression: La localisation du système tachykinergique à des régions cérébrales connues pour réguler les comportements affectifs, ainsi que certaines études précliniques, suggèrent un rôle majeur de ce système dans les troubles psychiatriques comme l'anxiété et la dépression. Chez les rongeurs et le cochon, l'administration de la SP provoque des comportements anxieux, craintifs et dépressifs [208]. Ces observations sont validées chez l'homme. En effet, une étude de Rimón et al. a montré une augmentation des niveaux de SP dans le fluide cérebrospinal des sujets en dépression par rapport à des volontaires sains. De plus, une équipe allemande a démontré que les niveaux sériques de SP sont augmentés chez les patients atteints de dépression majeure [209, 210]. Plusieurs antagonistes du NK1R ont montré des effets anxiolytiques et antidépressifs dans plusieurs modèles animaux de dépression. Chez l'homme, une étude clinique a démontré les effets antidépresseurs de l'antagoniste MK-0869 [211].

- c) Asthme : Du fait de l'expression du NK1R dans plusieurs structures du système respiratoire et de l'action pro-inflammatoire de la SP, le système tachykinergique joue un rôle dans la physiopathologie de l'asthme. Dans des modèles animaux, la SP stimule la contraction du muscle lisse bronchique, la sécrétion de mucus, la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux ainsi que le recrutement leucocytaire. L'ensemble de ces mécanismes induirait une hypersensibilité des voies respiratoires et à une inflammation, deux caractéristiques importantes de l'asthme. Chez les cobayes, l'administration d'antagonistes du NK1R réduit la bronchoconstriction induite par le SP. Par contre, les résultats des études cliniques sont peu concluants puisque les antagonistes du NK1R n'ont pas réussi à prouver leur supériorité par rapport aux traitements actuels. Cependant, une approche se basant sur la combinaison des antagonistes du NK1R à ces traitements semble la plus prometteuse selon certaines études précliniques [212].
- d) Immuno-modulation : Les tachykinines, en particulier la SP, l'HK et l'EK jouent un rôle dans l'hématopoïèse. Rameshwar et collaborateurs ont montré que la SP est capable de maintenir l'hématopoïèse *in vitro* sur des cellules de la moelle osseuse isolée de donneurs [213]. Ainsi, des concentrations de SP allant de 10^{-11} - 10^{-8} mol/L peuvent remplacer le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) et le GM-CSF (granulocyte monocyte colony stimulating factor). Par contre, la SP ne peut remplacer l'érythropoïétine, bien que la présence simultanée des deux molécules augmente l'activité de l'érythropoïétine. L'ajout d'anticorps dirigés contre l'IL-1, l'IL-3, le G-CSF et le GM-CSF réduit partiellement la croissance des cellules, démontrant ainsi que la SP régule l'hématopoïèse indirectement en favorisant la production de cytokines par les cellules stromales de la moelle osseuse [213]. L'HK-1 est essentielle à la maturation des précurseurs des cellules B [186]. L'ajout de l'HK-1 dans une culture cellulaire murine de pré-cellules B a augmenté la prolifération et la survie de ces cellules *in vitro*. L'inhibition de l'effet de l'HK-1 par l'ajout d'un antagoniste du NK1R diminue le nombre des pré-cellules B en augmentant le pourcentage de cellules apoptotiques [186]. L'effet de l'HK-1 sur la différenciation des cellules B est cependant différent de l'effet de la SP. En effet, la SP agit indirectement sur la

différenciation des lignées myéloïdes en stimulant la production de cytokines spécifiques des cellules stromales de la moelle osseuse tandis que l'HK-1 agit directement sur la lignée lymphoïde de pré-cellules B favorisant leur survie et leur prolifération [214]. Récemment, l'expression du gène *Tac4* a été montrée chez les cellules B à tous les stades de leur développement [214]. Cette même étude a reporté l'implication de l'HK-1 humaine (i.e. EKA/B) dans la survie non seulement des pré-cellules B, mais également des lymphocytes B matures. La divergence des résultats de ces études est peut-être due à l'origine des cellules B : le groupe de Zhang a eu recours à des cellules B issues de la moelle osseuse de souris, tandis que l'étude de Grassin-Delyle a eu recours à des lymphocytes B humains issus du sang périphérique.

La surexpression du système tachykinergique SP/NK1R chez plusieurs cellules immunitaires pendant l'inflammation a été rapportée par plusieurs groupes [179, 215-217]. La SP possède un rôle pro-inflammatoire et elle participe à l'activation des macrophages et à la dégranulation et la libération d'histamine des mastocytes [218, 219]. Elle exerce également un effet chimio-attractant sur les neutrophiles et les éosinophiles [220, 221].

3.6 Cellules T et NK1R

La stimulation du NK1R par la SP module diverses fonctions immunitaires en particulier au niveau des cellules T. Ainsi l'activation du NK1R stimule la prolifération des lymphocytes T *in vitro* [222, 223], et favorise la migration lymphocytaire des nodules vers la périphérie *in vivo* [224]. De plus, la voie de signalisation du NK1R via la PLC induit l'activation de plusieurs facteurs de transcription permettant la production de plusieurs cytokines activatrices. Les plus importantes sont l'IL-1 et l'IL-2 [225]. Le groupe de Nowicki a démontré que l'ajout de SP augmentait la production de l'IL-1 dans les lymphocytes T de patients atteints de leucémie et que l'ajout d'un antagoniste du NK1R ramenait l'IL-1 au niveau de base [226]. De plus, l'activation du NK1R par la SP augmente de manière concentration dépendante la synthèse d'ARNm codant pour l'IL-2. En fait, la SP agirait plutôt comme un co-signal qui amplifierait la réponse déjà induite par l'activation de la calcineurine

en augmentant la stabilité de l'ARNm de l'IL-2 durant sa traduction [227].

L'EKA, l'EKB et l'HK-1 jouent un rôle important dans le développement et la maturation des cellules T doubles positives en cellules simples positives. En effet, le blocage du NK1R avec différents antagonistes sélectifs, dont le L-733,060, inhibe la maturation des cellules doubles positives *in vitro* et *in vivo* [228]. Ainsi, le système tachykinergique SP/NK1R est impliqué dans la régulation de plusieurs processus indispensables à la maturation et à la fonction des cellules T.

Chapitre 4. Modèle cellulaire pour l'étude des effets des immunosuppresseurs : les cellules Jurkat

L'élucidation du mécanisme d'action des drogues immunosuppressives nécessita plusieurs études *in vitro* sur des cellules T. Un des modèles utilisé fut les cellules Jurkat, une lignée leucémique humaine de cellules T CD3+, CD4+, CD8-. Cette lignée fut isolée à partir du sang périphérique d'un patient atteint de leucémie. Elle présente toutes les caractéristiques moléculaires d'une cellule T activée, la rendant un modèle approprié pour l'étude des propriétés immunosuppressives de la CsA, le tacrolimus et la rapamycine. Ainsi, ce fut dans le lysat des Jurkat que les récepteurs intracellulaires de la CsA et du tacrolimus ont été identifiés en premier [33]. Plusieurs études ont été effectuées sur ces cellules qui ont permis d'identifier le gène de l'IL-2 et le NFAT comme cibles de la CsA et du tacrolimus [229]. De plus, l'isolation et la caractérisation de la calcineurine comme le maillon manquant entre l'engagement du TCR et la transcription des gènes fut établi chez les cellules Jurkat [31, 230]. Le choix de cette lignée est également approprié du fait que l'expression du NK1R dans les Jurkat a été montrée dans notre laboratoire.

L'objectif général de ce projet fut de démontrer l'implication de la voie de signalisation du NK1R dans la régulation des mécanismes associés aux immunosuppresseurs. Ensuite, nous avons voulu étudier l'effet potentiel de la combinaison des antagonistes du NK1R avec les immunosuppresseurs sélectionnés sur leurs voies de signalisation respectives.

Chapitre 5. Objectifs de recherche

Un lien entre la calcineurine et son substrat le NFAT avec le NFAT a démontré dans plusieurs types de cellules neurales [231]. Dans les lymphocytes T, il a été démontré que la SP pouvait stimuler la production d'IL-2. D'un autre côté, le NK1R régule l'activité de l'Akt dans plusieurs types de cellules cancéreuses [197]. L'Akt est un élément impliqué dans la cascade de signalisation régulée par la mTOR, cible de la rapamycine.

De ceci découle nos hypothèses de recherches (figure 10) :

- a) le NK1R interagit avec la voie d'activation de la calcineurine en régulant son activité, et par conséquent l'activité de son substrat le NFAT et la production d'IL-2.
- b) Le NK1R en agissant sur Akt modulerait l'activité de mTOR, et par conséquent son activité sur ses substrats dont la p70S6K et la S6R
- c) L'ajout d'un antagoniste du NK1R à la CsA et au tacrolimus (inhibiteurs de la calcineurine) augmenterait leur action immunosuppressive sur la calcineurine.
- d) L'ajout d'un antagoniste du NK1R à la rapamycine (inhibiteur de la mTOR) augmenterait son effet inhibiteur sur l'activation des cellules T.

Les objectifs spécifiques de mon projet qui font l'objet de l'article inclus dans ce mémoire sont les suivants:

5.1 Confirmer l'expression du NK1R et identifier l'isoforme exprimé, ainsi que de déterminer l'expression de la SP et des isoformes des endokinines chez les cellules Jurkat.

La détermination de l'expression de ce récepteur et de son ligand chez les cellules T Jurkat nous permettrait d'émettre l'hypothèse de l'existence de mécanismes de régulation impliquant l'activation autocrine de ce système tachykinergique, et ainsi cela justifierait l'utilisation d'antagonistes sélectifs du NK1R pour bloquer son activation.

5.2 Étudier la possibilité de l'interaction de la voie de signalisation du NK1R avec la

voie de signalisation de la calcineurine.

Le NK1R a été impliqué dans l'activation des cellules T, cependant les mécanismes responsables de cette activation sont encore peu connus. Ainsi, nous étudierons l'implication du NK1R dans la régulation de l'activité enzymatique de la calcineurine et de l'activité du NFAT.

5.3 Étudier les effets de la combinaison d'un antagoniste du NK1R avec les inhibiteurs de la calcineurine la CsA et le tacrolimus

Afin d'étudier les objectifs 5.2 et 5.3, nous déterminerons l'activité NFAT et la production d'IL-2 comme indicateurs de l'activité calcineurine lors du blocage du NK1R seul et en combinaison avec la CsA et le tacrolimus.

5.4 Étudier la possibilité de l'interaction de la voie de signalisation du NK1R avec la voie de signalisation de la mTOR

Aucune étude n'existe sur la relation du NK1R avec mTOR. Nous voulons déterminer si le NK1R pourrait réguler l'activité de mTOR et de ses substrats chez les cellules T.

5.5 Étudier les effets de la combinaison d'un antagoniste du NK1R avec la rapamycine

Afin de démontrer l'implication du NK1R dans la voie de signalisation de la mTOR, et de la présence ou non d'un effet de combinaison nous déterminerons le niveau de phosphorylation des protéines de la voie de signalisation de la mTOR, à savoir mTOR, p70S6K et S6R. Les niveaux de phosphorylation de ces protéines sur des résidus bien spécifiques seront quantifiés en utilisant le système BioPlex basé sur la technologie Luminex. Nous allons également déterminer l'effet de l'antagoniste et de la combinaison sur la phosphorylation de quelques protéines en amont de la voie de mTOR comme l'Akt.

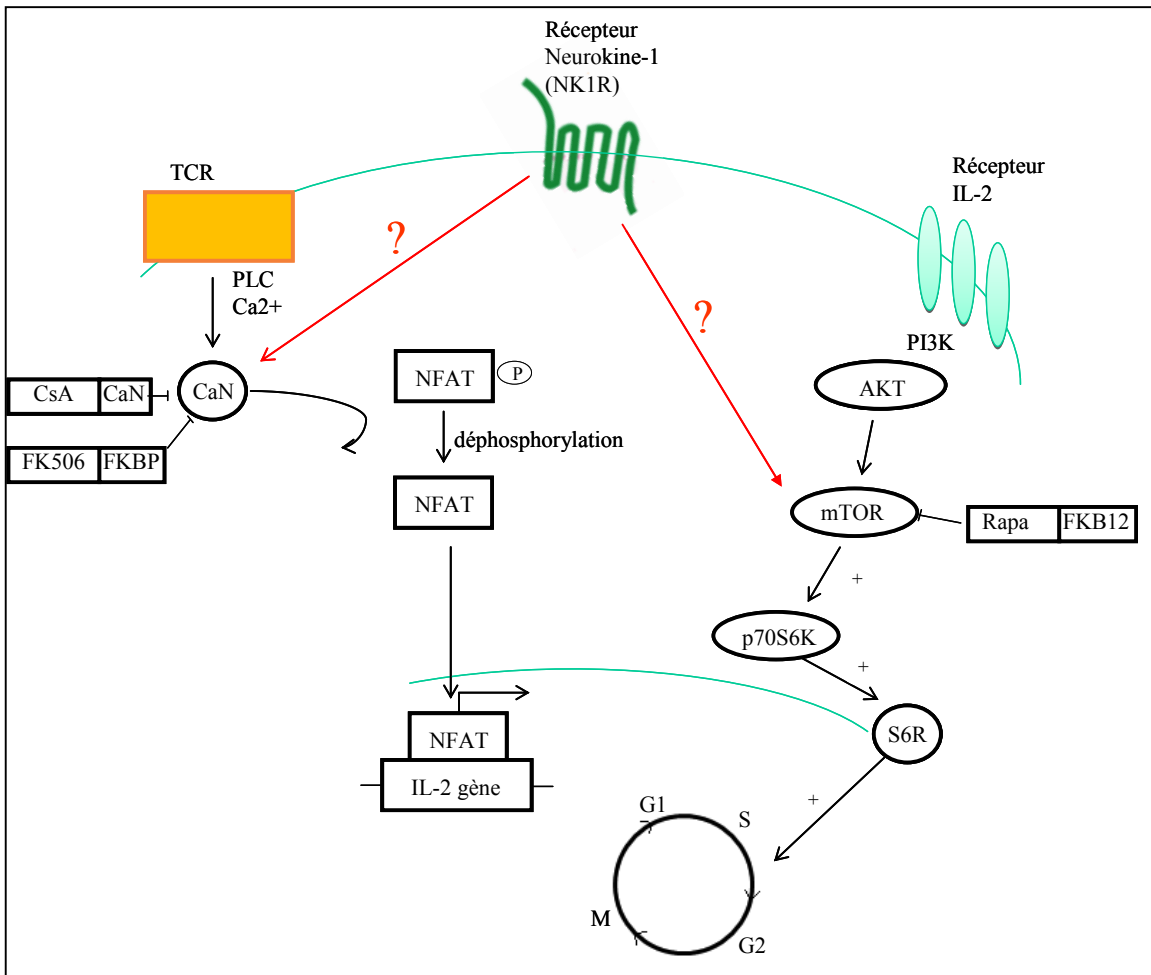


Figure 10 : Hypothèses de recherche. Le récepteur neurokinine-1 (NK1R) agirait sur la voie de la calcineurine inhibée par la cyclosporine (CsA) et le tacrolimus (FK506). Ceci se traduirait par une inhibition marquée de l'activité NFAT et la production de l'IL-2. Le NK1R agirait également sur la voie de la mTOR inhibée par la rapamycine. Ceci se traduirait par une inhibition augmentée de la phosphorylation de la p70S6K, et la S6R.

Ce projet a reçu une subvention du programme VINCI-IRSC pour la maturation de projets technologiques innovateurs. Ce projet vise à démontrer la possibilité d'un effet de combinaison entre les antagonistes du NK1R et les immunosuppresseurs dans le but futur de réduire les doses administrées aux patients et conséquemment les effets secondaires.

Chapitre 6. Article

Interactions of the neurokinin-1 receptor with intracellular signalling pathways regulated by immunosuppressive drugs in T cells

Khadije Jizi, Mélanie Welman, Karim Maghni

Research Center, Sacré-Cœur Hospital of Montreal, Laboratory of Asthma Neuroimmunology, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada.

Abbreviations: CaI, calcium ionophore; CsA, cyclosporine A; DMSO, dimethyl sulfoxide; FBS, fetal bovine serum; mTOR: mammalian target of rapamycin; NK1R, neurokinin-1 receptor; PMA, Phorbol 12-myristate 13 acetate.

Running title: Action of immunosuppressors and NK-1R antagonists

My specific contribution to this article was to conduct all the experiments presented, except for the use of the Bio-Plex system, which was done by Ms Lucero Castellanos (Research technician). In addition, I analyzed all the results, did the statistical analysis and I participate actively in the writing of this manuscript along with my research director Dr. Karim Maghni and Dr. Mélanie Welman, research associate in Dr. Maghni's laboratory.

Abstract

There are increasing evidences for a role of the neurokinin 1 receptor (NK1R) in the regulation of innate and adaptive immune systems. However, whether NK1R regulates calcineurin/nuclear factor of activated T cell (NFAT) and mTOR pathways in T cells is unknown. These signalling pathways being targets of the immunosuppressive drugs cyclosporine A (CsA), FK506 and rapamycin respectively. We also examined whether pharmacological blockade of NK1R may be combined to those immunosuppressors to repress T cell activation. In this article, we first show that Jurkat T cells express both genes for NK1R and its ligands endokinins which suggests the existence of an autocrine tachykinergic regulation of T cell function. This hypothesis is supported by our data showing that blockade of this receptor with specific NK1R antagonists inhibits IL-2 production in Jurkat T cells which is associated with the reduction of NFAT activation. Interestingly, we show interplay between NK1R antagonists and calcineurin inhibitors to repress IL-2 production and NFAT activation. In contrast, blockade of NK1R has no inhibitory effect on mTOR and p70S6K activation but reduce S6R (Ser235/236) and Akt (Ser473) phosphorylation. However, combining rapamycin with NK1R antagonist has no enhancing effect on rapamycin-reduced mTOR activation and its signalling pathway. Our findings provide the evidence of a novel mechanism of regulation of NFAT activation-induced IL-2 production in T cells involving the tachykinergic system NK1R/endokinins. These observations may offer new applications for NK1R antagonists in transplantation immunotherapy in combination with immunosuppressors.

