

2ml. 2895.4

Université de Montréal

Le mycophénolate mofétil et la rapamycine inhibent
le rejet chronique allogreffe du rein chez le rat

Par

Étienne-Marc Jolicoeur

Département de chirurgie

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

avril 2001

©E. Marc Jolicoeur, 2001



W
4
W58
2001
N. 100

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Le mycophénolate mofétil et la rapamycine inhibent
le rejet chronique allogreffe du rein chez le rat

présenté par :

Étienne-Marc Jolicoeur

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Gilles St-Louis..... président du jury
Huifang Chen..... directeur de recherche
Louis Dumont..... codirecteur de recherche
Stéphane Busque..... membre du jury

Mémoire accepté le:.....

SOMMAIRE

Malgré une amélioration sans cesse croissante de la maîtrise du rejet aigu, la survie à long-terme d'un rein transplanté ne s'est pas améliorée depuis les vingt dernières années. Le rejet chronique du rein constitue à ce jour l'une des principales causes de perte des greffons.

En plus de leur propriété immunosuppressive, le mycophénolate mofétil et la rapamycine modulent l'activité des cellules musculaires lisses, inhibent l'expression de multiples cytokines et empêchent la production de molécules d'adhésion cellulaire qui sont autant de protagonistes impliqués dans la genèse de rejet chronique.

Le but de l'étude présentée dans ce mémoire est d'évaluer l'efficacité du mycophénolate mofétil et de la rapamycine seuls ou en association dans la prévention du rejet chronique allogreffe du rein chez le rat.

Des rats Lewis néphrectomisés ont reçu une greffe orthotopique du rein à partir de rats donneurs Fisher ou Lewis (groupe témoin isogreffe). Les épisodes initiaux de rejet aigu ont été évités avec un bref traitement de cyclosporine (1.5 mg/kg/d durant 10 jours). Les animaux ont été traités de la semaine 4 à la semaine 20 post-transplantation selon l'organisation suivante: témoin allogreffe, témoin isogreffe, MMF (20 mg/kg), RAPA (0.8 mg/kg) et MMF (20 mg/kg) + RAPA (0.8 mg/kg) en association. À intervalles réguliers, les animaux ont été sacrifiés et une évaluation histologique à l'aide de l'échelle de Banff pour la pathologie du rein allogreffe a été effectuée pour tous les reins recueillis.

Sur un suivi de 50 semaines, le groupe témoin allogreffe montre en moyenne un pointage de Banff élevé (7.21 ± 0.97) signant la présence de rejet chronique. Les animaux traités avec le mycophénolate mofétil ou la rapamycine en monothérapie ne se distinguent pas cliniquement ou statistiquement du témoin allogreffe (pointages respectifs de 6.31 ± 1.01 et de 7.27 ± 1.14 , $p > 0.05$). Par contre, le groupe traité

conjointement avec les deux immunosuppresseurs montre un pointage de Banff distinct de celui du témoin allogreffe (4.21 ± 0.79 , $p < 0.05$). L'association prévient spécifiquement la fibrose interstitielle, la glomérulopathie allogreffe et la vasculopathie allogreffe.

En conclusion, nos résultats montrent que le mycophénolate mofétil et la rapamycine en association inhibent le rejet chronique allogreffe du rein chez le rat. Grâce à cette découverte, nous espérons paver la voie à d'éventuels développements cliniques.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Historique de la transplantation rénale.....	2
1.1.1 Les époques de la transplantation rénale.....	3
1.1.2 Les dates importantes.....	6
1.2 Immunobiologie de la transplantation.....	7
1.2.1 Le système immunitaire : une brève revue.....	7
1.2.2 Rejet d'organe solide : présentation directe et indirecte.....	10
1.3 Épidémiologie et facteurs de risque du rejet chronique.....	13
1.3.2 Épidémiologie.....	13
1.3.3 Facteurs de risque	15
1.4 Diagnostic et physiopathologie du rejet chronique.....	19
1.4.1 Diagnostic clinique.....	19
1.4.2 Diagnostic histologique.....	20
1.4.3 Physiopathologie du rejet chronique.....	22

1.5	Vasculopathie allogreffe.....	24
1.5.1	Les agressions de Ross et la réponse de Häyry	24
1.5.2	Hypothèses alternatives.....	27
1.6	Mycophénolate mofétil.....	29
1.6.1	Mécanisme d'action principal.....	29
1.6.2	MMF <i>in vitro</i>	32
1.6.3	Pharmacocinétique.....	33
1.6.4	Effets secondaires.....	35
1.7	Rapamycine (RAPA).....	37
1.7.1	Mécanismes d'action.....	38
1.7.2	Pharmacocinétique.....	45
1.7.3	Effets secondaires.....	46
1.8	Prévention pharmacologique du rejet chronique.....	48
1.8.1	Les modèles de rejet chronique.....	49
1.8.2	MMF et rejet chronique.....	50
1.8.3	RAPA et rejet chronique	56
1.9	Transplantation rénale orthotopique.....	64
1.9.1	Modèle chirurgical	65
1.10	But du projet de recherche.....	66
CHAPITRE 2 : Mycophenolate Mofetil (MMF) and Rapamycin (RAPA) in Prevention of Chronic Allograft Rejection of the Kidney in the Rat.		
2.1	Abstract.....	71
2.2	<i>Introduction</i>	73
2.3	<i>Materials and methods</i>	76

2.4	<i>Results</i>	79
2.5	<i>Discussion</i>	81
2.6	<i>Acknowledgments</i>	85
2.7	<i>References</i>	86

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1	Critique de la méthodologie.....	98
3.1.1	Justification du modèle expérimental.....	98
3.1.2	Limites de l'étude histologique.....	99
3.1.3	Limites de la méthode statistique.....	100
3.2	Discussion des résultats.....	104
3.2.1	Efficacité du modèle.....	104
3.2.2	MMF et RAPA en monothérapie.....	104
3.2.3	MMF et RAPA en combinaison inhibent le rejet chronique: où et Quand?.....	105
3.3	La physiopathologie du rejet chronique revisitée.....	108
3.4	Perspectives.....	110

CHAPITRE 4 : SOURCES DOCUMENTAIRES

CHAPITRE 5 : ANNEXES

5.1	Transplantation rénale orthotopique; protocole microchirurgical.....	xvii
5.2	<i>Banff Working Classification of Renal Allograft Pathology; Chronic Rejection</i>	xxi
5.3	Tableaux des données : pointages de Banff.....	xxiii

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-I.	<i>Les dates importantes de la transplantation</i>	6
TABLEAU 1-II.	<i>Réponse immunitaire cellulaire du rejet d'organe</i>	10
TABLEAU 1-III.	<i>Facteurs de risque du rejet chronique.....</i>	15
TABLEAU 1-IV.	<i>Manifestations du rejet chronique dans divers organes.....</i>	19
TABLEAU 1-V.	<i>Comparaison entre l'athérosclérose classique et la vasculopathie allogreffe.....</i>	21
TABLEAU 1-VI.	<i>Propriétés in vitro de l'acide mycophénolique sur les lignées cellulaires humaines</i>	32
TABLEAU 1-VII.	<i>Propriétés pharmacocinétiques de l'acide mycophénolique.....</i>	33
TABLEAU 1-VIII.	<i>Propriétés pharmacocinétiques de la rapamycine.....</i>	45
TABLEAU 1-IX.	<i>Propriétés du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet chronique.....</i>	50
TABLEAU 1-X.	<i>Propriétés de la rapamycine dans la prévention du rejet chronique.....</i>	56
TABLEAU 5-I.	<i>Effets du MMF et de RAPA sur les critères histologiques de la classification de Banff.....</i>	xxiii
TABLEAU 5-II.	<i>Effets du MMF et de RAPA sur le rejet chronique allogreffe du rein chez le rat (F344 → LEW).</i>	xxiv

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1.	<i>L'évolution des outils de la transplantation</i>	2
FIGURE 1-2.	<i>Mécanismes du système immunitaire impliqués dans le rejet d'un greffon</i>	9
FIGURE 1-3.	<i>Présentation lymphocytaire directe et indirecte</i>	12
FIGURE 1-4.	<i>Causes de pertes d'allogreffes rénales dans les 10 ans post-transplantation</i>	14
FIGURE 1-5.	<i>Séquence des événements physiopathologiques du rejet chronique</i>	22
FIGURE 1-6.	<i>Hypothèse de Ross appliquée à l'athérosclérose du rejet chronique</i>	25
FIGURE 1-7.	<i>Résumé des événements survenant lors de la vasculopathie allogreffe associée au rejet chronique</i>	28
FIGURE 1-8.	<i>Mycophénolate mofétil</i>	29
FIGURE 1-9.	<i>Voies de synthèse des purines</i>	31
FIGURE 1-10.	<i>Rapamycine</i>	37
FIGURE 1-11.	<i>Sites d'action des immunosuppresseurs sur le cycle cellulaire</i>	38
FIGURE 1-12.	<i>Mécanisme d'action de la rapamycine sur la kinase p70^{S6k}</i>	41

FIGURE 1-13.	<i>Mécanisme postulé de l'action de la rapamycine dans l'inhibition du complexe cycline E-cdk 2.....</i>	<i>42</i>
FIGURE 1-14.	<i>Vue d'ensemble des mécanismes d'action de la rapamycine</i>	<i>44</i>
FIGURE 1-15.	<i>La voie finale commune de la prolifération des cellules musculaires lisses.....</i>	<i>59</i>
FIGURE 1-16.	<i>Transplantation rénale orthotopique.....</i>	<i>65</i>
FIGURE 2-1.	<i>Effect of MMF and RAPA on histological criterions of the Banff working classification.....</i>	<i>94</i>
FIGURE 2-2.	<i>Photomicrographs representative of the effect of MMF and RAPA in combination on chronic renal allograft rejection</i>	<i>95</i>
FIGURE 2-3.	<i>Effect of MMF and RAPA on chronic renal allograft rejection in the rat (F344 → LEW).....</i>	<i>96</i>
FIGURE 3-1.	<i>Répartition chronologique des sacrifices.....</i>	<i>101</i>
FIGURE 3-2.	<i>Modèle convergent de la physiopathologie du rejet chronique.</i>	<i>109</i>

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- ADCC : (de l'Anglais : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ;
- Ah : (de l'Anglais : *arteriolar nodular thickening*), hyalinose nodulaire artériolaire ;
- ANOVA : (de l'Anglais : *analysis of variance*) ;
- APC : (de l'Anglais : *antigen presenting cell*), cellule présentatrice d'antigène ;
- ARNm : acide ribonucléique messenger ;
- bFGF : (de l'Anglais : *b-fibroblast growth factor*) ;
- cg : (de l'Anglais : *allograft glomerulopathy*), glomérulosclérose allogreffés ;
- ci : (de l'Anglais : *interstitial fibrosis*), fibrose interstitielle ;
- CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ;
- CML : cellule musculaire lisse ;
- CMV : cytomégalovirus ;
- CsA : ciclosporine A ;
- CSF : (de l'Anglais : *colony stimulating factor*) ;
- ct : (de l'Anglais : *tubular atrophy*), atrophie tubulaire ;
- cv : (de l'Anglais : *vascular fibrous intimal thickening*), vasculopathie allogreffe ;
- FDA : (de l'Anglais : *Food and Drugs Administration*) ;
- FKBP : (de l'Anglais : *FK 506 Binding Protein*), protéine de liaison du FK 506 ;
- GTP : guanosine triphosphate ;
- HLA : (de l'Anglais : *human leukocyte antigen*), antigène leucocytaire humain ;
- HTA : haute tension artérielle ;
- IFN : interféron ;
- IL- : interleukine ;

