

2ml. 2852.2

Université de Montréal

**Les effets des modulateurs des canaux K^+ _{ATP}
dépendant sur la survie des allogreffes
cardiaques chez le rat**

par

Dominic Rhéaume

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

**Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales**

Décembre 2000

© Dominic Rhéaume, 2000



W
4
158
2001
N. 048

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Les effets des modulateurs des canaux K^+ _{ATP}
dépendant sur la survie des allogreffes
cardiaques chez le rat**

présenté par :

Dominic Rhéaume

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Muhammad Zafarullah..... président –rapporteur
Huifang Chen.....directeur de recherche
Louis Dumont.....codirecteur
Stéphan Busque.....membre du jury

Mémoire accepté le :.....

SOMMAIRE

Des controverses existent concernant le rôle immunorégulateur des canaux potassiques. Dans la présente étude, nous avons évalué les effets de l'aprikalim, un activateur des canaux potassiques ATP dépendant ($K^+_{(ATP)}$) ainsi que du glibenclamide et du gliclazide, deux inhibiteurs des canaux $K^+_{(ATP)}$ dans un modèle de greffe cardiaque hétérotopique chez le rat. Le but est de délimiter les conséquences d'une activation ou d'une inhibition de ces canaux sur la survie des greffons et d'établir l'influence de ces modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ sur l'efficacité de la cyclosporine A.

Des rats Brown-Norway étaient utilisés comme donneurs et des rats Lewis comme receveurs. Neuf groupes de rats (n=6) étaient inclus dans cette étude. La survie moyenne du groupe 1, les allogreffes cardiaques non-traités, était de 6.5 ± 0.2 jours. Les greffons du groupe 2 à qui étaient administrés l'aprikalim (1.1 mg/kg/j) survivaient 9.7 ± 0.9 jours ; ceux du groupe 3, traité à la cyclosporine A, (CsA) (2mg/kg/j) survivaient 10.2 ± 1.0 jours; ceux du groupe 4, traité au glibenclamide, (0.2mg/kg/j) survivaient 6.8 ± 0.2 jours; et ceux du groupe 5, traité au gliclazide (5mg/kg/j), survivaient 9.0 ± 0.8 jours. Les agents étaient administrés quotidiennement par gavage. Comparés au groupe non-traité, les temps de survie des groupes traités avec la CsA, l'aprikalim et le gliclazide démontraient une augmentation significative. L'association de la cyclosporine A et des modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ n'améliorait pas la

survie des greffons de façon significative versus l'administration de la CsA seule. Les greffons du groupe 6, traité à la CsA et à l'aprikalim, survivaient 10.5 ± 0.2 jours; ceux du groupe 7, traité à la CsA et au glibenclamide, survivaient 10.8 ± 0.3 jours; ceux du groupe 8, traité à la CsA et au gliclazide, survivaient 12.6 ± 1.0 jours. De plus, chez le groupe 9, l'association de l'aprikalim et du glibenclamide comme traitement, procurent un temps de survie de 10.2 ± 0.6 jours.

Ces résultats indiquent que les modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ peuvent procurer un bénéfice significatif sur la survie des allogreffes cardiaques, mais leurs mécanismes d'action semblent être relié à la cardioprotection du greffon et à des effets cardiovasculaires plutôt qu'immunitaires. Toutefois, l'association de ces agents pharmacologiques avec la CsA n'améliore pas la survie des allogreffes cardiaques suggérant que l'action bénéfique de la cyclosporine A n'est pas tributaire d'une modulation de l'activité des canaux $K^+_{(ATP)}$.

TABLE DES MATIÈRES

Page titre	i
Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Liste des tables	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xi

CHAPITRE I - INTRODUCTION

1.1 Histoire de la transplantation.....	2
1.2 Rejet de greffe.....	9
1.2.1 Rejet suraigu.....	9
1.2.2 Rejet aigu.....	10
1.2.3 Rejet chronique.....	11
1.2.4 Immunobiologie du rejet de greffe.....	12
1.2.5 Tolérance de greffe.....	16
1.3 Immunosuppression.....	19
1.3.1 Traitements classiques.....	19
1.3.2 Traitements actuels.....	20
1.3.3 Traitements futurs.....	24
1.3.4 Thérapie d'association.....	24
1.4 Cyclosporine A.....	26
1.4.1 Structure et mécanisme d'action.....	27

1.5 Récepteurs à canaux.....	31
1.5.1 Base de l'action pharmacologique.....	31
1.5.2 Récepteurs à canaux ionique.....	32
1.5.3 Canaux à voltage dépendant.....	33
1.5.3.1 Canaux sodiques.....	34
1.5.3.2 Canaux calciques.....	35
1.5.3.3 Canaux potassiques.....	36
1.6 Canaux potassiques ATP-dépendant.....	38
1.6.1 Structures et fonctions.....	38
1.6.1.1 Activateurs du canal.....	43
1.6.1.2 Inhibiteurs du canal.....	43
1.6.2 Rôles physiologiques des $K^+_{(ATP)}$	44
1.6.3 Canaux potassiques et transplantation cardiaque.....	44
1.6.3.1 Cardioprotection.....	44
1.6.3.2 Tonus vasculaire.....	46
1.6.3.3 Activation des lymphocytes.....	47
1.6.3.4 $K^+_{(ATP)}$ et diabète.....	49
1.7 Diabète et transplantation.....	52
1.8 Transplantation cardiaque.....	54
1.8.1 Chirurgie de transplantation.....	55
1.8.2 Ischémie et cardioprotection.....	56
1.8.3 Rejet de greffe.....	57
1.8.4 Immunosuppression.....	58
1.8.5 Transplantation cardiaque expérimentale.....	59
1.9 Description du projet.....	61
1.9.1 Hypothèse.....	61
1.9.2 Médicaments.....	62
1.9.3 Modèle expérimental.....	63
1.9.4 Statistiques.....	64

CHAPITRE II - MANUSCRIT

2.0 PROLONGATION OF RAT HEART ALLOGRAFT SURVIVAL WITH K⁺ATP DEPENDENT CHANNEL MODULATORS

Title page.....	67
Abstract.....	68
Introduction.....	69
Materials and methods.....	70
Results.....	73
Discussion.....	74
References.....	78

CHAPITRE III - DISCUSSION

3.1 Critique du modèle.....	85
3.2 Modulateurs des K ⁺ _(ATP) et transplantation cardiaque.....	87
3.3 Modulateurs des K ⁺ _(ATP) et la cyclosporine A.....	90
3.4 Conclusions.....	93

CHAPITRE IV – BIBLIOGRAPHIE

4.0 Bibliographie.....	95
------------------------	----

LISTE DES TABLES

TABLE I	Recipient rats treated with K^+_{ATP} channel modulators.....	81
TABLE II.	Recipient rats treated with CsA alone or with K^+_{ATP} channel modulators and CsA.....	82
TABLE III.	Blood glucose level in rats treated with CsA alone, K^+_{ATP} channel modulators or their association CsA.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1:	Structure moléculaire de la cyclosporine A.....	29
Figure 1.2 :	Mode d'action de la cyclosporine A.....	30
Figure 1.3:	Représentation des structures des sous-unité <i>Kir</i> et SUR du canal $K^+_{(ATP)}$	39
Figure 1.4:	Schéma de la régulation d'un $K^+_{(ATP)}$ cardiaque par les nucléosides diphosphate et les activateurs potassiques	42
Figure 1.5:	Transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat.....	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å: Angstrom.
 ADCC: *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*.
 ADN: Acide Déoxyribonucléique.
 APC: *activated presentation cell*.
 ATP : Adénosine Triphosphate
 BN: Rats de type Brown-Norway.
 CMH: Complex Majeur d'Histocompatibilité.
 CPA: Cellule Présentatrice d'Antigènes.
 CsA: Cyclosporine A.
 CyA : Cyclophiline A.
 CTC: *Cytotoxic T cells*.
 DSG: Déoxyspergualin.
fa/fu: Fraction affectée/ fraction non-affectée.
 FKBP: *FK-Binding Protein*.
 FK506: Tacrolimus.
 FRAP: *FK-Rapamycin-Associated Protein*.
 GM-CSF: *Granular-Macrophage Colony-Stimulating Factor*.
 HLA: *Human Lymphocyte antigen*.
 IFN- γ : Interféron Gamma.
 Ig: Immunoglobulines.
 IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -10: Interleukines-1, 2, 3, 4, 5, 6, 10.
 $K^+_{(ATP)}$: Canal potassique adénosine triphosphate dépendant.
 $K^+_{(V)}$: Canal potassique à voltage dépendant.
 $K^+_{(Ca^{2+})}$: Canal potassique à calcium dépendant.
 Kg: Kilogramme.
Kir: Canaux à voltage *Inward Rectifier*
 BN: Rats de type Brown Norway
 LEW: Rats de type Lewis.
 mg: milligramme.
 MMF: Mycophénolate Mofétil.
 6-MP: 6-Mercaptopurine.
 MTS \pm ET: Temps de Survie Moyen \pm Écart Type.
 NDP : Nucléoside diphosphate.
 NK: *Natural Killer Cells*.
 PDGF: Platelet-Derived Growth Factor.
 TCR: *T cell receptor*.
 TGF- β 1: *Transforming Growth Factor beta 1*.
 TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*.
 SUR : récepteur aux sulfonilurées

REMERCIEMENTS

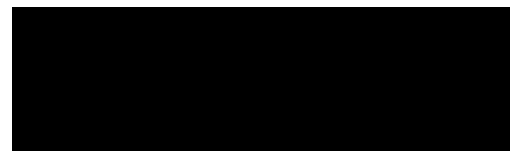
Merci à ma femme, Josée, de m'avoir épaulé sur le chemin menant à la rédaction de ce mémoire. Je la remercie de m'avoir aidé dans mes recherches et ma rédaction. Sa motivation et sa persévérance, bref, son soutien moral ont été un succès pour cette réalisation.

Je remercie mon fils, Sébastien, pour sa naissance, qui fut une joie, au cours de ce mémoire. Le défi qui fut de combiner ce mémoire et mon rôle de père, m'a particulièrement aidé à comprendre l'importance des études et à lui tendre, avec tout mon amour, le flambeau de l'éducation.

Je remercie mon directeur de recherches Dr. Huifang Chen et mon co-directeur Dr. Louis Dumont pour avoir cru en moi, pour leur dévouement et leur soutien technique.

Finalement, je tiens à remercier mes parents et ceux de mon épouse, mes amis ainsi que mes collègues de travail pour l'accomplissement de ce mémoire.

Sincères remerciements,



CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.0 HISTOIRE DE LA TRANSPLANTATION

À travers l'histoire humaine, la transplantation d'organes a toujours été l'objet de recherches intensives parce qu'elle offrait à certains, l'espoir d'une meilleure qualité de vie et à d'autres, l'espoir de survie. Encore jusqu'à présent, l'opportunité de remplacer un organe représente la solution définitive à diverses défaillances ou insuffisances d'un organe. De tous les domaines médicaux, celui de la transplantation d'organes représente le mieux l'impact qu'a pu avoir la convergence de la science et de la technologie. Grâce à cette convergence, les quatre barrières au succès de ce domaine soit : les aspects techniques, le rejet, la disponibilité d'organes et le coût ont pu être contournés et continuent de l'être.

L'histoire de la transplantation d'organes débute sous forme de mythes et légendes. Les récits antiques sont remplis d'allusions aux sirènes, aux sphinx, aux centaures, ainsi qu'à toutes sortes de héros ayant des corps hybrides d'animaux et d'humains. La transplantation acquiert son aspect médical au 6^{ème} siècle de notre ère, époque à laquelle certains textes Hindous rapportent la reconstruction de visages blessés à l'aide de greffes de peau.

Au 14^{ème} siècle, grâce au développement de l'expérimentation médicale, un chirurgien ambitieux, Gasparre Tagliacozzi, décrit en détail le

remplacement de tissus et de certaines parties du corps. Malheureusement, ces publications ne sont pas prises au sérieux, et les grands chirurgiens du temps, tel que James Cooke, dédaignent lui accorder plus que quelques phrases dans leurs manuels de chirurgie. Les cinq siècles suivants seront marqués par un oubli général de la transplantation par les grands chirurgiens de ce monde. D'ailleurs, les seuls écrits sur la transplantation ne seront que de simples anecdotes ou rapports invraisemblables.

Au 19^{ème} siècle, la transplantation est marquée en Angleterre par les frères John et William Hunter. Ces chirurgiens font preuve d'une dextérité remarquable et parviennent à autogreffer des ovaires et des testicules avec succès. Ils sont les premiers à déclarer qu'un "principe vital" se perd si le greffon n'est pas implanté immédiatement suivant son prélèvement. Ils établissent aussi que la vascularisation du greffon, c'est-à-dire l'établissement d'une continuité avec la circulation sanguine du receveur est essentielle au succès de l'opération.

Cette période est aussi marquée par un retour aux techniques de chirurgie esthétique des Hindous. Un chirurgien français du nom de Reverdin établit que les greffes de tissus sont soutenues et alimentées par la croissance de ponts vasculaires entre l'hôte et la greffe. Cette observation lui permet de prouver que l'adhérence seule, concept proposé par Hunter, n'est pas suffisante pour alimenter la greffe.

L'ère moderne de la transplantation débute dès le 20^{ème} siècle avec le développement des techniques de chirurgie vasculaire tel que les anastomoses. Le perfectionnement de ces techniques rend envisageable pour la première fois la transplantation d'organes. En 1906, Matthieu Jaboulay de l'Université de Lyon, réussit une transplantation rénale et maintient la fonction du greffon pendant une heure. Le jeune Alexis Carrel, chirurgien d'une dextérité hors pair, à qui on crédite le début de la transplantation d'organes en clinique, est présent durant cette opération. Suite à son arrivée en Amérique, Carrel s'associe avec Charles Guthrie. Ensemble, ils publient plusieurs études améliorant l'aspect technique de la transplantation et établissent le besoin d'hypothermie pour la survie du greffon. Cependant, Carrel est davantage reconnu pour sa mention d'un *principe immunitaire* qui empêcherait la survie d'allogreffe. Ses travaux lui ont valu le prix Nobel.

Ce principe immunitaire est évident durant les travaux de greffe de tumeur, mais personne n'est en mesure d'expliquer la nature exacte de la réaction qui aboutie au rejet du greffon. Un généticien, nommé Snell, attribue ce rejet à la différence génétique entre le donneur et le receveur et introduit le terme « *gène d'histocompatibilité* », ce qui lui vaut le prix Nobel en 1958. Par ailleurs, personne ne parvient à des progrès majeurs durant la première moitié du XX^{ème} siècle.

Avant 1940, les recherches en transplantation ont perdu de leur intensité, notamment à cause de l'incontournable rejet de la greffe. Par contre, une étude de Gibson et Médawar démontre clairement que la perte du greffon est due à une réaction immunitaire (Gibson et Medawar, 1942). Cette observation stimule une multitude d'autres recherches qui finissent par identifier les lymphocytes comme élément de départ de la réaction immunitaire. Cette découverte marque un point culminant dans l'histoire de la transplantation: la cause du rejet de la greffe étant finalement identifiée, les recherches qui suivent sont axées sur l'inhibition de cette réaction.

Au début de la Guerre Froide, l'inquiétude générée par l'effet des retombées nucléaires engendre une vague d'expériences sur la radiation au cours desquelles sont découvertes leurs propriétés immunosuppressives. Quoique d'une toxicité extrême, la radiation permet le succès de quelques transplantations rénales entre jumeaux. Des années plus tard, les recherches en leucémie permettent la découverte des propriétés immunosuppressives des glucocorticostéroïdes. En 1958, Schwartz et Dameshek, utilisent la 6-mercaptopurine (6-MP) sur des modèles animaux avec un succès modeste. Malgré cela, sa toxicité moins sévère que celle de la radiation donne à la 6-MP une place de choix en immunosuppression clinique: la 6-MP et son précurseur l'azathioprine, associées aux

glucocorticostéroïdes seront les seules thérapies immunosuppressives des 20 années suivantes.

Grâce à ces agents, la transplantation d'organes fait des progrès considérables. Elle devient un domaine clinique établi, ce qui laisse place au développement de plusieurs revues médicales dédiées uniquement aux recherches en transplantation. Cependant, ces progrès sont principalement obtenus en transplantation rénale. En transplantation hépatique, pulmonaire et pancréatique, les taux de succès sont faibles. L'aspect technique de ces chirurgies semble insurmontable et il faudra attendre le début des années '80 pour que ces chirurgies soient établies en clinique. La transplantation cardiaque suit son propre chemin. Son aspect technique est bien établi, mais durant les années '70, il se heurte à l'opinion d'un public méfiant des expériences médicales sur les humains. Il faudra aussi patienter jusque dans les années '80 pour convaincre ce public non seulement de la nécessité d'une telle procédure, mais aussi de sa faisabilité.

Les années '80 amène la découverte d'un agent qui fait de la transplantation d'organes une solution thérapeutique acceptable en clinique. L'introduction de la Cyclosporine A (CsA) par Calne et White (1978) et sa commercialisation par la compagnie Sandoz permettent de doubler le temps de survie des greffons rénaux et d'amener des progrès considérables en transplantation de foie et de cœur. La CsA étant beaucoup moins toxique

que les glucocorticostéroïdes, on l'incorpore rapidement dans les thérapies d'immunosuppression comme agent de première ligne. Grâce à la venue de la CsA, la survie du greffon n'est plus le point central des recherches en transplantation : on peut maintenant se concentrer à l'amélioration des techniques, sur la spécificité du traitement et sur la réduction des effets secondaires des immunosupresseurs (Ginns *et al.*, 1999).