Introduction

Cyclosporin A (CsA), FK506, and rapamycin are immunosuppressive drugs used in the treatment of allogenic transplantation. CsA and FK506 act on T cells by inhibiting interleukin-2 (IL-2) production, a mitogenic factor essential for T cell activation [1]. CsA immunosuppressive action is mediated by binding to its cytoplasmic receptor, cyclophilin [2], to form a complex that interacts with calcineurin (CaN), also known as phosphatase 2B, to inhibit its phosphatase activity [3]. CaN is then no longer capable of dephosphorylating the nuclear factor of activated T cell (NFAT), which fails to translocate to the nucleus to initiate IL-2 production [4]. FK506 also blocks CaN activity but by binding to the FK506 binding protein 12 (FKBP12) [5]. Rapamycin also binds to the FKBP12 [6], but it targets the mTOR protein to inhibit its functions, thus blocking the T cell cycle progression and proliferation [7]. One of the most well known substrate of mTOR is the p70S6 kinase, which controls the phosphorylation level of the S6 ribosomal protein (S6R) [8]. The S6R is essential for ribosome biogenesis that controls the rate of proteins synthesis. It was also found that S6R phosphorylation, through p70S6K, plays a role in the regulation of mRNA translation [9].

The survival of transplants grafts has increased with the use of these drugs. However, nephrotoxicity, leucopenia, thrombocytopenia and hyperlipidaemia are amongst the several side effects still associated with the long-term use of immunosuppressive drugs [10-12]. One strategy to reduce drugs side effects in transplantation protocols is to decrease therapeutics doses or the repetitive number of drug administrations by combining lower doses of several immunosuppressive drugs; rapamycin being frequently combined with CsA or FK506 [13]. Even though combining these drugs show beneficial effects in organs transplantation it still

produces adverse effects [14]. Hence, it is crucial to find alternative treatments that can enhance these drugs efficacy without increasing the side effects. A classic pharmacological approach would be to combine immunosuppressive drugs with other molecules that can enhance or potentiate their efficacy.

The neurokinin-1 receptor (NK1R) encoded by the *Tac1R* gene is a tachykinin receptor that belongs to the family of 7-transmembrane G protein-coupled receptors (GPCR) [15]. The NK1R is widely expressed in neurons [16, 17], vascular endothelial cells [18], smooth muscles cells [19], bone marrow cells [20] and in most immune cells, including T cells [21]. In contrast to most GPCR, several endogenous orthosteric ligands bind NK1R with different affinities [22]. The first discovered is the substance P (SP) [23, 24], then neurokinin-A [25, 26]. Both peptides are encoded by the *Tac1* gene but SP have the higher affinity for NK1R. Recently, the tachykinin family has been extended by the discovery of a new tachykinin gene *Tac4* that encodes four forms of endokinines (EKs), named EKA, EKB, EKC and EKD. In contrast to SP, endokinins are widely expressed in the peripheral system but not in the central system [27].

Human T lymphocytes express both the NK1R and tachykinin genes, which suggests the existence of an autocrine tachykinergic mechanism regulating T cells function [28]. The activation of NK1R stimulates proliferation of T lymphocytes, and the production of IL-1 and IL-2 [29, 30]. In addition, several evidence from studies in neural cells indicates an interaction between calcineurin/NFAT and the NK1 receptor [31, 32]. For instance, the activation of NK1R in rat spinal cord led to the activation of NFAT [31]. However, whether NK1R expressed in human T cells [21] is involved in the calcineurin-NFAT pathway leading to IL-2

production is presently unknown. To the best of our knowledge, there is no evidence in the scientific literature supporting a role for NK1R in the regulation of the mTOR signalling pathway. Akt phosphorylation in Ser473 inhibits mTOR activation [33]. In human glioblastoma cell line, NK1R regulates Akt phosphorylation in Ser474 [34], which finding suggests that NK1R may be also involved in the regulation of the mTOR signalling pathway.

Regarding the role of NK1R as a modulator of immune cells function [29, 30], we have examined whether this receptor may also regulate T cells function by modulating the calcineurin-NFAT and mTOR signalling pathways. To address these issues, the human leukemic T cell lines Jurkat, a well know cell model to study molecular mechanisms of immunosuppressive drugs *in vitro*, was used [3, 35, 36].

We have determined the expression of both NK1R and endokinin genes in Jurkat T cells to predict the existence of tachykinergic autocrine mechanisms regulating T cell functions. Using a pharmacological approach, we have also determined whether activated NK1R interacts with intracellular pathways leading to NFAT activation and IL-2 production, as well as with the activation of mTOR pathway. Finally, we examined whether combining a NK1R with an immunosuppressive drug may allow reducing its concentration while keeping or increasing its effects on T cell functions. Our study brings new insights in the role of NK1R in the modulation of T cell activation, and suggests new applications for the use of NK1R antagonists in transplantation immunotherapy.

Materials and Methods

Cell culture

The human Jurkat T cell line was purchased from ATCC (Manassa, VA, USA) and cultured in RPMI-1640 media from Sigma (Oakville, Ontario, Canada) supplemented with 10% FBS (HyClone, Logan, UT, USA), 2 mM of L-glutamine, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

Materials

CsA, NK-1R antagonist L-703,606 and CaI (calcium ionophore) were purchased from Sigma. FK506 was purchased from Alexis (San Diego, CA, USA). Rapamycin was purchased from Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA). PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate) was purchased from Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA, USA). L-733,060 was obtained from Tocris (Ellisville, Missouri, USA) and the opti-MEM media from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada).

Western blot analysis

Jurkat T cells (1×10^6 cells) were lysed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 1mM EDTA at pH 8, 140 mM NaCl, 10 mM NaF, 2mM Na₃VO₇, 10% glycerol, 20 mM CHAPS, 1 mM PMSF and PIC (protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich, Ontario, Canada). Samples were electrophorized on 10% SDS-PAGE. After migration, proteins were transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad, Mississauga, Canada), then incubated over night in 5% powder

milk in TBS-T. Immunoblotting was performed using a rabbit anti-human NK1R antibody (1:1000; Novus, Littleton, USA) identifying the receptor N-terminal sequence. A goat HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, dilution 1:10000) and SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate system (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, USA) were used for immunodetection. Immunoblots were then stripped with the Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) for the detection of the housekeeping gene GAPDH (Abcam, Cambridge, MA, USA, dilution 1:2500).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Cellular RNA was extracted from cells with TRIZOL reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) [19]. Reverse transcriptase was conducted using 2 µg of RNA as a template, oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer, and Superscript II enzyme (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), in presence of acetylated bovine serum albumin (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and RNAGuard RNase (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) as enzyme inhibitors. To identify mRNA expression for Tac1R, Tac1 and Tac4 genes, the corresponding cDNA was amplified with 20 nM DNTP mix in 10X PCR buffer, 50 nM MgCl₂, 0.625 U of Taq DNA polymerase Platinum (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and 20 µM of the respective primers. The following primers were used for PCR reaction: human Tac1R gene (sense 5'-GTGCTGCCCCTTCATCAG- 3', antisense 5'-CCATGACAGAGAGCTTCAGC- 3'), human Tac1 gene (sense 5'-GACAGCGACCAGATCAAGGAGGAA- 3', antisense 5'-GAGCATCCCGTTTGCC- 3'), human Tac4 gene (sense 5'-GCTGATGGGGAAGCGAGTGGAGGCAGAGA- 3', antisense 5'-

CAGGATACAGAGTGTGCGAGTCTCCTCACT- 3'), and cyclophilin (sense 5'-GGTCAACCCCACCGTGTTCTTCG-3', antisense 5'-GTGCTCTCCTGAGCTACAGAAGG- 3'). Samples were amplified using the MJ Research PTC 200 (GMI, Ramsey, MI, USA) with the following cycles: 1 min of denaturation at 92°C, 2 min of annealing at 60°C and 3:00 min of polymerisation at 72°C. After 40 cycles, 10 min of polymerisation at 72°C was allowed. PCR products were then migrated on a gel-agarose (2.5%) and visualized by ethidium bromide staining [19].

Quantification of IL-2 production

Jurkat cells (2×10^5 cells/well; 96-wells plate) were incubated with CsA (1, 5, or 10 ng/ml) or FK506 (0.01, 0.05 or 0.1 ng/ml) in the presence or absence of L-733,060 or L-703,606 at 1, 5 or 10 μ M. After 30 min of incubation, Jurkat cells were stimulated with PMA (200 nM) and CaI (1 μ M) for 24 hours and then supernatants were collected and centrifuged. IL-2 production was quantified using the human IL-2 ELISA Ready-Set-Go kit (eBiosciences, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions.

NFAT luciferase assay

Jurkat cells (5×10^6 cells) were electroporated (300V, 900 μ F; Electro Cell manipulator 600, BTX, Holliston, MA, USA) in Opti-MEM media with 20 μ g of luciferase reporter NFAT-luc (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and 1 μ g of pRL-TK to normalize the transfection efficacy. After 4 hours in Opti-MEM media, cells were washed and then incubated in the complete RPMI media for 24h. Cells were then treated with CsA, FK506 and L-733,060 at the selected concentrations for 30 min, and then stimulated with 200 nM of PMA and 1 μ M CaI for 4h.

Luciferase activity was measured in cellular extracts with the Dual-Luciferase reporter assay System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions, and the Polar Star OPTIMA (BMG Labtech, Nepean, Ontario, Canada). Data were transformed as the ratio of relative luciferase activity of NFAT-luc over pRL-TK, and then expressed as the percentage of NFAT activity of drug-treated cells over the control condition.

Determination of mTOR pathways activation using the Luminex technology

Levels of phosphorylation of the main mTOR signalling pathway proteins were quantified using the 11-Plex Akt/mTOR Panel-Phosphoprotein kit (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) according to the manufacturer instructions. This kit allows the detection of mTOR (Ser2448), p70S6K (Thr412), IRS1 (Ser312), GSK α (Ser21), GSK β (Ser9), Akt (Ser473), PTEN (ser380), IR (Tyr1162/Tyr1163), IGF1R (Tyr1135/Tyr1136), RS6 (Ser235/Ser236) and TSC2 (ser939). Briefly, Jurkat cells (2×10^6 cells/ml) were treated with rapamycin at 1 or 10 nM for 30 min at 37°C in the presence or absence of L-733,060 (5 μ M). Lysates were collected using the Cell extraction Buffer (Invitrogen) and then plated in a 96-well plate along with the beads suspension, and incubated overnight at 4°C. After a series of washes, biotinylated antibodies were added for the detection of respective eleven proteins followed by the addition of a Streptavidin-PE conjugate to quantify respective levels of phosphorylation. The plate was analyzed using the Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) based on the Luminex technology, and data were expressed as the mean of fluorescence intensity.

Proliferation assay

To determine whether drugs treatment may alter Jurkat cells number, the proliferation was quantified using the Cy QUANT NF cell proliferation assay (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. This assay is based on the incorporation of the fluorescent DNA binding dye to the DNA of living cells. Briefly, cells were plated in a dark 96-wells plate at a density of 8000 cells/well, and then treated with CsA (5 ng/ml) or FK506 (0.05 ng/ml) in the presence or absence of L-733,060 at 5 μ M. Cells were then stimulated with PMA (200 nM) and CaI (1 μ M) for 24 hours at 37°C. Afterwards, the media was removed and the fluorescent dye solution was added to each well and then incubated 1 hour at 37°C. At the time of cell growth quantification, a standard curve was drawn by adding into wells of the same culture plate known concentrations of Jurkat cells (500 to 32000 cells/well). Fluorescence intensities were measured at 485/530 nm with the PolarStar OPTIMA system. Cell number was then calculated from the drawn standard curve.

Flow cytometric analysis of Apoptosis

To determine whether drugs treatment may alter Jurkat cells viability, apoptosis was detected with the Apoptotic blebs assay kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells (1×10^6 cells/ml) were treated for 24h with FK506 at 0.05 ng/ml, in the presence or absence of L-733,060 at 5 μ M. Cells were stimulated with PMA (200 nM) and CaI (1 μ M) for 24 hours at 37°C. Treatment with Camptothecin (4 μ g/ml) was used as a positive control for apoptosis induction in T cells. Cells were harvested, washed twice with the assay buffer, and then incubated with scFv fusion protein solution for 20 min at 4°C to detect blebs present on the cell surface of apoptotic cells. scFv fusion protein binding

was quantified using the fluorescein labelled-rabbit IgG solution that binds to the protein A domain of the scFv fusion protein. Cells were then incubated with the propidium iodide (PI) solution. Flow cytometric analysis was performed using the Epics XL from Beckman Coulter, and data were analyzed with the Expo32 software.

Statistical analysis

Data were expressed as means +/- standard error of the mean (SEM). Statistical comparison was done by using a one tailed ANOVA followed by a Dunnett or Tukey test for multiple comparisons. A student t test was used for paired comparisons. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Jurkat cells express the NK1R receptor and endokinin

Human T cells have been shown to express the NK1R, and its orthosteric ligand substance P (SP) [21], which suggests the existence of a tachykinergic autocrine regulation of human T cell functions. The human Jurkat CD3+CD4+CD8- T cell line is a well know model to investigate immunosuppressor mechanisms in T lymphocytes [3, 35, 32]. Therefore, we have first determined whether Jurkat cell express tachykinin genes. By using a specific set of primers that recognizes a sequence present in the full-length human NK1R receptor, we demonstrated that the Jurkat cells express mRNA transcripts for the *Tac1R* gene (Fig. 11A). cDNA produced from humain brain was used as a positive control for NK1R expression, and the house keeping gene cyclophilin. Western blot analysis using an antibody identifying the N-terminal sequence of NK1R confirmed the expression of full-length NK1R in Jurkat cells with an apparent molecular mass of 47 kDa (Fig. 11B); the short isoform of 38 kDa was not detected. A previous study has reported the absence of *Tac1* gene expression in Jurkat cells [27]. However PCR primers were designed to detect solely the α and β transcripts of the *Tac1* gene. Substance P is the product of the translation of four alternatives splicing of the *Tac1* gene: α , β , γ and δ . Using a pair of primers validated to recognize a common sequence in the four isoforms of the human *Tac1* gene [28], any isoforms was detected in Jurkat cells in contrast to human brain (Fig. 11C). Furthermore, no mRNA transcripts were detected when using pairs of primers validated to recognize a sequence specific to each isoforms [28] (data not shown). We next addressed whether Jurlat cells may express one members of the

endokinin family encoded by the *Tac4* gene [27]. The human monocytic cell line U937 was used as positive control for the expression of the *Tac4* gene [27]. Our data indicated that the isoform δ *Tac4* gene encoding for EKB was detected in Jurkat cells (Fig. 11C). EKB having similar affinity as SP for NK1R, the expression of both receptor and ligand strongly suggest the existence of a tachykinergic autocrine mechanism regulating T cell function.

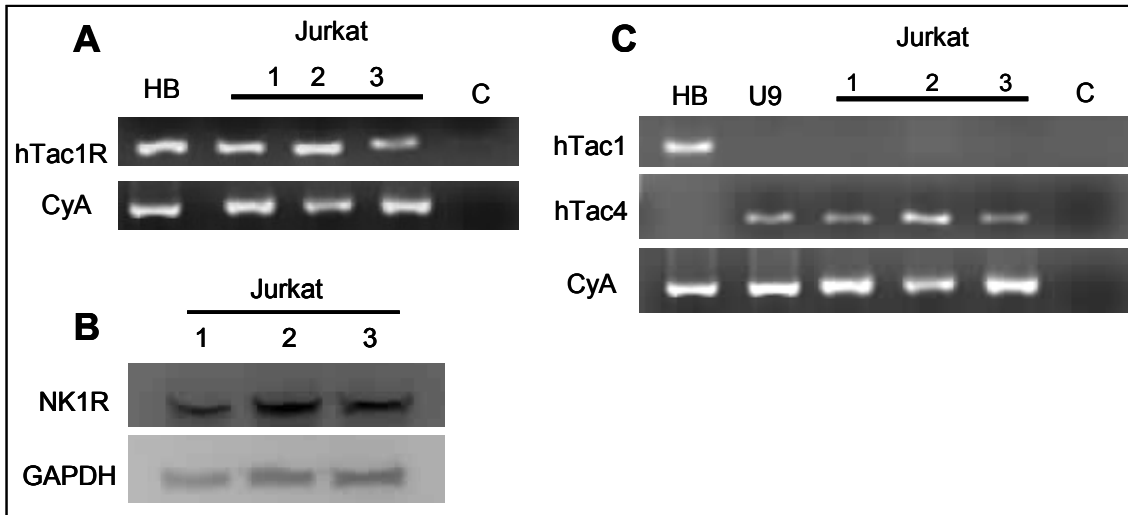


Figure 11: Expression of NK1R and its ligand in human Jurkat T cells. Jurkat cells express the human *Tac1R* and the *Tac4* genes. (A) PCR analysis of the expression of the human *Tac1R* in three separate culture of Jurkat T cells. PCR primers allow the detection of a sequence present in the full-length NK1R isoform. The cDNA of human brain was used as a positive control for NK1R expression, and cyclophilin was used as a housekeeping gene. (B) Western blot analysis of the NK1R expression in three separate cell cultures. The antibody recognizes the N-terminal sequence of the receptor only detected in the full length NK1R isoform in cell extracts with a molecular weight of 47 Kda. GAPDH was used as a housekeeping gene. (C) PCR analysis of the expression of the human *Tac1* and *Tac4* genes in three separate cell cultures. The human brain was used as a positive control for the detection of *Tac1*, and the human monocytic cell line U937 as positive control for *Tac4* gene expression. Cyclophilin was used as a housekeeping gene. The control lane shows the specificity of the primers. The results are representative of three separate experiments. HB: human brain; CyA: cyclophilin;

U9: U937; C: control, no DNA.

NK1R is involved in IL-2 production in stimulated Jurkat T cells.

The immunosuppressive drugs CsA and FK506 inhibit T cell activation by blocking the calcineurin-NFAT pathway, thus reducing IL-2 release. Stimulation of Jurkat cells with PMA and CaI (calcium ionophore) for 24 hours increases IL-2 production (Fig. 12A); basal levels being nearly undetectable (data not show). We have first optimised the concentrations of both CsA and FK506 to reduce IL-2 synthesis. Using concentrations of immunosuppressors calculated to be 10 times lower than corresponding therapeutic doses administered to patients [39], we found that cells treatment with CsA (1, 5 or 10 ng/ml) and FK506 (0.01, 0.05 or 0.1 ng/ml) inhibited in a concentration dependant manner IL-2 production (Fig. 12A).