IMP :	inosine monophosphate ;
IMPDH :	inosine monophosphate déshydrogénase ;
IV :	intraveineux ;
LEI :	lamina élastique interne ;
M :	macrophage ;
mm :	(de l'Anglais : <i>mesangial matrix increase</i>), hypertrophie mésangiale ;
MMF :	mycophénolate mofétil ;
MPA :	acide mycophénolique ;
mTOR :	(de l'Anglais : <i>mammalian target of rapamycin</i>) ;
NK :	(de l'Anglais : <i>natural killer</i>) ;
PBM :	pointage de Banff modifié ;
PDGF- α :	(de l'Anglais : <i>platelet derived growth factor</i>) ;
po :	(du Latin : <i>-per os</i>), par la bouche ;
pRb :	protéine du rétinoblastome ;
RAPA :	rapamycine ;
SCF :	(de l'anglais : <i>stem cell factor</i>) ;
SEM :	(de l'Anglais : <i>standard error of the mean</i>), erreur-type ;
SRL :	sirolimus (rapamycine) ;
TcR :	(de l'Anglais : <i>T cell receptor</i>), récepteur du lymphocyte T ;
TGF- β :	(de l'Anglais : <i>transforming growth factor</i>) ;
Th :	voie métabolique du lymphocyte T auxiliaire ;
TNF :	(de l'Anglais : <i>tumor necrosis factor</i>) ;
TRO :	transplantation rénale orthotopique.

REMERCIEMENTS

Thanks to Dr. Huifang Chen who first believes in this project. Thank you for your patience and your devotion. I appreciated your teaching of science and philosophy.

Merci au Dr. Louis Dumont pour avoir assumé la co-direction de mes travaux. Pédagogue excellent, vous m'avez donné l'élan nécessaire pour mener à bien ce projet.

Thanks to Dr. Shijie Qi "the magic fingers" for the teaching of the art of microsurgery. Thanks to Dr. Dasheng Xu for all the judicious advises. You both are precious friends.

Merci au Dr. Walter Schürch pour avoir offert de son temps et de son expertise en pathologie du rein.

Merci à Diem Vu qui a d'abord été un modèle, ensuite une collègue et enfin mon amie. J'admire ta détermination. Merci à Stéphane Johnson pour la perspective culturelle enrichissante.

Merci à l'équipe de chirurgie-transplantation de l'hôpital Notre-Dame, particulièrement au fougueux Dr. Stéphane Busque, pour m'avoir introduit à la transplantation clinique.

Merci à Alain Laplante pour m'avoir pris sous son «aile protectrice». Merci au Dr. Richard Béliveau, homme visionnaire, pour la collaboration scientifique.

Merci à Marie-Claude Hardy B. pharm. et à Marc-André St-Germain MD. pour la révision scientifique des textes. Merci à Marie-Claude Guertin Ph.D. pour les conseils sur l'analyse statistique. Merci à Jean-François Boileau et à Ari-Nareg Meguerditchian pour le *primum movens*.

Merci à Dominique Lefavre et à Mathieu Faucher pour les oreilles attentives et les tapes dans le dos. Finalement, merci à ma famille pour tout ce support inconditionnel.

À mes patients, qui font de cet ouvrage un message d'espoir.

À Agnès et Jean-Guy.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 HISTORIQUE DE LA TRANSPLANTATION RÉNALE

La transplantation fascine l'imaginaire. Plus qu'un simple transfert d'organe, elle est don de vie. Telle que nous l'apprend son histoire, le succès contemporain de la transplantation est le fruit d'audace et de persévérance. L'idée de remplacer les organes ne date pas d'hier, mais il aura fallu attendre le début du XXe siècle pour voir naître les premières tentatives significatives de greffes rénales. Cet acte est aujourd'hui possible grâce à deux révolutions bien précises : l'amélioration des techniques d'anastomoses vasculaires et l'utilisation des immunosuppresseurs. Il existe désormais une multitude d'outils qui permettent de repousser les limites de ce qui était impossible il y a encore cent ans.

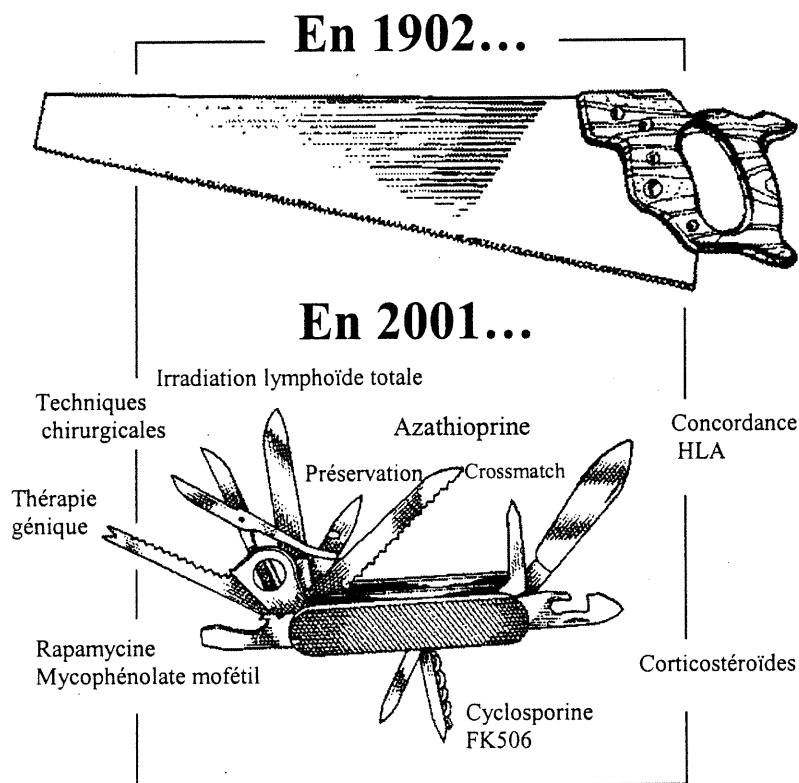


FIGURE 1-1. L'évolution des outils de la transplantation. Caricature illustrant le progrès depuis les expérimentations d'Emerich Ullmann en 1902. (Illustration originale).

LES ÉPOQUES DE LA TRANSPLANTATION RÉNALE

Il convient de distinguer 3 grandes époques dans l'histoire de la transplantation : l'ère «technique» marquée principalement par le raffinement des techniques d'anastomoses vasculaires, puis «la renaissance» de l'intérêt pour la transplantation rénale depuis longtemps oubliée à cause de l'inexplicable rejet et enfin, la «période moderne» issue de l'avènement des agents immunosuppresseurs. Influencée par les progrès de la science actuelle, une ère nouvelle semble désormais s'établir; celle de la thérapie génique, de la synthèse artificielle d'organes, de la xénotransplantation et des agents anti-rejet chronique.

L'ère technique

On attribue la première transplantation rénale réussie à Emerich Ullmann en 1902 (Université de Vienne). Chirurgien expérimentaliste, Ullmann utilise alors le chien comme modèle. Rapidement, l'idée atteint la France et dès 1906, Jaboulay greffe les premiers reins chez l'homme, à partir de donneurs animaux (chèvres et porcs).

La plus grande contribution de cette époque vient sans contredit d'Alexis Carrel (prix Nobel, 1912). S'inspirant des travaux préalablement décrits par Payr, Carrel met au point vers 1902 les techniques modernes d'anastomoses vasculaires. On sait dès lors que la transplantation est techniquement possible.

Au début du siècle, le manque de connaissances fondamentales en physiologie rénale et en immunologie rend strictement impossible la compréhension du phénomène de rejet d'organe qui mate les unes après les autres les tentatives de greffe. La transplantation tombe alors dans l'oubli et la désuétude. Il faudra attendre la science de l'histocompatibilité, avec à sa tête Jean Dausset, pour voir se résoudre les énigmes de cette époque.

La renaissance

Malgré plusieurs tentatives d'allogreffes effectuées chez l'homme par Voronoy vers 1936, ce n'est qu'au début des années cinquante que le véritable engouement renaît. Dempster (1953) et Simonsen (1953) ont l'idée d'analyser les organes transplantés (et rejetés) à la lumière des connaissances contemporaines en immunologie. En associant la fonction leucocytaire au rejet d'organe, Dempster découvre l'efficacité de la radiation pan-corporelle pour en retarder l'apparition.

Les premières expériences tentant d'outrepasser le système immunitaire sont réalisées vers 1954. Murray a la brillante idée d'isotransplanter entre-eux deux frères jumeaux monozygotes. Pour l'époque, l'opération est un succès.

Durant ces années lumières, la science trouve des explications et des solutions au rejet d'organe. Il devient de plus en plus évident que le salut de la transplantation passe par un «apprivoisement» du système immunitaire.

La période moderne.

Les premières heures de cette ère remontent au début des années soixante avec l'utilisation rationnelle de l'irradiation pan-corporelle et du 6-mercaptopurine (6-MP, ancêtre de l'azathioprine) comme méthode immunosuppressive. Déjà, à Paris et à Boston, on rapporte des cas de greffes rénales tolérées et persistantes entre humains. En 1961, l'azathioprine (Immuran®) devient disponible pour usage chez l'homme. L'année suivante, Hamburger transplante pour une première fois des reins entre deux sujets préalablement identifiés comme histocompatibles. Ces quelques innovations permirent de diminuer considérablement l'incidence du rejet hyperaigu.

Dans les années 70, on assiste à un accroissement de la popularité du don d'organe. Déjà, la demande excède l'offre. L'immunopharmacologie fait son apparition. Avec Borel (1976) et Calne (1978) on voit naître l'implantation clinique du plus célèbre immunosuppresseur: la cyclosporine. C'est d'ailleurs à cette époque que la thérapie cyclosporine-azathioprine-stéroïdes est mise au point. Pour la première fois, on peut se targuer de maîtriser le rejet aigu. La dernière décennie a vu s'installer de nouveaux

agents: le mycophénolate mofétil¹ (MMF, Cellcept®), le FK506 (tacrolimus, Prograf®) et la rapamycine (sirolimus, Rapamune®). L'avenir nous dira quelle place occuperont ces agents dans la pharmacopée mise à la disposition de la médecine de ce nouveau millénaire.

Le tableau 1-1 présente les étapes déterminantes de l'histoire de la transplantation ainsi que les protagonistes qui y sont associés.