Au fil des ans, la transplantation est passée d'un rêve de chirurgiens excentriques à une réalité clinique. En effet, la transplantation a, depuis longtemps, cessé d'être une procédure expérimentale et fait maintenant partie intégrante des solutions offertes en clinique. Toutefois, le besoin d'amélioration rend l'expérimentation essentielle. Malgré le fait que plusieurs nouveaux agents, tel que le tacrolimus, le sirolimus et le mycophénolate mofétil viennent diversifier les traitements immunosuppresseurs, le temps de survie du greffon demeure limité et les effets secondaires des thérapies sont inquiétants, ce qui laisse supposer qu'aucune thérapie immunosuppressive n'est encore idéale. De plus, vient s'ajouter le problème de la pénurie d'organes qui force les patients à attendre plusieurs années avant qu'un organe ne soit disponible (Ginns *et al.*, 1999).

Le début du troisième millénaire est consacré aux des défis présentés par ces obstacles. La progression dans la recherche d'immunosuppresseurs

plus efficaces continue. La xénotransplantation et l'organogénèse sont des domaines de recherche d'où pourraient émerger les solutions aux problèmes auxquels la transplantation fait face.

1.2 REJET DE GREFFE

Le rejet de greffe est le résultat de plusieurs événements immunologiques axés vers la protection du receveur contre un greffon reconnu comme un corps étranger. Bien que plusieurs facteurs y contribuent, la reconnaissance des différences entre les antigènes du donneur et du receveur, par le système immunitaire, est le stimulus initiateur du rejet. Le rejet est une réaction immunologique initiée par le receveur contre les antigènes étrangers (Ag) portés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH ou HLA chez l'humain) du greffon. Cette réaction est initiée par les lymphocytes, les cellules cytotoxiques NK et les anticorps (Ac). Le rejet de greffe amène la destruction des cellules et de la perturbation des fonctions du greffon. L'issue du rejet de greffe est donc la destruction et la perte de l'organe implanté (Révillard, 1998; Ginns *et al*, 1999). Il y a trois types de rejet de greffe: le rejet sur-aigu, aigu, et chronique.

1.2.1 Rejet sur-aigu

Le rejet sur-aigu survient immédiatement après la transplantation. Il se caractérise par l'accumulation de globules rouges et la formation de microthrombi sur l'endothélium vasculaire du greffon. Ceci résulte de la réaction des anticorps préformés. Ils sont le produit d'une présensibilisation

du système immunitaire de l'hôte, résultat de transplantations antérieures, de transfusions sanguines ou bien de grossesses. Cette présensibilisation a pour effet de produire une réaction immunitaire immédiate. Étant donné que quelques gouttes de sang peuvent produire une telle réaction, il est donc essentiel de faire une perfusion complète du greffon. Le rejet sur-aigu est aussi causé par une incompatibilité totale des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Dans ce cas-ci, la perte du greffon est immédiate (Révillard, 1998).

1.2.2 Rejet aigu

En transplantation d'organes, le rejet aigu est une cause importante d'insuccès. Malgré le fait que le rejet sur-aigu puisse être prévenu, le receveur démontre de multiples réactions de ses cellules T contre les antigènes du greffon. Le rejet aigu est induit directement par les interactions entre les molécules CMH allogéniques et les récepteurs des lymphocytes T (TCR) du receveur ou indirectement, par les peptides liés aux CMH exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de l'hôte et le TCR (Dallman; dans es Ginns *et al.*, 1999). Des biopsies sur le greffon au moment d'une crise de rejet aigu révélant la présence de lymphoblastes, de lymphocytes T activés, d'éosinophiles, de monocytes de même que l'augmentation de l'expression des CMH sur l'endothélium. Il y a aussi la production locale des lymphokines, IFN- γ pour activer les macrophages et

TNF- α pour induire entre autres la mort cellulaire programmée : l'apoptose (Révillard, 1998).

1.2.3 Rejet chronique

Le rejet chronique est un tout autre type d'événement qui se caractérise par une détérioration à long terme du greffon. En effet, une période d'un à deux ans peut s'écouler avant que le greffon ne soit plus fonctionnel. Le rejet chronique est issu de plusieurs facteurs et il se divise en trois phases importantes :

- 1) Une phase dans laquelle l'organe transplanté est attaqué par les anticorps ou par le complexe anticorps/antigène et le complément et ce, à la suite des lésions cellulaires.
- 2) Une période de dommages cellulaires médiés au départ par les lymphocytes T et plus tard, par les macrophages.
- 3) Une dernière phase dans laquelle il y a un remodelage du tissu et ce, dépendant des cytokines et des facteurs de croissance (TGF- β 1, INF- γ et PDGF) (Ginns *et Al*, 1999).

Le rejet chronique est une cicatrisation générale du greffon, que l'on explique, comme un durcissement des vaisseaux sanguins et des capillaires,

processus similaire à l'artériosclérose. Ce processus de cicatrisation est aussi actif au niveau de la matrice extracellulaire qui prolifère d'une façon incontrôlée suite à la sécrétion des mêmes cytokines. Bref, un organe implanté, où le rejet chronique s'installe, subit une perte de fonction graduelle suite à au changement tissulaire, qui créer à son tour une condition ischémie permanente (Shirwan, 1999).

Facteurs de risques du rejet chronique

Plusieurs facteurs sont impliqués dans le rejet chronique, notamment des facteurs antigène dépendant et des facteurs non-antigène dépendant. Dans les facteurs antigène dépendant, on note principalement la ressemblance entre les CMH et le rejet aigu. Pour ce qui est des facteurs non-antigène dépendant ce sont principalement les phénomènes suivants: les dommages causés par l'ischémie/reperfusion, toxicité des immunosuppresseurs, des infections virales, l'hypertesion et l'hyperlipidémie. Tous ces phénomènes sont impliques directement ou indirectement dans la perte fonctionnelle de l'organe transplantée et ce, en modifiant les tissus de l'organe (Ginns *et Al*, 1999).

1.2.4 Immunobiologie du rejet de greffe

Le rejet, plus particulièrement le rejet aigu, est une réaction immunologique classique où le greffon est reconnu comme non-soi par les

lymphocytes T et est soumis aux anticorps et aux cellules cytotoxiques (CTC, NK). Le rejet est initié par la migration des cellules dendritiques provenant du greffon, dans les organes lymphoïdes du receveur. Puisque ces cellules expriment des antigènes étrangers, ils sont reconnus par les lymphocytes résidents et stimulent ainsi la réaction de défense (Révillard, 1998). Ces cellules dendritiques deviennent alors présentatrices professionnelles d'antigènes, les CPA. Les antigènes du donneur sont exprimés à la surface des CPA par les CMH. Les CMH sont des glycoprotéines de surface cellulaire qui transportent des peptides provenant de tissus. Les CMH des cellules du greffon présentent des peptides du donneur. Durant l'interaction entre le récepteur des cellules T (TCR) et les CMH, ces derniers sont reconnus comme antigènes (Ag) par les récepteurs des cellules T (TCR) du receveur. Suivant cette interaction, les lymphocytes T sont activés et les macrophages se mettent à sécréter des cytokines comme le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-1, et l'IFN- γ , ces deux dernières servant à recruter et à activer les cellules T cytotoxiques (CTC) (Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999).

Les cellules T peuvent être activées directement par les CPA du donneur ou indirectement par les CPA du receveur. La reconnaissance de l'antigène étranger se fait par le récepteur des cellules T, un complexe moléculaire dit TCR. Celui-ci est composé des chaînes α et β qui servent à l'interaction avec le CMH (Ginns *et al.*, 1999; Révillard, 1998). La transmission du signal d'activation se fait par une troisième portion du TCR :

la chaîne CD3. Le signal provenant de CD3, active l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire qui marque le début de l'expansion clonale des cellules T. La transcription de gènes de cytokines (exemple l'IL-2) ainsi que leurs récepteurs est alors initiée (Révillard, 1998).

Le complexe d'activation des lymphocytes T comprend d'autres glycoprotéines de co-stimulation sans lesquelles ils ne peuvent s'activer et deviennent anergiques, c'est-à-dire dormants (Schwartz, 1997; Révillard, 1998). Les récepteurs des CPA et des cellules T sont exposés à d'autres costimulateurs, entre autre, les CD2, CD54, CD11a/CD18, CD15, CD28, ses ligands, B7-1 et B7-2, et CD40 et son ligand CD40L (Révillard, 1998;).

Les lymphocytes T complètement activés, doivent maintenant traverser l'endothélium vasculaire pour pénétrer l'organe ou le tissu transplanté. Durant la migration à l'intérieur du greffon, un système d'adhésion permet aux lymphocytes T d'atteindre leur cible. Précédant l'inflammation du greffon, des chimiokines, RANTES, IL-8 et MCP-1, sont sécrétées par les macrophages et les cellules dendritiques pour induire l'expression, sur l'endothélium vasculaire du greffon, de molécules d'adhésion cellulaire VLA-4, ICAM-1, VCAM-1, et E-sélectine. Ces glycoprotéines serviront de points d'attachement aux lymphocytes T activés et aux macrophages qui expriment les ligands pour ces molécules. C'est

grâce à ces structures que les lymphocytes T peuvent cibler et pénétrer le site d'inflammation, qui est le greffon (Révillard, 1998).

Suivant la présentation d'antigènes, l'activation et la migration des lymphocytes T, le rejet de greffe aboutit à la destruction des tissus transplantés. Le système immunitaire possède, au travers des anticorps et des cellules cytotoxiques, deux mécanismes de destruction (Ginns *et al.*, 1999). D'abord les anticorps causent des lésions cellulaires en se fixant aux antigènes portés par l'endothélium du greffon pour induire la cytotoxicité cellulaire (ADCC). Puis, les cellules du greffon meurent soit par nécrose ou par l'activation du suicide programmé, dit apoptose (Révillard, 1998).

Les cellules cytotoxiques, les CTC, sont activées pour lyser les cellules exprimant des CMH étrangers. Les CTC détruisent leurs cibles en sécrétant des granzymes pour la digestion du contenu intra-cellulaire et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α pour l'induction de l'apoptose. (Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999).

Certains événements résultent de la réaction immunitaire sans toutefois contribuer au rejet aigu, c'est-à-dire à la mort directe des cellules étrangères. Par exemple, les macrophages activés sécrètent aussi le Facteur de Croissance (TGF)- β et le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), provoquant, dans le greffon, la prolifération du muscle lisse vasculaire et la

sécrétion de collagène dans la matrice cellulaire. Ces facteurs contribuent à la détérioration à long terme du greffon: le rejet chronique (Shirwan, 1999).

1.2.5 Tolérance de greffe

Le système immunitaire est capable de reconnaître un corps étranger dans l'organisme. C'est grâce à un système de reconnaissance des différences génétiques que le soi de l'organisme peut être différencié du non-soi (Révillard, 1998). Acquérir un état de tolérance préviendrait la reconnaissance des alloantigènes du greffon par les lymphocytes T et B du receveur par un de trois mécanismes de tolérance: l'anergie, la répression, et la suppression.

Anergie

Un lymphocyte T devient anergique quand il ne peut être complètement activé par des antigènes étrangers reconnus par le TCR. Le greffon est alors protégé puisque la réaction immunitaire contre le donneur ne peut être amorcée. L'anergie des lymphocytes T est associée à une perte de réponse à l'IL-2 ou un manque de costimulation (Révillard, 1998). L'anergie dans les cellules B est le résultat de la perte d'expression des récepteurs aux immunoglobulines. Les lymphocytes B sont inactivés durant un stimulus antigénique, mais contrairement aux lymphocytes T, la perte de

ce stimulus ou l'arrivée d'un autre, comme une infection, réactive les cellules devenues anergiques (Rocken, 1992).

Répression

L'inhibition de la réponse des lymphocytes T qui sont réactifs contre les antigènes étrangers. Les lymphocytes reconnaissent les allo-antigènes et par conséquent, réagissent contre ceux-ci. La répression se fait au niveau de la réponse des lymphocytes T à l'activation. Par exemple, des anticorps anti-TCR peuvent désamorcer les lymphocytes et ainsi répriment leur capacité de réponse. La cytokine Transforming Growth Factor (TGF)- β a aussi un effet d'inhibition sur les CTC (Ginns *et al.*, 1999).

Suppression

Un moyen efficace d'induire la tolérance serait de supprimer des lymphocytes T réactifs contre le greffon présent déjà dans le thymus du receveur. Quand des lymphocytes T, présents dans le thymus, réagissent contre des peptides/CMH du soi, exprimés aussi dans le thymus; ils subissent alors l'apoptose et sont éliminés. Ce mécanisme assure à l'organisme la protection contre toutes les réactions auto-immunes (Révillard, 1998). Conséquemment, supprimer les lymphocytes T alloréactifs de cette

manière permettrait l'induction de la tolérance, puisque toutes cellules nocives au greffon seraient supprimées.

Le rejet de greffe est un événement complexe issu de plusieurs étapes. Certains avantages peuvent être tirés d'une telle complexité. Chacune des étapes peut devenir une cible pour les thérapies immunosuppressives. En effet, prévenir le rejet de greffe peut se faire au niveau de la présentation d'antigènes, de la prolifération des cellules T, de l'adhésion ou de la migration des lymphocytes et de l'inhibition de la sécrétion de cytokines. Malheureusement, chacune des étapes de la réaction immunitaire est souvent activée par plusieurs facteurs. En effet, le système immunitaire étant redondant, il ne peut être suffisant d'inhiber une voie d'activation. Une thérapie immunosuppressive efficace devra donc inclure plusieurs agents aux modes d'action qui diffèrent.

1.3 IMMUNOSUPPRESSION

1.3.1 Traitements classiques

Irradiation

L'irradiation des lymphoïdes par rayons ultra violets ou X est la première thérapie immunosuppressive. L'irradiation provoque la détérioration de l'ADN cellulaire dans les organes lymphoïdes du receveur : toutes les cellules en phase proliférative, notamment les lymphocytes, voient leur croissance s'arrêter (Révillard, 1998). Malgré le déficit immunitaire induit par l'irradiation, les organes transplantés subissent quand même le rejet aigu et suraigu. D'ailleurs, seules les transplantations entre jumeaux identiques ont du succès (Ginns *et al.*, 1999).

Antimitotiques

La thiopurine 6-mercaptopurine (6-MP) a été le premier agent antimitotique utilisé dans les crises de rejet. La 6-MP empêche la prolifération des lymphocytes T et B en remplaçant les purines durant la transcription de l'ADN (Elion *et al.*, 1955). En transplantation, l'azathioprine, un précurseur de la 6-MP est utilisée à cause de sa plus grande efficacité.

L'addition des corticostéroïdes, prednisolone et prednisone, aux traitements avec l'azathioprine, marque la venue des thérapies d'association

(Ginns *et al.*, 1999). Les stéroïdes font désormais partie intégrante des régimes immunosuppresseurs. Comme l'azathioprine, ces agents enrayent la prolifération des lymphocytes T, mais cette fois-ci en bloquant la production de l'IL-1 et en diminuant la production de l'IL-2 ainsi que de l'INF- γ et ce après le lien du TCR avec l'antigène (Révillard, 1998).

Les bienfaits suscités par l'administration de ces agents sont accompagnés d'effets secondaires importants. Les antimétabolites suppriment l'hématopoïèse et toute la résistance immunitaire. Ils engendrent chez les receveurs des aspects cushingnoïdes, le diabète, l'hypertension, les ulcères gastriques et même l'instabilité émotionnelle. De plus, malgré les progrès, la réussite des transplantations cardiaques et viscérales ne sont pas nombreuses (Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999).

1.3.2 Traitements Actuels

Cyclosporine A

Depuis le début des années 80, la cyclosporine A constitue la base des thérapies immunosuppresseives. Les effets sélectifs de ce macrolide fongique envers les lymphocytes T activés améliorent la spécificité du traitement et entraînent des progrès considérables en transplantation. Sa découverte est souvent considérée, dans les milieux cliniques, marquante du début de la transplantation comme procédure chirurgicale établie. Grâce à la

CsA, les greffes du cœur, du foie, et du pancréas deviennent réalisables (Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999).

La CsA bloque la transcription des gènes de l'IL-2, une cytokine importante pour l'activation des lymphocytes (Ginns *et al.*, 1999). Elle agit d'une façon sélective sur les lymphocytes T car elle bloque leur prolifération sans intervenir sur d'autres monocytes. Ces effets immunosuppresseurs sont synergiques à ceux des glucocorticostéroïdes et la CsA est alors administrée aux patients avec les glucocorticoides et l'azathioprine; une combinaison thérapeutique dite triple-thérapie (Révillard, 1998). En dépit de ces avantages, la CsA induit une toxicité sévère au foie et aux reins. Elle induit aussi la sécrétion de cytokines responsable du développement de l'athérosclérose dans les réseaux vasculaires du greffon. Comme les corticostéroïdes, la CsA neutralise le système immunitaire laissant les patients susceptibles aux infections opportunistes (Ginns *et al.*, 1999).

Macrolides antiprolifératifs

Les années '90 sont marquées par l'introduction de nouveaux macrolides fongiques, le sirolimus, le tacrolimus et le mycophénolate mofétil, qui ciblent des étapes distinctes de l'activation des lymphocytes. Ces agents sont généralement puissants que la CsA et leur association avec la CsA décuple les effets immunosuppresseur. Les données obtenues en laboratoire révèlent que le tacrolimus est en mesure de remplacer la CsA

comme immunosuppresseur de base dans les thérapies d'association (Révillard, 1998 ; Ginns *et al.*, 1999).

Le sirolimus, aussi connu sous le nom de rapamycine, prévient la prolifération des clones de lymphocytes T en bloquant les signaux intracellulaires, de la liaison de l'IL-2 à son récepteur, par l'intermédiaire des protéines cytoplasmiques *FK-binding proteins* (FKBP). La liaison du sirolimus aux FKBP empêche l'entrée dans le noyau de facteurs de transcription comme le NF κ B. Son traitement, quoique plus sécuritaire que celui de la CsA, induit la thrombocytopénie ou l'hypercholestérolémie chez les receveurs (Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 1993).