We have next hypothesized that NK1R is activated in an autocrine manner in stimulated Jurkat cells, and therefore, that it is involved in IL-2 synthesis. To address this issue, pharmacological inhibitions of NK1 autocrine activation prior to cell stimulation was done using two different NK1R specific antagonists L-733,060 and L-703,606; these two compounds having different chemical structures. Our results indicate (Fig. 12B) that both antagonists inhibit in a concentration-dependant manner IL-2 synthesis in stimulated Jurkat cells. Interestingly, both antagonists at a concentration of 10 μ M have completely abolished IL-2 release (Fig. 12B) showing similar efficacy than highest concentrations of the classical calcineurin inhibitors CsA and FK506 (Fig. 12A). These results provide the first evidence for a direct role NK1R in IL-2 synthesis in activated T cells.

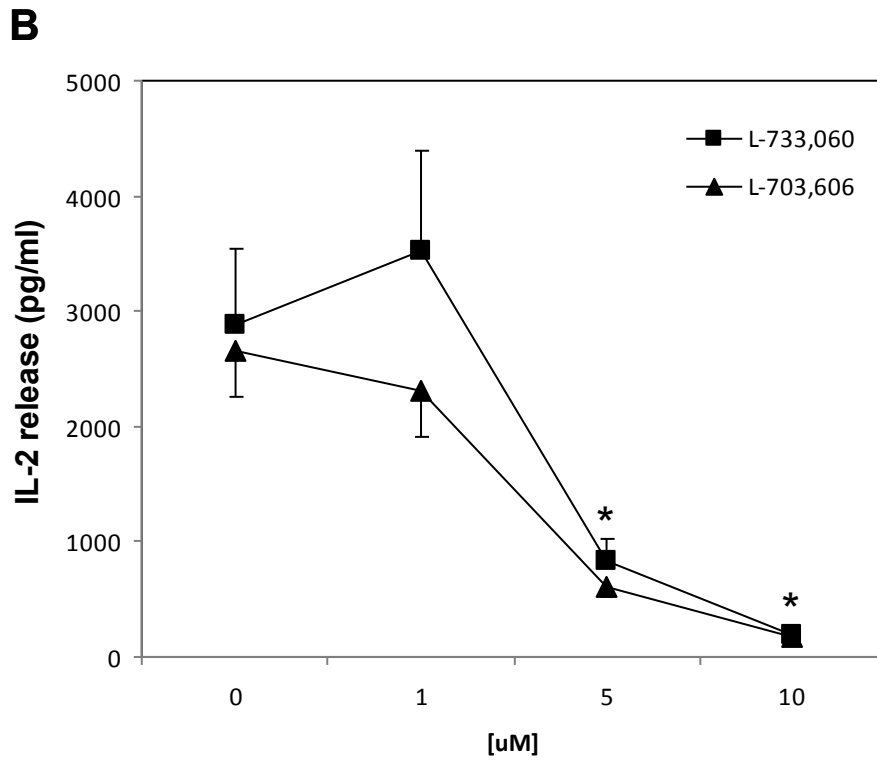
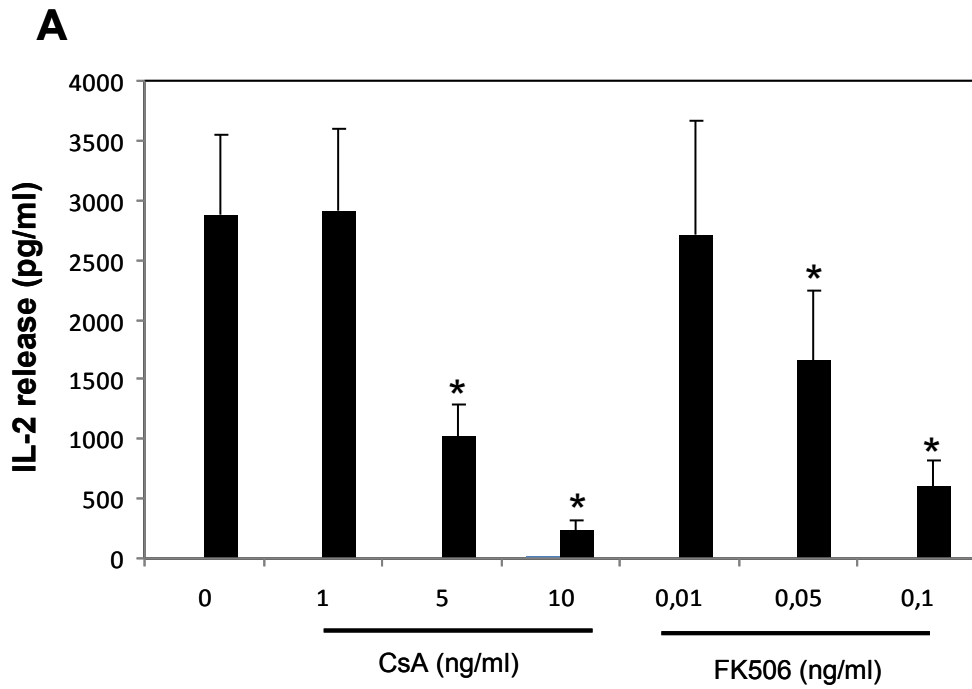


Figure 12: Effects of immunosuppressive drugs and pharmacological blockage of NK1R in IL-2 synthesis. (A) Jurkat cells were treated with different concentrations of CsA or FK506 for 30 min prior to stimulation with PMA (200 nM) and CaI (1 μ M) for 24h. IL-2 release was quantified by ELISA. (B) Jurkat cells were treated with NK1R antagonists L-733,060 or L-703,606 at 1, 5 and 10 μ M for 30 min, and then stimulated for IL-2 release. Data represent the means \pm SEM of 8 separate experiences. Statistical significance was determined using paired, one tailed Student's t-test for comparison of treated cells versus the control condition (* $p < 0.01$).

NK1R inhibition enhances the inhibitory effect of CsA and FK506

To examine first whether NK1R may interact with intracellular signalling pathways regulated by the two immunosuppressors, cells were treated with different concentrations of CsA or FK506 in the presence of 1 or 5 μ M of the NK1R antagonist L-703,606. Our data indicate that combining L-703,606 at 1 μ M or 5 μ M with CsA at 5 ng/ml provoked a significant inhibition of IL-2 synthesis in stimulated cells when compared to the inhibitory effect of respective individual drugs (Fig 13). Interestingly, the combination of L-703,606 at 1 μ M did not increase FK506-induced inhibition of IL-2 synthesis (Fig 13A). However, L-703,606 at 5 μ M significantly enhanced the inhibitory effect of FK506 at 0.05 or 0.1 ng/ml (Fig 13B). Similar effects were observed when the NK1R antagonists L-733,060 at 5 μ M was combined to CsA or FK506 (Fig. 14). Our results strongly suggest that the autocrine activation of the NK1R in stimulated T cells interact with intracellular signalling pathways of calcineurin inhibitors. Furthermore, our results indicate that combining CsA or FK506 with NK1R antagonist allow reducing by 2-fold the concentration of respective immunosuppressors as exemplified by the similar immunosuppressive effect between CsA at 10 ng/ml alone and the combination of L-733,060 at 5 μ M with CsA at 5 ng/ml (Fig. 14).

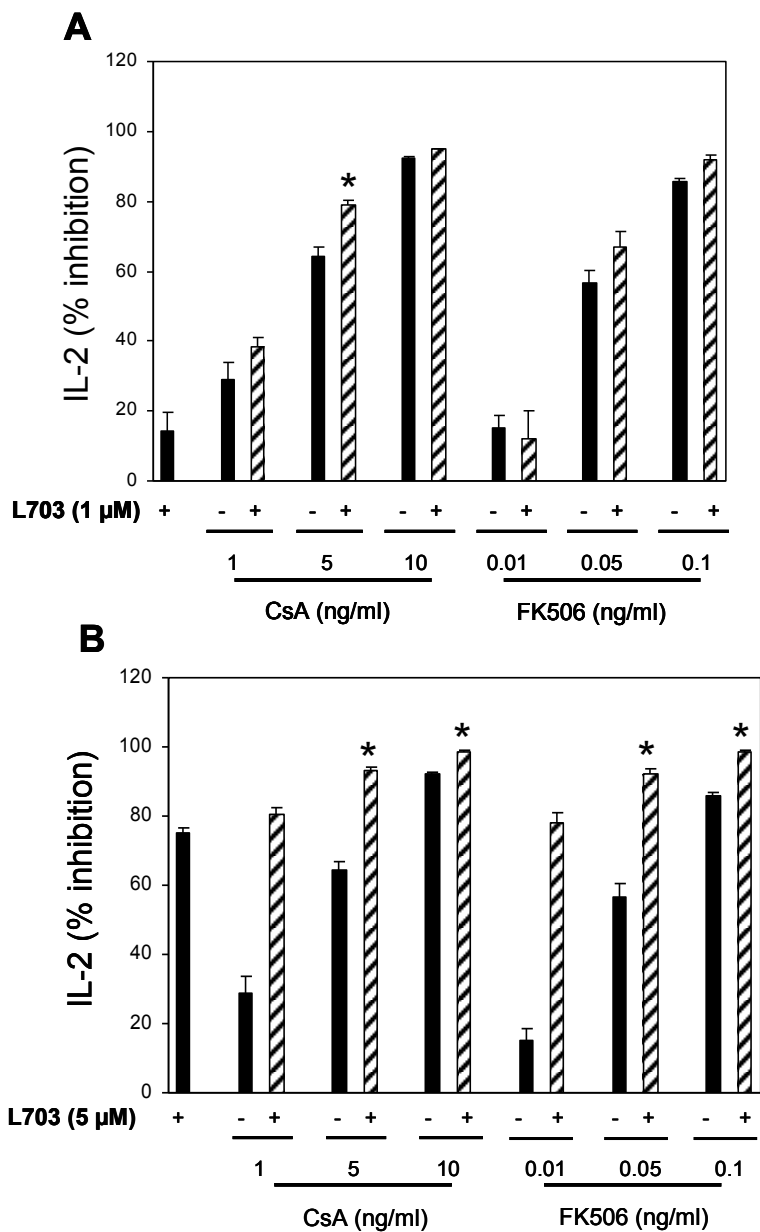


Figure 13: Blockage of NK1R with L-703,606 increases the inhibitory effect of CsA and FK506. Jurkat cells were treated with different concentrations of CsA or FK506 in the presence or not of the L-703,606 at 1(A) 1 μM or and (B) 5 μM for 30 min, and then stimulated for IL-2 release. Data were expressed as the percentage of IL-2 inhibition in comparison to the control condition of each treatment and combination was calculated and represented. Data represent the mean +/- SEM of 8 independent experiments. Tukey test or a

Dunnett test were used for statistical analyses (* $p < 0.05$). Each combination was compared with the effect of the each drug alone at the corresponding concentration.

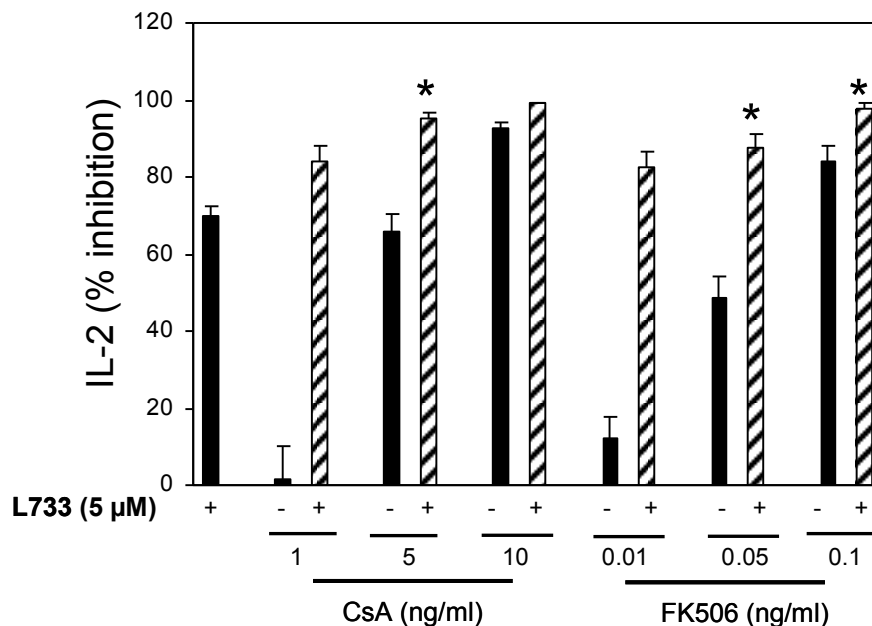


Figure 14: Blockage of NK1R with L-733,060 increases the inhibitory effect of CsA and FK506. Jurkat cells were treated with different concentrations of CsA or FK506 in the presence or not of the L-733,060 at 1(A) 1 μM or and (B) 5 μM for 30 min, and then stimulated for IL-2 release. Data were expressed as the percentage of IL-2 inhibition in comparison to the control condition of each treatment and combination was calculated and represented. Data represent the mean +/- SEM of 8 independent experiments. Tukey test was used for statistical analyses (* $p < 0.05$). Each combination was compared with the effect of the each drug alone at the corresponding concentration.

NK1R regulated NFAT activation in stimulated T cells

To further examine the underlying mechanisms of NK1R interactions with signalling pathways of calcineurin inhibitors, we have next examined whether NK1R regulates the activation of NFAT, a key transcription factor for IL-2 synthesis [4, 40]. This issue was

addressed in stimulated cells treated with the most interesting combinations that we found for calcineurin inhibitors and NK1R antagonists. NFAT activity was determined using a luciferase dual reporter assay. Our results showed that pharmacological blockage of NK1R activation with the L-733,060 at 5 μ M significantly reduced the NFAT activity in stimulated cells when compared to control condition (Fig. 15). Furthermore, the combination L-733,060 with CsA at 5 ng/ml (Fig. 15A) or FK506 at 0.05 ng/ml (Fig. 15B) significantly enhanced their inhibitory effect on NFAT activity when compared to respective immunosuppressors alone. This result is consistent with the effects of combined drugs on the inhibition of IL-2 synthesis (Fig. 14). Our results provide the first direct evidence that the NK1R signalling pathway regulates NFAT activity in activated T cells. Furthermore, the nearly abolishment of NFAT activity when immunosuppressors were combined with a NK1R antagonists suggests interplay between the NK1R/EKB tachykinergic system and calcineurin signalling pathways in the regulation of NFAT activity in activated T cells.

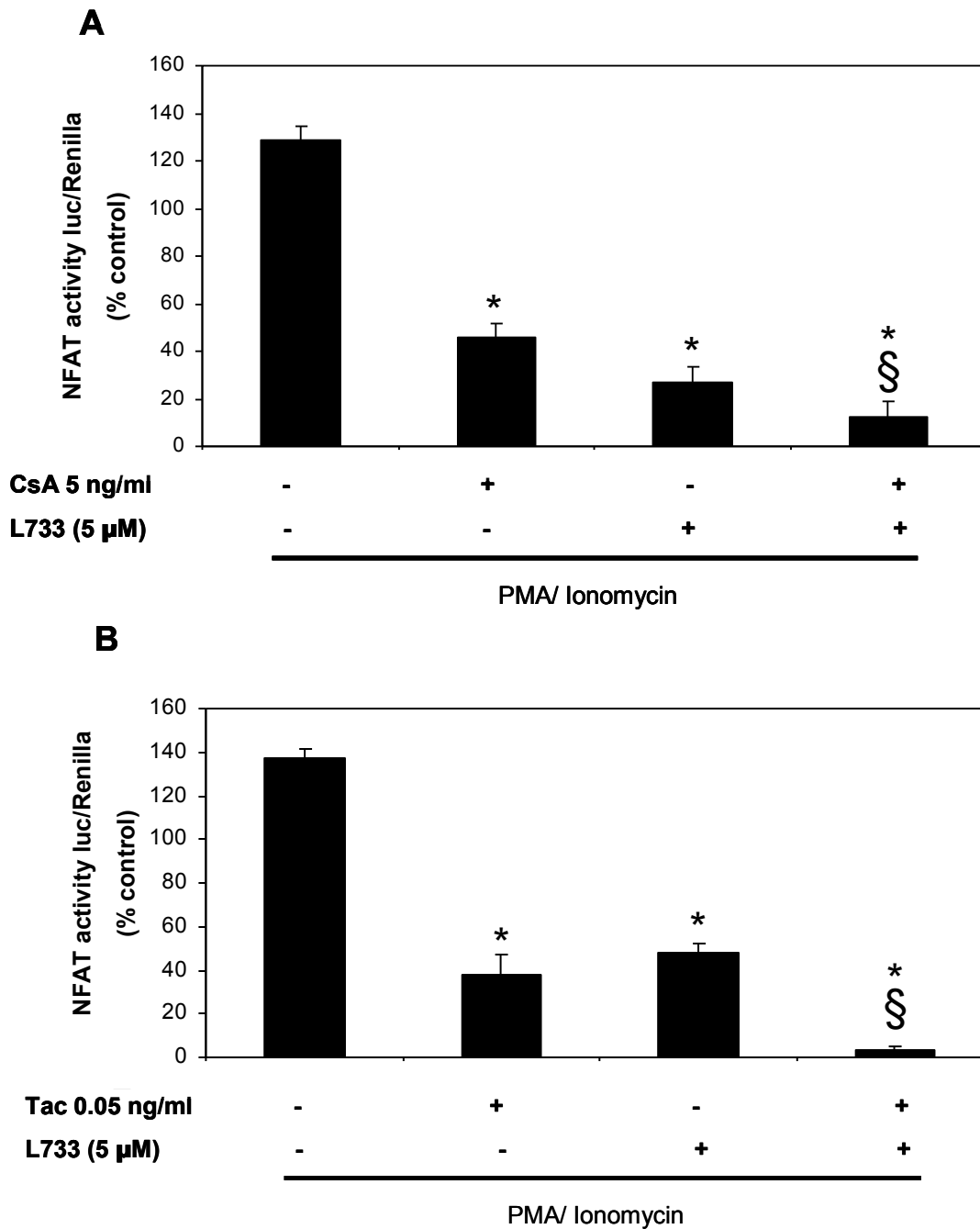


Figure 15 : Involvement of NK1R in the regulation of NFAT activity and effects of combining NK1R with calcineurin inhibitors. Jurkat cells were transiently transfected with NFAT-luc plasmid, and the empty vector PRL-TK to normalize transfection efficiency. Cells were then treated with CsA (A) or FK506 (Tacrolimus; Tac) (B) in the presence or absence of L-733,060

(L733) at 5 μ M. After 4h stimulation with PMA/CaI, cells lysates were analyzed for NFAT luciferase activity. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiences. Tukey test was used for statistical analyses. * $p < 0.01$ when compared to the control and $\S p < 0.05$ when compared with each drug alone.