Vers un nouveau siècle

Les défis de la transplantation moderne sont autrement différents de ceux rencontrés par Ullmann au début du XX^e siècle. Aujourd'hui, on parle de xénogreffe, de tolérance immune et de thérapie génique.

L'amélioration sans cesse croissante de la survie à court terme des organes transplantés aura permis l'émergence du phénomène de rejet chronique. On comprend désormais que la seule maîtrise du système immunitaire ne sera pas suffisante pour empêcher le rejet chronique de se manifester. En plus d'avoir les qualités de leurs prédécesseurs, les nouveaux agents thérapeutiques devront aussi inhiber les processus pathologiques à l'origine du rejet chronique : la vasculopathie allogreffe et l'infiltration leucocytaire parenchymateuse.

¹ En réalité, l'acide mycophénolique a été utilisée en clinique bien avant la cyclosporine, mais comme antibiotique.

Dates importantes de la transplantation rénale

1902	Première transplantation rénale expérimentale réussie (Ullmann, 1902)
1906	Première xénotransplantation rénale réussie chez l'homme (Jaboulay, 1906)
1933	Première allotransplantation rénale réussie chez l'homme (Voronoy, 1936)
1950	Renaissance de l'intérêt pour la transplantation (Simonsen, 1953, Dempster, 1953)
1950-53	Allotransplantation rénale humaine sans immunosuppression, à Paris (Küss <i>et al.</i> , 1951 ; Servelle <i>et al.</i> , 1951; Dubost <i>et al.</i> , 1951) et Boston (Hume <i>et al.</i> , 1955)
1953	Première transplantation familiale, Paris (Michon <i>et al.</i> , 1953)
1954	Première transplantation entre jumeaux monozygotes, Boston (Murray <i>et al.</i> , 1958)
1958	Description du complexe majeur d'histocompatibilité (Dausset, 1958)
1959-62	Utilisation de la radiation comme méthode immunosuppressive, à Paris (Hamburger <i>et al.</i> , 1959; Küss <i>et al.</i> , 1958) et Boston (Murray <i>et al.</i> , 1960)
1960	Efficacité du 6-MP lors de transplantations rénales canines (Calne, 1960; Zukoski <i>et al.</i> , 1960)
1960	Survie prolongée des greffons chez des patients irradiés et traités au 6-MP (Kuss <i>et al.</i> , 1962)
1962	Première utilisation de greffons histocompatibles (Hamburger <i>et al.</i> , 1962; Terasaki <i>et al.</i> , 1965; Dausset, 1980)
1966	Établissement du lien entre le rejet hyperaigu et l'incompatibilité tissulaire (Terasaki <i>et al.</i> , 1965; Kissmeyer-Nielsen <i>et al.</i> , 1966)
1967	Développement des méthodes de conservation rénale (Belzer <i>et al.</i> , 1967)
1973	Description de l'effet «transfusion» (Opelz <i>et al.</i> , 1973)
1978	Premier essai clinique de la cyclosporine (Calne <i>et al.</i> , 1978)
1978	Application de la concordance HLA-DR pour la transplantation rénale (Ting et Morris, 1978)
1983	Anticorps OKT-3 (Cosimi, 1983)
1990	Utilisation du FK 506 (Starzl <i>et al.</i> , 1990)

TABLEAU 1-I. Les dates importantes de la transplantation.

Adapté de Hamilton (1994) et Ryffel *et al.* (1994).

1.2 IMMUNOBIOLOGIE DE LA TRANSPLANTATION

L'histocompatibilité représente une branche distincte de l'immunologie et la compréhension du phénomène de rejet fait appel à des concepts qui lui sont exclusifs. D'un point de vue immunologique, la notion de rejet chronique est fallacieuse. Mis sur une scène conjointe, on pourrait croire que le rejet aigu finit par devenir chronique avec la persévérance des actions destructrices du système immunitaire. Cette vision de la réalité est fautive. Issu du greffon plutôt que du greffé, le rejet chronique est la réponse physiologique de cicatrisation de l'organe transplanté. Il constitue la manifestation d'un organe usé précocement par de multiples assauts.

LE SYSTÈME IMMUNITAIRE: UNE BRÈVE REVUE.

Le système immunitaire d'un individu a pour responsabilité de reconnaître et d'éliminer tout ce qui est non-soi (ou antigène). La transplantation d'un organe constitue pour le receveur un exemple assez singulier d'envahissement par le non-soi. Ce sont les complexes majeurs d'histocompatibilité I et II (CMH²) qui sont les principaux constituants antigéniques impliqués lors du rejet. Plus la disparité génomique entre les CMH du donneur et du receveur est grande, plus le rejet sera intense.

Il est possible de scinder le système immunitaire en compartiment cellulaire et humoral. Ces deux systèmes travaillent en synergie dans le but d'éliminer tout agent étranger potentiellement délétère. Les deux branches de l'immunité sont impliquées lors du rejet aigu et chronique.

L'immunité cellulaire est principalement constituée de cellules présentatrices d'antigène (ou APC, incluant le macrophage) et de lymphocytes T CD4⁺ (auxiliaires) et CD8⁺ (cytotoxiques). Les APC ont la propriété de fragmenter les particules antigéniques en déterminants (épitopes) et de les combiner au sillon d'une molécule du CMH. Le lymphocyte reconnaît le déterminant antigénique comme étranger si et seulement si ce

dernier est présenté par le biais d'un CMH. Tandis que le lymphocyte T CD4+ reconnaît les antigènes associés au CMH II, le CD8+ reconnaît les antigènes associés au CMH I (Lechler *et al.*, 1995).

En plus de la présentation CMH-antigène/TcR-CD3, l'activation lymphocytaire nécessite la présence d'un second signal. La co-stimulation provient la plupart du temps de la liaison CD28 (lymphocyte) et B7-1/B7-2 (APC) (Kelley et Strom, 1995) (voir figure 1-14). Cette double signalisation «transduit» deux signaux différents qui convergent vers le noyau afin d'enclencher la production de protéines effectrices nécessaires à la réponse lymphocytaire. La signalisation intracellulaire peut être divisée en voie calcium-indépendante (CD28-B7) et calcium-dépendante.

Une fois l'antigène reconnu comme étranger, l'activation du lymphocyte T CD4+ est enclenchée. On peut comparer le CD4+ à un «chef d'orchestre» qui dirige la réaction du système immunitaire. Il est responsable de la production d'une multitude de cytokines essentielles à la mobilisation, la croissance et la différenciation des autres cellules impliquées dans le rejet (neutrophiles, macrophages, NK). Entre autres, la participation des lymphocytes T CD4+ est nécessaire à l'activation des lymphocytes B, grands responsables de l'immunité humorale. Les lymphocytes B produisent les anticorps capables de détruire les particules antigéniques en s'y liant (figure 1-2).

² Le CMH humain est nommé HLA (*human leukocyte antigen*).

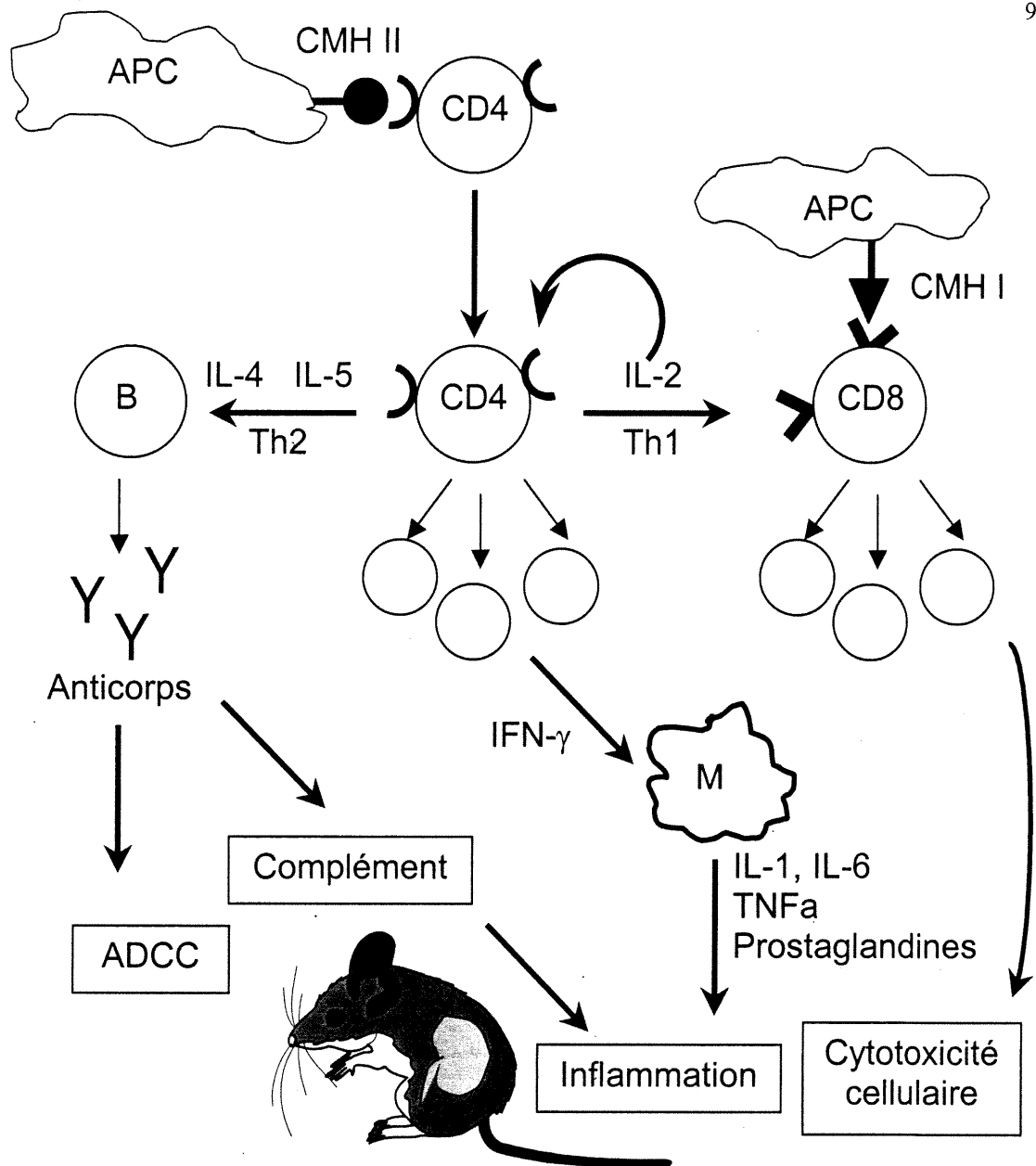


FIGURE 1-2. Mécanismes du système immunitaire impliqués dans le rejet d'un greffon. La cellule présentatrice d'antigène active le lymphocyte T auxiliaire via les CMH. Le lymphocyte auxiliaire active à son tour les lymphocytes T et B ainsi que le macrophage. La réponse immune culmine contre le rein transplanté en quatre types d'attaques: l'ADCC, l'activation du complément, l'inflammation et la cytotoxicité lymphocytaire (Hutchinson, 1992). (Abréviations. ADCC: *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, APC: *antigen presenting cell*, B: lymphocyte B, CD4: lymphocyte T auxiliaire, CD8: lymphocyte T cytotoxique, CMH: complexe majeur d'histocompatibilité, IFN: interféron, IL: interleukine, M: macrophage, Th: voie métabolique du lymphocyte T auxiliaire, TNF: *tumor necrosis factor*). (Illustration originale).