Le tacrolimus (FK506) est un macrolide similaire au sirolimus dont la cible est aussi une FKBP: FKBP-12 ou FRAP. Le complexe FK506-FKBP-12 bloque la transcription des gènes de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF- α et GM-CSF, tous impliqués dans l'induction du rejet (Jiang *et al.*, 1991). Le tacrolimus s'est avéré plus puissant et aussi sécuritaire pour remplacer la CsA comme agent de base des thérapies immunosuppressives. En plus d'être neurotoxique, le tacrolimus occasionne les mêmes effets secondaires que la CsA, notamment la néphrotoxicité et l'induction du rejet chronique (Ginns *et al.*, 1999).

Le mycophénolate mofétil (MMF) abroge la synthèse de novo des purines en inhibant l'inosine monophosphate déhydrogénase (IMPDH)-II une enzyme essentielle aux développements des lymphocytes T (Ginns *et al.*, 1999). Le mycophénolate mofétil possède un mode d'action unique parmi les immunosuppresseurs, ce qui explique sa puissance synergique avec la CsA et le tacrolimus. Les cibles d'action du mycophénolate mofétil incluent aussi les facteurs de prolifération de muscles lisses vasculaires, d'importants inducteurs du rejet chronique. Ce macrolide est très toxique au système gastro-intestinal, mais il est bien toléré quand il est administré par voie intraveineuse (Révillard, 1998 ; Ginns *et al.*, 1999).

Agents biologiques

Les recherches visant à améliorer la spécificité et la sélectivité du traitement immunosuppresseur ont permis le développement d'agents biologiques tels que des sérums d'anticorps dirigés contre les lymphocytes (ALS pour *Anti Lymphocyte Serum*) et les protéines de fusion comme le CTLA-4-Ig ou le IL-2-Ig. Ils agissent en se liant aux récepteurs exprimés par les cellules immunitaires et aux médiateurs solubles comme les cytokines bloquant certaines co-stimulations et empêchant les liaisons ligand/récepteur des facteurs de prolifération (Ginns *et al.*, 1999). Ces agents ne peuvent être utilisés seul et servent d'ajout aux thérapies actuelles. Les protéines de fusions sont dirigées contre les molécules de co-stimulation des lymphocytes

T en voie d'activation, comme la CTLA-4Ig ou l'IL-2, ce qui bloque la co-stimulation et entraîne l'anergie (Ginns *et al.*, 1999).

1.3.2 Traitements futurs

Nouveaux agents

Au cours des prochaines années, de nouvelles classes d'immunosuppresseurs non-apparentées, par structure et mécanisme d'actions, aux agents connus seront introduites dans les protocoles d'immunosuppression clinique: des molécules comme le bréquinar, les malononitrilamides, 15-déoxyspergualin (DSG) et le FTY720. De ce groupe, les malononitrilamides et le FTY 720 sont les agents les plus prometteurs, car ils ont des modes d'action distincts des macrolides. En fait, les malononitrilamides empêchent l'utilisation des pyrimidines par les lymphocytes tandis que le FTY720 restreint l'accès des lymphocytes T au réseau vasculaire du greffon (Ginns *et al.*, 1999).

1.3.4 Thérapie d'association

Les thérapies courantes doivent être administrées à des doses élevées au receveur. Cet obstacle est surmonté grâce aux stratégies d'association qui consistent à associer les médicaments dont les effets sont soit additifs ou, idéalement, synergiques. Associer les immunosuppresseurs

permet de réduire les doses administrées, permettant ainsi d'éviter certains effets secondaires (Révillard, 1998). Des agents tels que le tacrolimus, le mycophénolate mofétil ou le sirolimus sont plus puissants que la CsA. (Ginns *et al.*, 1999). Leur mode d'action, plus ou moins sélectif pour les lymphocytes activés, permet une thérapie plus ciblée.

1.4 CYCLOSPORINE A

La découverte de la cyclosporine A (CsA) a transformé la transplantation d'organes d'une procédure expérimentale dont les taux de morbidité et de mortalité étaient élevés à un traitement adéquat pour les individus souffrant de divers types d'insuffisance d'organes. Son introduction dans les protocoles d'immunosuppression a aussi permis de réduire les doses de glucocorticostéroïdes. La cyclosporine A sert de base à la thérapie la plus utilisée en clinique, la triple-thérapie qui est l'association de la CsA et des glucocorticostéroïdes ainsi que de l'azathioprine (Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999).

La cyclosporine A est un macrolide fongique qui a la capacité de bloquer l'entrée des lymphocytes T activés en phase S du cycle de prolifération cellulaire. La CsA est le premier agent qui donne aux thérapies immunosuppressives une sélectivité pour les lymphocytes T. En effet, la CsA n'affecte pas la formation de colonies érythroïdes et myéloïdes, et elle n'est pas toxique pour la moelle osseuse. La CsA a permis de doubler le temps de survie d'un greffon et c'est grâce à sa découverte que les transplantations pulmonaires et cardiaques sont associées à une excellente survie (Flye, 1989; Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999).

1.4.1 Structure et Mécanisme d'Action

La cyclosporine A est un undécapeptide cyclique dérivé du processus de fermentation du fungus *Tolpocladium inflatum gams* (Révillard, 1998; Ginns *et al.*, 1999). De ce processus se forme une vingtaine de cyclosporines dont la CsA est la seule à posséder des caractéristiques immunosuppressives. La CsA est formée de 11 acides aminés aliphatiques agencés en structure cyclique (Fig 1.1). Cette configuration donne aux cyclosporines des propriétés pharmacologiques uniques (Ginns *et al.*, 1999).

Les cibles de la CsA se constituent de cyclophilines, des protéines cytosoliques impliquées dans la voie de signalisation de la calcineurine. Ces enzymes possèdent des domaines de liaison aux cyclosporines, aux glucocorticoïdes et aux macrolides comme le tacrolimus et le sirolimus. Ces agents lient la cyclophiline A (CyA) et l'inhibition des signaux lymphocytaires en résulte (Fig. 1.2) (Ginns *et al.*, 1999). Le complexe CsA-CyA bloque les fonctions enzymatiques de la calcineurine, c'est-à-dire la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT1, elk-1, et *cAMP-response element binding protein* (CREB): enzymes induites par la reconnaissance d'antigènes (Sugimoto *et al.*, 1997). Ces déphosphorylations sont les étapes limitantes de l'activation des lymphocytes, c'est-à-dire que la transposition de ces facteurs de transcription dans le nucléus en dépend. Ces facteurs servent à activer la transcription de gènes de cytokines et des proto-oncogènes *c-mys*,

c-fos, et *n-ras* qui sont responsables d'amorcer le passage du cycle cellulaire G0 à G1 et d'induire l'expansion clonale des CTC (Cristillo *et al.*, 1997).

La cyclosporine A freine la maturation des CTC et la réponse contre les alloantigènes est diminuée. De plus, les crises de rejet sont réduites de façon très importantes. Par contre, les régimes à base de CsA affectent les fonctions rénales. La CsA induit la nécrose des cellules vasculaires rénales et la fibrose des cellules interstitielles causant ainsi la diminution de la filtration glomérulaire (Révillard, 1998). Les patients traités à la CsA subissent une augmentation de la tension artérielle due à l'épaississement de la média vasculaire et d'une vasoconstriction. Chez certains patients, des syndromes d'ordres neurologiques tels que la convulsion et la dépression peuvent avoir lieu. La CsA est aussi connue pour ses effets néoplasiques. D'ailleurs, son administration est associée à une augmentation d'incidence de lymphomes (Ginns *et al.*, 1999).

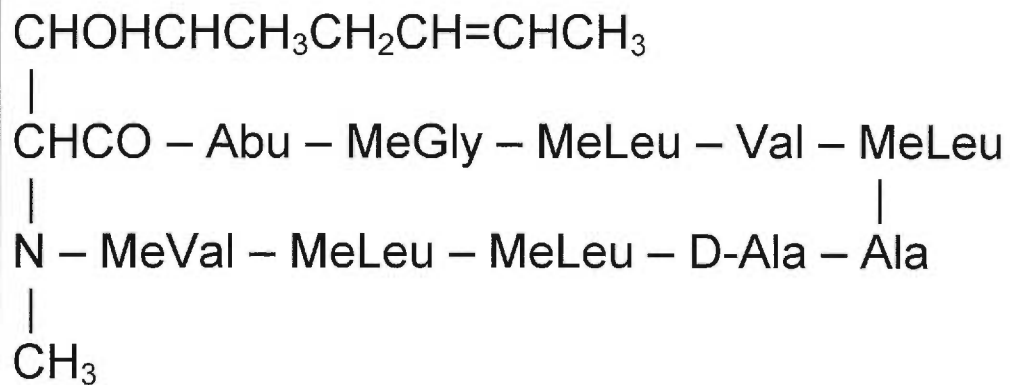


Figure 1.1: Structure moléculaire de la cyclosporine A. (Katzung, B. , 1995 ; p.864)

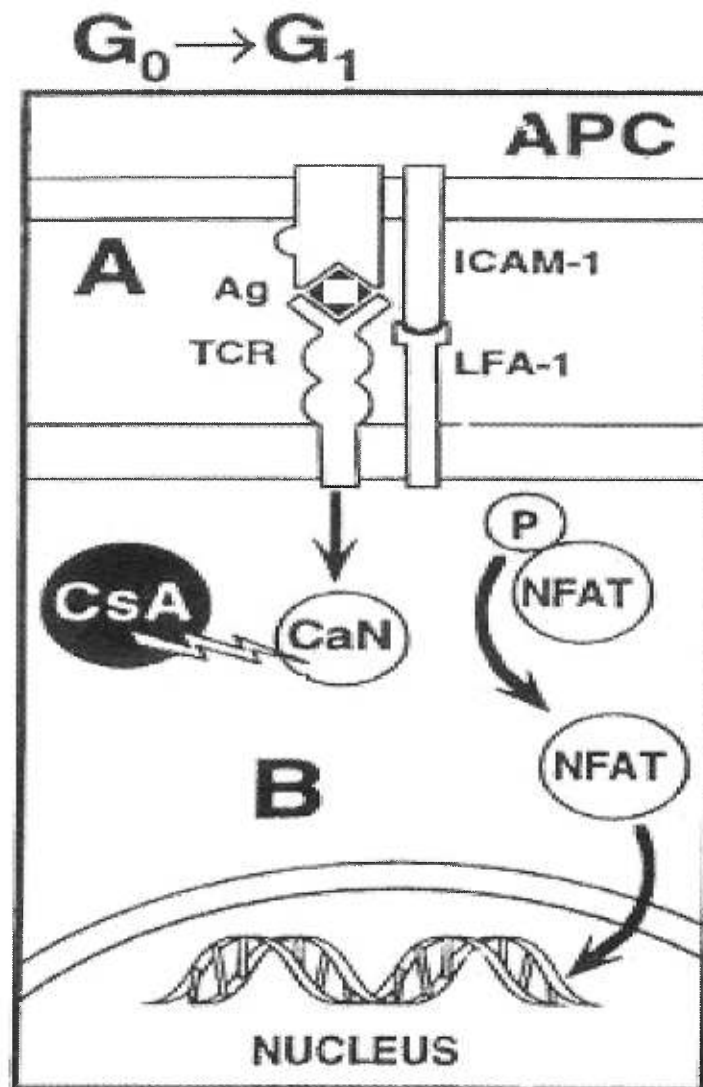


Figure 1.2: Mode d'action de la cyclosporine A. (A) Suivant la liaison avec un CMH d'une cellule porteuse d'antigènes étrangers (APC, *activated presentation cell*), le TCR active la voie de signalisation impliquant la calcineurine qui aboutit à l'activation des facteurs de transcription de cytokines (NFAT) responsables de la transcription des gènes d'IL-2 et l'entrée en phase proliférative G1. (B) La cyclosporine A bloque l'action de la calcineurine (Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation*. Blackwell Sciences. Malden, Mass: 1999; p174).

1.5 RÉCEPTEURS À CANAUX

1.5.1 Base de l'Action Pharmacologique

Tous les médicaments, immunosuppresseurs, hormones, neurotransmetteurs, toxines ou autre stimulus extracellulaire, agissent sur les organismes biologiques en incitant une réponse cellulaire. La base moléculaire de l'action d'un médicament, c'est-à-dire l'initiation d'une réponse pharmacologique est la formation d'un complexe entre le médicament en question et la cellule ciblée. Cette formation initie la transmission d'un signal intra-cellulaire qui engendrera la réponse pharmacologique de la cellule. Puisque cette réponse est unique à l'agent ou au médicament, la cellule ciblée requiert un système permettant de reconnaître d'une manière spécifique chaque médicament et le signal qu'il induit. Ce système se constitue de la liaison d'un ligand, comme un médicament ou un autre stimulus extra-cellulaire, à un récepteur cellulaire qui le reconnaît et transmet son signal.

Le complexe ligand/récepteur est le point critique de la transmission d'un signal particulier et l'induction d'une réponse pharmacologique spécifique. Étant donné la multitude de stimulus extra-cellulaires capables d'initier une réponse, les organismes biologiques ont développé quelques

centaines de récepteurs liés à une dizaine de voies de signalisation (Pratt et Taylor, 1990 ; Katzung, 1995).

Généralement, les récepteurs sont classifiés par les types d'agents pharmacologiques auxquels ils répondent par exemple : les récepteurs adrénergiques, cholinergiques, à l'insuline, à la morphine ou à l'acétylcholine. Ils peuvent aussi être classifiés en deux classes dites, muscarinique et nicotinique, selon le type de réponse induite par l'acétylcholine. Au-delà de ces classes, les récepteurs sont divisés par rapport à leur réponse aux agonistes et aux antagonistes ou par rapport à la puissance de la réponse induite. Dans certains cas, la classification est basée sur le type de réponse élicitée : la voie de signalisation induite, la structure moléculaire du site de liaison au ligand ou même son emplacement anatomique ou cellulaire. Il existe 4 types de récepteurs : intra-cellulaire, transmembranaire, lié à une protéine G et à canal ionique (Katzung, 1995).

1.5.2 Récepteurs à canal ionique

Ces récepteurs ont la capacité d'ouvrir un canal qui permet de façon sélective aux ions de passer au travers de la membrane cellulaire, en aval de leur gradient de concentration. Sur certains récepteurs se retrouve une composante du site de liaison au ligand activateur et le canal ionique. Sur d'autres, l'activation du canal se fait par un changement de potentiel membranaire ou par une modulation de la part d'un autre complexe

ligand/récepteur. Généralement, le canal de ces récepteurs laisse passer exclusivement des ions sodiques (Na^+), calciques (Ca^{++}), potassiques (K^+) et chloriques (Cl^-). Ces canaux sont impliqués dans la dépolarisation membranaire suite aux potentiels d'actions postsynaptiques et dans le maintien des gradients ioniques cellulaires (Pratt et Taylor, 1990).

1.5.3 Canaux voltage dépendant

Une autre famille de canaux, ceux-ci sont voltage dépendant $C_{(v)}$ répond au changement de potentiel membranaire en laissant passer des Na^+ , Ca^{2+} , K^+ et Cl^- . Les canaux à voltage jouent trois rôles dans la cellule : la propagation du potentiel d'action dans les cellules excitables, le contrôle du potentiel membranaire et la modulation des taux de Ca^{2+} intra-cellulaires. Ces canaux sont sélectifs à un ion en particulier et sont caractérisés principalement par leur dépendance au voltage pour leur activation.

Plusieurs similarités structurales et fonctionnelles existent entre les canaux à voltage et ceux récepteur/ligand. Les deux familles se constituent de polymères transmembranaires placés autour d'un canal dont la surface intérieure est jonchée d'acides aminés chargés. Des analyses électrophysiologiques indiquent que la durée et fréquence d'ouverture des canaux récepteur/ligand est influencée par le voltage. Les canaux à voltage répondent de la même façon, sans toutefois dépendre de la liaison d'un

ligand endogène pour leur ouverture. Cependant, il existe quand même certains activateurs et inhibiteurs naturels de ces canaux qui ont permis leur isolation et identification (Pratt et Taylor, 1990; Catterall, 1988).

Jusqu'à présent, trois types de canaux à voltage dépendant ont été identifiés : les canaux sodiques, calciques et potassiques. Malgré le fait que leur structure puisse varier, la sélectivité ionique et la sensibilité au voltage sont communes aux trois types de canaux.

1.5.3.1 Canaux sodiques

Les canaux sodiques à voltage ont été identifiés par Hodgkins et Huxley durant leurs travaux sur les axones de calmar géant. Ces canaux jouent leur rôle dans l'initiation du potentiel d'action. Ils s'activent suite à des changements abrupts du potentiel membranaire pour laisser entrer dans la cellule, des ions sodiques extra-cellulaires. La perméabilité des canaux sodiques augmente jusqu'à un certain niveau et baisse subséquemment. Les canaux sodiques sont toujours en transition entre l'état de repos où ils sont clos, l'état de conductance où ils sont ouverts et l'état inactif où ils se referment. Certains agents, comme la tétrodothine agissent sur les canaux sodiques en inhibant ou activant un des trois états (Pratt et Taylor, 1990 ; Aldrich *et al.*, 1983).

1.5.3.2 Canaux calciques

Le calcium est bien connu pour son rôle de messenger secondaire dans la médiation des signaux intra-cellulaires et le maintien du potentiel trans-membranaire. Dans les cellules musculaires, la présence de calcium est nécessaire à la contraction des fibres d'actine et de myosine suivant une excitation des jonctions neuromusculaires. Quoique les cellules en possèdent des réserves importantes, les niveaux de Ca^{2+} libre intra-cellulaires sont toujours maintenus à des niveaux sous-micromoléculaires. Ceci est rendu possible par les pompes calciques qui extraient du cytoplasme le surplus de calcium. La concentration extra-cellulaire de calcium est 100 à 1000 fois plus élevées que celle du cytoplasme. Introduire du calcium dans le cytoplasme se fait par l'ouverture des dépôts intra-cellulaires et par l'action des canaux ioniques qui laissent passer le Ca^{2+} extra-cellulaire selon de leur gradient de concentration. Les canaux calciques sont soit des récepteurs à ligand soit des canaux à voltage (Miller, 1987).