Effects of blocking NK1R alone and in combination with immunosuppressors on T cells proliferation

The tachykinergic system NK1R/SP has been shown to enhance mitogen-induced human T cell proliferation [30]. Therefore, we have next examined whether the decrease in IL-2 synthesis and NFAT activity may be attributable to a reduced proliferation of Jurkat T cells in response to drugs treatments. We have used the CyQuant NF non-isotopic proliferation assay to which we included a standard curve to determine the absolute number of cells in cultures. Our data indicated that treatments of unstimulated Jurkat cells (Fig. 16A) or PMA/CaI stimulated cells (Fig. 16B) with CsA at 5 ng/ml or FK506 at 0.05 ng/ml (Fig. 16A) in the presence or absence of L-733,060 at 5 μ M have no significant effect on cell proliferation. Therefore, a potential cytotoxic effect due to the action of drugs alone or in combination in the presence of PMA/CaI stimulation is likely excluded to explain the inhibition of IL-2 synthesis and NFAT activity in response to cell treatments.

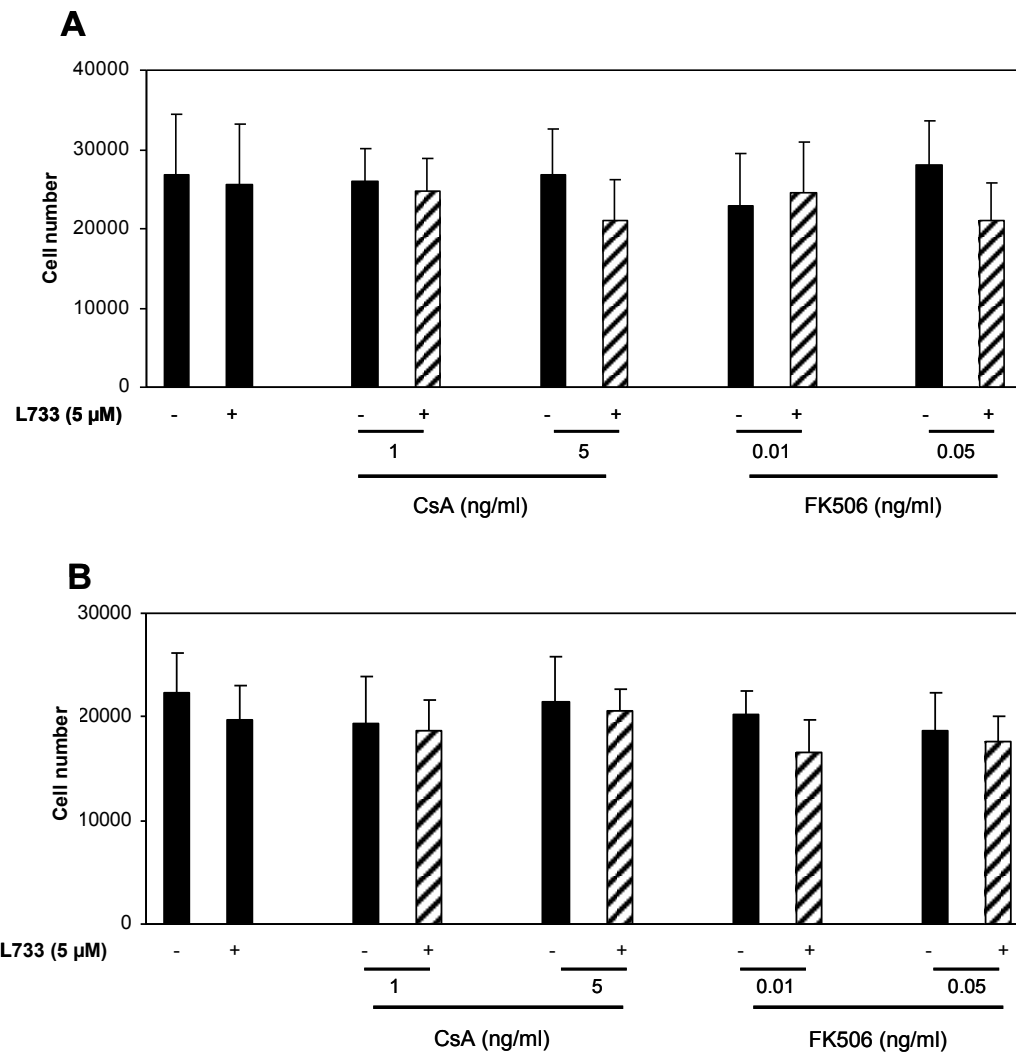


Figure 16 : Effects of calcineurin inhibitors and L-733,060 alone or in combination on Jurkat T cells proliferation. (A) Unstimulated cells and (B) PMA/CaI stimulated cells were treated with CsA, FK506 and L-733,060 alone or in combination for 24h. Cells proliferation was assessed using the CyQuant NF non-isotopic proliferation assay. Data are the means +/- SEM of 4 to 5 separate experiments.

Effects of blocking NK1R alone and in combination with immunosuppressors on T cells apoptosis

Finally, we have addressed whether the decrease in IL-2 synthesis and NFAT activity may be attributable to the induction of early apoptosis in stimulated T cells in response to drugs treatments. The apoptotic blebs assay was used to determine cell populations in early and late apoptosis stages by measuring breakup of the nucleus and the redistribution of nuclear fragments to blebs on the apoptotic cell surface [41]. Jurkat cells treated with camptothecin at 4 µg/ml were used as a positive control for T cell apoptosis. Flow cytometric analyses of three separate experiments indicated that, in contrast to camptothecin, treatments with FK506 at 0.05 ng/ml in the presence or absence of L-733,060 at 5 µM have no significant effect on basal levels of Jurkat cells apoptosis (Fig. 17). Furthermore, cell stimulation with PMA and CaI for 24h along with the different drugs treatments didn't induce significant apoptosis as compared to camptothecin. Therefore, the potential induction of early apoptosis is unlikely to be responsible for decreases in IL-2 synthesis and NFAT activity in cells in response to drugs treatments.

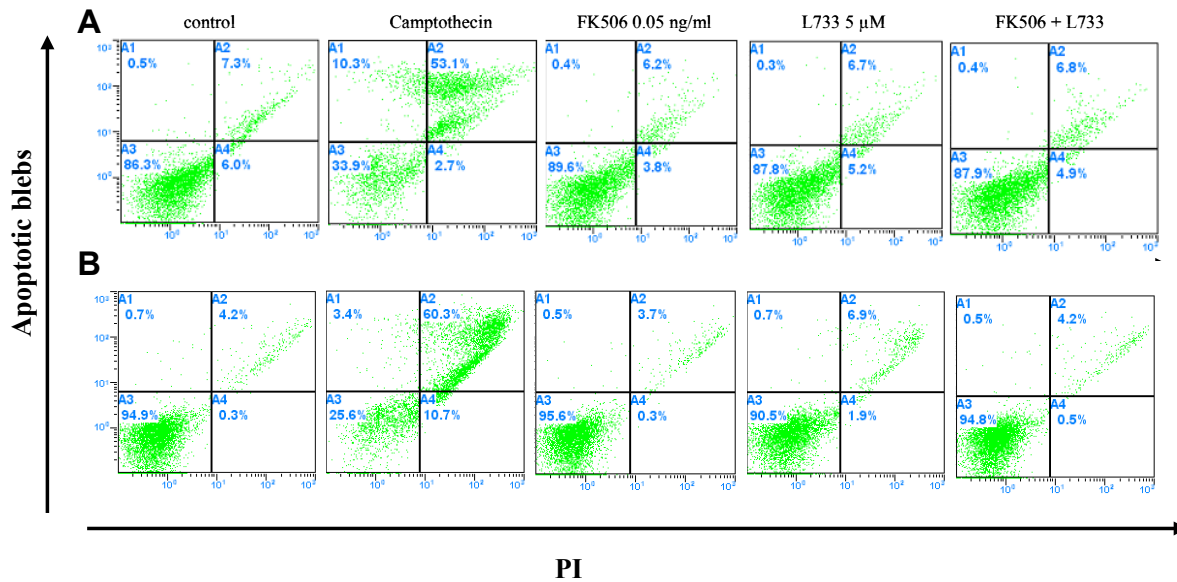


Figure 17: Effects of FK506 and L-733,060 alone or in combination on Jurkat T cells apoptosis. (A) Unstimulated cells and (B) PMA/CaI stimulated cells were treated with camptothecin (4 μg/ml), FK506 (0.05 ng/ml), L-733-606 (L733, 5 μM) and the combination FK506 + L733. Cells were stained with the scFv fusion protein detecting blebs on early and late apoptotic cells. Apoptotic cells are double stained and found in the quadrant A2, and viable cells in the quadrant A3. Cells treated with camptothecin were used as a positive control, and showed 53% of apoptotic cells after 24h. Data are representative of three separate experiments.

Interactions of NK1R with the mTOR signalling pathway

mTOR is a serine/threonine kinase that phosphorylates several downstream targets involved in the regulation of T cells functions. Among its targets, the p70S6 kinase activates the S6 ribosomal protein, an important factor that initiates ribosome biogenesis [8]. To study the

potential interaction of the NK1R signalling pathway with the mTOR pathway, we used the Luminex technology, which is highly sensitive to quantify levels of phosphorylation of multiple proteins in a single sample [42]. Our data indicated that blocking NK1R with L-733,060 (5 μ M) had no significant effect on the levels of mTOR Ser2448 and p70S6K Thr389 phosphorylation (Fig. 18). Surprisingly, blocking NK1R had a significant inhibitory effect on S6R Ser235/236, reducing by almost 50% its level of phosphorylation.

Because upstream activators of S6R were not affected when inhibiting NK1R activation, it is plausible that NK1 regulates S6R phosphorylation on the Ser235/236 residues independently of the mTOR pathway. To address this issue, the levels of phosphorylation of Akt on Ser473 residue, an upstream element of the mTOR pathway was examined. Our data indicated that the inhibition of NK1R activation with L-733,060 decreased by almost 50% the level of Akt Ser473 phosphorylation.

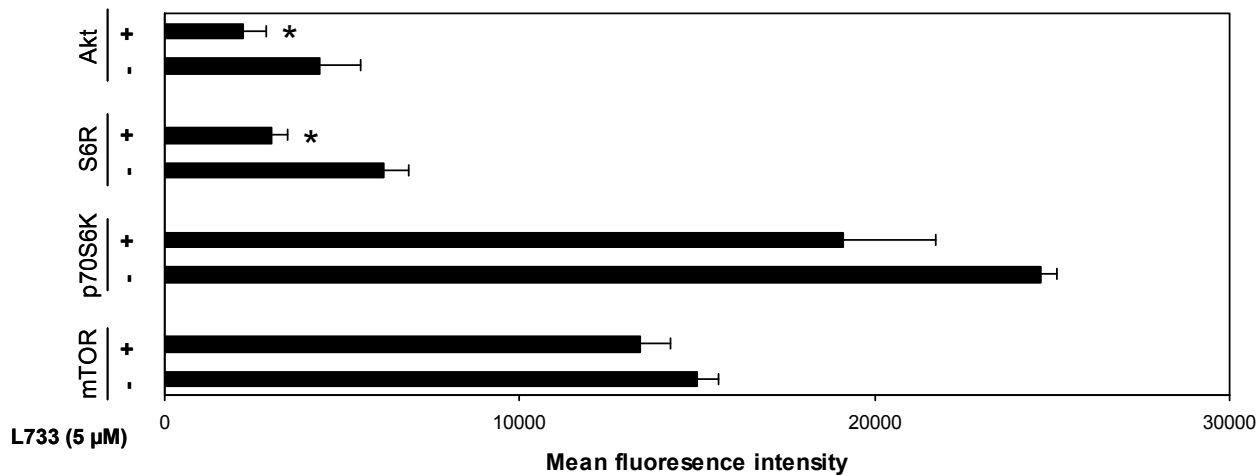


Figure 18: Role of NK1R in the regulation of mTOR, p70S6K, S6R and Akt activation. Jurkat cells were treated with the NK1R antagonist L-33,060 (L-733) at 5 μ M for 30 min. Cell

lysates were analyzed using the Luminex technology to quantify levels of phosphorylation of mTOR, p70S6K, S6R and Akt, and data were expressed as the mean of fluorescence intensity. Data are the mean +/- ESM of 7 independent experiments. Statistical significance was determined using paired, one tailed Student's t-test (* p<0.05).

Interactions of NK1R with Rapamycin-induced inhibition of mTOR signalling pathway

Since our results indicated that NK1R regulates S6R Ser235/236 and the Akt Ser473 phosphorylation independently of mTOR activation, we have next examined whether this receptor may interact with rapamycin to enhance its inhibition of the mTOR signalling pathway. Cells were treated with rapamycin at 1 nM and 10 nM in combination or not with the L-733,060 at 5 μ M, and data were expressed as the percentage of phosphorylation levels over the control condition (i.e. no drug treatment). As previously reported in the literature, rapamycin reduced levels of mTOR Ser2448 phosphorylation, and subsequently levels of phosphorylated p70S6K Thr389 and S6R Ser235/236 (Fig. 19). However, the Luminex technology allows us to demonstrate that a decrease of only 20 % of mTOR Ser2448 activity with rapamycin at 1 nM was enough to mostly abolish the phosphorylation of p70S6K and S6R, but not Akt Ser473 as expected (Fig. 19, lower right). Blocking NK1R activation with L-733,060 had no effect on rapamycin-decreased mTOR Ser2448 phosphorylation and subsequently p70S6K Thr389 (Fig. 19, upper left and right). Furthermore, there is no enhanced inhibition of S6R Ser235/236 and Akt Ser473, which further support our findings that NK1R regulates these two kinases independently of the mTOR pathway. Our data also indicate that a combination of NK1R antagonists with rapamycin may have no therapeutic application interest.

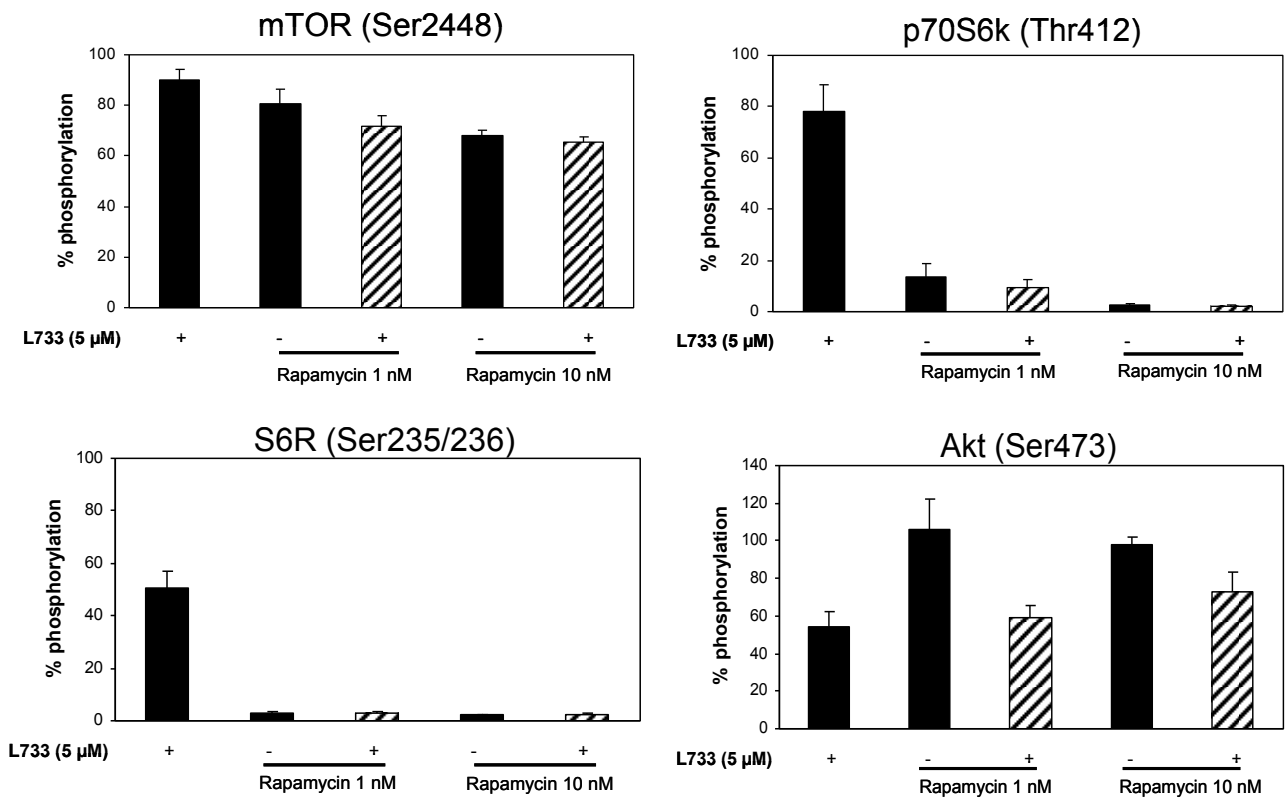


Figure 19 : Interactions of NK1R with Rapamycin-induced inhibition of mTOR signalling pathway. Jurkat cells were treated with the NK1R antagonist L-33,060 (L-733) at 5 μM and rapamycin at 0.1 and 1 nM for 30 min. Cell lysates were analyzed using the Luminex technology to quantify levels of phosphorylation of mTOR on Ser2448 (upper left), p70S6K on Thr412 (upper right), S6R on Ser235/236 (lower left) and Akt on Ser473 (lower right). Data are the mean +/- ESM of 7 independent experiments. Statistical significance was determined using paired, one tailed Student's t-test (* p<0.05).

Discussion

In this paper, we have studied the implication of the NK1R in different signalling pathways activating T cells functions. These pathways being the target of common immunosuppressors like CsA, FK506 and rapamycin.