REJET D'ORGANE SOLIDE : PRÉSENTATION DIRECTE ET INDIRECTE.

De tous les antigènes transmis lors d'une transplantation, les CMH du donneur sont ceux qui induisent chez le receveur la réponse immune la plus vigoureuse. Le paradoxe est intéressant : la molécule qui est impliquée dans la présentation d'antigènes devient elle-même un antigène lorsqu'elle est transférée dans un organisme auquel elle est étrangère. C'est le chat qui devient la souris ! Lors d'un rejet, la réponse immunitaire cellulaire se déroule telle que l'indique la séquence du tableau 1-II.

Réponse immunitaire cellulaire du rejet.

1. Présentation du peptide étranger au système immunitaire du receveur.
 2. Activation du lymphocyte T auxiliaire.
 3. Production de cytokines.
 4. Effets des cytokines sur :
 - a. Le système immunitaire du receveur.
 - b. Le tissu transplanté.
 - i. Antigènes CMH.
 - ii. Molécules d'adhésion endothéliales.
 - iii. Effets toxiques directs.
 5. Entrée de cellules activées dans le greffon.
 6. Migration des cellules dans le greffon.
 7. Dommages cytotoxiques spécifiques et inflammatoires.
-

TABLEAU 1-II : Réponse immunitaire cellulaire du rejet d'organe.

Tiré de Hutchinson (1992).

L'allogénicité du complexe majeur d'histocompatibilité est responsable d'un phénomène unique en immunologie. Après transplantation, les APC du donneur transportés avec le greffon peuvent interagir avec les lymphocytes du receveur. On nomme ces APC «leucocytes clandestins» (*passenger leukocytes*). Du coup, on se retrouve avec deux séries d'APC (plutôt qu'une) capables d'activer les lymphocytes du receveur: celle du greffon et celle du greffé. Cette dualité rend le tissu transplanté particulièrement antigénique. À titre d'exemple, il a été mesuré qu'un lymphocyte T peut répondre 1 fois sur 10 000 à un pathogène environnemental commun tandis qu'il répond 1 fois sur 200 à un antigène CMH allogénique (Fischer-lindahl et Wilson, 1977, dans Auchincloss, 1995).

La capacité des APC du donneur d'activer les lymphocytes T du receveur a donné naissance au concept de présentation directe et indirecte. La présentation directe sous-entend que le lymphocyte T reconnaît la molécule allogénique du CMH sans l'intermédiaire des APC du receveur. De fait, la présentation indirecte réfère au mode d'activation physiologique habituel du lymphocyte T (figure 1-3).

Un lymphocyte donné est capable de reconnaître directement un CMH allogénique sans que cette molécule ne soit fragmentée en déterminants épitopiques, telle que l'exige la présentation habituelle par les APC du soi. Cette notion qui, de prime abord, va à l'encontre des connaissances de bases en immunologie, s'explique par les spécificités engendrées lors de la sélection positive³. Le but de la sélection positive est de générer des thymocytes capables de reconnaître les CMH du soi. Sitôt confronté à la moindre variation du CMH (comme lorsque ce dernier lie dans son sillon un épitope antigénique), le lymphocyte T sera activé. Parce que le leucocyte clandestin possède un CMH suffisamment similaire, il est compatible avec le lymphocyte du receveur. En revanche, parce que son CMH est suffisamment distinct, il peut l'activer (Auchincloss, 1995).

³ La sélection positive renvoie ici au processus de sélection intra-thymique lors de l'ontogenèse du lymphocyte T.

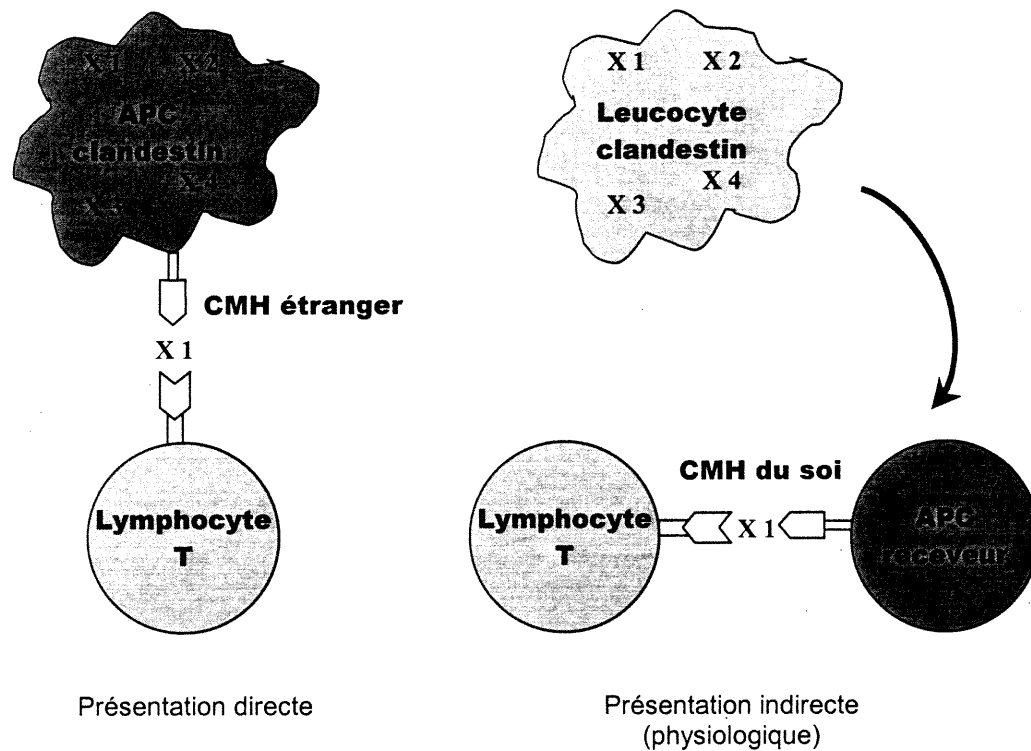


FIGURE 1-3. Présentation lymphocytaire directe et indirecte. La présentation directe sous-entend que le lymphocyte T reconnaît la molécule allogénique du CMH sans l'intermédiaire des APC du receveur. Tiré de Auchincloss (1995).

Cette dichotomie dans la présentation des antigènes permet en partie d'expliquer pourquoi les épisodes de rejet aigu sont plus fréquents et intenses durant la période post-greffe immédiate. Simple question de probabilité, l'activation directe par les leucocytes «clandestins» additionnée aux antigènes CMH du donneur et au contexte inflammatoire engendré multiplie les chances pour qu'un lymphocyte du receveur, jusqu'alors quiescent, soit activé et se révolte à son tour contre l'organe inconnu.

Il semble que l'immunogénicité d'un greffon s'atténue avec temps à cause d'une diminution des leucocytes «clandestins» provenant du donneur et capables d'induire l'immunité allogreffe (Lechler *et al.*, 1982 dans Paul et Solez, 1992).

1.3 ÉPIDÉMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE DU REJET CHRONIQUE

Lorsqu'on transplante un rein, on espère que son bon fonctionnement sera définitif. Au moment des premières séries d'allogreffes réalisées dans les années cinquante, il était inconcevable qu'un rein transplanté puisse survivre au-delà de quelques jours. Il aura fallu attendre la venue de l'immunosuppression chimique au début des années soixante pour que la survie des greffons augmente considérablement. C'est en 1962 qu'on rapporte en primeur qu'une allogreffe rénale a survécu plus d'un an (Kuss *et al*, 1962, dans Foster et Dennis, 1992). À l'examen histologique, ces organes exhibaient une composition pathologique inédite: épaissement intimal, sténose et oblitération vasculaire, atrophie tubulaire et sclérose glomérulaire. Ces changements, d'abord décrits comme le «*insidious late rejection*» seront retenus plus tard comme des critères très spécifiques de rejet chronique (Porter *et al*, 1963).

L'engouement pour le rejet chronique est relativement récent. La raison est simple; depuis les premières heures de la transplantation, les efforts de la communauté scientifique ont été orientés vers une maîtrise optimale du rejet aigu. Avec l'avènement d'immunosuppresseurs spécifiques, la survie à court terme des greffons n'a pas cessée de s'améliorer. Pour cette raison, le rejet chronique a été observé de plus en plus fréquemment, si bien qu'il est devenu accessoirement un phénomène d'intérêt.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Au début des années quatre-vingt-dix, il a été démontré qu'en dépit de toutes les améliorations apportées à la maîtrise du rejet aigu, les chances de développer un rejet chronique étaient demeurées les mêmes. Ainsi, entre 1970 et 1990, les taux de survie à 1, 5 et 10 ans sont passés respectivement de 73%, 58% et 63% à 86% (↑), 71% (↑) et 52% (↓) (Schweitzer *et al*, 1991).

La survie médiane d'une greffe rénale cadavérique est inférieure à 8 ans et ne s'est pas améliorée en deux décennies (Terasaki *et al*, 1990). Précisément, la survie à 5 ans est de 81% pour un rein en santé, mais de 31% lorsque ce dernier est porteur d'un rejet chronique démontré à la biopsie (Almond *et al*, 1993). C'est donc dire que, malgré l'amélioration des thérapies immunosuppressives, du traitement des infections et des techniques chirurgicales, la médecine demeure sans ressource contre le rejet chronique.

La principale cause de perte du greffon dans les dix années suivant une transplantation est le rejet chronique (24% des cas). On sait que parmi tous les reins greffés en une année, approximativement 30 % seront cliniquement en rejet chronique quatre ans plus tard. On parle ainsi d'une incidence annuelle de 6% (Häyry, 1993-a). Comme autres causes, on retrouve les décès cardiovasculaires (18%), les infections (13%) et le rejet aigu (11%) (Schweitzer *et al*, 1991).

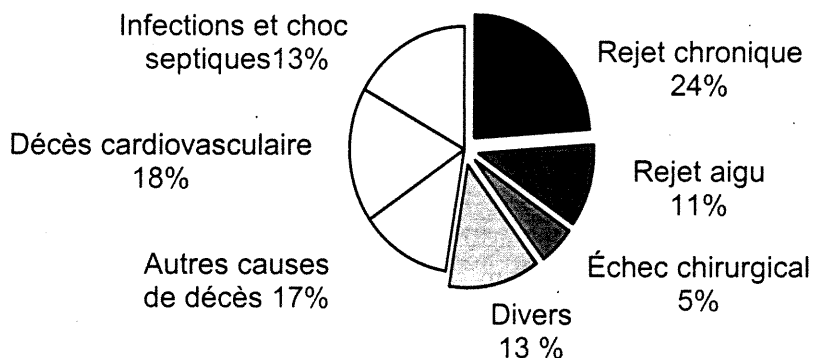


FIGURE 1-4. Causes de pertes d'allogreffes rénales dans les 10 ans post-transplantation. Sont illustrées en blanc les causes attribuables à un décès du receveur. Données compilées entre 1970 et 1990. Tiré de Schweitzer *et al*. (1991).