Comme les autres canaux à voltages, les canaux calciques sont susceptibles aux changements de potentiel membranaire. Leur cinétique peut être modifiée par certains agents, entre autres, le vérapamil, le diltiazem et les dihydropiridines. Plusieurs types de canaux calciques ont été identifiés

et chacun réagit à différents voltages et se retrouvent dans différents systèmes anatomiques (Tsien *et al.*, 1988).

1.5.3.3 Canaux potassiques

Les canaux potassiques servent principalement au maintien du potentiel de membrane dans le système nerveux ainsi qu'à l'hyperpolarisation de la cellule suite à un potentiel d'action. Ils s'activent une fois la cellule dépolarisée et laissent entrer le K^+ extra-cellulaire dans la cellule, ce qui a pour effet d'hyperpolariser celle-ci. Ils jouent le rôle inverse des canaux sodiques dans le développement d'un potentiel d'action. Ils sont aussi impliqués dans la dépolarisation des cellules myocardiques, dans le maintien de l'osmose cellulaire avec l'aide de la pompe K^+/Na^+ , dans la réabsorption des fluides dans la anse de Henle, dans l'activation lymphocytaire ainsi que d'autres activités. Il existe plusieurs types de canaux potassiques : voltage dépendant $K^+_{(v)}$, calcium dépendant $K^+_{(Ca^{2+})}$ et adénosine triphosphate dépendant $K^+_{(ATP)}$. Ce dernier type sera traité dans la prochaine section (1.6). Leur présence est très nombreuses, mais on ne retrouve pas tous les types à chaque endroit. Les $K^+_{(v)}$ sont les plus répandus ; ils se retrouvent dans la membrane des neurones, des muscles squelettiques, des muscles lisses, des lymphocytes et bien d'autres et ce, selon des variances au niveau de leur excitabilité. Quant à eux, les $K^+_{(Ca^{2+})}$

sont principalement retrouvés dans le cerveau et dans les lymphocytes(Cahalan , 1990 ; Guyton et Hall, 1996 ; Catterall, 1988).

1.6 CANAUX POTASSIQUES ATP-DÉPENDANT

1.6.1 Structure et fonctions

Le canal $K^+_{(ATP)}$ appartient à une classe de récepteurs aux sulfonylurées (SUR) qui possèdent sur leur portion intracellulaire, deux sites de fixation des nucléotides. La régulation de l'activité du canal se fait à partir de sa portion intracellulaire plus précisément des sous-unités qui entourent le pore. Le canal $K^+_{(ATP)}$ se constitue de sous-unités dont la conformation est semblable aux canaux à voltage nommé *Kir* (*Inward Rectifier*): deux segments transmembranaires de 390 acides aminés, reliés par une boucle d'acides aminés, H5, et arrangés en tétramère. Ces boucles typiques aux canaux K^+ , lui confèrent sa sélectivité ionique.

Une hypothèse propose que le canal $K^+_{(ATP)}$ est formé de quatre sous-unités appelées *Kir*, chacune jumelée à une unité SUR (Fig 1.3). Chacune des SUR est définie par 1582 acides aminés organisés en 13 segments transmembranaires desquels les segments 9 et 10 (S9 et S10) sont séparés par une boucle extra-membranaire qui, avec l'extrémité de S10, forme les sites de liaisons aux nucléotides. La caractéristique centrale aux canaux $K^+_{(ATP)}$ est le rôle de l'ATP cytosolique comme ligand pour la fermeture du pore et comme substrat enzymatique pour son ouverture. L'ouverture du pore requiert la présence de Mg^{2+} .

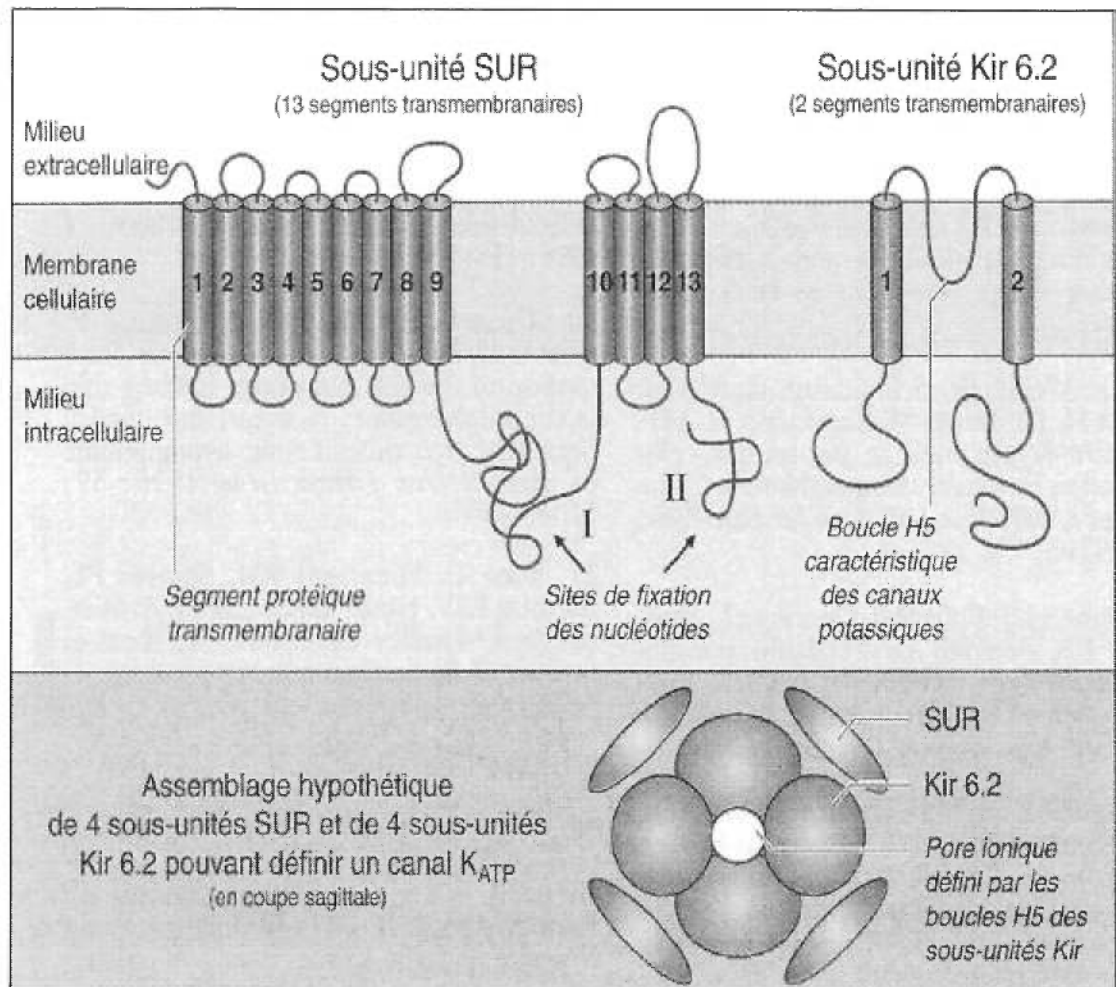


Fig 1.3 : Représentation des structures des sous-unités Kir et SUR du canal K(ATP). La sous-unité SUR est constituée de 13 segments transmembranaires et la sous-unité Kir, deux segments. (Thuringer D et Cavero I. **Les canaux potassiques inhibés par l'ATP cellulaire: une aventure physiologique à suspense moléculaire.** *Médecine/Science* 1997; 13; 1050)

Les canaux potassiques ATP-dépendant ($K^+_{(ATP)}$) ont été découverts en 1983 par Akinori Noma (Noma, 1983). Précédant cette découverte, il était connu que le flux membranaire potassique était sensible aux fluctuations énergétiques cellulaires. En effet, suivant l'épuisement des myocytes cardiaques, il y avait une conduction vers l'extérieur d'ions potassiques (Thuringer et Caverio, 1997). Grâce à la méthode *patch-clamp*, Noma démontra que ce flux sortant suit la dépression de la synthèse d'adénosine-5'- Triphosphate (ATP) et que ce même flux est inhibé par l'injection d'ATP dans le cytosol (Noma, 1983). Ces canaux portent maintenant l'appellation canal potassique ATP-dépendant ou simplement $K^+_{(ATP)}$.

La présence d'ATP cytosolique sur le canal $K^+_{(ATP)}$ exerce deux fonctions régulatrices : d'une part comme ligand qui ferme le pore, d'autre part, comme substrat enzymatique qui l'ouvre. En plus de la présence d'ATP, l'ouverture du pore nécessite que ce dernier soit couplé avec un Mg^{2+} . Le canal possède aussi un site intracellulaire de phosphorylation qui se charge de l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour restaurer l'activité du pore. Cette fonction de phosphorylation n'est pas impliquée dans la fermeture du canal par l'ATP (Thuringer et Caverio, 1997). D'autres nucléosides ont des effets régulateurs qui varient selon leur type; par exemple les diphosphates tels que le ADP ou le GDP, sont capables d'antagoniser l'inhibition du canal

par l'ATP. En fait, les diphosphates peuvent induire l'ouverture du canal malgré la présence d'ATP cytosolique (Terzic *et al.*, 1995).

L'explication actuelle de la régulation des canaux $K^+_{(ATP)}$ veut que, sur sa portion intracellulaire, le canal possède deux sites, P1 et P2, impliqués dans l'activité enzymatique $ATP-Mg^{2+}$ associée à la phosphorylation (Fig 1.4). Pour s'ouvrir spontanément en l'absence de nucléotides, le canal doit d'abord être phosphorylé sur P1. La perte progressive de l'activité spontanée du canal résulte de la déphosphorylation de ce site. Suivant la déphosphorylation de P1 et donc l'inaction de canal, la fixation du nucléosides diphosphates (NDP) sur le site N peut induire la réouverture du canal à condition que le site P2 soit phosphorylé. Par contre, l'ATP inhibe l'ouverture du canal et son activité spontanée et ce, indépendamment des sites P1 et P2 phosphorylés, en se liant au site A. Dans les $K^+_{(ATP)}$ cardiaques, les deux sites doivent être phosphorylés simultanément pour empêcher l'action de l'ATP.

1.6.1.1 Activateurs du canal $K^+_{(ATP)}$

Les activateurs du canal $K^+_{(ATP)}$ augmentent son activité en agissant sur une portion régulatrice encore non-identifiée. Des agents comme le bimakalim, l'aprikalim, le cromakalim et le levcromakalim forment un complexe avec un site interne qui bloque l'effet inhibiteur de l'ATP envers le pore. Le nicorandil, l'ER001533 et le HOE-234 agissent sur les sites A et N (Terzic *et al.*, 1995). Ces agents sont sélectifs pour les $K^+_{(ATP)}$ et ils ont pour effet d'ouvrir le pore pour laisser passer les K^+ du cytosol vers l'espace interstitiel. Les activateurs des $K^+_{(ATP)}$ induisent l'hyperpolarisation de la membrane. Les activateurs des $K^+_{(ATP)}$ sont reconnus pour leurs effets vasodilatateurs et la cardioprotection induit durant l'ischémie (Pignac *et al.*, 1993; Grover, 1994).

1.6.1.2 Inhibiteurs du canal $K^+_{(ATP)}$

Les protéines SUR qui entourent les *Kir* pourvoient aussi un site de régulation du canal. Les SUR sont susceptibles de lier les sulfonylurées créant un barrage devant le pore des $K^+_{(ATP)}$. Les sulfonylurées tel le gliclazide, le gibenclamide, le glipizide et le glimépiride, sont utilisées en clinique comme hypoglycémiantes oraux. En effet, les inhibiteurs des canaux $K^+_{(ATP)}$ favorise la dépolarisation des cellules, ils augmentent la sécrétion d'insuline, ce qui leur confèrent des propriétés d'hypoglycémiantes (Harrower, 2000 ; Luzi et Pozza, 1997 ; de Weille *et al.*, 1988).

1.6.2 Rôles physiologiques des $K^+_{(ATP)}$

Les $K^+_{(ATP)}$ se retrouvent dans plusieurs types de tissu où leur rôle cellulaire varie. Cette diversité leur est conférée par l'existence de différents isoformes des sous-unités SUR et Kir. Comme il a déjà été indiqué, le potentiel membranaire de repos est maintenu par les $K^+_{(ATP)}$. Cependant, la régulation du mouvement d'ions K^+ a ses effets au-delà de la membrane cellulaire. Les canaux $K^+_{(ATP)}$ règlent l'excitabilité des cellules musculaires squelettiques, maintiennent le tonus vasculaire, contrôlent la sécrétion de certaines hormones (Ex : Insuline). Ils sont aussi impliqués au niveau hypothalamique dans le réglage de l'appétit et contribuent au recyclage des ions K^+ au niveau de l'épithélium rénal (Thuringer et Caverio, 1997). Leur rôles dans divers mécanismes physiologiques font des canaux $K^+_{(ATP)}$ l'objet de recherches dans certains domaines cliniques, notamment la transplantation cardiaque et l'endocrinologie de diabète.

1.6.3 Canaux potassiques et transplantation cardiaque

1.6.3.1 *Cardioprotection*

Le rôle des canaux $K^+_{(ATP)}$ dans la protection ischémique tissulaire a récemment retenu l'attention de plusieurs chercheurs. En effet, l'extrusion d'ions potassiques est impliquée d'une façon importante dans la phase initiale de l'ischémie dans les tissus cardiaques et cérébraux : l'activité des

$K^+_{(ATP)}$ contribue à réduire la sévérité des lésions ischémiques et la mort cellulaire (Grover, 1994).

Suite à une ischémie cardiaque, la phase plateau du potentiel d'action (PA) des cardiomyocytes sera raccourcie et les contractions cardiaques réduites. Plusieurs recherches démontrent que cette altération du PA myocardique est associée à une extrusion de K^+ via des canaux $K^+_{(ATP)}$ lorsque l'ATP cellulaire diminue. L'activité électrochimique du myocarde diminue et les arrêts en diastole deviennent plus rapides, ce qui protège les réserves énergétiques des cardiocytes. Ces événements réduisent l'amplitude de la diffusion du Ca^{2+} intracellulaire et la surcharge de Ca^{2+} . Il apparaît donc que l'activation des $K^+_{(ATP)}$ dans les cardiocytes et la réduction de la durée du PA sont des mécanismes permettant de préserver l'ATP cellulaire et de prévenir des lésions ischémiques (Pignac *et al.*, 1993; Grover, 1994)

Suivant la revascularisation du greffon, la fonction contractile du cœur reste souvent inadéquate face aux besoins du receveur (Cole *et al.*, 1991; Pignac *et al.*, 1993). Les recherches visant à améliorer l'état du cœur durant l'ischémie ont proposé l'addition de modulateurs de canaux $K^+_{(ATP)}$ aux manœuvres de cardioprotection. En effet, des activateurs de $K^+_{(ATP)}$ comme l'aprikalim, le pinacidil et le cromakalim se montrent efficaces dans la réduction des lésions ischémiques dans des modèles *ex-vivo*. En permettant

l'extrusion de K^+ ils maintiennent la fonction contractile et réduisent les arythmies qui surviennent suite à l'ischémie cardiaque (Pignac *et al.*, 1993; Grover, 1994). Ces effets protecteurs sont aussi rapportées dans les greffons cardiaques pré-conditionnés au nicorandil (Menasché, 1996). Les autres activateurs des canaux $K^+_{(ATP)}$, le bimakalim et l'aprikalim, offrent la même cardioprotection dans les modèles animaux d'infarctus cardiaque (Auchampach *et al.*, 1994). La protection cardiaque est amoindrie par la présence d'antagonistes de $K^+_{(ATP)}$ comme le glibenclamide et le glycazide. En effet, contrairement aux activateurs du canal $K^+_{(ATP)}$ les inhibiteurs préviennent le raccourcissement du PA et ils détériore d'avantage la fonction contractile du cœur (Cole *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1993).

1.6.3.2 Tonus vasculaire

Le tonus vasculaire peut lui aussi varier en fonction de l'activation des $K^+_{(ATP)}$. En effet, l'hyperpolarisation causée par l'ouverture des $K^+_{(ATP)}$, diminue non seulement les cardiaques, mais celles des cellules musculaires lisses. C'est pourquoi les activateurs de $K^+_{(ATP)}$, sont des vasodilatateurs et les inhibiteurs des $K^+_{(ATP)}$ sont, quant à eux, des vasoconstricteurs. Les activateurs comme le cromakalim et le pinacidil sont reconnus pour induire une vasodilatation dans les cellules musculaires lisses vasculaires, c'est pourquoi qu'on les reconnaient comme vasodilatateur. (Standen *et al.*, 1989).

Dans la transplantation d'organes très vascularisés, comme le poumon et le coeur, l'activation des $K^+_{(ATP)}$ sert à diminuer la résistance vasculaire suscitée lors de la période l'ischémie et d'hypoxie. Des recherches animales indiquent que l'administration du vasodilatateur nicorandil, un activateur des $K^+_{(ATP)}$, aux greffons pulmonaires améliore sa fonction en réduisant la résistance vasculaire et en réduisant les effets de la myéloperoxidase, enzyme active durant l'ischémie (Yamashita *et al.*, 1996).