The group of Lai and al. [21, 28] showed that human T lymphocytes isolated from peripheral blood express both NK1 receptor and its ligand the SP, suggesting the existence of an autocrine/paracrine activation of this tachykinergic system. First, we demonstrated the expression of the NK1R mRNA by PCR and protein by western blot in human Jurkat T cells. For the detection of *Tac1* gene, we used the same pair of primers that Lai and al. [28] used in their study. We did not detect any *Tac1* mRNA transcripts in three different cultures of Jurkat T cells by PCR. Then, Using a real time PCR (data not shown), we failed once again to detect the transcripts in Jurkat cells, showing that these cells do not express the *Tac1* gene.

The *Tac4* gene encodes a new family of tachykinins called endokinins (EK) [43]. Page and al. [27] showed their expression in a wide range of human peripheral tissues and cells. The *Tac4* gene encodes four-splice variants α , β , γ , and δ Tac4 that encode EKA, B, C and D; these peptides show high affinity for the NK1 receptor. We detected the expression of the mRNA of the *Tac4* gene in different cultures of Jurkat T cells. We used specific primers for all four-splice variants (data not shown) but only the δ Tac4 was detected in our clone of Jurkat cells while the group of Page found the γ Tac4 variant. These results might be divergent, but in fact these two splice variants encode the EKB that shows, along with EKA, the higher affinity for the NK1 receptor. Our data actually confirms that the Jurkat T cells clone express only the splice variants that encode for the EKB.

The presence of both *Tac1R* and *Tac4* genes and the absence of *Tac1* in these cells strongly

suggest that EKs are the SP-like autocrine agonist of the NK1R receptor. It also suggests the presence of an autocrine mechanism of activation. So, in contrary to most papers that studies NK1R activation, we did not add any exogenous ligand (i.e. SP) to activate the receptor since the cells are supposed to produce endogen EKB.

The NK1R belong to the family of G-protein coupled 7 transmembrane domain receptors, it mediate its biological by transduction pathways that activating several second message systems like inositol 1,4,5-triphosphate production and intracellular calcium release via phospholipase C, arachidonic acid mobilization via phospholipase A2 and cyclic adenosine accumulation via adenylyl cyclase [46-48].

Our results demonstrated the implication of NK1R in the calcineurin-NFAT signalling pathway, since the blockade of NK1R inhibits NFAT activation thus reducing IL-2 production in activated Jurkat T cells. To the best of our knowledge we're the first to report the implication of the NK1R signalling in the calcineurin pathway in T cells. Nerveless, several groups showed that NK1R activation activate NFAT in different types of neural cells like rat spinal cells and in HEK293 cells stably expressing NK1R [1, 31, 32]. Seybold and al. showed that the NK1 receptor activation in spinal neurons induces the expression of several genes implicated in nociception via the NFAT pathway, and that this NFAT-dependant gene expression can be blocked by the inhibition of calcineurin [31].

We have showed, in Jurkat T cells that the NK1R blockade inhibits IL-2 production. The NK1R antagonists have then immunosuppressive proprieties similar to those of CsA and FK506. The presence of the L-733,060 or L-703,060 with CsA or FK506 enhanced the

inhibitory effect of these immunosuppressive drugs on IL-2 production, for some of the tested concentrations. We next determined if the NK1R signalling pathway interfere with the calcineurin-NFAT pathway blocked by CsA and FK506. Using NFAT luciferase reporter assay we showed that the L-733,060 did inhibit NFAT activation, suggesting thereby that the NK1R signalling pathway acts on the calcineurin phosphatase activity. Furthermore, the presence of L-733,060 enhanced the inhibitory effects of calcineurin target drugs such as CsA and FK506, and the effect of the combination was different from the effect of each drug alone. We can suppose then that a synergic mechanism of action exist between the NK1R antagonist and the calcineurin-inhibitors via different signalling pathway. CsA and FK506 bind directly to calcineurin and disturb its tree-dimensional configuration; the result is an inactive enzyme [49]. The antagonist binds to the NK1R and inhibits signalling pathway that leads to calcineurin activation. The link between the NK1R and calcineurin is still under investigations; nerveless several hypotheses can be made. Meshki and al. [32] have shown that the stimulation of U373MG cells with SP increases the intracellular calcium concentration, and that increase can be blocked by adding aprepitant an NK1R antagonist (derivate from the L-733,060). Furthermore, Miyano and al. [50] showed that the NK1 receptor activation in spinal astrocytes induces calcium release from IP₃ sensitive intracellular calcium stores, and subsequent calcium influx through TRPC3. It is well known that the calcium signalling is crucial to calcineurin activation; hence the NK1R by increasing the intracellular calcium contributes to calcineurin-NFAT activation and IL-2 production.

Based on our results, we can suppose that the blockade of the NK1 receptor by specific antagonist, reduce the calcium release, which can lead to calcineurin inactivation.

Nevertheless, still little is known about the link between the NK1R and the calcium pathway in T cells, further investigations will be needed to demonstrate the effect of the NK1R on the calcium channel for example TRPC3 in T cells.

Jurkat cells mimic activated T lymphocytes after antigen recognition. Strauss et al. [51] showed that CsA and FK506 inhibited proliferation of naïve T cells, but had no effect on activated T cells. The same results were observed by Miller and al. [39]. Our data confirm these results, and the concentrations we used are 10 to 20 times lower than those used by Strauss. The group observed the similar results on T cells apoptosis where CsA and FK506 failed to induce cell apoptosis. Several reports demonstrate that CsA do not eliminate T cells but rather induces their anergy, thus explaining its immunosuppressive effect [52, 53]. Munoz and al. showed the inhibitory effect on cell proliferation and the apoptotic effect of several NK1R antagonists on different cancer cell lines [54-56]. While our results did not lead us to the same observations, we cannot exclude the effect of concentration used in our study. The L-733,060 at 5 μ M did not induce any apoptosis, but some unpublished data from our laboratory showed that at 10 μ M the antagonist induces apoptosis in a part of the cell population.

The immunosuppressive drug rapamycin, has a specific mechanism of action by inhibiting the mTOR signalling pathway. We used a highly sensitive assay based on the luminex technology to measure the phosphorylation level of different proteins in the mTOR pathway. As proven, rapamycin inhibits mTOR phosphorylation on ser2448, inhibiting thereby the phosphorylation of p70S6K on Thr389 and S6R on Ser235/236, but did not affect the phosphorylation level of Akt on Ser473 [57]. The blockade of the NK1R did not affect the mTOR protein nor its downstream target p70S6K, showing that the NK1R signalling does not

affect directly the mTOR kinase activity. The combination of both these drugs didn't result in a synergic inhibitory effect on mTOR, p70S6K and S6R, in fact their effect was not significantly different from the effect of the rapamycin alone. Since no increasing potential of the effect of rapamycin *in vitro* was reported, its combination with L-733,060 is not therapeutically interesting.

On another hand, it has been reported that the stimulation by SP of the NK1 receptor increases the phosphorylation of Akt in human glioblastoma cells, and that the addition of L-733,060 inhibits the basal kinase activity of Akt [34]. In Jurkat T cells we showed an inhibition of Akt phosphorylation on ser473 when treated with the L-733,060. The ser473 phosphorylation is an indicator of Akt kinase activity, once active Akt phosphorylates the Ser939 on the TSC2 complex (tuberous sclerosis complex 2) [58]. We measured the phosphorylation on Ser939 on TSC2 (data not shown) and found that the treatment with the NK1R antagonist did not affect its phosphorylation state. This shows that the reduction on Akt phosphorylation did not alter its kinase activity.

Interestingly, the L-733,060 had an inhibitory effect on the S6R protein but not on its upstream actor the p70S6K. Roux et al. have demonstrated that other kinases beside p70S6K might activate the S6 ribosomal protein like the RSK kinase [59]. The effect of L-733,060 on S6R might be due to the inhibition of RSK. This hypothesis is supported the fact that the NK1R pathway is know to activated the MAPK (ERK1/2, JNK and p38) in different cell types like mast cells [60]. The implication of the NK1R in the MAPK pathway may also explain the effect on Akt phosphorylation. Further investigations are needed to confirm this hypothesis.

In conclusion, we have showed the expression of both the NK1R and its ligand the

EKB in Jurkat T cells. This strongly suggests that the autocrine mechanism of activation of this receptor is blocked when the antagonists are added, the calcineurin-NFAT activation and IL-2 release. Further studies will be needed to complete our understanding of the implication of the NK1R in T cells functions. Thus, the combination of an NK1R antagonist with reduced dose of CsA and FK506 might open a new door in the improvement of graft rejection protocols.

Acknowledgments

This work has been supported by the VINVI programm for innovative projects, from the Canadian Institutes of Health Reaserch (CIHR).

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

Reference

1. Beinborn, M., et al., *TGF-beta regulates T-cell neurokinin-1 receptor internalization and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4293-8.
2. Handschumacher, R.E., et al., *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 1984. **226**(4674): p. 544-7.
3. O'Keefe, S.J., et al., *FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 692-4.
4. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
5. Siekierka, J.J., et al., *FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin*. J Immunol, 1989. **143**(5): p. 1580-3.
6. Sabers, C.J., et al., *Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 815-22.
7. McMahon, G., et al., *The evolving role of mTOR inhibition in transplantation tolerance*. J Am Soc Nephrol. **22**(3): p. 408-15.
8. Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar, *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks*. Biochem J, 2012. **441**(1): p. 1-21.
9. Jastrzebski, K., et al., *Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function*. Growth Factors, 2007. **25**(4): p. 209-26.
10. Bennett, W.M. and D.J. Norman, *Action and toxicity of cyclosporine*. Annu Rev Med, 1986. **37**: p. 215-24.
11. Napoli, K.L. and P.J. Taylor, *From beach to bedside: history of the development of sirolimus*. Ther Drug Monit, 2001. **23**(5): p. 559-86.
12. Naesens, M., D.R. Kuypers, and M. Sarwal, *Calcineurin inhibitor nephrotoxicity*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(2): p. 481-508.
13. Kovarik, J.M., et al., *Differential pharmacokinetic interaction of tacrolimus and cyclosporine on everolimus*. Transplant Proc, 2006. **38**(10): p. 3456-8.
14. Martin-Martin, N., et al., *Sirolimus and cyclosporine A alter barrier function in renal proximal tubular cells through stimulation of ERK1/2 signaling and claudin-1 expression*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F672-82.
15. Almeida, T.A., et al., *Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships*. Curr Med Chem, 2004. **11**(15): p. 2045-81.
16. Pennefather, J.N., et al., *Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family*. Life Sci, 2004. **74**(12): p. 1445-63.
17. Moussaoui, S.M., et al., *Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment*. Neuroscience, 1992. **48**(4): p. 969-78.
18. Linnik, M.D. and M.A. Moskowitz, *Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells*. Peptides, 1989. **10**(5): p. 957-62.
19. Maghni, K., et al., *Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(1): p. 103-10.

20. Bandari, P.S., et al., *Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells*. Neuropeptides, 2002. **36**(1): p. 13-21.
21. Lai, J.P., S.D. Douglas, and W.Z. Ho, *Human lymphocytes express substance P and its receptor*. J Neuroimmunol, 1998. **86**(1): p. 80-6.
22. Maggi, C.A. and T.W. Schwartz, *The dual nature of the tachykinin NK1 receptor*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(10): p. 351-5.
23. Chang, M.M. and S.E. Leeman, *Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P*. J Biol Chem, 1970. **245**(18): p. 4784-90.
24. Harrison, S. and P. Geppetti, *Substance p*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(6): p. 555-76.
25. Severini, C., et al., *The tachykinin peptide family*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 285-322.
26. Kangawa, K., et al., *Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **114**(2): p. 533-40.
27. Page, N.M., et al., *Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6245-50.
28. Lai, J.P., et al., *Quantification of substance P mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes using a mimic-based RT-PCR*. J Immunol Methods, 1999. **230**(1-2): p. 149-57.
29. Nowicki, M., D. Ostalska-Nowicka, and B. Miskowiak, *In vitro substance P-dependent induction of bone marrow cells in common (CD10) acute lymphoblastic leukaemia*. Leuk Res, 2008. **32**(1): p. 97-102.
30. Rameshwar, P., P. Gascon, and D. Ganea, *Immunoregulatory effects of neuropeptides. Stimulation of interleukin-2 production by substance p*. J Neuroimmunol, 1992. **37**(1-2): p. 65-74.
31. Seybold, V.S., et al., *Substance P initiates NFAT-dependent gene expression in spinal neurons*. J Neurochem, 2006. **97**(2): p. 397-407.
32. Meshki, J., et al., *Substance P induces rapid and transient membrane blebbing in U373MG cells in a p21-activated kinase-dependent manner*. PLoS One. **6**(9): p. e25332.
33. Foster, K.G. and D.C. Fingar, *Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony*. J Biol Chem. **285**(19): p. 14071-7.
34. Akazawa, T., et al., *A constitutively active form of neurokinin 1 receptor and neurokinin 1 receptor-mediated apoptosis in glioblastomas*. J Neurochem, 2009. **109**(4): p. 1079-86.
35. Clipstone, N.A. and G.R. Crabtree, *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 695-7.
36. Koizumi, T., et al., *Inhibitors of IL-2 production and IL-2 receptor expression in human leukemic T-cell line, Jurkat*. Cell Immunol, 1986. **103**(2): p. 469-75.
37. Cascieri, M.A., et al., *Characterization of the binding of a potent, selective, radioiodinated antagonist to the human neurokinin-1 receptor*. Mol Pharmacol, 1992. **42**(3): p. 458-63.
38. Rupniak, N.M., et al., *Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the*

- NK1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils.* Pain, 1996. **67**(1): p. 189-95.
39. Miller, J.L. and S.G. Ericson, *Cyclosporin a and tacrolimus (FK506) differentially alter T-cell receptor expression in vivo.* Immunopharmacol Immunotoxicol, 2007. **29**(1): p. 105-18.
 40. Jain, J., C. Loh, and A. Rao, *Transcriptional regulation of the IL-2 gene.* Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 333-42.
 41. Cocca, B.A., A.M. Cline, and M.Z. Radic, *Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens.* J Immunol, 2002. **169**(1): p. 159-66.
 42. VanDerMeid, K.R., et al., *A method to extract cytokines and matrix metalloproteinases from Schirmer strips and analyze using Luminex.* Mol Vis. **17**: p. 1056-63.
 43. Chiang, G.G. and R.T. Abraham, *Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase.* J Biol Chem, 2005. **280**(27): p. 25485-90.
 44. Isotani, S., et al., *Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro.* J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34493-8.
 45. Zhang, Y., et al., *Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis.* Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 392-7.
 46. Mitsuhashi, M., et al., *Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor.* J Neurosci Res, 1992. **32**(3): p. 437-43.
 47. Munoz, M., M. Rosso, and R. Covenas, *A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists.* Curr Med Chem. **17**(6): p. 504-16.
 48. Takeda, Y., et al., *Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in Chinese hamster ovary cells and evidence for differential stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic AMP second messenger responses.* J Neurochem, 1992. **59**(2): p. 740-5.
 49. Braun, W., et al., *Three-dimensional structure and actions of immunosuppressants and their immunophilins.* FASEB J, 1995. **9**(1): p. 63-72.
 50. Miyano, K., et al., *Activation of the neurokinin-1 receptor in rat spinal astrocytes induces Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores and extracellular Ca²⁺ influx through TRPC3.* Neurochem Int. **57**(8): p. 923-34.
 51. Strauss, G., W. Osen, and K.M. Debatin, *Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs.* Clin Exp Immunol, 2002. **128**(2): p. 255-66.
 52. Prud'homme, G.J., et al., *Effects of cyclosporin A, rapamycin, and FK520 on peripheral T-cell deletion and anergy.* Cell Immunol, 1995. **164**(1): p. 47-56.
 53. Koenen, H.J., E. Fasse, and I. Joosten, *Cyclosporine preserves the anergic state of human T cells induced by costimulation blockade in vitro.* Transplantation, 2005. **80**(4): p. 522-9.
 54. Munoz, M., et al., *Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines.* Melanoma Res, 2004. **14**(3): p. 183-8.
 55. Munoz, M., et al., *The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines.* Neuropeptides, 2005. **39**(4): p. 427-32.
 56. Munoz, M., et al., *Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines.*

- Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(7): p. 2567-70.
57. Esteban, F., et al., *Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression.* Histopathology, 2009. **54**(2): p. 258-60.
 58. Guertin, D.A., et al., *Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1.* Dev Cell, 2006. **11**(6): p. 859-71.
 59. Roux, P.P., et al., *RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation.* J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14056-64.
 60. Fang, X., et al., *An involvement of neurokinin-1 receptor in FcepsilonRIota-mediated RBL-2H3 mast cell activation.* Inflamm Res.

Chapitre 7. Discussion

La découverte de nouveaux mécanismes de régulation de la calcineurine et de mTOR dans les cellules T est importante pour établir de nouvelles stratégies conduisant à réduire les doses thérapeutiques des immunosuppresseurs tout en conservant leurs efficacités. Ainsi, dans le but de développer de nouvelles stratégies, nous avons adoptée de cibler le NK1R du fait de son rôle dans la régulation des cellules T, et que l'étude du système tachykinergique est l'une des thématiques de recherche du laboratoire.

Dans notre étude nous avons tout d'abord évalué l'implication du NK1R dans les cascades de signalisation qui sont inhibées par les immunosuppresseurs les plus utilisés: la cyclosporine, le tacrolimus et la rapamycine. Nous avons ensuite déterminé l'existence ou non d'un effet de combinaison d'antagonistes du NK1R avec chacun des ces immunosuppresseurs.

Afin de valider le modèle cellulaire utilisé pour étudier l'activation autocrine du NK1R et son implication dans les cascades de signalisation des immunosuppresseurs, il a fallu démontrer son expression ainsi que celle de ses ligands. En effet, l'expression concomitante du NK1R et de l'un de ses ligands, la SP, a été démontrée dans plusieurs types cellulaires d'origine neurale et non-neurale suggérant l'existence d'un mécanisme d'activation autocrine de ce récepteur. L'expression du gène *Tac1R* a été montrée chez les lymphocytes T humains isolés du sang, ainsi que les quatre transcrits α , β , δ et γ du gène *Tac1* codant pour la SP. Malgré la sensibilité de la technique de PCR en temps réel utilisée, la quantité détectée pour ces transcrits fut très faible ne dépassant pas les 120 molécules. Nous avons démontré l'expression du gène *Tac1R* chez les cellules Jurkat au niveau de son transcrit et de la protéine. Par contre, nous n'avons pas détecté l'expression du gène *Tac1* chez ces cellules. Cependant, la SP n'est pas le seul ligand connu du NK1R, les EKs peuvent également activer le NK1R. Ainsi, nous avons montré l'expression du transcrit δ du gène *Tac4* qui code pour l'EKB. L'expression du système tachykinergique EKB/NK1R suggère fortement l'existence de mécanisme d'activation autocrine chez ces cellules.