FACTEURS DE RISQUE

S'il est inéluctable que la fonction d'un rein transplanté finisse par se détériorer, on constate que certains greffons parviennent plus rapidement que d'autres à cet état de sénescence organique. Cette observation est à l'origine des grandes études rétrospectives entreprises dans le but d'identifier chez l'homme les éléments prédictifs du rejet chronique. La prise de conscience de ces facteurs de risque a permis de renouveler la pratique en transplantation clinique de telle sorte qu'aujourd'hui, toute décision est orientée vers l'atténuation de ces éléments.

Les facteurs de risque du rejet chronique sont habituellement scindés en deux catégories exclusives : les facteurs antigène-dépendants et les facteurs antigène-indépendants (Tullius et Tinley, 1995). Cette division basée sur l'antigène n'est pas sans rappeler l'époque où l'action du système immunitaire était le seul élément connu dans la pathogenèse du rejet chronique. La tableau 1-III présente ces facteurs de risque.

Facteurs antigène-dépendants	Facteurs antigène-indépendants
Discordance HLA	Ischémie / lésion de reperfusion
	Proportions rénales inadéquates ; âge du donneur, sexe, race, taille
Épisodes de rejet aigu répétitifs	HTA / hyperlipidémie
	Néphrotoxicité; cyclosporine et tacrolimus
Agressions immunologiques progressives infra-cliniques	Infection au CMV et autres virus
	Donneur en mort cérébrale

TABLEAU 1-III. Facteurs de risque du rejet chronique.

(Abréviations. CMV : cytomégalovirus, HLA : *Human leukocyte antigen*, HTA : haute tension artérielle). Tiré de Nagano et Tilney (1997).

Les facteurs de risque tendent à se présenter selon un profil temporel grossier. En général, les éléments antigène-dépendants surviennent plus tôt et ont des retentissements plus précoces dans la genèse du rejet chronique (Nagano *et al.*, 1997). Le concept de profil chronologique est pertinent car il a été démontré que les lésions histologiques initiales du rejet chronique sont temporairement réversibles. En retransplantant des reins de rats allogreffés vers un nouveau receveur isogénique (donneur F344 → receveur LEW → receveur F344), un renversement *ad integrum* des lésions précoces du rejet chronique est observé en autant que la seconde chirurgie soit effectuée à l'intérieur d'un délai critique de douze semaines. Passé ce temps, les lésions se consolident et progressent vers le rejet chronique, même si on effectue une retransplantation (Tullius *et al.*, 1994-a). Cette élégante expérience laisse croire qu'une atténuation prompte et agressive des facteurs antigène-dépendants en post-greffe immédiat peut favoriser une diminution de l'incidence du rejet chronique⁴.

Facteurs antigène-indépendants

L'influence des facteurs non-immunologiques a été découverte après que l'on ait constaté chez le rat que des reins isogreffés finissent eux-aussi par développer des stigmates histologiques de rejet chronique. À la différence, les lésions surviennent beaucoup plus tardivement que ce qui est observé lors d'allogreffes. Ces dommages se développent également sur des reins auxquels on a préalablement fait subir une lésion d'ischémie-reperfusion significative (Tullius *et al.*, 1994).

Des études cliniques rétrospectives ont permis d'identifier plusieurs caractéristiques démographiques influençant la survie à long terme d'un transplanté rénal. À partir de données américaines (*United Network of Organ Sharing*), le genre féminin, la race noire, l'âge inférieur à 4 ans ou supérieur à 65 ans ainsi que les receveurs avec une masse corporelle élevée ont été reconnus comme des éléments prédictifs du rejet chronique (Chertow *et al.*, 1995).

⁴ Tel que discuté au chapitre III, il est pure cohérence que des agents aux propriétés anti-rejet chronique baignent déjà le plasma des receveurs au moment de la greffe.

L'hypothèse de la masse néphronique et de l'hyperfiltration tente de concilier ensemble ces facteurs. En quelques sortes, la transplantation rénale représente un transfert de néphrons d'un donneur vers un receveur. La capacité de filtration d'un rein est proportionnelle à la quantité de néphrons présents. Aussi, on a constaté qu'un rein auquel on ampute une partie de ses néphrons dégénère rapidement (Heemann *et al.*, 1993). L'explication du phénomène est simple; une diminution de la quantité de néphrons efficaces d'un rein (la masse néphronique) accroît en proportion la charge des néphrons résiduels (l'hyperfiltration). Or, plus un néphron travaille, plus il dégénère rapidement. De façon insidieuse, un cercle vicieux s'installe dans lequel chaque néphron qui dégénère augmente la charge des néphrons résiduels qui à leur tour dégèrent et ainsi de suite. Les facteurs prédictifs rapportés par Chertow *et al.* ont tous la même caractéristique; ils engendrent des situations où les proportions rénales sont inadéquates, soit parce que le donneur a une masse néphronique diminuée (femme, race noire, âge), soit parce que le receveur a un besoin accru de filtration (masse corporelle élevée).

La durée de l'ischémie au moment de la chirurgie est un déterminant majeur du sort guettant l'organe transplanté. Une privation prolongée en oxygène est connue pour accroître l'expression organique des complexes majeurs d'histocompatibilité, particulièrement le CMH-II, à la surface endothéliale (Shackelton *et al.*, 1990). Cette hausse des CMH rend ces cellules plus immunogènes. Il a été rapporté que chaque minute d'ischémie chaude épargnée sous un temps de clampage de 50 minutes représente une amélioration de 1% de la survie à 1 an d'un rein greffé (Van Es *et al.*, 1983).

La dyslipidémie et la haute tension artérielle jouent un rôle controversé dans la pathogenèse de la vasculopathie allogreffe. Par contre, il est largement reconnu que l'hypercholestérolémie cause des lésions endothéliales qui peuvent entretenir l'athérosclérose (Ross, 1986). Il faudra retenir qu'une transplantation rénale génère en elle-même plusieurs facteurs de risque d'athérosclérose : une protéinurie abondante (syndrome néphrotique) et une hausse de la tension artérielle moyenne (Kasiske, 1992).

La néphrotoxicité des anti-calcineurine (cyclosporine et tacrolimus) est maintenant largement reconnue comme contributive au rejet chronique (Keown *et al.*, 1992, Racusen *et al.*, 1998).

Facteurs antigène-dépendants.

Le rejet aigu est sans contredit le plus important de tous les éléments qui favorisent le rejet chronique. À preuve, les receveurs subissant un épisode de rejet aigu dans les soixante premiers jours après une greffe rénale voient quintupler leurs chances de développer un rejet chronique. Au-delà de cette période, les chances augmentent à huit fois (Almond *et al.*, 1993). Cliniquement, la sévérité et la fréquence des crises de rejet aigu sont de puissants moyens prédictifs du rejet chronique (Massy *et al.*, 1995). Un traitement immunosuppresseur complet et équilibré doit être maintenu afin d'éviter la survenue d'un rejet aigu. Par exemple, la cyclosporine à des doses inférieures à 5 mg/Kg/jour durant la première année post-transplantation est un facteur de risque pour le rejet chronique (Almond *et al.*, 1993).

L'influence de l'histocompatibilité entre donneur et receveur reste controversée. Cette polémique oppose habituellement des études multicentriques et des études locales (Peeters *et al.*, 1995). Les études réalisées durant les dernières décennies par l'organisation Eurotransplant (12 883 primo-receveurs, 52 hôpitaux) montrent clairement que les concordances HLA-A, -B et particulièrement -DR augmentent la survie à court et long terme du couple greffon/receveur. Une différence de 30% dans la survie du greffon à cinq ans existerait à la faveur des receveurs sans discordance HLA-A, -B et -DR comparée à celle des receveurs avec six discordances HLA (Thorogood *et al.*, 1992).

Tel que discuté dans la prochaine section, le rejet chronique se doit d'être perçu comme la manifestation non-spécifique d'une réponse à des insultes, nonobstant leur nature antigénique ou mécanique.

1.4 DIAGNOSTIC ET PHYSIOPATHOLOGIE DU REJET CHRONIQUE

DIAGNOSTIC CLINIQUE

Le rejet chronique n'est pas un phénomène exclusif au rein et varie en manifestations d'un organe à l'autre.

Cœur	Rein	Foie
Inflammation	Inflammation	Inflammation
Athérosclérose (coronarienne)	Artériosclérose Glomérulosclérose Atrophie tubulaire	Artériosclérose Gonflement hépato-cellulaire Disparition des voies biliaires Transformation des cellules géantes
Fibrose interstitielle	Fibrose interstitielle	Fibrose interstitielle

TABLEAU 1-IV. Manifestations du rejet chronique dans divers organes.

Tiré de Häyry *et al.* (1995).

Le rejet chronique résulte d'une détérioration progressive des fonctions et de la structure de l'organe transplanté. La présentation clinique du rejet chronique du rein est caractéristique : en absence de cause spécifique, le niveau plasmatique de créatinine augmente progressivement, une protéinurie s'installe et une hausse inexorable de la pression artérielle diastolique est objectivée (Häyry *et al.* 1993-a).

Devant la confusion régnant quant à la définition clinique du rejet chronique, la communauté scientifique, au moment de la 4^e conférence Alexis Carrel (Suède, 1992), a vu la nécessité d'établir des critères diagnostiques exacts et spécifiques. La définition alors formulée est largement acceptée dans la littérature. Cette définition tient compte à la fois des aspects cliniques et histologiques (Paul *et al*, 1993) :

1. Trois mois doivent s'être écoulés depuis la transplantation.
2. Les taux sériques de créatinine doivent être croissants.
3. La biopsie montre les lésions typiques du rejet chronique.
4. Il n'y a pas d'évidence clinique ou histologique d'autres causes pouvant expliquer la détérioration du greffon.

DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE

Les critères histologiques peuvent être répartis selon les principaux compartiments du rein (vasculaire, glomérulaire, tubulaire et interstitiel). La classification histologique du rejet chronique la plus largement utilisée est la «*Banff Working Classification of renal allograft pathology*» (Racusen *et al.*, 1999) (voir section 5.2). Elle propose six critères :

1. Fibrose interstitielle.
2. Atrophie tubulaire.
3. Glomérulopathie allogreffe.
4. Hypertrophie de la matrice mésangiale.
5. Hypertrophie intinale fibreuse.
6. Hyalinose nodulaire artériolaire.

Une hypertrophie complète du rein est habituellement présente et s'explique par l'adaptation que tente l'organe pour contrebalancer sa défaillance. À plus ou moins brève échéance, l'organe finit par s'atrophier, rétrécir et devenir fibrotique. Au microscope optique, les glomérules montrent plusieurs anomalies tels qu'un dépôt matriciel au niveau du mésangium et une duplication de la membrane basale glomérulaire (Olsen, 1992). Ce dernier critère est particulièrement spécifique au rejet

chronique. Dans un contexte ischémique, la duplication est associée avec un rétrécissement et une rétractation de la membrane basale.