Les bénéfices associés à l'activation des $K^+_{(ATP)}$ sont nombreux. Dans un greffon cardiaque riche en cellules musculaires et en vaisseaux sanguins, les activateurs de $K^+_{(ATP)}$, comme l'attestent les recherches, protègent la constitution du greffon en diminuant les lésions d'ischémie/reperfusion. Ceci indique le rôle direct que les $K^+_{(ATP)}$ et, plus particulièrement, ses modulateurs peuvent jouer dans l'évolution d'une transplantation cardiaque.

1.6.3.3 Activation des lymphocytes

Les $K^+_{(ATP)}$ se retrouvent dans presque tous les types de tissus où ils maintiennent l'intégrité cellulaire et participent à plusieurs voies de signalisation. Cependant, leur rôle dans la régulation des lymphocytes reste inconnu. Quant aux canaux potassiques à voltage ($K_{(V)}$), ils sont impliqués dans l'inhibition de l'activité mitogénique des lymphocytes T. Certains antagonistes des $K_{(V)}$ tel le tétraéthylammonium (TEA), le 4-aminopyridine

(4AP) et la quinine empêchent l'incorporation de thymidine bloquant ainsi la prolifération mitogénique (Chandy *et al.*, 1984). Les mitogènes peuvent en retour moduler l'activité des $K_{(V)}$. Plusieurs types de cellules du système immunitaires dépendent des signaux mitogéniques pour leur réplication, notamment les cellules T cytotoxiques et les *natural killer cells* (NK) (Fukushima *et al.*, 1984; Sidell *et al.*, 1986). En plus de l'aspect antimitotique, l'effet des $K_{(V)}$ se manifestent à plusieurs étapes de la croissance des cellules T. On rapporte un rôle pour : l'activation par IL-2, la synthèse de protéines des cellules activées (Lee *et al.*, 1986) et la régulation du volume de ces cellules (Cheung *et al.*, 1982). Les canaux potassiques servent aussi de marqueurs de la différenciation des lymphocytes T (McKinnon et Ceredig, 1986).

Les antagonistes aux canaux $K_{(V)}$ empêchent l'expansion clonale, non pas par la voie de l'inactivation des lymphocytes, mais en inhibant la biosynthèse de leur prolifération. D'après Schell *et al.*, (1987) le TEA, par exemple, bloque la prise d'acides aminés nécessaires à la prolifération et à la synthèse de lymphokines. Ceci pourrait résulter de la dépolarisation membranaire causé par l'antagonisme aux canaux $K_{(V)}$. Les systèmes de transport cellulaire qui dépendent d'un certain potentiel transmembranaire se retrouveraient alors restreints. Les antagonistes des $K_{(V)}$ n'ont donc aucun effet direct sur les lymphocytes en prolifération; ils altèrent plutôt l'environnement électrique de la cellule en ralentissant ou même empêchant la biosynthèse ou la sécrétion nécessaire à l'expansion lymphocytaire.

Les canaux potassiques à voltage sont aussi impliqués dans la régulation de la croissance lymphocytaire. De plus, l'intrusion de Ca^{2+} qui suit l'activation lymphocytaire est aussi modulée par les canaux K^+ de type $\text{K}_{(V)}$ 1.3. Le Ca^+ est impliqué dans plusieurs voies de signalisation activées durant l'activation des lymphocytes, notamment la production de cytokines et la prolifération cellulaire (Lin *et al.*, 1993).

Les étapes de la régulation de la croissance des lymphocytes a toujours offert des cibles intéressantes pour aboutir à l'immunosuppression. La présence de canaux ioniques dans les lymphocytes T pourrait aussi servir de point de modulation de la réaction immunitaire par leur implication dans la régulation du niveau de Ca^+ (Koo *et al.*, 1997). Les $\text{K}_{(ATP)}^+$ participent aussi aux changements de niveaux de Ca^+ intra-cellulaire et pourraient, autant que les $\text{K}_{(V)}$, servir de cible aux manœuvres d'immunosuppression. Cependant, leur expression et leur rôle dans les lymphocytes restent à être étudié.

1.6.3.4 $\text{K}_{(ATP)}^+$ et diabète

La connaissance du rôle physiologique des canaux potassiques s'est élargie quand il est devenu claire que les hypoglycémiant oraux, comme le gibenclamide et le diazoxide étaient des antagonistes des canaux $\text{K}_{(ATP)}^+$. De plus, la caractérisation moléculaire du canal décrivait clairement un

hétéromère formé de deux types de sous-unités : les *Kir* et les *SUR*. Ces dernières étant des récepteurs à la famille des sulfonylurées. Depuis lors, les sulfonylurées sont devenues des outils essentiels à la compréhension du rôle physiologiques des canaux $K^+_{(ATP)}$ (Thuringer et Cavaro, 1997).

Le pancréas est un organe marqué par l'abondance des $K^+_{(ATP)}$ à la surface des cellules qui, lorsque stimulées par la présence de glucose, sécrètent de l'insuline. Précédant la sécrétion d'insuline, les cellules β -pancréatiques subissent une dépolarisation lente initiée par la fermeture des $K^+_{(ATP)}$ via l'ATP (Cook et Hales, 1984). Les ions calciques qui pénètrent via des canaux Ca^{2+} à voltage, activent les voies de signalisation menant à la sécrétion d'insuline (Lebrun *et al.*, 1982; Soria *et al.*, 1996). Le glibenclamide et le diazoxide doivent leurs propriétés hypoglycémiantes à la sécrétion d'insuline qui suit la fermeture du $K^+_{(ATP)}$ suivant leur liaison aux sous-unités *SUR*. Les hormones endogènes, comme la galanine, responsables de la régulation de la glycémie sont aussi des modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ (Thuringer et Cavaro, 1997; de Weille *et al.*, 1988).

Certaines mutations des $K^+_{(ATP)}$ seraient responsables de l'hypoglycémie hyperinsulinique infantile, une perte de la régulation de l'hypersécrétion d'insuline. Les patients souffrant d'une telle condition présentent des altérations au niveau des protéines *SUR1* qui conduisent à des pertes importantes des fonctions du canal $K^+_{(ATP)}$ (Kane *et al.*, 1996).

Des conditions plus générales, comme le diabète non-insulino dépendant (type II) et l'obésité familiale seraient expliquées par l'existence d'un polymorphisme des protéines SUR1 (Thuringer et Cavero, 1997).

1.7 DIABÈTE ET TRANSPLANTATION

Grâce aux succès obtenus en transplantation depuis la découverte de la CsA, l'emphase des recherches dans ce domaine est dirigée vers d'autres aspects de la survie de greffon, telle que la santé post opératoire du patient. Ainsi, il a récemment été rapporté qu'une des complications post opératoires consistait à l'intolérance au glucose, c'est-à-dire le diabète méllitus post transplantation (DMPT). De plus, les immunosuppresseurs comme la CsA et le tacrolimus, se sont avérés être des agents diabétogènes, agissant sur les cellules β -pancréatiques pour diminuer la sécrétion d'insuline (Weir *et al.*, 1999). Certains chercheurs suggèrent que la calmoduline soit impliquée dans la sécrétion d'insuline et que, suivant sa liaison avec la CsA, la synthèse d'insuline soit diminuée (Krausz *et al.*, 1980).

Dans la transplantation rénale, le DMPT est considéré comme étant aussi important que le diabète méllitus à cause de la détérioration progressive des tissus rénaux, et de là une diminution du temps de survie du greffon. A cause de cette problématique, un contrôle rigoureux du niveau de glycémie à l'aide d'agents antidiabétiques pourrait s'avérer nécessaire. Cependant, il n'existe aucune donnée démontrant la sécurité de l'interaction entre les hypoglycémiantes oraux et les immunosuppresseurs. (Miles *et al.*, 1998).

Le besoin d'étudier l'interaction hypoglycémiantes oraux / immunosuppresseurs s'étend au delà du traitement post-greffe. La transplantation d'îlots de Langerhans est devenue une alternative thérapeutique à l'administration d'insuline dans le traitement du diabète de type I. Depuis le début de son utilisation en clinique, ce traitement n'a eu qu'un modeste succès dû en partie aux facteurs non-immunologiques, comme l'insensibilité des cellules pancréatiques au niveau au glucose sanguin. Par contre, il s'avère que par leur capacité de stimuler la sécrétion d'insuline, les bloqueurs des $K^+_{(ATP)}$ pourraient être un ajout utile à l'implantation d'îlot de Langerhans. En effet, une étude *in vivo* faite avec une masse limitée de cellules β -pancréatiques démontre que contrecarrer les effets des $K^+_{(ATP)}$ aide à maintenir la glycémie dans les valeurs normales (Soria *et al.*, 1996). Il reste à démontrer si le fait d'ajouter un hypoglycémiant oraux aux traitements immunosuppresseurs lors de la transplantation d'îlots de Langerhans ne compromet pas la survie du greffon. L'interaction entre hypoglycémiantes oraux et immunosuppresseurs pour les autres types de greffes n'a pas fait l'objet d'une étude approfondie.

1.8 TRANSPLANTATION CARDIAQUE

Près d'un siècle d'expérimentation, d'essais techniques, de découvertes en physiologie et d'études en immunosuppression ont précédé le succès qu'est devenu la transplantation cardiaque aujourd'hui. En 1905, Carrel et Guthrie sont les premiers à démontrer dans un modèle canin, qu'une telle opération était possible. Néanmoins, la transplantation de cœur reste une procédure expérimentale jusqu'au développement du modèle orthotopique animal durant les années '60. Les progrès qui suivirent furent rapides et l'année 1967 marque la réussite de la première transplantation cardiaque chez l'humain. Depuis lors, cette procédure est devenue une solution thérapeutique établie pour les patients souffrant de défaillance cardiaque sévère et irréversible. (Ginns *et al.*, 1999).

De nos jours, la transplantation cardiaque est une solution à plusieurs problèmes cardiaques. Près de 90% des receveurs de transplantation cardiaque souffrent d'insuffisance terminal, et 10% sont transplantés à la suite d'une angine pectorale réfractaire, des tumeurs cardiaques inopérables ou bien diverses formes d'arythmie. Le taux de survie à deux ans après la chirurgie s'élève à 85% (Ginns *et al.*, 1999).

1.8.1 Chirurgie de transplantation

Donneur

La préparation du donneur débute avec une sternotomie médiane. Les vaisseaux sanguins majeurs sont ensuite entourés de ruban ombilical pour fin d'identification. La veine cave supérieure est alors liée de ligatures de soie; de l'héparine est ensuite injectée par canulation de la veine cave inférieure. Suivant la canulation, l'aorte est attachée, et la veine cave inférieure ainsi que la veine pulmonaire sont sectionnées. À l'aide d'une injection de solution saline froide par l'aorte ascendante, la cardioplogie cristalloïde froide est induite. Suivant la section de la veine cave supérieure, de l'aorte et de l'artère pulmonaire, le cœur est excisé et placé dans un récipient contenant une solution physiologique maintenue à 4°C (Ginns *et al.*, 1999).

Receveur

La préparation du receveur est plus complexe, car la circulation du receveur doit être maintenue par des moyens artificiels extra-corporels. Une cardiectomie est faite sur le receveur de la même façon que pour l'opération du donneur, sauf qu'une section de l'oreillette du receveur est gardée pour séparer l'aorte et les veines caves du greffon. Le greffon est mis en place de manière orthotopique, position normale. Les vaisseaux sanguins sont tous revascularisés par anastomoses termino-terminales. Habituellement, la mise

en place du greffon prend environ trois heures pour être complétée (Ginns *et al.*, 1999).

1.8.2 Ischémie et Cardioprotection

La transplantation d'organes se définit par deux opérations distinctes: le prélèvement de l'organe et sa mise en place dans le receveur. Le prélèvement de l'organe nécessite un arrêt circulatoire suivi d'une vidange sanguine totale pour prévenir le rejet suraigu. L'organe en question restera sans circulation sanguine jusqu'à la reperfusion durant sa revascularisation, c'est-à-dire sa mise en place dans le receveur. Il y a un certain délai entre le prélèvement et la mise en place durant lequel l'organe en question subit deux types de lésions caractéristiques : lésions d'ischémie-réperfusion et celles liées à l'arrêt circulatoire. Durant la période d'ischémie, les tissus sont privés de sang et d'oxygène et ne peuvent donc pas maintenir certains mécanismes essentiels à la survie cellulaire. Ils subissent une détérioration générale causée par deux mécanismes : la mort cellulaire et la réaction inflammatoire, toutes les deux consécutives à l'anoxie. Les cellules du greffon réagissent à de telles agressions en exprimant des protéines de choc (hsp pour *Heat-Shock Protein*) qui servent à assister ou à maintenir l'activité de protéines cytoplasmiques ayant perdu leur capacité de fonction suite à l'anoxie. Les injures ischémiques induisent aussi la production de radicaux libres et d'anti-oxydants toxiques pour les cellules. Ces réactions toxiques directes s'ajoutent à d'autres mécanismes indirects qui amplifient la réaction

inflammatoire, tels que la sécrétion de prostaglandines et de leucotriènes, l'activation de facteurs de transcription des cytokines (IL-1 et TNF- α) et le déclenchement de la mort cellulaire programmée appelée apoptose (Révillard, 1998).

La préservation du greffon précédant sa revascularisation est essentielle au succès d'une transplantation cardiaque. Plusieurs méthodes sont utilisées afin de protéger le greffon des lésions ischémiques. L'hypothermie et l'arrêt cardioplégique pourvoient une protection adéquate pour la chirurgie à cœur ouvert. Cependant, durant les chirurgies de transplantation, l'ischémie est prolongée et les cliniciens ont donc recours à des solutions cardioplégiques modifiées (ex : la solution cardioplégique froide de St-Thomas ou la solution de l'Université du Wisconsin) saturées de potassium dans lesquelles baigne le greffon avant sa revascularisation (Ginns *et al.*, 1999; Révillard, 1998).

1.8.3 Rejet de greffe

Comme toutes les autres organes transplantés, le cœur transplanté est sujet au rejet de greffe dirigé contre les HLA étrangers présents en majorité dans les cardiomyocytes. Bien sûr, trouver un donneur histocompatible identique au receveur est idéal, mais dû à la pénurie d'organes, les transplantations sont effectuées dans des conditions moindre qu'une histocompatibilité parfaite. Le greffon cardiaque peut être alors la cible de crises de rejet sévères. Les cellules immunitaires étant mobilisées à

travers de l'endothélium vasculaire, un organe très vascularisé comme le cœur pourvoit de multiples sites propices à l'infiltration de monocytes. L'abondante vascularisation du cœur le rend aussi, en temps que greffon, susceptible au rejet chronique qui s'installe dans les vaisseaux sanguins (Ginns *et al.*, 1999).

Le rejet est la cause principale des échecs en transplantation cardiaque: 90% des crises de rejet surviennent durant les six premiers mois après la chirurgie. À prime abord, elles sont diagnostiquées avec des biopsies hebdomadaires de l'endomyocarde ventriculaire faites à l'aide de techniques fluoroscopiques. Les crises de rejet sont souvent accompagnées de dyspnée, de malaise, de tachycardie, d'hypotension et dans les cas sévères, d'arythmie. Ces symptômes ne constituent pas des évidences précises d'une crise de rejet et les cliniciens ont donc recours à des échocardiographies pour évaluer l'impact clinique de celles-ci.

1.8.4 Immunosuppression

En transplantation cardiaque, l'immunosuppression a trois buts : la prophylaxie de rejet, le maintien de la tolérance et le traitement contre le rejet aigu. Malheureusement, aucune thérapie immunosuppressive courante ne peut être considérée idéale à cause de leurs effets secondaires. De plus, aucun agent inhibe complètement la réaction immunitaire. La majorité des centres de transplantation cardiaque utilisent la tri-thérapie en guise de régime immunosuppresseur: la cyclosporine A, la prednisone et la

azathioprine. Plus récemment, des anticorps monoclonaux (l'OKT-3) ou polyclonaux (ATG) ont été administrés comme thérapie de prophylaxie pour supporter les régimes à la CsA (McGoon et Frantz, 1992).

Le tacrolimus s'est avéré être un agent aussi efficace que la CsA. De plus, plusieurs centres de transplantation le considère déjà comme une alternative adéquate. D'autres agents, le mycophénolate de mofétil et le mizoribine sont capables de compléter le tacrolimus pour former un régime plus sécuritaire et plus efficace que la tri-thérapie standard. Les thérapies à base du tacrolimus sont présentement en phases d'essai clinique (Tsamandas *et al.*, 1997; Ginns *et al.*, 1999).

1.8.5 Transplantation cardiaque expérimentale

La transplantation cardiaque a débuté comme une procédure expérimentale. Dans ces modèles, le greffon cardiaque était implanté en position hétérotopique c'est-à-dire en parallèle avec le cœur du receveur (Ginns *et al.*, 1999). À l'aide de cette méthode, les techniques maintenant établies en clinique ont pu être perfectionnées.

La transplantation cardiaque hétérotopique dans les modèles de rongeurs, les modèles canins et porcins est restée un outil expérimental d'une grande utilité. Depuis l'observation que le rejet de l'allogreffe

cardiaque hétérotopique n'aboutit pas à la mort de l'animal, cette procédure est devenue l'outil de choix pour les tests préliminaires d'efficacité des immunosuppresseurs tels que les études histologiques sur le rejet, la xénotransplantation (Chen et Daloz, 1992) ou l'évaluation de la cardioprotection ischémique (Duguay *et al.*, 1996). Plusieurs techniques de transplantation cardiaque hétérotopique existent, mais celle de Ono et Lindsey (1969) est la plus populaire. La technique de Ono et Lindsey (1969) doit sa popularité à la facilité de la chirurgie d'opération et au coût peu élevé pour un modèle de rongeur. De plus, la survie du greffon, soit le paramètre principal de l'étude, peut être vérifiée par une simple palpation transabdominale du cœur implanté (Chen et Daloz, 1993; Chen et Daloz, 1994).