Une revue critique du Dr Nigel Page sur les endokinines soulève un point pertinent sur l'homologie des séquences entre la SP et les endokinines, et ainsi l'identification du gène

(Tac1 ou Tac4) exprimé. Ainsi, il a montré que plusieurs anticorps anti-SP reconnaissent les EKs avec une réactivité croisée de 100% avec la séquence C-terminale de l'EKA/B humaine et 70% de réactivité avec l'HK-1 de la souris et du rat [189]. L'existence de cette réactivité croisée des anticorps anti-SP remet donc en question les conclusions des études comportant des mesures de l'expression de la SP par des immuno-essais (histochimie ou ELISA par exemple) dans divers types de tissus et de cancers [198, 232].

Afin d'étudier l'implication du NK1R dans la voie de signalisation de la calcineurine, nous avons bloqué l'activation du NK1R par des antagonistes sélectifs comme le L-733,060 et le L-703,606; ces deux antagonistes possédant des structures chimiques différentes. Nous avons sélectionné cette stratégie puisque les cellules Jurkat expriment à la fois le NK1R et l'EKB indiquant qu'un antagoniste sélectif du NK1R devrait altérer les mécanismes cellulaires induits par une activation autocrine de ce système tachykinergique.

La CsA et le tacrolimus inhibent la production d'IL-2 des cellules T en interférant avec l'activité enzymatique de la calcineurine. Dans notre étude, les concentrations choisies de CsA et de tacrolimus sont 10 fois inférieures aux doses thérapeutiques administrées aux patients [233]. Comme attendu, nos résultats montrent que la CsA et le tacrolimus inhibent presque complètement la production de l'IL-2 des cellules Jurkat stimulées par le PMA/CaI (Phorbol myristate acétate/calcium ionophore). L'antagoniste du NK1R, le L-733,060 inhibe aussi d'une façon concentration dépendante cette synthèse d'IL-2. Nous avons confirmé ce résultat en utilisant un autre antagoniste du NK1R, le L-703,606. Nos résultats démontrent que le récepteur NK1 est impliqué dans la voie de synthèse de cette cytokine. L'inhibition du NK1R interfère également avec l'activité NFAT ce qui confirme l'implication de ce récepteur dans le contrôle de l'expression de l'IL-2. Fait intéressant, le L-733,060 est aussi efficace que la CsA et le tacrolimus sur l'inhibition du NFAT. Ainsi, la voie de signalisation du NK1R interagit avec la voie de la calcineurine chez les cellules T.

La combinaison de l'antagoniste NK1R à la CsA ou au tacrolimus augmente l'effet inhibiteur sur la production d'IL-2 pour certaines combinaisons. La combinaison (CsA 5 ng/ml +L733 5 µM et FK506 0.05 ng/ml +L733 5 µM) augmente aussi l'effet inhibiteur sur l'activité NFAT. D'ailleurs l'analyse statistique par comparaisons multiples, nous indique que l'effet de la

combinaison est différent de celui de chacune des deux drogues seules.

Récemment, il a été reporté que la stimulation du NK1R avec la SP augmentait l'activité de la voie des facteurs de transcription NFAT et AP-1 chez les cellules HEK293, cette activité serait augmentée en présence du TGF- β [234]. Le TGF- β en retardant l'internalisation du récepteur activée par la SP augmente l'activité de NFAT. Cette étude démontre donc l'existence d'un lien entre l'activation du NK1R et le NFAT.

Nous ignorons actuellement par quel mécanisme intracellulaire le NK1R pourrait moduler l'activité de la calcineurine. Le NK1R est un récepteur couplé aux protéines G_q qui active la PLC, la résultante est une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire. Le groupe de Miyano a démontré que chez les astrocytes de rat l'activation du NK1R par la SP induisait une augmentation de la relâche du calcium des réservoirs intracellulaires et une augmentation de l'efflux calcique via les canaux TRPC3 (canonical transient receptor potential 3) [235]. Ce signal calcique serait responsable des fonctions physiologiques de la SP au niveau des neurones quant à la transmission de la douleur et de la modulation synaptique. Des observations similaires ont été réalisées au niveau des cellules endothéliales dermiques humaines. En effet, Quinlan et coll. ont montré que la stimulation du NK1R par la SP augmentait la transcription des gènes d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 en activant la voie de NFAT et de NF- κ B. Cette activation serait dépendante de la mobilisation calcique car l'ajout d'un chélateur de calcium inhibe la liaison du NFAT et de NF- κ B aux promoteurs de ICAM-1 et VCAM-1 empêchant ainsi leur transcription [231]. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un mécanisme similaire se produirait chez les cellules Jurkat. L'engagement du TCR augmente l'influx calcique dans la cellule nécessaire à l'activation de plusieurs gènes impliqués dans la reconnaissance antigénique. Il est possible que chez les cellules Jurkat l'activation du NK1R par l'EKB viendrait potentialiser le signal induit lors de l'engagement du TCR poussant les signaux calciques à leur capacité maximale. Bien entendu, des études prouvant un lien entre les canaux calciques et le NK1R chez les lymphocytes T seront à réaliser pour valider cette hypothèse.

Une deuxième hypothèse quant à l'implication du NK1R dans la voie de la calcineurine peut être avancée, celle-ci impliquerait les espèces réactives d'oxygène (ROS).

En effet, *in vivo* la calcineurine interagit avec une enzyme la superoxyde dismutase (SOD) à cuivre/zinc [236]. Elle est d'ailleurs essentielle pour l'activité de la calcineurine car cette dernière contient dans son centre métallique un atome de Fe^{2+} sensible à l'oxydoréduction. Ainsi, après une activation par le calcium, le Fe^{2+} est oxydé par des espèces oxygénés et rend l'enzyme inactive. La SOD protège donc la calcineurine contre une inactivation oxydative [237]. Reiter et Rusnak ont démontré que le traitement des lymphocytes T avec le peroxyde d'hydrogène inactivait à 90% l'activité calcineurine et NFAT. Au delà d'un niveau seuil d'espèces réactives, la SOD devient saturée et l'activité calcineurine est abolie [238]. D'autre part, une étude de Springer a démontré que l'activation du NK1R par la SP induisait la formation de ROS dans des cellules pulmonaires de souris, et que ces ROS étaient associés à l'inflammation de l'épithélium pulmonaire [239]. Une autre étude de Brooks, a démontré l'implication spécifique du NK1R dans la production des ROS chez les mastocytes murins; l'utilisation d'agonistes spécifiques au NK1R augmentant cette production. Les antagonistes du NK1R diminuent les ROS et le stress oxydatif chez les mastocytes. Il est intéressant de noter que les agonistes et les antagonistes spécifiques du NK2R sont sans effet sur la production des ROS, prouvant ainsi la spécificité d'action du NK1R dans la génération des ROS [240]. Ainsi, du fait de l'implication du NK1R dans la formation de ROS, ce dernier pourrait moduler l'activité calcineurine. L'implication des ROS dans le mécanisme responsable de la modulation de l'activité de NFAT et de la synthèse d'IL-2 par le système tachykinergique EKB/NK1R est l'une des avenues de recherche qui sera étudiée dans la suite de ce projet.

En résumé, nous avons démontré que le NK1R interagit avec la voie de la calcineurine et de la synthèse d'IL-2 chez les cellules Jurkat stimulées. De plus, la combinaison d'un antagoniste NK1R avec la CsA et le FK506 permet de réduire la concentration de ces immunosuppresseurs tout en ayant un effet inhibiteur semblable à celui d'une concentration supérieure de ce même immunosuppresseur. Cela serait ainsi une approche pharmacologique et thérapeutique potentiellement intéressante afin de réduire les doses administrées aux sujets transplantés.

Nous nous sommes ensuite assurés par la mesure de la prolifération et de l'apoptose que les traitements avec les immunosuppresseurs, le L-733,060 et leur combinaison n'induisaient pas de toxicité cellulaire, ce qui aurait pu expliquer la diminution de l'activité NFAT et la synthèse de l'IL-2. Nous n'avons observé aucune diminution significative de la prolifération des cellules ni de l'induction d'une mort cellulaire par apoptose ou nécrose en présence de ces traitements. Ces résultats pourraient s'expliquer du fait de l'état d'activation des cellules Jurkat qui sont constamment activées de manière similaire à l'engagement du TCR. En effet, une étude de Strauss a démontré que la CsA et le tacrolimus à une concentration de 100 ng/ml inhibaient la prolifération des cellules T naïves, mais restaient sans effet sur les cellules T activées [241]. Les concentrations que nous avons utilisées sont 10 et 20 fois inférieures à celle utilisée dans cette étude. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet sur la prolifération suite au traitement avec ces immunosuppresseurs. D'autre part, le même groupe de chercheurs a démontré que des concentrations élevées de CsA et de tacrolimus (supérieures à 1000 ng/ml) pouvaient induire un faible taux d'apoptose (environ 10%). Cet effet est négligeable lorsque comparé à l'effet de la méthotrexate qui à des faibles concentrations peut induire plus de 50% d'apoptose chez les cellules T [241]. Ainsi, les faibles concentrations utilisées de CsA et de tacrolimus dans notre étude expliqueraient l'absence d'apoptose. D'ailleurs, il a été démontré que les inhibiteurs de la calcineurine n'induisent pas l'apoptose des lymphocytes T, mais agissent uniquement au niveau du 1^{er} signal en induisant un état d'anergie [242, 243].

Nous avons observé des résultats similaires suite au traitement des cellules Jurkat avec le L-733,060 à savoir l'absence d'effet sur la prolifération et aucune induction d'apoptose. Cependant, plusieurs études démontrent un effet apoptotique et antiprolifératif du L-733,060 sur différents types de cellules cancéreuses de glioblastome, rétinoblastome, neuroblastome et mélanome [197, 244, 245]. Cependant, les concentrations de L-733,060 qui inhibent significativement la prolifération cellulaire et induisent l'apoptose se situent au delà de 20 μ M. La concentration de 5 μ M du L-733,060 sélectionnée pour nos traitements en combinaison est sans doute trop faible pour activer la cascade d'apoptose comme le démontre nos résultats en cytométrie en flux.

Un autre volet de ce projet fut l'étude de l'interaction de la voie de signalisation du NK1R avec celle de la mTOR qui est inhibée par la rapamycine. Notre stratégie fut similaire à savoir, bloquer le NK1R avec un antagoniste sélectif, le L-733,060, et étudier l'effet de ce blocage sur les protéines de la voie de mTOR. Ensuite, nous avons voulu déterminer l'existence ou non d'un effet de combinaison entre l'antagoniste du NK1R et la rapamycine.

La rapamycine agit en inhibant l'activité kinase de la protéine mTOR l'empêchant de phosphoryler ses substrats afin de les activer. Parmi les substrats de la mTOR, nous avons mesuré l'activité de la p70S6K et de la S6R. En fait, le niveau de phosphorylation de la p70S6K sur le résidu Thr412 reflète directement l'activité de mTOR [246]. L'existence d'un niveau basale de phosphorylation des résidus Ser2448 de mTOR, Thr412 de la p70S6K et Ser235/236 de la S6R nous indique que la voie de mTOR est active chez les cellules Jurkat en absence d'un stimulus externe. De plus, l'ajout de la rapamycine inhibe de façon concentration-dépendante le niveau de phosphorylation de ces résidus. Grâce à la sensibilité de la technologie Luminex utilisée pour ces mesures des niveaux de phosphorylation nous pouvons pu quantifier plus précisément l'effet de la rapamycine sur les niveaux de la phosphorylation de la voie de mTOR.

Comme attendu, nos résultats confirment que la rapamycine bloque effectivement l'activité kinase de la mTOR qui se traduit par une diminution de la phosphorylation du résidu Ser2448. Cependant, la phosphorylation de ce résidu n'est pas complètement abolie suite au traitement avec la rapamycine car 80% de la phosphorylation de Ser2448 est toujours présente. Il est intéressant de noter que cette faible réduction semble suffisante pour induire l'inhibition totale de la phosphorylation en Thr412 de la p70S6K directement phosphorylée par mTOR. Il en de même pour les résidus Ser235/236 de la S6R qui sont phosphorylés par la p70S6K.

L'effet minimal de la rapamycine sur la phosphorylation de mTOR en Ser2448, mais maximal sur les protéines en aval peut être expliqué de différentes façons :

- 1- Le résidu Ser2448 fait partie de l'un des nombreux résidus critiques à l'activité mTOR. En effet, plusieurs autres sites sur mTOR sont essentiels à son activité kinase comme les résidus Ser2484, Ser1261 et Thr2446 [247]. Une réduction simultanée de tous ces sites sous l'effet de la rapamycine (10 nM) pourrait expliquer l'inhibition quasi-totale de

la phosphorylation, et sans doute de l'activité, de la p70S6K et la S6R.

- 2- Il est difficile de déterminer avec exactitude quel est le niveau de phosphorylation seuil en deçà duquel l'enzyme perd son activité *in vivo*. Une perte même minime de la phosphorylation du résidu Ser2448 sur mTOR pourrait être suffisante pour abolir son activité kinase.

Cette dernière hypothèse pourrait expliquer l'effet de l'antagoniste du NK1R sur la voie de signalisation de mTOR. En effet, le L-733,060 inhibe de 10% environ la phosphorylation de mTOR et de p70S6K. Cette faible inhibition est cependant suffisante pour inhiber la phosphorylation de la S6R. Une hypothèse peut être avancée pour expliquer ce résultat: la phosphorylation de la S6R sur les résidus Ser235/236 peut être effectuée par une autre kinase de la voie des MAP kinases nommée RSK. Roux et collaborateurs ont démontré que ces résidus peuvent être phosphorylés indépendamment de la p70S6K [248]. En bloquant la voie du NK1R, il serait possible d'altérer la voie des MAPK et par la suite la RSK. Cette hypothèse est plausible puisque le NK1R active la voie des MAPK (ERK 1/2, JINK et p38) dans d'autres types cellulaires [176, 249, 250]. L'implication de la voie des MAPK et de RSK dans le mécanisme responsable de la modulation de la phosphorylation de S6R par le système tachykinergique EKB/NK1R est l'une des avenues de recherche qui sera étudiée dans la suite de ce projet.

En résumé, nous avons montré que la voie de signalisation intracellulaire du NK1R n'interagit pas directement avec la voie de la mTOR. En outre, l'effet de la combinaison de l'antagoniste du NK1R avec la rapamycine n'est pas différent de l'effet de la rapamycine seule. Ainsi, aucun effet de combinaison n'a été observé.

Nous nous sommes alors intéressés à étudier la possibilité que le NK1R agirait sur les voies en amont de mTOR à savoir la voie des PI3K qui active l'Akt. L'Akt est un oncogène qui régule la prolifération et la survie cellulaire. De nombreux signaux mitogéniques activent la PI3K ce qui mène à l'accumulation du PIP3 et à l'activation de l'Akt. L'Akt phosphoryle sur le résidu Ser939 la TSC2 (tubérine) et elle inhibe son activité GAP permettant l'activation subséquente de mTOR [251]. La rapamycine n'a aucun effet sur la phosphorylation des protéines de la voie en amont de celle de la mTOR. Nos résultats le confirment puisque les niveaux de

phosphorylation de l'Akt sur le résidu Ser473 et TSC2 sur le résidu Ser939 suite au traitement avec la rapamycine ne diffèrent pas des niveaux de base. Cependant, l'inhibition du NK1R par l'antagoniste réduit la phosphorylation de l'Akt en Ser473 de manière significative. Cependant, l'activité kinase de l'Akt n'est pas affectée puisque la phosphorylation du résidu Ser939 de TSC2 ne fut pas réduite. Ces données viennent supporter l'hypothèse que la voie de NK1R n'affecte pas directement celle de la mTOR, mais agirait plutôt sur celle de l'Akt. Cette hypothèse est plausible puisque le NK1R active l'Akt sur le résidu Ser473 dans d'autres types cellulaires [197, 245]. Ainsi, nos résultats permettent d'expliquer que la combinaison de la rapamycine avec un antagoniste du NK1R n'affecterait pas l'effet de cet immunosuppresseur malgré l'effet inhibiteur sur l'Akt sur le résidu Ser473.

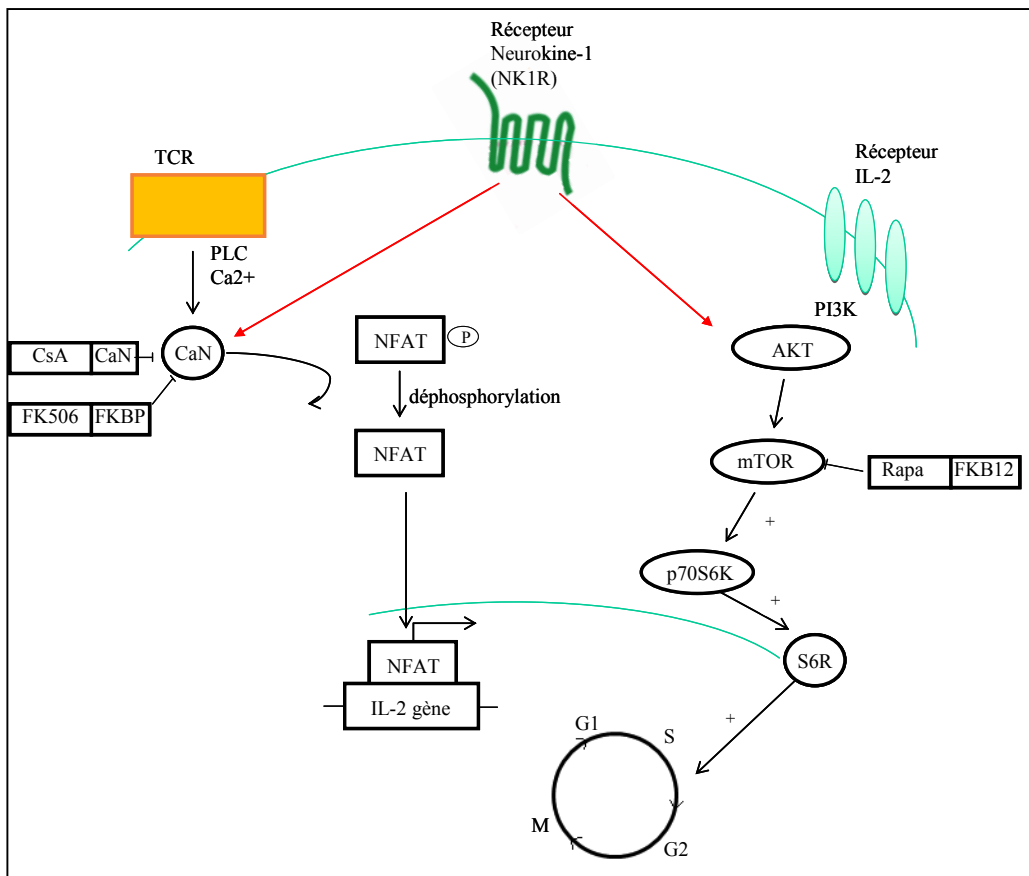


Figure 20 : Interaction de la voie de signalisation du NK1R avec la voie de la calcineurine, et de la mTOR.