Les lésions du système vasculaire artériel se manifestent par l'athérosclérose allogreffe. Cette vasculopathie résulte d'une hypertrophie intimale attribuable à la migration des cellules musculaires lisses et au dépôt massif de matrice extracellulaire dans la paroi du vaisseau (Paul, 1995. Häyry *et al*, 1996). L'épaississement intimal peut être tel qu'il oblitère suffisamment la lumière pour causer des lésions ischémiques. Cette entité rappelle l'athérosclérose artérielle retrouvée dans les maladies oblitérantes du système vasculaire coronarien (tableau 1-V).

Classique	Allogreffe
Foyer proximal et focal	Atteinte généralisée
Lésion excentrique	Lésion concentrique
Dépôt lipidique	Dépôt lipidique
Calcification fréquente	Calcification rare
LEI détruite	LEI intacte

TABLEAU 1-V. Comparaison entre l'athérosclérose classique et la vasculopathie allogreffe. (LEI : lamina élastique interne). Tiré de Häyry *et al*. (1996).

Les lésions histologiques retrouvées lors du rejet chronique sont caractéristiques, mais non-pathognomoniques. Aussi, ces lésions peuvent se manifester avant que le rejet chronique ne soit cliniquement apparent (Foster et Dennis, 1992). Au diagnostic différentiel, le rejet chronique doit être distingué de la sténose de l'artère rénale, du lymphocèle et de la sténose de l'uretère à sa jonction avec la vessie. Des photographies montrant les lésions histologiques du rejet chronique sont disponibles au chapitre II.

PHYSIOPATHOLOGIE DU REJET CHRONIQUE

Le rejet chronique, répétons-le, est la manifestation non-spécifique d'une réponse à des insultes, nonobstant la nature immune ou mécanique de ces dernières. L'identification des principaux facteurs de risque ainsi qu'une étude histologique détaillée auront permis l'élaboration des hypothèses physiopathologiques du rejet chronique. Si l'on sait que le rejet chronique est davantage qu'un rejet aigu qui persévère, on ignore cependant quelle est la contribution exacte de ce dernier. Plusieurs explications ont été avancées, notamment l'idée d'un assaut immunitaire continu et à bas bruits doublé d'épisodes de rejet aigu violent, mais très limités dans le temps. Il semble ici que la chronicité oppose l'intensité.

Vision globale du phénomène

Le schéma contemporain des événements physiopathologiques du rejet chronique pourrait s'apparenter à celui proposé par Beckingham *et al.* (1995). Parce que l'endothélium de l'organe transplanté est une zone extrêmement antigénique, il est la cible d'attaques soutenues de la part du système immunitaire. En réponse à ces agressions, l'intima artériolaire finit par s'hypertrophier. À long terme, cette réponse cicatricielle culmine vers une occlusion progressive du système artériel, privant en oxygène les structures en aval. L'aggravation des dommages ischémiques entraîne une irrémédiable décroissance de la masse néphronique. L'hyperfiltration enclenche une diminution de la fonction de filtration du rein; le rejet chronique s'imisce lentement (figure 1-5).

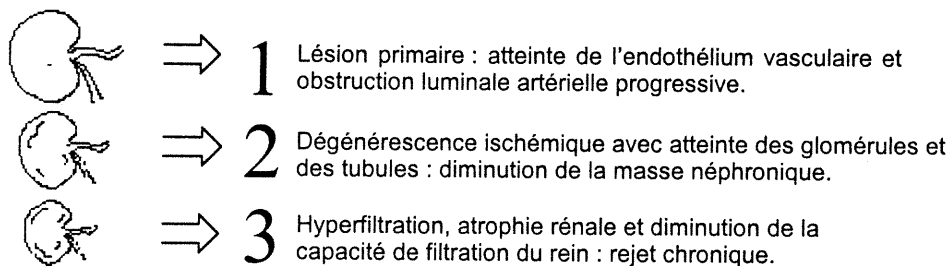


FIGURE 1-5. Séquence des événements physiopathologiques du rejet chronique.

Atteinte rénale ; glomérule, tubule et interstice.

Il existe une glomérulopathie spécifique à la transplantation (Ward et Glassock, 1992). Dans ce contexte, la maladie glomérulaire peut survenir suite à :

1. Récurrence de la maladie originale qui a conduit l'individu à être greffé.
2. Glomérulonéphrite *de novo* sans lien aucun avec la maladie originale.
3. Glomérulonéphrite présente chez le donneur, inconnue au moment de la transplantation (ex. : infection au CMV).
4. Rejet immunitaire du transplant.

Comme il existe une glomérulopathie spécifique au rejet chronique, il est pertinent de croire que les attaques immunes y contribuent en permanence. Les anticorps sont particulièrement impliqués dans la destruction glomérulaire. La microscopie par immunofluorescence permet en effet d'objectiver des dépôts de IgM, C1 et C3 sous l'endothélium des glomérules. Parmi les facteurs non-immuns, la pression artérielle diastolique élevée (et incidemment la pression capillaire glomérulaire) ainsi qu'une diète riche en protéines contribuent à la progression des lésions (Paul, 1995).

La fibrose interstitielle est une autre caractéristique du rejet chronique. On y observe un dépôt de matrice extracellulaire en abondance. Les macrophages et les lymphocytes T composent l'essentiel de l'infiltration cellulaire. Ceci est en accord avec l'hypothèse qui veut que le système cellulaire soit au cœur des mécanismes immunitaires lors du rejet chronique (Paul, 1995). Il est généralement difficile de préciser à quel facteur est redevable la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire observée : ischémie, néphrotoxicité de la cyclosporine ou hypertension.

La prochaine section se consacre exclusivement à la physiopathologie de la maladie vasculaire allogreffe. Actuellement, la majorité des efforts de recherche en rejet chronique est dirigée vers la compréhension et la prévention de ce type de lésions.

1.5 VASCULOPATHIE ALLOGREFFE

LES AGRESSIONS DE ROSS ET LA RÉPONSE DE HÄYRY

Les agressions de Ross.

L'occlusion vasculaire progressive est sans contredit le plus important de tous les éléments contributifs à la genèse du rejet chronique. Il existe à ce jour une littérature abondante sur ce phénomène. Les bases de cette entité pathologique reposent sur les travaux de Russel Ross, père de l'athérosclérose. Ross explique la formation de la plaque athéromateuse à l'aide de son hypothèse «*response to injury*» qui stipule que l'athérosclérose est la manifestation finale d'un vaisseau sanguin réagissant à des attaques multiples. Cette vision du phénomène s'applique admirablement à la vasculopathie retrouvée lors du rejet d'organes solides. En fait, la ressemblance entre les lésions vasculaires du rejet chronique et celles de l'athérosclérose dyslipidémique suggère que ces deux affections naissent de mécanismes similaires.

La réponse de Häyry.

L'athérosclérose allogreffe survient dans tout organe transplanté, le foie aussi bien que le rein ou le cœur (Demetris *et al.*, 1989). Les principales manifestations vasculaires du rejet chronique, à savoir l'infiltration cellulaire de la média (monocytes, fibroblastes et CML) et l'accumulation de matrice extracellulaire témoignent de la complexité du phénomène.

Le remodelage pariétal du compartiment vasculaire d'un organe transplanté est au cœur de la genèse du rejet chronique. Partant de ce principe, Häyry *et al.*, a eu l'originalité de reprendre l'hypothèse de Ross en y appliquant les particularités propres à l'athérosclérose allogreffe du rejet chronique (Häyry *et al.*, 1995). En effet, si l'hypothèse de Ross intègre convenablement les facteurs qui engendrent les lésions initiales du rejet

chronique, elle ne fournit en revanche que très peu d'explications sur la réponse de la paroi vasculaire à ces attaques (figure 1-6).

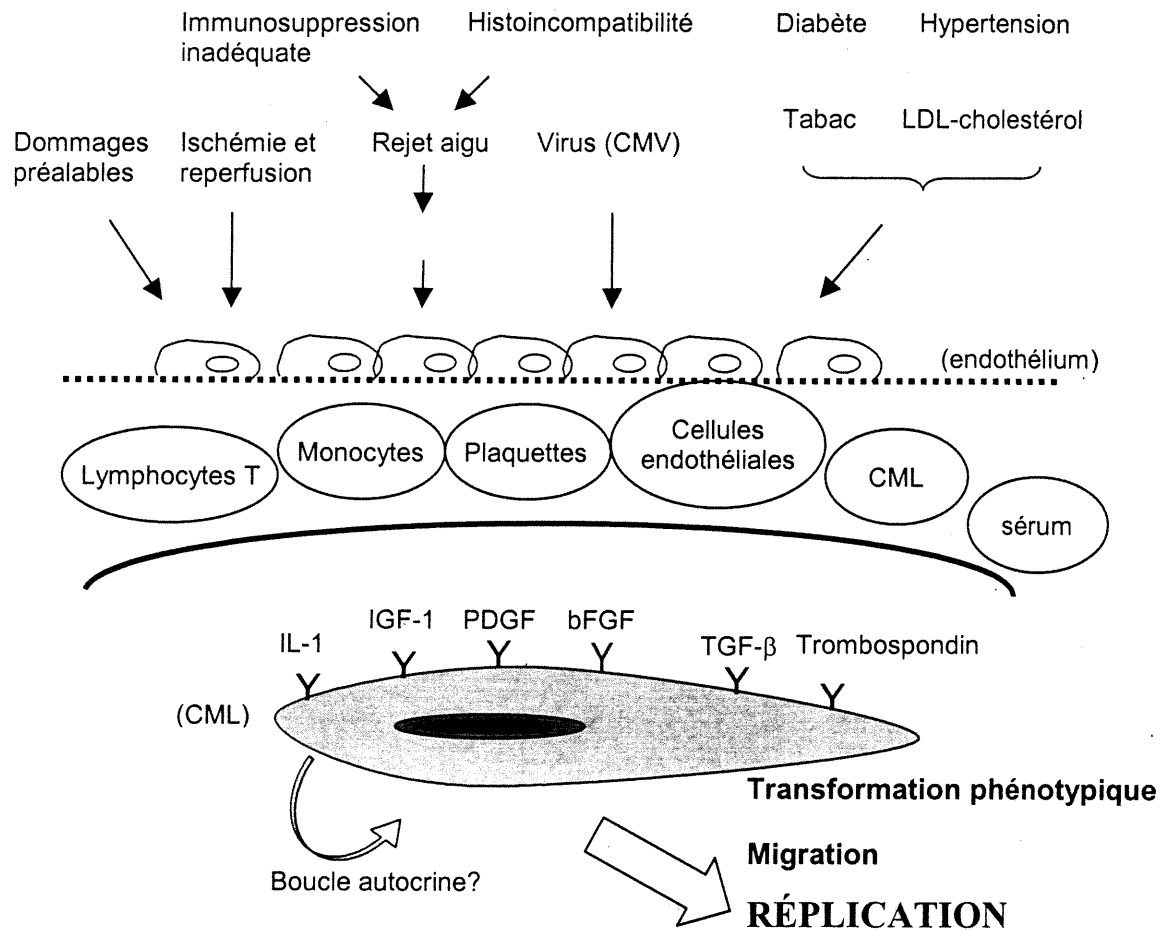


FIGURE 1-6. Hypothèse de Ross appliquée à l'athérosclérose du rejet chronique.