1.9 DESCRIPTION DU PROJET

1.9.1 Hypothèse

Les canaux potassiques jouent des rôles fondamentaux dans le maintien du potentiel membranaire et participent à la signalisation intracellulaire. L'implication des $K^+_{(ATP)}$ dans divers mécanismes cellulaires leur a valu une place importante dans les modalités de cardioprotection et dans le traitement hypoglycémiant. Les lymphocytes T sont aussi soumis à l'activité des canaux potassiques. Les données disponibles indiquent clairement la présence des $K^+_{(V)}$ et des $K^+_{(Ca^{2+})}$ à la surface membranaire des lymphocytes T. Par contre, l'expression des $K^+_{(ATP)}$ n'a pas encore été démontrée.

Nous proposons que les $K^+_{(ATP)}$ sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T par leur modulation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire. Ainsi, contrôler l'activité des $K^+_{(ATP)}$ pourrait avoir des conséquences directes sur rejet de greffe cardiaque soit par cardioprotection ou encore en modifiant l'activité des lymphocytes T. Nous voulons évaluer cette hypothèse en modulant l'activité des $K^+_{(ATP)}$ dans un greffon cardiaque en utilisant des activateurs et des inhibiteurs de ces canaux. Le but est de définir les conséquences d'une activation ou d'une inhibition des canaux $K^+_{(ATP)}$ sur la survie des greffons cardiaques.

Nous avons aussi évalué l'interaction des modulateurs des $K^+_{(ATP)}$, notamment ceux utilisés comme traitement du diabète non insulino-dépendant (type II) avec la cyclosporine A. Les candidats aux transplantations d'organes peuvent être sous traitement de sulfonyles hypoglycémiantes et il n'existe aucune donnée sur les interactions issues de l'association des modulateurs des canaux $K^+_{(ATP)}$ et la cyclosporine A.

1.9.2 Médicaments

Pour étudier l'aspect immunorégulateur des $K^+_{(ATP)}$ nous utilisons l'aprikalim, le glibenclamide et le gliclazide, tous étant des modulateurs des $K^+_{(ATP)}$. L'aprikalim (RP 52891 ou 2-(3-pyridyl)Tetrahydrothioyran-2-carbothiamide) est un dérivé thioformamide activateur des $K^+_{(ATP)}$ (Aloup *et al.*, 1990). Des expériences préliminaires indiquaient qu'une dose de 1.1 mg/kg/j était efficace et sécuritaire pour les animaux. Le glibenclamide, aussi 1-[4-[2-(5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl] benzenesulfonyl]-3-cyclohexyluré, est une sulfonyle inhibitrice des $K^+_{(ATP)}$ utilisé dans le traitement du diabète de type II (de Weille *et al.*, 1988). Le glibenclamide était administré à 0.2 mg/kg/j, une dose choisie selon des études préliminaires. Le gliclazide est aussi une sulfonyle hypoglycémiant de deuxième génération. Le gliclazide augmente les niveaux sanguins d'insuline sans occasionner la détérioration progressive des cellules β -

pancréatiques, effet secondaire typique au glibenclamide (Harrower, 2000). Le gliclazide était administré à une dose de 5.0mg/kg/j.

Nous avons aussi étudié l'interaction des modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ avec la cyclosporine A, l'immunosuppresseur le plus utilisé en transplantation. La dose utilisée est de 2.0 mg/kg/j, une dose permettant une réduction du rejet sans l'inhibition complète. (Ginns *et al.*, 1999).

1.9.3 Modèle expérimental

Nous utilisons une modification de la méthode de transplantation cardiaque hétérotopique proposée par Ono et Lindsey (1969) chez les rats de types Lewis (Fig 1.5) (Chen et Daloz, 1995). À l'aide de techniques microchirurgicales, le greffon cardiaque de rats donneurs de type Brown Norway est placé dans l'abdomen des rats Lewis (n=6) par groupe. Le greffon est ensuite revascularisé à l'aide de deux anastomoses termino-latérales, une entre l'aorte et l'artère pulmonaire du cœur du donneur et l'aorte dorsale et la veine cave inférieure du receveur. Le temps de survie du greffon cardiaque est évalué par palpations abdominales. Finalement, pour évaluer l'efficacité de la méthode de transplantation, nous utilisons un groupe de rat Lewis isogreffé qui sera sacrifié au 60^{ème} jour de la transplantation.

Les receveurs d'allogreffes étaient divisés en sept groupes expérimentaux recevant soit un agent ou une association d'agents. Le

groupe témoin n'était pas traité (groupe 1). Le groupe 2 était traité avec l'aprikalim à 1.1mg/kg/j; le groupe 3 avec le glibenclamide à une dose de 0.2mg/kg/j; le groupe 4 avec le gliclazide à une dose de 5.0mg/kg/j; le groupe 5 recevait une association aprikalim et glibenclamide à leur dose respective; le groupe 6 recevait la CsA à une dose de 2.0mg/kg/j; et les groupes 7, 8 et 9 recevaient la même dose de CsA associé avec soit l'aprikalim, le glibenclamide ou le gliclazide à leur dose respective. Les médicaments ont été administrés quotidiennement par gavage pendant 14 jours.

Le niveau de glucose sanguin des animaux transplantés et traités est mesuré par la réaction glucose-oxidase, pour s'assurer d'un effet comparatif des modulateurs des $K^+_{(ATP)}$.

1.9.4 Statistiques

La survie du greffon et les niveaux de glucose sanguin sont traités avec l'analyse de variance ANOVA pour les différences entre groupes et le test Student t pour les valeurs non-pairées ainsi que la comparaison au groupe témoin. Une valeur $P < 0.05$ est considérée significative.

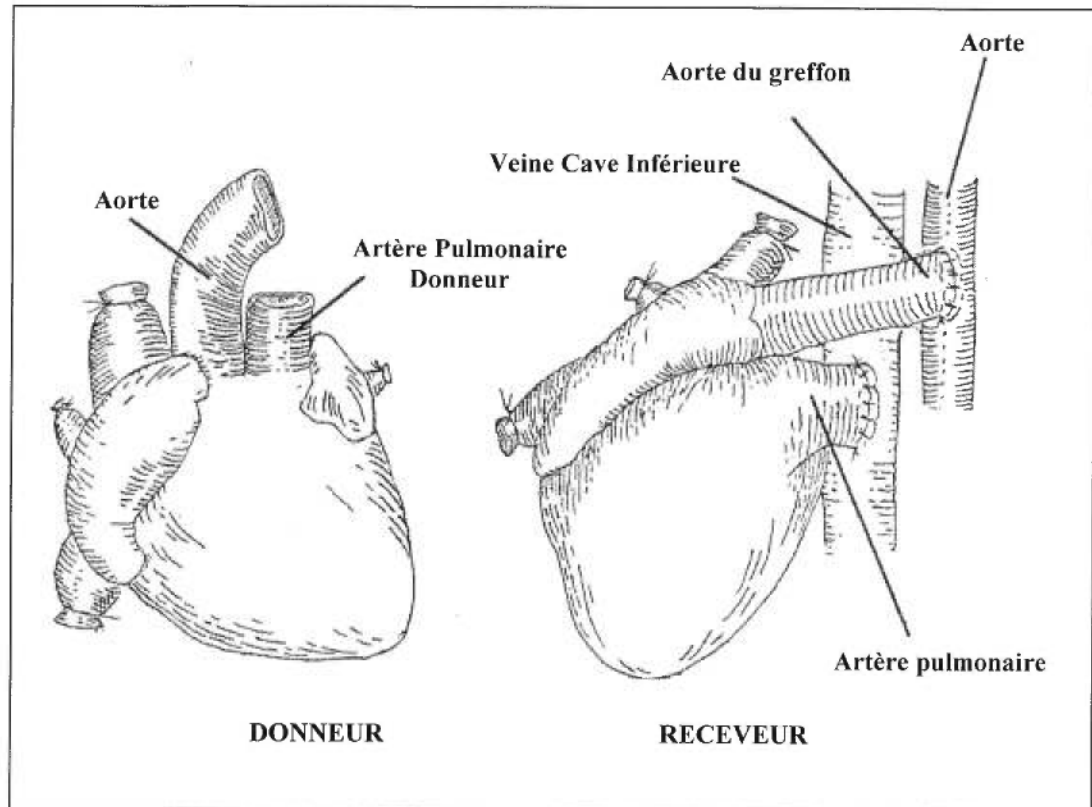


Figure 1.5: Transplantation hétérotopique du cœur chez le rat. Représentation du greffon suivant la préparation du cœur du donneur et les anastomoses avec le receveur tel que proposé dans le modèle de Chen et Dalozé (Chen H et Dalozé P., 1995) **Heart transplantation.** Dans es Zhang F, Lineaweaver WCX, Kao SD, Walker R, Tonken HP. **Manual of experimental muscle flap and organ transplantation models in the rat.** Sharpoint. 1995: p89).

CHAPITRE II

Manuscrit

PROLONGATION OF RAT HEART ALLOGRAFT SURVIVAL WITH K⁺ATP-DEPENDENT CHANNEL MODULATORS

Publication: Rheaume, D. Dumont, L. Peng, J. Xu, D. Qi, S. Liu, D. Chen H. **Prolongation of rat heart allograft survival with K⁺ATP dependent channel modulators.** *Microsurgery* 19 : 314-317, 1999.

**PROLONGATION OF RAT HEART ALLOGRAFT SURVIVAL WITH K⁺ATP
DEPENDENT CHANNEL MODULATORS^{1,2}**

Dominic Rheaume³, Louis Dumont⁴, Ph.D., Junzheng Peng³, M.D., Ph.D.,
Dasheng Xu³, M.D., M.Sc., Shijie Qi³, M.D., Dingyi Liu³, M.D., Huifang
Chen^{3,5}, M.D., Ph.D.

Laboratory of Experimental Surgery³, Research Center of CHUM, Notre-
Dame Hospital, Department of Pharmacology⁴, University of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada

1. Presented at the 4th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery, July 18-21, 1998, London, Ontario, Canada.
2. This work was supported in part by FQMC, Novartis Pharma Canada Inc., and Research Center of CHUM, University of Montreal.
3. Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital, University of Montreal, Montreal.
4. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal.
5. Address correspondence to: Huifang Chen, MD., PhD., Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Room Y 1611, Notre-Dame Hospital, University of Montreal, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada. Tel: (514) 281-6000 ext. -7081; Fax: (514) 896-4679

Running title: The effect of K⁺ ATP channel modulators on rat heart allograft.

Key words: heart, transplantation, rat, K⁺ ATP channel, cyclosporine

Abbreviations: BN, Brown Norway; CsA, cyclosporine; LEW, Lewis, MST, mean survival time.

**PROLONGATION OF RAT HEART ALLOGRAFT SURVIVAL WITH K^+ ATP
DEPENDENT CHANNEL MODULATORS**

ABSTRACT

Controversies exist regarding the immunoregulatory properties of K^+ ATP channel modulators. In this study, we investigated the effects of aprikalim, a K^+ ATP dependent channels activator, glibenclamide and gliclazide, two inhibitors of K^+ ATP dependent channels on the prolongation of heart allograft survival in the rat. Nine groups ($n \geq 5$) were involved in this study with Brown-Norway to Lewis rat combination treated with aprikalim, glibenclamide, gliclazide and/or cyclosporine. The results indicate that modulators of K^+ ATP dependent channels can improve the survival of rat heart allograft without interfering with the immunosuppressive properties of cyclosporine.

INTRODUCTION

Since the discovery of K^+_{ATP} dependent channel in 1983 by Noma¹, this channel appears to be involved in many functional activities of the human body. They play a major role in vascular tone², in cardiac depolarization^{3,4}, and also in insulin secretion⁵. Confirmation that ion channels are implicated in T-lymphocyte activities has been reported and transmembrane movement plays a critical role in lymphocyte activities. Up to now, three ion channels are postulated to participate in the activation of T-lymphocytes. It has been found that Ca^{2+} channels, K^+ voltage gated and Ca^{2+} activated K^+ channels are involved⁶. In heart allograft rejection, immunological and nonimmunological factors are involved. Two nonimmunological phenomena in allograft heart transplantation that involved K^+_{ATP} dependent channel are implicated, vascular tone and protection of ischemia. The heart allograft rejection involves immunological activities that implicate T-lymphocytes. The vascular component of the transplanted heart seem to be the first target of the immune reaction. Recent studies showed that K^+_{ATP} channel openers ameliorates lung allograft dysfunction and reduces pulmonary activity in the transplanted lung⁷. Blocking ATP-sensitive K^+ channel in the transplanted pancreatic islets maintained normoglycemia with a limited beta-cell mass⁸, and K^+_{ATP} channels opener has organ protection in organ preservation⁹.

However, K^+_{ATP} dependent channel has never been demonstrated in T-lymphocyte cells. We suppose that the K^+_{ATP} dependent channel may be effective in graft rejection by an implication in T-lymphocyte activities or in cardioprotective effect in relation with the efficacy reported. In order to test this hypothesis, we propose that the modulation of K^+_{ATP} dependent channel by activator and/or inhibitor could significantly improve the survival of rat cardiac allografts. In this study, we used aprikalim (K^+_{ATP} dependent channel activator), glibenclamide and gliclazide (K^+_{ATP} dependent channel inhibitors) to assess their immunomodulator properties at clinically relevant dose in rat heart allografts. Secondly, in order to examine whether these agents interfere with the immunosuppressive activity of cyclosporin A (CsA), concomitant therapy of these agents with low dose of CsA were also studied in rat heart transplantation model.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Adult (9-11 weeks old), male Brown Norway (BN, RT1ⁿ) and Lewis (LEW, RT1¹) rats weighing 225-250 g were obtained from Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). LEW strain rats were used as recipients and the BN strain rats served as donor. The rats were housed in controlled light/dark cycles and allowed free access to water and rat chow.

Drugs. Aprikalim (RP 52891) was a generous gift from Rhone-Poulenc Rorer, Canada. The dose of 1.1 mg/kg/day was selected from preliminary

study indicating that the dose improved graft survival without any adverse effects. The dissolution of aprikalim was made in 95% ethanol then diluted in water. Glibenclamide was provided by Smith Kline Beecham Pharma, Canada; the dose of 0.2 mg/kg/day was selected on the basis of previous studies. The dissolution of glibenclamide was made in DMSO then diluted in alkaline water. Gliclazide was a kindly gift from Les Laboratoires Servier, Neuilly, France. The dose of 5.0 mg/kg/day was selected on the basis of previous studies. Gliclazide was dissolve in alkaline water with a pH value less than 9.0. Cyclosporine was obtained from Novartis Pharma Canada Inc., and was diluted in olive oil. All drugs solution was kept in 4⁰C except for CsA that was kept at room temperature.

Heterotopic heart transplantation. Heterotopic heart transplantation was placed intraabdominlly by a method described by Ono and Lindsey¹⁰ with some modifications^{11,12}. Donor and recipient rats were anesthetized with 40 mg/kg of pentobarbital interperitoneally. Donor hearts were perfused through thorax inferior vena cava with heparinized saline to chill them to 4⁰C prior to ligation of the vena cava and pulmonary vein. The grafts were stored in 4⁰C saline for less than 30 minutes. After exposing the infrarenal vena cava and aorta of the recipients, the end-to-side anastomoses of donor aorta to the recipient aorta and the donor pulmonary artery to the recipient vena cava were performed using 10-0 nylon sutures (Ethicon, Somerville, NJ). The allograft recipients were randomly allocated to different groups (n≥5).

Untreated group allografts (group 1) served as control. Group 2 aprikalim (RP 52891), at a dose of 1.1 mg/kg/day; group 3 was treated with glibenclamide, at a dose of 0.2 mg/kg/day; group 4 gliclazide, at a dose of 5.0 mg/kg/day; group 5 received a combination of aprikalim and glibenclamide with their respective dose. Group 6 was treated with low-dose of CsA 2 mg/kg/day. Group 7, 8 and 9 were treated with low-dose CsA combined with either aprikalim, glibenclamide, or gliclazide. The appropriate volume of drugs solution was administered daily by gavage for 14 days.

Monitoring. The function of the transplanted heart was evaluated by daily abdominal palpation. The time of rejection was defined as the last day of palpable cardiac contraction and rejection was confirmed histologically after laparotomy. Animals that lost palpable activity of the graft within 3 days after surgery were classified as technical failures (less than 3%) and were omitted from data analysis. Blood glucose was measured by using the glucose-oxidase reaction and was made on allografts recipients treated with K^+_{ATP} dependent channels blockers in the 5th day of treatment. Isograft recipients were included in the follow-up studies and sacrificed on the 60th day posttransplantation to allow histopathological studies.

Data Analysis. All values are expressed as mean \pm SEM. Differences within and among groups were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and the Student t test for unpaired data with $p < 0.05$ being significant.

RESULTS

Effects of K⁺ ATP dependent channel modulators in heart transplantation.

In untreated LEW recipients rats receiving BN heart allografts, an MST of 6.4 ± 0.2 days was observed. LEW recipients treated with either aprikalim alone (1.1 mg/kg/day), gliclazide alone (5.0 mg/kg/day), or aprikalim combined with glibenclamide (1.1 mg/kg/day + 0.2 mg/kg/day) had a significantly prolonged heart allografts survival with an MST of 9.7 ± 0.9 , 9.0 ± 0.8 , and 10.2 ± 0.6 days respectively, compared to naïve controls ($p < 0.05$, Table 1). While LEW recipients treated with glibenclamide (0.2 mg/kg/day), an MST of 6.7 ± 0.2 days was observed without significant difference compared to naïve controls ($p > 0.05$, Table 1).

Effects of K⁺ATP dependent channel modulators with cyclosporine in heart transplantation.