Comme tout modèle expérimental, il existe des limites au modèle cellulaire choisi. En effet, les cellules Jurkat sont différentes des cellules T primaires notamment à cause de nombreuses modifications génétiques qui font en sorte que le TCR est activé en permanence. De plus, les Jurkat sont des cellules cancéreuses obtenus à partir d'un lymphome d'un patient, ainsi elles possèdent des caractéristiques différentes que celles des cellules T CD4+ naïves ou effectrices. Néanmoins, comme indiqué dans ce mémoire, elles ont été utilisées dans les premières études sur les mécanismes d'action des immunosuppresseurs et continuent d'être un modèle cellulaire utilisé. Toutefois, d'autres études *in vitro* sur des cellules T issues du sang périphériques seront effectuées afin de déterminer l'efficacité des antagonistes du NK1R et de la combinaison, et les mécanismes intracellulaires associés.

En conclusion, notre étude a montré a) l'implication du NK1R dans la régulation de l'activité de NFAT et de la synthèse d'IL-2 et b) un effet fort intéressant de la combinaison d'un antagoniste du NK1R avec les inhibiteurs de la calcineurine. Il serait pertinent par la suite de déterminer l'effet de cette combinaison *in vivo* dans un modèle animal de greffe, par exemple la greffe de rein chez le rat. Cette combinaison aurait un intérêt thérapeutique futur si elle permettait de réduire les doses d'immunosuppresseurs du type inhibiteur de la calcineurine administrés aux sujets greffés tout en conservant l'efficacité du traitement antirejet.

Conclusion :

Notre étude confirme le rôle important du NK1R dans la régulation des fonctions des cellules immunitaires, en particulier dans ce cas chez les cellules T. Elle a permis aussi d'identifier les mécanismes d'interactions ou non avec celles de la calcineurine et de la mTOR. Plus particulièrement, notre étude a démontré que:

- L'activation du NK1R, fort probablement de manière autocrine via les endokinines, est impliquée dans l'activation du NFAT et la synthèse de l'IL-2;
- Le blocage pharmacologique du NK1R par un antagoniste spécifique inhibe l'activation du NFAT et par conséquent de l'activité enzymatique de la calcineurine;
- La combinaison d'un antagoniste du NK1R avec des immunosuppresseurs de type inhibiteurs de la calcineurine (CsA, tacrolimus) augmente l'inhibition de l'activité NFAT et la synthèse de l'IL-2 tout en réduisant la concentration de ces immunosuppresseurs;
- La voie de signalisation du NK1R n'affecte pas directement l'activité kinase de mTOR ni de son substrat la p70S6K, puisque l'inhibition pharmacologique du NK1R fut sans effet sur le niveau de leur phosphorylation respective. Par contre, l'inhibition de ce récepteur inhibe l'Akt et la S6R par une voie qui serait probablement dépendante des MAPK;
- La combinaison de la rapamycine avec un antagoniste du NK1R n'augmente pas son effet immunosuppresseur;
- La combinaison des immunosuppresseurs de type inhibiteurs de la calcineurine avec un antagoniste du NK1R pourrait être une approche thérapeutique intéressante pour la

réduction des doses administrées aux sujets greffés, et de ce fait des effets secondaires associés.

Bibliographie :

1. Heeger, P.S. and R. Dinavahi, *Transplant immunology for non-immunologist*. Mt Sinai J Med, 2012. **79**(3): p. 376-87.
2. Zehn, D., et al., *TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(10): p. 1565-75.
3. Kindt, T.J., Goldsby, R.A, Osborne, B.A, *Immunology*. 6th ed, ed. F.W.H.a. compagny. 2007, New York.
4. Spencer, C.T., et al., *Minor histocompatibility antigens: presentation principles, recognition logic and the potential for a healing hand*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(4): p. 512-25.
5. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5 ed, ed. G. Science. 2001, New York:.
6. Thervet, E., et al., [*Immunosuppressive treatments: mechanisms of action and clinical use*]. Nephrol Ther, 2011. **7**(7): p. 566-81.
7. Wood, K.J. and R. Goto, *Mechanisms of Rejection: Current Perspectives*. Transplantation, 2012.
8. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2715-29.
9. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
10. Legros-Maida, S., et al., *Granzyme B and perforin can be used as predictive markers of acute rejection in heart transplantation*. Eur J Immunol, 1994. **24**(1): p. 229-33.
11. Wagrowska-Danilewicz, M. and M. Danilewicz, *Immunoexpression of perforin and granzyme B on infiltrating lymphocytes in human renal acute allograft rejection*. Nefrologia, 2003. **23**(6): p. 538-44.
12. Cai, J. and P.I. Terasaki, *Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment*. Hum Immunol, 2005. **66**(4): p. 334-42.
13. Terasaki, P.I., *Humoral theory of transplantation*. Am J Transplant, 2003. **3**(6): p. 665-73.
14. Nankivell, B.J. and S.I. Alexander, *Rejection of the kidney allograft*. N Engl J Med, 2010. **363**(15): p. 1451-62.
15. Colvin, R.B., *Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1046-56.
16. Borel, J.-F., *L'histoire de la cyclosporine*. Revue d'histoire de la pharmacie, 1996. **84e année**(312): p. 413-421.
17. Borel, J.F., *History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development*. Wien Klin Wochenschr, 2002. **114**(12): p. 433-7.
18. Borel, J.F., *Pharmacology of cyclosporine (sandimmune). IV. Pharmacological properties in vivo*. Pharmacol Rev, 1990. **41**(3): p. 259-371.
19. Kino, T., et al., *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics*. J Antibiot (Tokyo), 1987. **40**(9): p. 1249-55.

20. Stepkowski, S.M., *Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs*. Expert Rev Mol Med, 2000. **2**(4): p. 1-23.
21. Kino, T., et al., *Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro*. Transplant Proc, 1987. **19**(5 Suppl 6): p. 36-9.
22. Sawada, S., et al., *Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation*. J Immunol, 1987. **139**(6): p. 1797-803.
23. Ochiai, T., et al., *Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat*. Transplant Proc, 1987. **19**(1 Pt 2): p. 1284-6.
24. Calne, R., D.S. Collier, and S. Thiru, *Observations about FK-506 in primates*. Transplant Proc, 1987. **19**(5 Suppl 6): p. 63.
25. *Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection*. European FK506 Multicentre Liver Study Group. Lancet, 1994. **344**(8920): p. 423-8.
26. Handschumacher, R.E., et al., *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 1984. **226**(4674): p. 544-7.
27. Schreiber, S.L., *Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands*. Science, 1991. **251**(4991): p. 283-7.
28. Husi, H. and M.G. Zurini, *Comparative binding studies of cyclophilins to cyclosporin A and derivatives by fluorescence measurements*. Anal Biochem, 1994. **222**(1): p. 251-5.
29. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
30. Klee, C.B., H. Ren, and X. Wang, *Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13367-70.
31. O'Keefe, S.J., et al., *FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 692-4.
32. Ke, H. and Q. Huai, *Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **311**(4): p. 1095-102.
33. Siekierka, J.J., et al., *FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin*. J Immunol, 1989. **143**(5): p. 1580-3.
34. Jorgensen, K.A., P.B. Koefoed-Nielsen, and N. Karamperis, *Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus*. Scand J Immunol, 2003. **57**(2): p. 93-8.
35. Hurwitz, M.Y., et al., *Domain II of calmodulin is involved in activation of calcineurin*. FEBS Lett, 1988. **238**(1): p. 82-6.
36. Rusnak, F. and P. Mertz, *Calcineurin: form and function*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1483-521.
37. Crivici, A. and M. Ikura, *Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1995. **24**: p. 85-116.
38. Stemmer, P.M. and C.B. Klee, *Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B*. Biochemistry, 1994. **33**(22): p. 6859-66.
39. Jiang, H., et al., *Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin*. Mol Immunol, 1997. **34**(8-9): p. 663-9.

40. Lim, H.W., et al., *Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy*. *Circulation*, 2000. **101**(20): p. 2431-7.
41. Tumlin, J.A., *Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport*. *Am J Kidney Dis*, 1997. **30**(6): p. 884-95.
42. Hanley, R.M., J.R. Dedman, and S. Shenolikar, *Identification of high-affinity calmodulin-binding proteins in rat liver*. *Am J Physiol*, 1987. **252**(3 Pt 1): p. C277-84.
43. Awumey, E.M., et al., *Molecular and functional evidence for calcineurin-A alpha and beta isoforms in the osteoclast: novel insights into cyclosporin A action on bone resorption*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **254**(1): p. 248-52.
44. Buttini, M., et al., *Distribution of calcineurin A isoenzyme mRNAs in rat thymus and kidney*. *Histochem J*, 1995. **27**(4): p. 291-9.
45. Kincaid, R.L., et al., *Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes*. *Nature*, 1987. **330**(6144): p. 176-8.
46. Goto, S. and Y. Ushio, *Immunostaining for calcineurin, a Ca²⁺/calmodulin-regulated protein phosphatase, in the diagnostic tumor pathology*. *Noshuyo Byori*, 1995. **12**(1): p. 23-30.
47. Lim, H.W. and J.D. Molkentin, *Calcineurin and human heart failure*. *Nat Med*, 1999. **5**(3): p. 246-7.
48. Molkentin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 215-28.
49. Izumo, S. and H. Aoki, *Calcineurin--the missing link in cardiac hypertrophy*. *Nat Med*, 1998. **4**(6): p. 661-2.
50. Yakel, J.L., *Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription*. *Trends Pharmacol Sci*, 1997. **18**(4): p. 124-34.
51. Ferreira, A., R. Kincaid, and K.S. Kosik, *Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(12): p. 1225-38.
52. Zhuo, M., et al., *A selective role of calcineurin alpha in synaptic depotentiation in hippocampus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4650-5.
53. Dunn, S.E., J.L. Burns, and R.N. Michel, *Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(31): p. 21908-12.
54. Aperia, A., et al., *Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na⁺,K⁺)-ATPase activity in renal tubule cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(16): p. 7394-7.
55. Asai, A., et al., *High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(48): p. 34450-8.
56. Bonnefoy-Berard, N., et al., *The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(2): p. 325-9.
57. Wang, L., et al., *Calcineurin (CN) activation promotes apoptosis of glomerular podocytes both in vitro and in vivo*. *Mol Endocrinol*. **25**(8): p. 1376-86.
58. Christie-Fougere, M.M., et al., *Calcineurin inhibition eliminates the normal inverted U curve, enhances acquisition and prolongs memory in a mammalian 3'-5'-cyclic AMP-dependent learning paradigm*. *Neuroscience*, 2009. **158**(4): p. 1277-83.

59. Mansuy, I.M., et al., *Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory*. Cell, 1998. **92**(1): p. 39-49.
60. Jain, J., C. Loh, and A. Rao, *Transcriptional regulation of the IL-2 gene*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 333-42.
61. Clipstone, N.A. and G.R. Crabtree, *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature, 1992. **357**(6380): p. 695-7.
62. Graef, I.A., F. Chen, and G.R. Crabtree, *NFAT signaling in vertebrate development*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 505-12.
63. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
64. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 707-47.
65. Wesselborg, S., et al., *Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp)*. J Biol Chem, 1996. **271**(3): p. 1274-7.
66. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
67. Liu, J., K. Arai, and N. Arai, *Inhibition of NFATx activation by an oligopeptide: disrupting the interaction of NFATx with calcineurin*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2677-87.
68. Park, S., M. Uesugi, and G.L. Verdine, *A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7130-5.
69. Al-Daraji, W.I., et al., *Localization of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(5): p. 779-88.
70. Shibasaki, F., et al., *Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4*. Nature, 1996. **382**(6589): p. 370-3.
71. Timmerman, L.A., et al., *Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 837-40.
72. Garrity, P.A., et al., *Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2159-69.
73. Weiss, D.L., et al., *Nuclear factor of activated T cells is associated with a mast cell interleukin 4 transcription complex*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(1): p. 228-35.
74. Okamoto, S., et al., *The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8582-9.
75. McCaffrey, P.G., A.E. Goldfeld, and A. Rao, *The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor-alpha gene transcription*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30445-50.
76. Cockerill, P.N., et al., *Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer function is associated with cooperative interactions between AP-1 and NFATp/c*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 2071-9.
77. Peng, S.L., et al., *NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation*. Immunity, 2001. **14**(1): p. 13-20.

78. Bueno, O.F., et al., *Defective T cell development and function in calcineurin A beta - deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9398-403.
79. Oukka, M., et al., *The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 295-304.
80. Yoshida, H., et al., *The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 115-24.
81. Kiani, A., et al., *Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 849-60.
82. Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 721-6.
83. Napoli, K.L. and P.J. Taylor, *From beach to bedside: history of the development of sirolimus*. Ther Drug Monit, 2001. **23**(5): p. 559-86.
84. Martel, R.R., J. Klicius, and S. Galet, *Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic*. Can J Physiol Pharmacol, 1977. **55**(1): p. 48-51.
85. Kahan, B.D., et al., *Potential applications of therapeutic drug monitoring of sirolimus immunosuppression in clinical renal transplantation*. Ther Drug Monit, 1995. **17**(6): p. 672-5.
86. Groth, C.G., et al., *Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group*. Transplantation, 1999. **67**(7): p. 1036-42.
87. Johnson, E.M., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety, tolerance, and preliminary pharmacokinetics of ascending single doses of orally administered sirolimus (rapamycin) in stable renal transplant recipients*. Transplant Proc, 1996. **28**(2): p. 987.
88. Kaplan, B., et al., *The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formulation coadministration on the pharmacokinetics of each agent*. Clin Pharmacol Ther, 1998. **63**(1): p. 48-53.
89. Miller, J.L., *Sirolimus approved with renal transplant indication*. Am J Health Syst Pharm, 1999. **56**(21): p. 2177-8.
90. Koltin, Y., et al., *Rapamycin sensitivity in Saccharomyces cerevisiae is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1718-23.
91. Bierer, B.E., et al., *Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9231-5.
92. Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall, *Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast*. Science, 1991. **253**(5022): p. 905-9.
93. Sabers, C.J., et al., *Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 815-22.
94. Kunz, J., et al., *Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression*. Cell, 1993. **73**(3): p. 585-96.
95. Schmelzle, T. and M.N. Hall, *TOR, a central controller of cell growth*. Cell, 2000.

- 103(2)**: p. 253-62.
96. Zhou, H. and S. Huang, *The complexes of mammalian target of rapamycin*. *Curr Protein Pept Sci*, 2011. **11(6)**: p. 409-24.
 97. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR*. *Genes Dev*, 2001. **15(7)**: p. 807-26.
 98. Perry, J. and N. Kleckner, *The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins*. *Cell*, 2003. **112(2)**: p. 151-5.
 99. Fingar, D.C. and J. Blenis, *Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression*. *Oncogene*, 2004. **23(18)**: p. 3151-71.
 100. Redpath, N.T., E.J. Foulstone, and C.G. Proud, *Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signalling pathway*. *EMBO J*, 1996. **15(9)**: p. 2291-7.
 101. Peterson, R.T., et al., *Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96(8)**: p. 4438-42.
 102. Huang, S., et al., *p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin*. *Cancer Res*, 2001. **61(8)**: p. 3373-81.
 103. Nourse, J., et al., *Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin*. *Nature*, 1994. **372(6506)**: p. 570-3.
 104. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. *Curr Biol*, 2004. **14(14)**: p. 1296-302.
 105. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307(5712)**: p. 1098-101.
 106. Tsang, C.K., et al., *Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases*. *Drug Discov Today*, 2007. **12(3-4)**: p. 112-24.
 107. Yip, C.K., et al., *Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition*. *Mol Cell*, 2010. **38(5)**: p. 768-74.
 108. Zheng, X.F., et al., *TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin*. *Cell*, 1995. **82(1)**: p. 121-30.
 109. Proud, C.G., *mTOR Signalling in Health and Disease*. *Biochem Soc Trans*, 2011. **39(2)**: p. 431-6.
 110. Wang, X. and C.G. Proud, *mTORC1 signaling: what we still don't know*. *J Mol Cell Biol*, 2010. **3(4)**: p. 206-20.
 111. Schalm, S.S. and J. Blenis, *Identification of a conserved motif required for mTOR signaling*. *Curr Biol*, 2002. **12(8)**: p. 632-9.
 112. Hara, K., et al., *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action*. *Cell*, 2002. **110(2)**: p. 177-89.
 113. Nojima, H., et al., *The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif*. *J Biol Chem*, 2003. **278(18)**: p. 15461-4.
 114. Jacinto, E. and A. Lorberg, *TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals*. *Biochem J*, 2008. **410(1)**: p. 19-37.

115. Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar, *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks*. *Biochem J*, 2012. **441**(1): p. 1-21.
116. Fenton, T.R. and I.T. Gout, *Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011. **43**(1): p. 47-59.
117. Weng, Q.P., et al., *Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(26): p. 16621-9.
118. Moser, B.A., et al., *Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70s6k*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(9): p. 5648-55.
119. Kawasome, H., et al., *Targeted disruption of p70(s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): p. 5033-8.
120. Shima, H., et al., *Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase*. *EMBO J*, 1998. **17**(22): p. 6649-59.
121. Ferrari, S. and G. Thomas, *S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1994. **29**(6): p. 385-413.
122. Bandi, H.R., et al., *Identification of 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites in Swiss mouse 3T3 fibroblasts stimulated with serum*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(6): p. 4530-3.
123. Flotow, H. and G. Thomas, *Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(5): p. 3074-8.
124. Meyuhas, O., *Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2008. **268**: p. 1-37.
125. Thomson, A.W., H.R. Turnquist, and G. Raimondi, *Immunoregulatory functions of mTOR inhibition*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(5): p. 324-37.
126. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(6): p. 652-7.
127. Fox, C.J., P.S. Hammerman, and C.B. Thompson, *Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(11): p. 844-52.
128. Powell, J.D. and G.M. Delgoffe, *The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism*. *Immunity*, 2010. **33**(3): p. 301-11.
129. Lee, K., et al., *Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways*. *Immunity*, 2010. **32**(6): p. 743-53.
130. Delgoffe, G.M., et al., *The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment*. *Immunity*, 2009. **30**(6): p. 832-44.
131. Araki, K., et al., *mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation*. *Nature*, 2009. **460**(7251): p. 108-12.
132. Rao, R.R., et al., *The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 67-78.
133. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 305-34.
134. Powell, J.D., C.G. Lerner, and R.H. Schwartz, *Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2775-84.