Les agressions propres à l'allogreffe induisent l'accumulation de leucocytes et de plaquettes dans la paroi du vaisseau. Les cellules endothéliales répondent à ces agressions par une sécrétion soutenue de multiples facteurs de croissance. Le contexte inflammatoire généré induit la transformation des CML vers un phénotype sécrétoire et leur réplication subséquente. Tiré de Häyry *et al.* (1995).

Vraisemblablement, la lésion initiale provient des attaques immunes dirigées contre l'endothélium vasculaire. Il est connu depuis un certain temps que l'endothélium vasculaire est très antigénique (Paul *et al.*, 1985). Il a longtemps été présumé que des épisodes itératifs de rejet aigu explosif suffisaient en eux-mêmes pour supporter le développement de la vasculopathie allogreffe. Durant ces épisodes, la destruction endothéliale permettrait aux thrombi plaquettaires d'adhérer à la paroi vasculaire et d'y relâcher en masse leurs facteurs de croissance. La subséquente exposition des couches sous-endothéliales aux protéines plasmatiques induirait la production locale d'élastases avec pour conséquence néfaste un remodelage pathologique des parois artérielles (Paul, 1995).

Par opposition à l'importance qu'accorde Paul au rejet aigu, le modèle proposé par Häyry favorise plutôt le concept de «dommages persistants à bas bruits». En transplantant des segments d'aorte entre des lignées de rats fortement histoincompatibles, l'équipe de Häyry est parvenue à développer un modèle animal capable de reproduire des lésions similaires à celles retrouvées lors de la vasculopathie allogreffe du rejet chronique chez l'homme⁵. En caractérisant l'évolution histologique des lésions de leur modèle, ils en sont venus à élaborer une hypothèse de travail qui stipule que :

«...Immune response, characterized by perivascular inflammation, induces persistent low-grade damage of vascular endothelium, which in turn responds to injury by secreting growth factors to repair the damage. Additional damage to the graft endothelium, such as ex vivo ischemia and reperfusion injury, acute episodes of rejection, infections (particularly cytomegalovirus [CMV]), and possibly lipid abnormalities in the recipient, are additive to the injury. As a consequence vascular SMC are induced to replicate in the vascular wall and they migrate from the media to the intima... » (Häyry et al., 1995).

Ainsi, les événements physiopathologiques aboutissant à l'athérosclérose allogreffe pourraient ressembler à la séquence suivante (voir aussi figure 1-7):

- 1 Réponse alloimmune, migration des cellules lymphoïdes, production de cytokines (IL-2, IFN- γ) et activation lymphocytaire (T et B).
- 2 Médiateurs lipidiques (eicosanoïdes et facteur d'activation plaquettaire [PAF]), contexte inflammatoire et état d'agression permanent de l'endothélium vasculaire.
- 3 Réponse et défense de l'endothélium vasculaire, sécrétion de facteurs de croissance peptidiques (PDGF-B, TGF- β).
- 4 Transformation phénotypique des CML, réplication et migration vers le néo-intima.

HYPOTHÈSES ALTERNATIVES

D'autres hypothèses que celle de Ross/Häyry ont été proposées. Par exemple, la théorie immunolymphatique du rejet chronique avance qu'une grande part du remodelage vasculaire serait attribuable à des ruptures focales du système de drainage lymphatique de l'organe transplanté. Ces ruptures, entretenues par des attaques immunes répétées, engendreraient un flux liquidien anormal à l'intérieur de l'organe. La stagnation lymphatique ainsi générée favoriserait l'induction d'un métabolisme anaérobique responsable de l'accumulation de lactate et de matrice extracellulaire dans la paroi du vaisseau (Demetris *et al.*, 1997). Il en résulterait un oedème de la paroi, une dégénérescence de la média et une fibrose de l'adventice.

Par opposition au rejet aigu, l'appellation «rejet chronique» est trompeuse. Le terme «rejet» évoque la notion d'incompatibilité immunologique. Il est important de garder à l'esprit que cette incompatibilité n'est qu'un facteur parmi tant d'autres. Aussi, le terme «d'usure chronique» du greffon semble plus approprié. Il apparaît évident que l'avenir de l'immunopharmacologie repose sur le développement de molécules capables d'inhiber simultanément la prolifération des lymphocytes et celles des cellules musculaires lisses. Beaucoup d'espairs sont fondés sur le mycophénolate mofétil et la rapamycine. Une nouvelle classe de médicaments, celle des agents anti-rejet chronique, est sur le point de voir le jour.

⁵ Concept revu en détail dans la section 1-8 ; Prévention pharmacologique du rejet chronique.

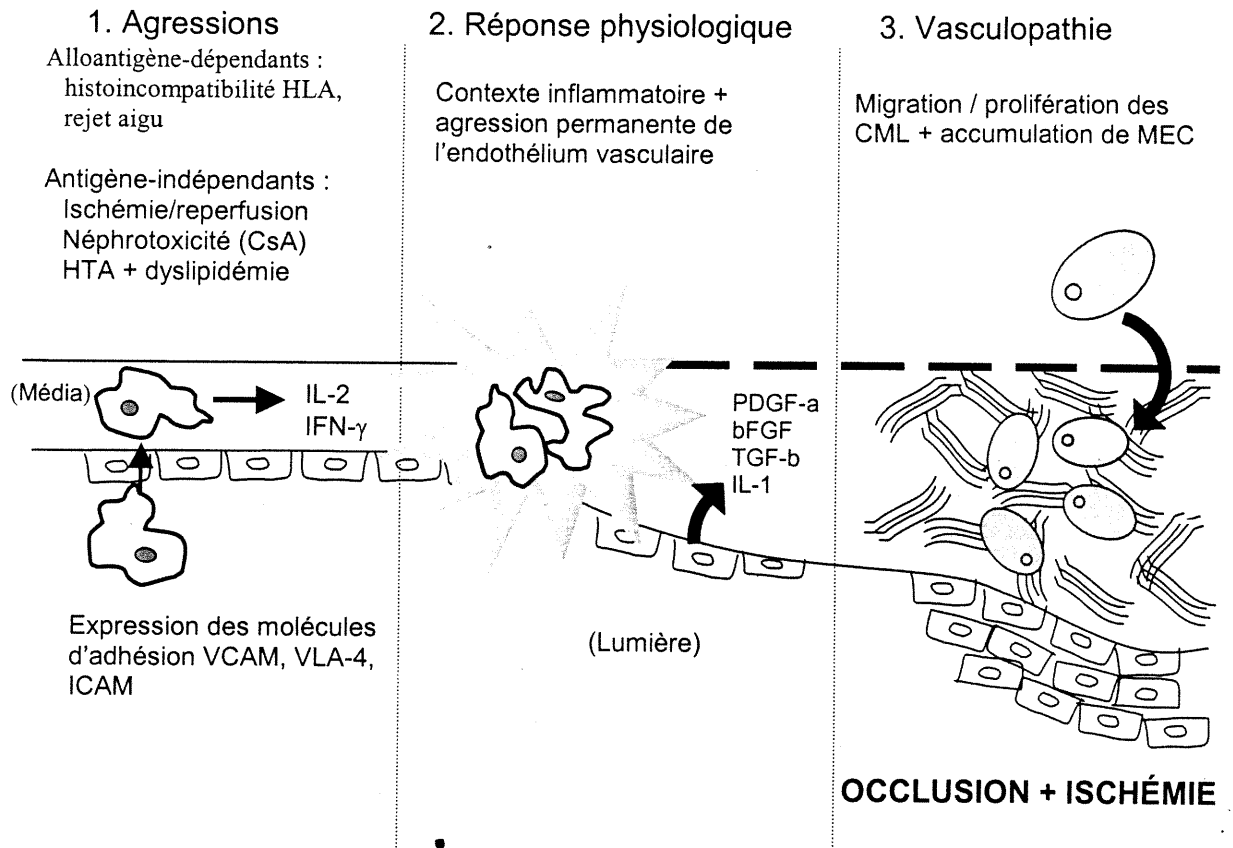


FIGURE 1-7. Résumé des événements survenant lors de la vasculopathie allogreffe associée au rejet chronique. Étape 1 : les diverses agressions dirigées contre l'endothélium vasculaire induisent l'expression des molécules d'adhésion cellulaire qui permettent la diapédèse massive de cellules inflammatoires vers l'intima. Étape 2 : les cytokines et les médiateurs lipidiques sécrétés par les leucocytes du néointima induisent un contexte inflammatoire *in situ*. L'inflammation irrite les cellules endothéliales qui se défendent en sécrétant des facteurs de croissance responsables de recruter les CML. Étape 3 : la persistance du contexte inflammatoire entretient la prolifération des CML et l'accumulation démesurée de MEC dans l'intima. À long terme, cet état finit par causer une occlusion vasculaire progressive et une subséquente ischémie des structures en aval. (Abréviations. CML : cellule musculaire lisse, CsA : cyclosporine, FGF : *fibroblast growth factor*, HLA : *human leukocyte antigen*, HTA : haute tension artérielle, ICAM : *intercellular adhesion molecule*, IFN : interféron, IL : interleukine, LEI : lamina élastique interne, MEC : matrice extracellulaire, PDGF : *platelet derived growth factor*, TGF : *transforming growth factor*, VLA : *very late activation antigen*. (Illustration originale).

1.6 MYCOPHÉNOLATE MOFÉTIL

L'acide mycophénolique (MPA) fut isolé pour la première fois il y a plus de cent ans à partir du champignon *Penicillin glaucum*. Au départ, la molécule a été étudiée pour ses propriétés antibactériennes, antivirales et antitumorales (Suzuki *et al.*, 1969). Rapidement, on constate un effet secondaire indésirable chez les sujets traités avec le MPA : ils sont incapables de se défendre contre des infections opportunistes!

Le mycophénolate mofétil (MMF, Cellcept®) est un précurseur morpholinyl-éthyl-ester de l'acide mycophénolique (MPA) développé pour en accroître la biodisponibilité orale. Le MPA, véritable métabolite actif, est obtenu après une hydrolisation hépatique du MMF lors de l'absorption entérique (figure 1-8). La molécule inhibe la prolifération des lymphocytes B et T *via* une inhibition réversible et non-compétitive de l'*inosine-monophosphate déshydrogénase* (IMPDH), enzyme clé dans la synthèse de *ново* des nucléotides purines guanines (Sievers *et al*, 1997).