In LEW recipients rats receiving BN heart allografts treated with CsA alone, an MST of 10.2 ± 1.0 days was observed. Combined treatment of CsA with K⁺_{ATP} dependent channel modulators did not further improve graft survival compared to CsA alone, e.g., aprikalim 1.1 mg/kg/day + CsA 2.0 mg/kg/day, glibenclamide 0.2 mg/kg/day + CsA 2.0 mg/kg/day, gliclazide 5.0 mg/kg/day + CsA 2.0 mg/kg/day, the mean survival time was 10.5 ± 0.5 , 10.8 ± 0.7 , 12.6 ± 1.0 days, respectively (Table 2).

Blood Glucose Examination

As expected, the treatment with oral sulfonylureas glibenclamide and gliclazide resulted in significant reduction in blood glucose. Both glibenclamide and gliclazide alone or combined with cyclosporine or aprikalim, were also associated with a reduction in glucemia similar to single agent use only (Table 3).

Pathology examination

During autopsy, abdominal organs of recipients appeared microscopically normal. Histological examination of left ventricle specimens indicated that isografts had no sign of ischemia or congestion and no infiltration of mononuclear cells were detected. On the contrary, all allografts had evidences of severe rejection. Histologically there was no difference at the terminal stage of rejection between modulators of K^+_{ATP} dependent channel treated groups and untreated group.

DISCUSSION

It has been reported that the potassium channels are involved in lymphocyte activities. The $K^+_{(V)}$ and $K^+_{(Ca^{2+})}$ channels play an important role in the lymphocyte proliferation⁶. Lymphocytes express both voltage-dependent potassium [$K^+_{(V)}$] channels and calcium-activated potassium [$K^+_{(Ca^{2+})}$] channels, and each is upregulated as cells progress toward division following mitogenic stimulation. Blockade of $K^+_{(V)}$ and $K^+_{(Ca^{2+})}$ channels effectively

inhibits the antigen-driven activation of lymphocytes, probably by inducing membrane depolarization and thereby diminishing calcium influx. A prolonged rise in intracellular calcium is a required signal for lymphocyte activation by antigen or mitogens. ATP-sensitive potassium (K^+_{ATP}) channels are generally believed to support these mechanisms of ischemic preconditioning, as administration of the K^+_{ATP} channel blocker glibenclamide can suppress this protective effect¹³. Furthermore, the use of potassium-channel openers or activators before or during hyperkalemic cardioplegic arrest can mimic ischemic preconditioning and improve functional recovery of hearts submitted to short-term ischemia^{14,15}. Potassium-channel openers have been reported to exert pharmacologic cardioprotection during acute ischemia by reducing myocardial dysfunction and infarct size. Opening K^+_{ATP} channels causes potential shortening and membrane potential hyperpolarization. This results in decreased electromechanical activity and more rapid diastolic arrest, thus saving energy stores. In this situation, the action potential shortening is accelerated leading to decrease in amplitude of intracellular Ca^{2+} diffusion and Ca^{2+} overload^{3,4}.

In this study, the K^+_{ATP} dependent channel opener, aprikalim can significantly prolonged cardiac allograft survival compared to control group, these protective effects may be vasodilation and/or cardiac protection. Glibenclamide administered alone did not prolong cardiac allograft survival, while combined with aprikalim prolong cardiac allografts survival. This result

is similar to Kirsch's report¹⁶ that preconditioning with cromakalim (K^+ channel opener) improved modestly long-term myocardial preservation for heart transplantation and glibenclamide did not abolish the effects of cromakalim. K^+_{ATP} channel inhibitor, gliclazide prolonged the cardiac allografts survival compared to control group, the mechanism remains unknown.

Although K^+_{ATP} can inhibit the voltage-dependent potassium current in human peripheral blood lymphocytes resulting in a depolarized membrane potential¹⁷, K^+_{ATP} channel modulators did not modify its immunosuppressive function. K^+_{ATP} channels are found in a variety of tissue types, including smooth muscle, heart, skeletal muscle, pancreas. Inhibition of K^+_{ATP} channels in the pancreatic β -cells causes enhancement of insulin release, and decrease the blood glucose level⁴. In this study, we observed the same results i.e., the inhibitors of K^+_{ATP} channel either alone or combined with CsA or aprikalim were associated with a reduction in glycemia similar in each agent use alone.

In conclusion, activation of K^+_{ATP} channels by aprikalim results in significant improvement of cardiac allografts survival, but it does not change the immunosuppressive activity of CsA. Inhibition of K^+_{ATP} channels by glibenclamide alone did not improve the heart allograft survival, while gliclazide modestly prolonged heart allograft survival. None of the K^+_{ATP}

inhibitors modified the immunosuppressive activity of CsA. The results suggested that transplanted patients treated with hypoglycemic agents are not at risk of reduced immunosuppressive effect when CsA is included in their drug regimen.

REFERENCES

1. Noma A: ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148, 1983.
2. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT: Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245: 177-180, 1989.
3. Pignac J, Bourgouin J, and Dumont L: Cold cardioplegia and the K⁺ channel modulator aprikalim (RP 52891): improved cardioprotection in isolated ischemic rabbit hearts. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 126-132, 1994.
4. Grover GJ: Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 24(Suppl 4): S18-S27, 1994.
5. de Weille J, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdumski M: ATP-sensitive K⁺ channels that are blocked by hypoglycemia-inducing sulfonylureas in insulin-secreting cells are activated by galanin, a hyperglycemia-inducing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1312-1316, 1988.
6. Yao Z, Cavero I, Gross GT: Activation of cardiac K⁺ATP channels: an endogenous protective mechanism during repetitive ischemia. *Am J Physiol* 264: 495-504, 1993.
7. Yamashita M, Schmid RA, Fujino S, Cooper JD, Patterson GA.
Nicorandil: a potent adenosine triphosphate-sensitive potassium-channel

- opener, ameliorates lung allograft reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112(5): 1307-1314, 1996.
8. Soria B, Martin F, Andreu E, Sanchez-Andres JV, Nacher V, Montana E: Diminished fraction of blockable ATP-sensitive K⁺ channels in islets transplanted into diabetic mice. *Diabetes* 45(12): 1755-1760, 1996.
 9. Du ZY, Hicks M, Spratt P, Mundy JA, Macdonald PS: Cardioprotective effects of pinacidil pretreatment and lazardolol preservation in isolated rat hearts after 12-hour hypothermic storage. *Transplantation* 66(2): 158-163, 1998.
 10. Ono K, Lindsey ES: Improved technique of heart transplantation in the rats. *J Thorac Surg* 57: 225-229, 1969.
 11. Chen H, Wu J, Xu D, Luo H, Daloz P: Reversal of ongoing heart, kidney, pancreas allograft rejection and suppression of accelerated heart allograft rejection in the rat by rapamycin. *Transplantation* 56:661-666, 1993.
 12. Chen H, Luo H, Daloz P, Xu D, Wu J: Rapamycin-induced long-term allograft survival depends on persistence of alloantigen. *J Immunol* 152: 3107-3118, 1994.
 13. Auchampach JA, Maruyama M, Gross GJ: Cardioprotective action of potassium channel openers. *Euro Heart J* 15:89-94, 1994.
 14. Menasche P, Mouas C, Grousset C: Is potassium channel opening an effective form of preconditioning before cardioplegia? *Ann Thorac Surg* 61: 1764-1768, 1996.

15. Menasche P, Kevelaitis E, Mouas C, Grousset C, Piwnica A, Bloch G: Preconditioning with potassium channel openers: a new concept for enhancing cardioplegic protection? *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 1606-1613, 1995.
16. Kirsch M, Baufreton C, Fernandez C, Brunet S, Pasteau F, Astier A and Loisanse DY: Preconditioning with cromakalin improves long-term myocardial preservation for heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 66: 417-424, 1998.
17. Schell SR, Nelson DJ, Fozzard HA, Fitch FW: The inhibitory effects of K⁺ channel-blocking agents on T lymphocyte proliferation and lymphokine production are "nonspecific". *J Immunol* 139:3224-3230, 1987.

Table I. Recipient rats treated with K⁺_{ATP} channel modulators

Group^a	Treatment^b	Dose(mg/kg/day)	Survival Days^c
1	Control	---	6.4 ± 0.2
2	Aprikalim	1.1	9.7 ± 0.9*
3	Glibenclamide	0.2	6.7 ± 0.2
4	Gliclazide	5.0	9.0 ± 0.8*
5	Aprikalim +	1.1	10.2 ± 0.6*
	Glibenclamide	0.2	

a. n≥5 in each group;

b. All agents were administered daily by gavage for 14 days;

c. Rejection was defined as the last day of palpable heart contraction and confirmed by laparotomy;

*. p<0.05 compared with Group 1.

Table II. Recipient rats treated with K⁺_{ATP} channel modulators and/or CsA

Group^a	Treatment^b	Dose(mg/kg/day)	Survival Days^c
1	Control	---	6.4 ± 0.2
2	CsA	2.0	10.2 ± 1.0*
3	Aprikalim + CsA	1.1 2.0	10.5 ± 0.5
4	Glibenclamide + CsA	0.2 2.0	10.8 ± 0.7
5	Gliclazide + CsA	5.0 2.0	12.6 ± 0.7

a. n≥5 in each group;

b. All agents were administered daily by gavage for 14 days;

c. Rejection was defined same as in Table 1.

* p<0.01 compared with controls. No significant differences compared Group 3, 4, 5 with Group 2 (p>0.05).

Table III. Blood glucose level in rats treated with K⁺_{ATP} channel modulators and/or CsA

Group^a	Treatment^b	Blood Glucose (mmol/ml)^c
1	Control	4.3 ± 0.1
2	CsA	4.2 ± 0.5
3	Glibenclamide	2.9 ± 0.1*
4	Gliclazide	2.3 ± 0.2*
5	Glibenclamide + Aprikalim	2.6 ± 0.1*
6	Glibenclamide + CsA	2.5 ± 0.1*
7	Gliclazide + CsA	2.0 ± 0.2*

a. n≥5 in each group;

b. Treatment of all agents was similar as in Table 1 and Table 2;

c. Whole blood glucose levels were assessed on day 5 postoperatively;

* p<0.05 compared with Group 1.

CHAPITRE III

DISCUSSION

3.0 DISCUSSION

3.1 Critique du modèle

Même si elle comporte certaines limitations, la transplantation cardiaque hétérotopique chez le rat est probablement le modèle expérimental le plus utilisé lors de l'évaluation des nouveaux immunosuppresseurs dans des modèles *in-vivo*. Ainsi, l'état du greffon peut être évalué par simple palpation transabdominale ou par électrocardiographie. Ceci rend facile le diagnostic de la phase terminale du rejet durant laquelle le cœur implanté arrête de battre. D'après notre modèle utilisé (Chen et Daloz, 1993;1994), la circulation sanguine passe par l'aorte de façon rétrograde. Ce processus perfuse le cœur par l'artère coronarienne située à la base du ventricule gauche, le sang perfuse le cœur et aboutit dans sinus coronaire qui se déverse dans l'oreillette droite. De celle-ci, le sang passe au ventricule droit puis il est éjecté dans l'artère pulmonaire. Un cœur transplanté hétérotopique ne manifeste pas les mêmes aspects hémodynamiques qu'un cœur normal. Il n'y a pas de sang qui entre dans le ventricule gauche et très peu de sang est éjecté dans le ventricule droit. On peut affirmer que par ce processus, le cœur fonctionne plus ou moins à vide expliquant l'atrophie musculaire de celui-ci. D'après Asfour *et al.*, (1999) l'atrophie du greffon est accélérée, car l'artère coronaire est surchargée et le sang présent dans le ventricule droit forme une masse coagulée. Le rejet de greffe n'est donc pas le seul facteur impliqué dans la perte de fonction du greffon et ceci constitue une

lacune importante du modèle (Asfour *et al.*, 1999). Mais, dans notre expérience, ce problème ne fut pas rencontré.

Plusieurs solutions à ce problème ont été proposées, entre autre la plus récente, la méthode de Asfour *et al.*, (1999) où l'artère pulmonaire est anastomosée à l'oreillette gauche permettant la circulation sanguine du ventricule droit à l'oreillette gauche. Le sang est apporté au greffon par la veine cave supérieure tandis que l'éjection se fait par l'aorte comme dans un cœur normal. Ce modèle reproduit les conditions hémodynamiques d'un cœur normal. Néanmoins, il implique un troisième anastomose (artère pulmonaire à l'oreillette gauche) ce qui, par conséquent, augmente la durée de la chirurgie et le temps d'ischémie du greffon. De plus, les modifications de Asfour *et al.*, (1999) ont été publiées après celle de nos résultats. Cependant, nous ne pensons pas que le choix du modèle ait influencé les résultats de façon significative. Les temps de survie des groupes traités sont comparés à ceux du groupe témoin qui, lui aussi, a subi une transplantation cardiaque selon le même modèle. Nous pensons que pour une étude comparative comme la nôtre, il n'est pas nécessaire de tenir compte du modèle de transplantation dans l'interprétation des résultats étant donné les temps de survies relativement courts de 6 à 13 jours. Par contre, une étude dont le paramètre principal est l'histopathologie du greffon, bénéficierait de façon significative des suggestions de Asfour *et al.*, (1999).

3.2 Modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ et transplantation cardiaque

Plusieurs controverses existent concernant l'effet immunorégulateur des canaux potassiques. Des études suggèrent l'implication des canaux potassiques dans l'activité des lymphocytes. En effet, deux types de canaux potassiques, le canal à voltage $K^+_{(V)}$ et le canal calcium-dépendant $K^+_{(Ca^{2+})}$ auraient des rôles importants dans la prolifération lymphocytaire (Cahanal *et al.*, 1990). En effet, les lymphocytes T expriment autant les $K^+_{(V)}$ que les $K^+_{(Ca^{2+})}$ et l'expression de ces deux types de canaux augmente lors de la mitose des lymphocytes après une stimulation mitogénique. Ainsi, bloquer l'activité des $K^+_{(V)}$ et des $K^+_{(Ca^{2+})}$ inhibe la prolifération des lymphocytes en induisant la dépolarisation de la membrane lymphocytaire. Ce changement de voltage inhibe le flux calcique dans le cytoplasme. Les ions calciques participent à l'activation des lymphocytes suivant la liaison à l'antigène: l'augmentation de la concentration cytoplasmique du Ca^{2+} est nécessaire à la transmission des signaux intracellulaires (Schell, 1987).

Les données obtenues dans notre étude indiquent qu'un activateur des $K^+_{(ATP)}$, soit l'aprikalim, est en mesure de prolonger de façon significative la survie d'un allogreffe cardiaque. Plusieurs explications peuvent être offertes pour cette prolongation de survie: les activateurs des $K^+_{(ATP)}$ sont des cardioprotecteurs et des vasodilatateurs. Les activateurs des $K^+_{(ATP)}$ sont connus pour leurs effets de pré-

conditionnement ischémique des greffons cardiaques durant l'arrêt cardioplégique, ce qui réduit les dommages subits durant l'ischémie. L'administration d'activateurs des $K^+_{(ATP)}$ avant ou même durant l'arrêt cardioplégique peut imiter le pré-conditionnement ischémique et améliorer la remise en état d'un cœur soumis à des périodes d'ischémie (Menasche, 1996; Menasche, 1995). L'ouverture des $K^+_{(ATP)}$ raccourcit la durée du potentiel d'action, en hyperpolarisant la membrane cellulaire: dans le cœur cela résulte en une diminution de l'activité électromécanique provoquant de rapides arrêts en diastole. Ce ralentissement d'activité permet le maintien des réserves d'énergie. De cette façon, le raccourcissement de la durée potentiel d'action est accéléré ce qui induit une diminution de l'ampleur de la diffusion intra-cellulaire de Ca^{2+} provoquant la surcharge de Ca^{2+} (Pignac, 1994; Grover, 1994). L'aprikalim est un vasodilatateur coronarien et son administration accélère la reperfusion du greffon après son implantation (Auchampach *et al.*, 1994).

Les $K^+_{(ATP)}$ sont impliqués dans la protection ischémique ; que les activateurs la favorisent et que les inhibiteurs la détériorent (Auchampach, 1994). Dans notre étude, un inhibiteur des $K^+_{(ATP)}$, le glibenclamide, administré seul, n'était pas en mesure de prolonger la survie des allogreffes cardiaques. Par contre, lorsque l'aprikalim et le glibenclamide furent administrés ensemble, la survie étant équivalente à celle observée avec l'aprikalim seul, indiquant que l'administration du glibenclamide n'abolit pas les effets protecteurs de l'aprikalim. Ces résultats confirment

ceux rapportés par Kirsh *et al.* (1998), soit que le pré-conditionnement avec le cromakalim, un activateur des $K^+_{(ATP)}$, améliore quoique très peu, la préservation du myocardium suivant les ischémies subies durant les transplantations de cœur; l'administration du glibenclamide n'avait aucun effet sur cette protection. Il semble donc que lorsque les activateurs et inhibiteurs des $K^+_{(ATP)}$ sont associés, l'effet immunorégulateur des activateurs à précéance sur l'effet des inhibiteurs. Par ailleurs, nous savons que suite à l'étude sur la glycémie (section 3.3 : *glycémie*) il n'y a pas de changement entre l'association du glibenclamide et de l'aprikalim comparativement à la glycémie avec le glibenclamide seul. Par conséquent, nous concluons que l'amélioration du temps de survie ne passe pas par le changement de la glycémie étant donné une baisse de celle-ci comparable dans les deux groupes. De plus, s'il y avait action directe sur les lymphocytes par l'aprikalim ou le glibenclamide, cette action aurait été contrée par l'ajout du glibenclamide. Finalement, nous sommes forcés d'admettre que l'action de l'aprikalim sur le temps de survie des greffons est tributaire de mécanismes vasculaires et cardioprotecteurs plutôt qu'immunitaires.