135. Vanasek, T.L., et al., *Antagonistic roles for CTLA-4 and the mammalian target of rapamycin in the regulation of clonal anergy: enhanced cell cycle progression promotes recall antigen responsiveness.* J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5636-44.
136. Zheng, Y., et al., *A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy.* J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2163-70.
137. Legendre, C., et al., [*Immunosuppression in kidney transplantation*]. Ann Urol (Paris), 2007. **41**(6): p. 276-84.
138. Veenstra, D.L., et al., *Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation.* Am J Kidney Dis, 1999. **33**(5): p. 829-39.
139. *Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicentre trial.* Lancet, 1983. **2**(8357): p. 986-9.
140. Naesens, M., D.R. Kuypers, and M. Sarwal, *Calcineurin inhibitor nephrotoxicity.* Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(2): p. 481-508.
141. Morozumi, K., et al., *Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology?* Transplant Proc, 2004. **36**(2 Suppl): p. 251S-256S.
142. Nankivell, B.J., et al., *The natural history of chronic allograft nephropathy.* N Engl J Med, 2003. **349**(24): p. 2326-33.
143. Maes, B.D. and Y.F. Vanrenterghem, *Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-a-vis tacrolimus.* Transplant Proc, 2004. **36**(2 Suppl): p. 40S-49S.
144. Demetris, A.J., et al., *Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK506 immunosuppressive therapy--a clinicopathologic study of 96 patients.* Transplantation, 1992. **53**(5): p. 1056-62.
145. Reggiani, P., et al., *Rescue FK506 early conversion for refractory rejection after pediatric liver transplantation: experience in 20 children.* Transpl Int, 1998. **11 Suppl 1**: p. S272-4.
146. Webster, A.C., et al., *Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data.* BMJ, 2005. **331**(7520): p. 810.
147. Solez, K., F. Vincenti, and R.S. Filo, *Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tarolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group.* Transplantation, 1998. **66**(12): p. 1736-40.
148. McCauley, J., *The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 1993. **2**(4): p. 662-9.
149. Khan, S. and W.A. Sewell, *Oral immunosuppressive drugs.* Clin Med, 2006. **6**(4): p. 352-5.
150. Murgia, M.G., S. Jordan, and B.D. Kahan, *The side effect profile of sirolimus: a phase I study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients.* Kidney Int, 1996. **49**(1): p. 209-16.
151. Diekmann, F. and J.M. Campistol, *Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft nephropathy: benefits and risks.* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(3): p. 562-8.
152. McAlister, V.C., et al., *Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression.* Lancet, 2000. **355**(9201): p. 376-7.

153. Brattstrom, C., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study to determine safety, tolerance, and preliminary pharmacokinetics of ascending single doses of orally administered sirolimus (rapamycin) in stable renal transplant recipients*. *Transplant Proc*, 1996. **28**(2): p. 985-6.
154. Ippoliti, G., C. Pellegrini, and V. Nieswandt, *Controversies about induction therapy*. *Transplant Proc*. **43**(6): p. 2450-2.
155. Vincenti, F., *Immunosuppression minimization: current and future trends in transplant immunosuppression*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(7): p. 1940-8.
156. Brattstrom, C., et al., *Hypertriglyceridemia in renal transplant recipients treated with sirolimus*. *Transplant Proc*, 1998. **30**(8): p. 3950-1.
157. Palma, C., *Tachykinins and their receptors in human malignancies*. *Curr Drug Targets*, 2006. **7**(8): p. 1043-52.
158. Pennefather, J.N., et al., *Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family*. *Life Sci*, 2004. **74**(12): p. 1445-63.
159. Griebel, G. and S. Beeske, *Is there still a future for neurokinin 3 receptor antagonists as potential drugs for the treatment of psychiatric diseases?* *Pharmacol Ther*. **133**(1): p. 116-23.
160. Pennefather, J.N., et al., *Mammalian tachykinins stimulate rat uterus by activating NK-2 receptors*. *Peptides*, 1993. **14**(2): p. 169-74.
161. Page, N.M., J. Dakour, and D.W. Morrish, *Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia*. *Mol Hum Reprod*, 2006. **12**(7): p. 427-33.
162. Krause, J.E., P. Blount, and B.S. Sachais, *Molecular biology of receptors. Structures, Expression and regulatory Mechanisms*. Buck, S.H. ed. The tachykinin receptors. 1994.
163. Gerard, N.P., et al., *Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones*. *Biochemistry*, 1991. **30**(44): p. 10640-6.
164. Mitsuhashi, M., et al., *Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor*. *J Neurosci Res*, 1992. **32**(3): p. 437-43.
165. Takeda, Y., et al., *Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in Chinese hamster ovary cells and evidence for differential stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate and cyclic AMP second messenger responses*. *J Neurochem*, 1992. **59**(2): p. 740-5.
166. Ma, H.T., et al., *Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca²⁺ entry channels*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 18888-96.
167. Holst, B., et al., *Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 19793-9.
168. Ramkissoon, S.H., et al., *G protein-coupled receptors in haematopoietic disruption*. *Expert Opin Biol Ther*, 2006. **6**(2): p. 109-20.
169. Seybold, V.S., et al., *Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons*. *J Neurosci*, 2003. **23**(5): p. 1816-24.
170. Sagan, S., et al., *Tachykinin peptides affect differently the second messenger pathways*

- after binding to CHO-expressed human NK-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **276**(3): p. 1039-48.
171. Mantyh, P.W., et al., *Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(7): p. 2622-6.
 172. McConalogue, K., et al., *Desensitization of the neurokinin-1 receptor (NK1-R) in neurons: effects of substance P on the distribution of NK1-R, Galphaq/11, G-protein receptor kinase-2/3, and beta-arrestin-1/2*. *Mol Biol Cell*, 1998. **9**(8): p. 2305-24.
 173. Garland, A.M., et al., *Mechanisms of desensitization and resensitization of G protein-coupled neurokinin1 and neurokinin2 receptors*. *Mol Pharmacol*, 1996. **49**(3): p. 438-46.
 174. Quartara, L. and C.A. Maggi, *The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation*. *Neuropeptides*, 1997. **31**(6): p. 537-63.
 175. Fong, T.M., et al., *Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor*. *Mol Pharmacol*, 1992. **41**(1): p. 24-30.
 176. Tuluc, F., et al., *Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(6): p. 271-6.
 177. Li, H., et al., *A substance P (neurokinin-1) receptor mutant carboxyl-terminally truncated to resemble a naturally occurring receptor isoform displays enhanced responsiveness and resistance to desensitization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(17): p. 9475-80.
 178. Caberlotto, L., et al., *Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain*. *Eur J Neurosci*, 2003. **17**(9): p. 1736-46.
 179. Harrison, S. and P. Geppetti, *Substance p*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. **33**(6): p. 555-76.
 180. Chang, M.M. and S.E. Leeman, *Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P*. *J Biol Chem*, 1970. **245**(18): p. 4784-90.
 181. Carter, M.S. and J.E. Krause, *Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma*. *J Neurosci*, 1990. **10**(7): p. 2203-14.
 182. Nawa, H., H. Kotani, and S. Nakanishi, *Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing*. *Nature*, 1984. **312**(5996): p. 729-34.
 183. Krause, J.E., et al., *Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(3): p. 881-5.
 184. Ribeiro-da-Silva, A. and T. Hokfelt, *Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons*. *Neuropeptides*, 2000. **34**(5): p. 256-71.
 185. Zubrzycka, M. and A. Janecka, *Substance P: transmitter of nociception (Minireview)*. *Endocr Regul*, 2000. **34**(4): p. 195-201.
 186. Zhang, Y., et al., *Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(5): p. 392-7.
 187. Kurtz, M.M., et al., *Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides*. *Gene*, 2002. **296**(1-2): p. 205-12.
 188. Page, N.M., et al., *Characterization of the endokinins: human tachykinins with*

- cardiovascular activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6245-50.
189. Page, N.M., *Hemokinin and endokinins*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(13): p. 1652-63.
 190. Page, N.M., *Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides*. Vascul Pharmacol, 2006. **45**(4): p. 200-8.
 191. Metwali, A., et al., *Cutting edge: hemokinin has substance P-like function and expression in inflammation*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6528-32.
 192. Duffy, R.A., et al., *Centrally administered hemokinin-1 (HK-1), a neurokinin NK1 receptor agonist, produces substance P-like behavioral effects in mice and gerbils*. Neuropharmacology, 2003. **45**(2): p. 242-50.
 193. Radhakrishnan, V. and J.L. Henry, *Novel substance P antagonist, CP-96,345, blocks responses of cat spinal dorsal horn neurons to noxious cutaneous stimulation and to substance P*. Neurosci Lett, 1991. **132**(1): p. 39-43.
 194. Takano, Y., et al., *Role of NK-1 receptor in central cardiovascular regulation in rats: studies on a novel non-peptide antagonist, CP-96,345, of substance P NK-1 receptor*. Neurosci Lett, 1992. **139**(1): p. 122-5.
 195. Seabrook, G.R., et al., *L-733,060, a novel tachykinin NK1 receptor antagonist; effects in [Ca²⁺]_i mobilisation, cardiovascular and dural extravasation assays*. Eur J Pharmacol, 1996. **317**(1): p. 129-35.
 196. Rupniak, N.M., et al., *Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils*. Pain, 1996. **67**(1): p. 189-95.
 197. Munoz, M., et al., *Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines*. Melanoma Res, 2004. **14**(3): p. 183-8.
 198. Munoz, M., M. Rosso, and R. Covenas, *A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists*. Curr Med Chem, 2011. **17**(6): p. 504-16.
 199. Tattersall, F.D., et al., *The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets*. Neuropharmacology, 2000. **39**(4): p. 652-63.
 200. Dando, T.M. and C.M. Perry, *Aprepitant: a review of its use in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting*. Drugs, 2004. **64**(7): p. 777-94.
 201. Cascieri, M.A., et al., *Characterization of the binding of a potent, selective, radioiodinated antagonist to the human neurokinin-1 receptor*. Mol Pharmacol, 1992. **42**(3): p. 458-63.
 202. Francis, B.E., et al., *Radioiodinated L-703,606: a potent, selective antagonist to the human NK1 receptor*. Appl Radiat Isot, 1994. **45**(1): p. 97-103.
 203. Huang, R.R., et al., *Localization of the ligand binding site of the neurokinin-1 receptor: interpretation of chimeric mutations and single-residue substitutions*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(4): p. 690-5.
 204. Marvizon, J.C., et al., *Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors*. J Neurosci, 1997. **17**(21): p. 8129-36.
 205. Powell, K.J., R. Quirion, and K. Jhamandas, *Inhibition of neurokinin-1-substance P receptor and prostanoid activity prevents and reverses the development of morphine tolerance in vivo and the morphine-induced increase in CGRP expression in cultured dorsal root ganglion neurons*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(6): p. 1572-83.
 206. De Felipe, C., et al., *Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the*

- receptor for substance P*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 394-7.
207. DeVane, C.L., *Substance P: a new era, a new role*. Pharmacotherapy, 2001. **21**(9): p. 1061-9.
 208. Ebner, K. and N. Singewald, *The role of substance P in stress and anxiety responses*. Amino Acids, 2006. **31**(3): p. 251-72.
 209. Rimon, R., et al., *Elevation of substance P-like peptides in the CSF of psychiatric patients*. Biol Psychiatry, 1984. **19**(4): p. 509-16.
 210. Bondy, B., et al., *Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results*. Biol Psychiatry, 2003. **53**(6): p. 538-42.
 211. Kramer, M.S., et al., *Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1640-5.
 212. Ramalho, R., et al., *Tachykinin receptors antagonism for asthma: a systematic review*. BMC Pulm Med. **11**: p. 41.
 213. Rameshwar, P., D. Ganea, and P. Gascon, *In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis*. Blood, 1993. **81**(2): p. 391-8.
 214. Grassin-Delyle, S., et al., *Expression and proliferative effect of hemokinin-1 in human B-cells*. Peptides. **32**(5): p. 1027-34.
 215. Nowicki, M., et al., *The significance of substance P in physiological and malignant haematopoiesis*. J Clin Pathol, 2007. **60**(7): p. 749-55.
 216. Marriott, I. and K.L. Bost, *IL-4 and IFN-gamma up-regulate substance P receptor expression in murine peritoneal macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 182-91.
 217. Kaltreider, H.B., et al., *Upregulation of neuropeptides and neuropeptide receptors in a murine model of immune inflammation in lung parenchyma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(2): p. 133-44.
 218. Kincy-Cain, T. and K.L. Bost, *Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2334-9.
 219. Kulka, M., et al., *Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production*. Immunology, 2008. **123**(3): p. 398-410.
 220. Carolan, E.J. and T.B. Casale, *Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **92**(4): p. 589-98.
 221. Roch-Arveiller, M., et al., *Tachykinins: effects on motility and metabolism of rat polymorphonuclear leucocytes*. Pharmacology, 1986. **33**(5): p. 266-73.
 222. Stanis, A.M., D. Befus, and J. Bienenstock, *Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen*. J Immunol, 1986. **136**(1): p. 152-6.
 223. Katsanos, G.S., et al., *Impact of substance P on cellular immunity*. J Biol Regul Homeost Agents, 2008. **22**(2): p. 93-8.
 224. Moore, T.C., J.L. Lami, and C.H. Spruck, *Substance P increases lymphocyte traffic and lymph flow through peripheral lymph nodes of sheep*. Immunology, 1989. **67**(1): p. 109-14.
 225. Kavelaars, A., F. Jeurissen, and C.J. Heijnen, *Substance P receptors and signal transduction in leukocytes*. Immunomethods, 1994. **5**(1): p. 41-8.
 226. Nowicki, M., D. Ostalska-Nowicka, and B. Miskowiak, *In vitro substance P-*

- dependent induction of bone marrow cells in common (CD10) acute lymphoblastic leukaemia.* Leuk Res, 2008. **32**(1): p. 97-102.
227. Calvo, C.F., *Substance P stabilizes interleukin-2 mRNA in activated Jurkat cells.* J Neuroimmunol, 1994. **51**(1): p. 85-91.
228. Zhang, Y. and C.J. Paige, *T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis.* Blood, 2003. **102**(6): p. 2165-72.
229. Henderson, D.J., et al., *Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production.* Immunology, 1991. **73**(3): p. 316-21.
230. Bram, R.J. and G.R. Crabtree, *Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein.* Nature, 1994. **371**(6495): p. 355-8.
231. Quinlan, K.L., et al., *Substance P activates coincident NF-AT- and NF-kappa B-dependent adhesion molecule gene expression in microvascular endothelial cells through intracellular calcium mobilization.* J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5656-65.
232. Severini, C., et al., *The tachykinin peptide family.* Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 285-322.
233. Miller, J.L. and S.G. Ericson, *Cyclosporin a and tacrolimus (FK506) differentially alter T-cell receptor expression in vivo.* Immunopharmacol Immunotoxicol, 2007. **29**(1): p. 105-18.
234. Beinborn, M., et al., *TGF-beta regulates T-cell neurokinin-1 receptor internalization and function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4293-8.
235. Miyano, K., et al., *Activation of the neurokinin-1 receptor in rat spinal astrocytes induces Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores and extracellular Ca²⁺ influx through TRPC3.* Neurochem Int, 2010. **57**(8): p. 923-34.
236. Namgaladze, D., H.W. Hofer, and V. Ullrich, *Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site.* J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5962-9.
237. Wang, X., V.C. Culotta, and C.B. Klee, *Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation.* Nature, 1996. **383**(6599): p. 434-7.
238. Reiter, T.A. and F. Rusnak, *Quantification of intracellular calcineurin activity and H₂O₂-induced oxidative stress.* Methods Enzymol, 2002. **353**: p. 70-81.
239. Springer, J., et al., *Neurokinin-1 receptor activation induces reactive oxygen species and epithelial damage in allergic airway inflammation.* Clin Exp Allergy, 2007. **37**(12): p. 1788-97.
240. Brooks, A.C. and C.J. Whelan, *Reactive oxygen species generation by mast cells in response to substance P: a NK1-receptor-mediated event.* Inflamm Res, 1999. **48 Suppl 2**: p. S121.
241. Strauss, G., W. Osen, and K.M. Debatin, *Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs.* Clin Exp Immunol, 2002. **128**(2): p. 255-66.
242. Koenen, H.J., E. Fasse, and I. Joosten, *Cyclosporine preserves the anergic state of human T cells induced by costimulation blockade in vitro.* Transplantation, 2005. **80**(4): p. 522-9.
243. Prud'homme, G.J., et al., *Effects of cyclosporin A, rapamycin, and FK520 on peripheral T-cell deletion and anergy.* Cell Immunol, 1995. **164**(1): p. 47-56.
244. Munoz, M., et al., *The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-*

- 733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides*, 2005. **39**(4): p. 427-32.
245. Munoz, M., et al., *Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. **46**(7): p. 2567-70.
246. Ferrari, S., et al., *Activation of p70s6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(15): p. 7282-6.
247. Acosta-Jaquez, H.A., et al., *Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(15): p. 4308-24.
248. Roux, P.P., et al., *RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(19): p. 14056-64.
249. Ramnath, R.D., et al., *Effect of mitogen-activated protein kinases on chemokine synthesis induced by substance P in mouse pancreatic acinar cells*. *J Cell Mol Med*, 2007. **11**(6): p. 1326-41.
250. Fang, X., et al., *An involvement of neurokinin-1 receptor in FcepsilonRIota-mediated RBL-2H3 mast cell activation*. *Inflamm Res*, 2012.
251. Rosner, M., A. Freilinger, and M. Hengstschlager, *Akt regulates nuclear/cytoplasmic localization of tuberlin*. *Oncogene*, 2007. **26**(4): p. 521-31.