Le gliclazide est aussi un inhibiteur des canaux $K^+_{(ATP)}$, mais contrairement au glibenclamide, nos données indiquent qu'il prolonge la survie du greffon cardiaque. La différence de temps de survie des groupes suggèrent une différence d'efficacité entre les deux sulfonylurés. Il est peu probable que les doses administrées (Glibenclamide, 0.2mg; Gliclazide, 5.0mg) soient responsables pour ce phénomène. En effet, il

n'y a pas de différence significative entre la glycémie obtenue chez les rats traités avec ces deux agents (2.9 ± 0.1 mmol/ml VS 2.3 ± 0.2 mmol/ml), ce qui démontre leur équipotence (discuté dans 3.3: *glycémie*). Le gliclazide est un sulfonyluré oral utilisé pour le traitement du diabète non insulino-dépendant dont l'action sur les plaquettes et la fibrinolyse a souvent été rapportée. Le gliclazide modifie la polymérisation des monomères de fibrine de manière à rendre le réseau de fibrine plus susceptible à la fibrinolyse (Dhall et Nair, 1994; Colwell, 1991). D'ailleurs, ceci empêcherait la formation de thrombus dans le greffon cardiaque. De plus, il est possible que l'amélioration du temps de survie avec le gliclazide soit tributaire de ses effets anti-thrombotiques (Alberti, 1994). La réduction de la formation de thrombus dans le territoire coronarien du greffon pourrait accélérer la récupération des lésions ischémiques.

3.3 Modulateurs des $K_{(ATP)}$ et cyclosporine A

Survie du greffon

Le canal potassique ATP-dépendant ($K_{(ATP)}^+$) est le seul type de canal potassique dont la présence dans les lymphocytes n'a pas été démontrée. Notre projet avait pour but d'évaluer les propriétés immunomodulatrices des $K_{(ATP)}^+$. L'utilisation des modulateurs des $K_{(ATP)}^+$ semblait n'avoir aucun effet attribuable à une répression de la réaction lymphocytaire. En effet, leur association avec la CsA n'apportait aucun effet additif significatif pour la survie du greffon. Même les bénéfiques

associés aux activateurs des $K^+_{(ATP)}$, notamment la cardioprotection, ne sont pas parvenus à augmenter la résistance du greffon aux crises de rejet. De plus, inhiber les $K^+_{(ATP)}$ avec le glibenclamide n'avait pas d'effet sur la survie du greffon.

Nous croyons que l'effet de l'aprikalim et du gliclazide soient tributaires d'actions vasculaires et cardioprotectrices. Par conséquent, l'effet non-additif de la CsA avec les modulateurs des canaux $K^+_{(ATP)}$ pourrait s'expliquer par le fait que l'action cardioprotectrice et vasculaire ne font qu'un bref moment suite à une transplantation soit immédiatement avant ou après celle-ci. Par la suite, il n'y aurait que l'aspect immunorégulateur de la CsA modifiant le temps de survie. Par contre, il serait aussi logique de croire que les effets vasoconstructeurs de la CsA annuleraient les effets vasodilatateurs de l'aprikalim.

Glycémie

Comme prévu, l'administration orale des sulfonylurées, le glibenclamide et le gliclazide, réduisait d'une façon considérable la glycémie chez les rats transplantés. La glycémie obtenue avec le glibenclamide et le gliclazide ne variait pas de façon significative ; les deux agents étaient administrés à des doses équipotentes pour leur effet hypoglycémiant. Les évaluations de l'interaction de la CsA avec les modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ ne révélaient aucune interaction au niveau de la glycémie, chez les animaux traités avec les hypoglycémiants et la CsA,

les temps de survie et les taux de glucose ne variaient pas de façon significative. De plus, nous pouvons conclure que la glycémie ne modifie pas directement les temps de survie.

Les effets hyperglycémiantes de la CsA rapportés par Nielsen (1986) ne se sont pas manifestés dans notre étude. D'après Nielsen, la cyclosporine A réduit la sécrétion d'insuline en jouant directement sur les cellules β -pancréatiques (Nielsen, 1986). Dans notre étude, en comparaison avec le groupe témoin, les rats recevant la CsA seule ne subissaient aucun changement significatif de la glycémie. Il faut mentionner que nous avons administré de faibles doses de CsA pour les besoins de l'étude. L'administration de plus fortes doses de CsA, comparables aux doses utilisées en clinique, aurait pour effet d'augmenter les temps de survie pour ensuite allonger la durée de l'étude. Il se peut donc que les doses utilisées ne soient pas assez élevées pour modifier la glycémie.

Les seules baisses attribuables aux effets de la CsA se manifestent chez les groupes traités avec l'association de la CsA et des hypoglycémiantes: ces groupes démontrent des baisses de taux de glucose de 0.3 mmol/ml lorsqu'ils sont comparés à ceux traités avec les hypoglycémiantes seuls. Par conséquent, les taux de glycémie semblent rester stables malgré l'association du glibenclamide ou du gliclazide avec la CsA. Ceci suggérerait qu'aux doses indiquées, les hypoglycémiantes et la cyclosporine A peuvent être administrés en toute sécurité.

3.4 Conclusion

En conclusion, notre étude démontre qu'avec l'activation des canaux potassique ATP-dépendant ($K^+_{(ATP)}$), il y a une amélioration significative du temps de survie des allogreffes cardiaques et que les effets de la CsA ne semblent pas modifiés par l'activation de ces canaux. L'inhibition des $K^+_{(ATP)}$ par le glibenclamide seul ne parvenait pas à modifier les temps de survie des allogreffes. Par contre, le gliclazide indiquait une modeste augmentation de la survie du greffon. Conséquemment, ceci indique que les deux agents se comportent de manière distincte, puisque les taux de glycémie entre les groupes administrés chaque agent ne varient pas de façon significative. Comme le démontre les temps de survie et les taux de glycémie obtenue, aucun des modulateurs des $K^+_{(ATP)}$ n'a d'effets sur l'activité de la CsA. De tels résultats suggèrent que les patients traités avec les hypoglycémiant, inhibiteurs de l'activité des $K^+_{(ATP)}$, ne soient pas à risque d'une interaction négative entre leur traitement antidiabétique et l'immunosuppression induite par la CsA. Finalement, la modulation des $K^+_{(ATP)}$ peut procurer un bénéfice significatif sur la survie des allogreffes cardiaques, mais leurs mécanismes d'actions semblent tributaire d'une cardioprotection ou d'un effet vasculaire que d'une action immunosuppressive.

CHAPITRE IV

BIBLIOGRAPHIE

4.0 BIBLIOGRAPHIE

Alberti K.G.M.M., **Gliclazide: Revue des actions métaboliques et vasculaires.** *Diabet metab* 1994; 20(3pt2): 341-48

Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF. **A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording.** *Nature* 1983; 306(5942): 436-41.

Asfour B, Hare JM, Kohi T, Baba HA, Kass DA, Chen K, Tjan TD, Hammel D, Weyand M, Hruban RH, Scheld HH et Bryne BJ. **A simple new model of physiologically working heterotopic rat heart transplantation provides hemodynamic performance equivalent to that of an orthotopic heart.** *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(10): 927-36.

Auchampach JA, Maruyama M et Gross GJ. **Cardioprotective action of potassium channel openers.** *Euro Heart J* 1994; 15(supl C): 89-94.

Catterall WA. **Structure and function of voltage sensitive ion channels.** *Science* 1988; 242(4875): 50.

Cahalan MD, Lewis RS. **Functional roles of ion channels in lymphocytes.** *Semin Immunol* 1990; 2(2): 107-117.

Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C et Gupta S. **Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation.** *J Exp Med* 1984; 160(2): 369-385.

Chen H, Luo H, Daloz P, Xu D, et Wu J. **Rapamycin-induced long-term allograft survival depends on persistence of alloantigen.** *J Immunol* 1994; 152(6): 3107-3118.

Chen H, Wu J, Xu D, Luo H, et Daloz P. **Prolongation of hamster rat xenograft survival by rapamycin.** *Transplant Proc* 1992; 24(2): 715-716.

Chen H, Wu J, Xu D, Luo H, et Daloz P. **Reversal of ongoing heart, kidney, pancreas allograft rejection and suppression of accelerated heart allograft rejection in the rat by rapamycin.** *Transplantation* 1993; 56(3): 661-666.

Cheung R, Grinstein S, Dosch HM et Gelfand E. **Volume regulation by human lymphocytes characterization of the ionic basis for regulatory volume decrease.** *J Cell Physiol* 1982; 112(2): 189-196.

Cole WC, McPherson CD et Sontag D. **ATP-Regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage.** *Cir Res* 1991; 69(3): 571-581.

Colwell JA. **Pathophysiology of vascular disease in diabetes: effects of gliclazide.** *Am J Med* 1991; 90(6A): 50S-54S.

Cook DL et Hales CN. **Intracellular ATP directly bloc K⁺ channels in pancreatic B cells.** *Nature* 1984; 311(5983): 271-273.

Cristillo AD, Heximer SP, Russell L et Forsdyke DR. **Cyclosporin A inhibits early mRNA expression of G0/G1 switch gene 2 (G0S2) in cultured human blood mononuclear cells.** *DNA Cell Biol* 1997; 16(12): 1449-58.

Dhall DP et Nai CH. **Effects of gliclazide on fibrin network.** *J Diabetes Complications* 1994; 8(4): 231-234.

Flye WM., **Principles of transplantation.** WB Saunders Company, Philadelphia, 1989.

Fukushima Y, Hagiwara S et Henkart M. **Potassium current in clonal cytotoxic T lymphocytes from the mouse.** *J Physiol* 1986; 351: 645-656.

de Weille J, Schmid-Antomarchi H et Lazdunsky M. **ATP-sensitive K⁺ channels that are blocked by hypoglycemia-inducing sulfonylureas**

in insulin-secreting cells are activated by galanin, a hyperglycemia-inducing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(4): 1312-1316.

Du ZY, Hicks M, Spratt P, Mundy JA, et Macdonald PS. **Cardioprotective effects of pinacidil pretreatment and lazaroid(U74500A) preservation in isolated rat hearts after 12-hour hypothermic storage.** *Transplantation* 1998; 66(2): 158-163.

Duguay P, Chen H, Daloz P et Dumont L. **Cardioprotective effects of the lazaroid U74389G following cold preservation and transplantation of rat hearts.** *Transplantation* 1996 15; 61(7): 1023-1028.

Gibson T, et Medawar PB. **The fate of skin homografts in man.** *J Anat* 1942; 77: 299-310.

Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ., **Transplantation.** Blackwell Sciences, Malden, Massachusetts, 1999.

Grover GJ. **Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia.** *J Cardiovas Pharmacol* 1994; 24(suppl 4):S18-S2.

Guyton CA et Hall EJ. **TEXTBOOK of Medical Physiology 9th edition.** W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996.

Harrower AD. **Comparative tolerability of sulphonylureas in diabetes mellitus.** *Drug Saf* 2000; 22(4): 313-320.

Jiang H, Takahara S, Kyo M, Kokado Y, Ishibashi M et Sonoda T. **Effetc of FK-506 on heart allograft survival in the highly sensitized recipient rats as compared with ciclosporin and 15-deoxyspergualin.** *Eur Surg Res* 1991; 23(3-4): 201-205.

Kane C, Shepherd RM, Squires PE, Johnson PRV, James RFL, Milla PJ, Aynsley-Green, A, Lu S, Clement JP, Lindley KJ, Seino S, et Aguilar-Bryan L. **Loss of functional $K_{(ATP)}$ channels in pancreatic B-cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.** *Nature Med* 1996; 2(12):1344-1347.

Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotina A, Shah K, Mulvany K, Hora D, Cunningham P, Wunderler DL, McManus OB, Slaughter R, Bugianesi R, Flix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer MS, Feeney W. **Blockage of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo.** *J Immunol* 1997; 158(11): 5120-5128.

Katzung GB. **Basic & Clinical Pharmacology 6th edition.** Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1995.

Kirsch M, Baufreton C, Fernandez C, Brunet S, Pasteau F, Astier A et Loisanse DY. **Preconditioning with cromakalin improves long-term myocardial preservation for heart transplantation.** *Ann Thorac Surg* 1998; 66(2): 417-424.

Krausz Y, Wollheim CB, Segal E et Sharp GWG. **Possible role for calmodulin in insulin release: Studies with trifluoperazine in the rat pancreatic islets.** *J Clin Invest* 1980; 66(3): 603-7.

Lebrun P, Malaisse WJ et Herchuelz A. **Nutrient induced intracellular calcium movement in rat pancreatic B cells.** *Am J Physiol* 1982; 243(4): E196-205.

Lee S, Sabath D, Deutsch D et Prystowsky M. **Increased voltage-gated potassium conductance during interleukin-2 stimulated proliferation of a mouse helper T lymphocyte clone.** *J Cell Biol* 1986; 102(4): 1200-1208.

Lin CS, Boltz RC, Blake JT, Nguyen M, Talento A, Fischer P, Springer MS, Sigal NH, Slaughter RS, Garica ML, Kaczorowski G, et Koo GC. **Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation.** *J Exp Med* 1993; 177(3): 637-645.

Luzi L et Pozza. **Glibenclamide : an old drug with a novel mechanism of action?** *Acta Diabetol* 1997; 34(4): 239-44.

Menasche P, Kevelaitis E, Mouas C, Grousset C, Piwnica A et Bloch G. **Preconditioning with potassium channel openers: A new concept for enhancing cardioplegic protection ?.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110(6): 1606-1613.

Menasche P, Mouas C et Grousset C. **Is potassium channel opening an effective form of preconditioning before cardioplegia ?.** *Ann Thorac Surg* 1996; 61(6): 1764-1768,

McGoan M et Frantz R. **Techniques of immunosuppression after cardiac transplantation.** *Mayo Clin Proc* 1992; 67(6): 586-595.

McKinnon D, et Ceredig R. **Changes in the expression of potassium channels during mouse T cell development.** *J Exp Med* 1986; 164(6): 1856-1850.

Miles AM, Sumrani N, Horowitz R, Homel P, Maursky V, Markell MS, Distant DA, Hong JH, Sommer BG et Friedman EA. **Diabetes mellitus after renal transplantation: as deleterious as non-transplant-associated diabetes?** *Transplantation* 1998; 65(3): 380-384.

Miller RJ. **Multiple Calcium channels and neuronal function.** *Science* 1987; 235(4784): 46-52.

Nielsen JH, Mandup-Poulsen T et Nerup J. **Direct effects of cyclosporin A on human pancreatic beta-cells.** *Diabetes* 1986; 35(9); 1049-52.

Noma A. **ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle.** *Nature* 1983; 305(5930): 147-148.

Ono K et Lindsey ES. **Improved technique of heart transplantation in the rats.** *J Thorac Surg* 1969; 57(2): 225-229.

Pignac J, Bourgouin J et Dumont L. **Cold cardioplegia and the K⁺ channel modulator aprikalim (RP 52891): improved cardioprotection in isolated ischemic rabbit hearts.** *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72(2): 126-132.

Pratt WB et Taylor P., **Principles of Drug Action.** 3rd Edition. Churchill Livingstone. New York, 1990.

Révillard J-P., **Immunologie 3^{ème} édition.**, DeBoeck Université, Paris. 1998.

Rocken M, Urban JF et Shevach EM. **Infection breaks T-Cell tolerance.** *Nature* 1992; 359(6390): 79-82.

Schell SR, Nelson DJ, Fozzard HA et Fitch FW. **The inhibitory effects of K⁺ channel-blocking agents on T lymphocyte proliferation and lymphokine production are "nonspecific".** *J Immunol* 1987; 139(10): 3224-3230.

Shirwan H. **Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role?** *Transplantation* 1999; 68(6); 715-726.

Sidell NL, Schlichter C, Wright SC, Hagiwara S et Golub SH. **Potassium channels in human NK cells are involved in discrete stages of the killing process.** *J Immunol* 1986; 137(5): 1650-1658.

Soria B, Marin F, Andreu E, Sanchez-Andres JV, Nacher V, Montana E. **Diminished fraction of blockable ATP-sensitive K⁺ channels in islets transplanted into diabetic mice.** *Diabetes* 1996; 45(12): 1755-1760.

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y et Nelson MT. **Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle.** *Science* 1989; 245(4914): 177-180.

Sugimoto T, Stewart S et Guan KL. **The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase.** *J Biol Chem* 1997 272(47): 29415-29418.

Terzic A, Jahangir A et Kurachi Y. **Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels : regulation by intracellular nucleotides and K channel-opening drugs.** *Am J Physiol* 1995; 269(3pt1): C525-545.

Tsamandas AC, Pham SM et Seaberg EC. **Adult heart transplantation under tacrolimus (FK506) immunosuppression : histopathologic observations and comparison to a cyclosporine-based regimen with lymphocytic (ATG) induction.** *J Heart Lung transplant* 1997; 16(7): 723-734.

Tsien RW, Lipscombe D et Madison DV. **Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation.** *Trends Neurosci* 1988; 11(10): 431-438.

Thuringer D et Caverio I. **Les canaux potassiques inhibés par l'ATP cellulaire: une aventure physiologique à suspense moléculaire.** *Médecine/Science* 1997; 13(8-9); 1049-1052.

Weir MR et Fink JC. **Risk for posttransplant diabetes mellitus with current immunosuppressive medications.** *Am J Kid Dis* 1999; 34(1): 1-13.

Yao Z, Cavero I et Gross GT: **Activation of cardiac K⁺ATP channels: an endogenous protective mechanism during repetitive ischemia.** *Am J Physiol* 1993; 264(2pt2): 495-504.

Yamashita M, Schmid RA, Fujino S, Cooper JD et Patterson GA. **Nicorandil: a potent adenosine triphosphate-sensitive potassium-channel opener, ameliorates lung allograft reperfusion injury.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112(5): 1307-1314.

Zhang F, Lineaweaver WCX, Kao SD, Walker R, Tonken HP. **Manual of experimental muscle flap and organ transplantation models in the rat.** Sharpoint, 1995.