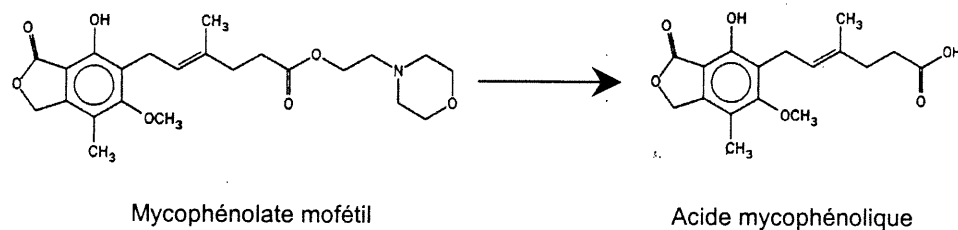


FIGURE 1-8. Mycophénolate mofétil. Le MMF est le précurseur de l'acide mycophénolique, véritable métabolite actif. Tiré de Lipsky *et al.* (1996).

MÉCANISME D'ACTION PRINCIPAL

Lors d'une allogreffe, les lymphocytes du receveur s'activent et prolifèrent dans le but de constituer l'effectif cellulaire nécessaire au rejet de l'organe. L'efficacité du MPA à prévenir cette réponse du système immunitaire tient à sa capacité de bloquer la

prolifération lymphocytaire. Il y parvient en inhibant la synthèse des nucléotides purines (guanine, adénine) constituant l'ADN cellulaire. Sans la production de bases nucléotides, la réplication de l'ADN devient impossible et la cellule ne peut plus proliférer.

À l'exception des lymphocytes, toute cellule mammifère dispose de deux voies métaboliques pour synthétiser ses purines: la voie *de novo* et la voie de récupération (Allison et Eugui, 1993) (figure 1-9). La voie *de novo* (voie de synthèse principale) transforme le précurseur ribose 5-phosphate en l'inosine-monophosphate (IMP) après maintes étapes métaboliques. L'IMP sera subséquentement transformée en guanosine ou en adénosine, selon les besoins du noyau. L'IMP-déshydrogénase (IMPDH) est l'enzyme clé la voie de cette transformation. Elle est essentielle à la production des bases guanosines ADN et ARN. La voie de récupération, secondaire en importance, complète la synthèse des purines en réutilisant les précurseurs négligés par la voie *de novo*. Le lymphocyte ne dispose pas de cette seconde voie (Allison *et al.*, 1977, Natsumeda *et al.*, 1993). Cette vulnérabilité des lymphocytes constitue une cible pharmacologique idéale.

C'est grâce aux travaux de Giblett *et al.* (1972) sur des enfants déficients en ADA (*Adenosine Deaminase*), une forme d'immunodéficience combinée sévère (*SCID*), qu'on a pu démontrer que la synthèse *de novo* de purines est essentielle à la prolifération des lymphocytes. On sait aujourd'hui que l'acide mycophénolique bloque la voie *de novo* des purines via l'inhibition de L'IMPDH (figure 1-9). Le MPA est cinq fois plus puissant pour inhiber l'isoforme IMPDH-II retrouvée dans le lymphocytes activés que l'isoforme des lymphocytes stagnants (Lipski, 1996). Au niveau moléculaire, Le MPA inhibe IMPDH II en s'y liant au site nicotinamide pour NAD^+ . Cette liaison empêche la conversion séquentielle de IMP en XMP puis en guanosine (Solliger *et al.*, 1991). Privé de guanosine, le lymphocyte ne peut plus synthétiser d'ADN et il est condamné à stagner en phase S du cycle de prolifération cellulaire.

Le MMF est spécifique aux lymphocytes et préserve la fonction des autres cellules du système immunitaires qui disposent de deux voies métaboliques pour synthétiser leur purine. Il en résulte une immunosuppression sélective des effecteurs impliqués dans le rejet d'organe, laissant intactes les autres sphères de l'immunité.

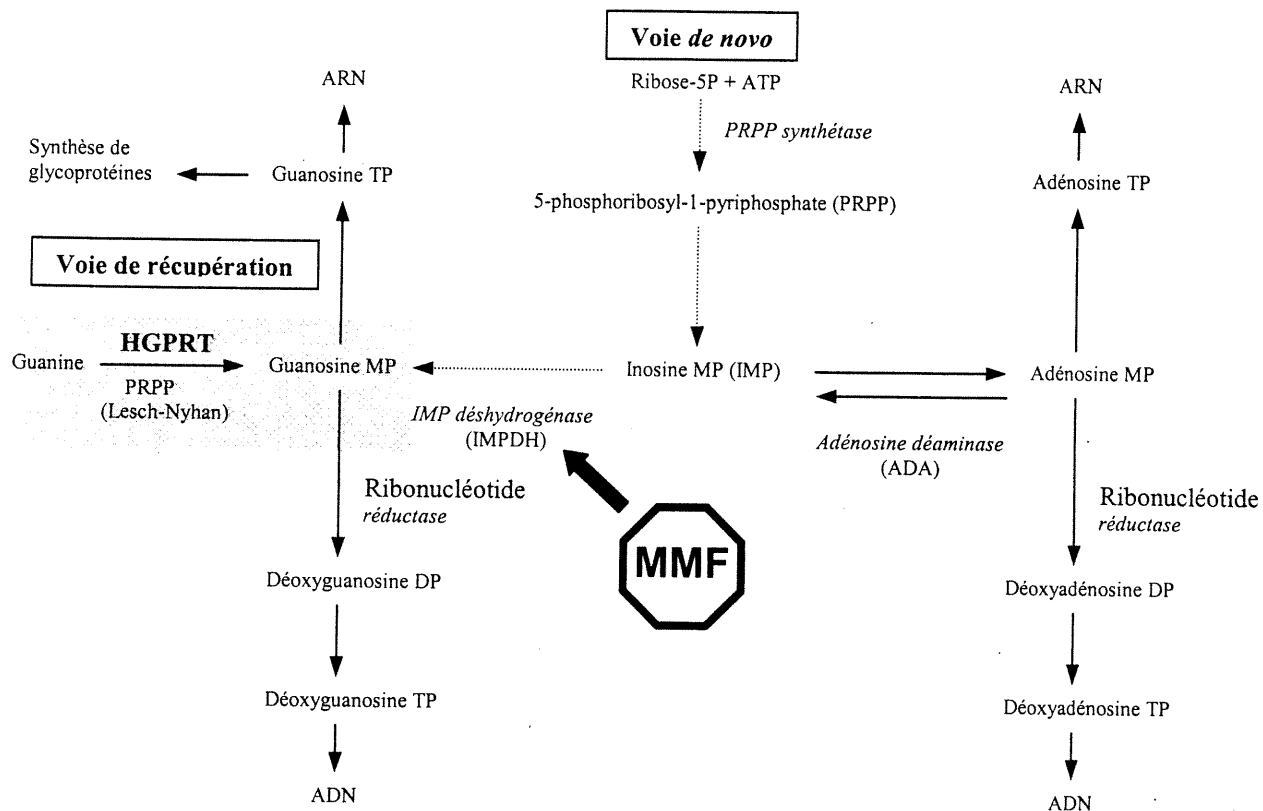


FIGURE 1-9. Voies de synthèse des purines. La voie de novo (flèches pointillées) est première en importance dans la synthèse du GTP. La voie de récupération (trame grise) est absente chez le lymphocyte en prolifération. Le MMF inhibe l'IMPDH-II.

Tiré de Allison *et al.* (1993).

MMF *in vitro*

Propriétés *in vitro* de l'acide mycophénolique sur les lignées cellulaires humaines.

Inhibition de la prolifération induite des lymphocytes T et B.

Inhibition de la production d'anticorps par le lymphocyte B.

Diminution des réserves intracellulaires de guanosine triphosphate (GTP) et de déoxyGTP (dGTP).

Inhibition de l'incorporation du mannose et du fucose aux glycoprotéines cellulaires (incluant les molécules d'adhésion).

Induction de la différenciation de plusieurs lignées cellulaires tumorales.

Aucun effet notable sur l'expression des récepteurs de l'interleukine-2.

Aucun effet notable sur la production d'IL-1 ou IL-2 par les monocytes activés.

TABLEAU 1-VI. Propriétés *in vitro* de l'acide mycophénolique sur les lignées cellulaires humaines. Données compilées à partir de Fulton et Markham (1996).

Les premières études immunobiologiques *in vitro* ont permis de jeter un nouveau regard sur les mécanismes immunosuppresseurs de l'acide mycophénolique. L'inhibition par MPA de la production d'anticorps des lymphocytes B humains activés est en continuité logique avec le mécanisme d'action principal proposé (Eugui *et al.*, 1991).

Pour une raison encore inconnue, la déplétion nucléaire des GTP induite par MPA inhibe le transfert de sucres complexes (mannose et fucose) lors de l'assemblage des glycoprotéines membranaires. Plusieurs de ces protéines sont des molécules d'adhésion cellulaire exprimées à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales. Elles assistent dans la margination, le roulement et la diapédèse des leucocytes au travers de la paroi vasculaire. Elles sont essentielles dans le recrutement de cellules inflammatoires circulantes vers un site inflammatoire.

L'ajout d'acide mycophénolique nuit à la synthèse lymphocytaire de molécules d'adhésion cellulaire et résulte en une production de protéines imparfaites et inaptes. La

synthèse de VLA-4 (exprimé par les leucocytes), le ligand naturel de VCAM-1 (exprimé par les cellules endothéliales) est inhibée par MPA (Allison *et al.*, 1993). Il est postulé que cet effet diminue considérablement le nombre de lymphocytes capables de migrer vers le parenchyme d'un rein transplanté.

Contrairement à la cyclosporine et au tacrolimus, le MPA n'inhibe pas la production d'IL-2, d'IL-2R et d'IL-1 β , IL-6, IL-8 ou TNF- α (Lempster *et al.*, 1992). De plus, des études complémentaires confirment l'absence d'un effet inhibiteur du MPA sur les neutrophiles humains (Fulton et Markham, 1996).

Le MPA est capable d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses, des fibroblastes et des cellules endothéliales. Cette propriété nourrit l'espoir d'une efficacité éventuelle du MPA dans la prévention du rejet chronique.

PHARMACOCINÉTIQUE

Propriétés pharmacocinétiques de l'acide mycophénolique

Concentration plasmatique maximale (C _{max}) post absorption p.o. ³	1 heure
2 ^e pic plasmatique après absorption p.o. (cycle entéro-hépatique) ³ .	8-12 heures
Aire sous la courbe (AUC) (PO \cong IV). ⁴	101 \pm 23.4 μ g-h/ml
Coefficient de variation intra-individuel de l'AUC. ⁴	10 %
Coefficient de variation inter-individuel de l'AUC. ⁴	25 %
Biodisponibilité p.o. (MMF). ³	94 %
Volume de distribution. ²	4 L/kg
Fraction libre sérique. ³	1.25 %
Fraction du MPA liée aux protéines sériques (albumine). ³	98 %
Fraction du MPAG liée aux protéines sériques (albumine). ³	82 %
Fraction du MPA intracellulaire du sang. ⁴	0.01%

Fraction du MPA intraplasmatique du sang. ⁴	99.9 %
Clairance rénale du MPA (filtration passive). ³	3.6 ml/min
Clairance rénale du MPAG (sécrétion tubulaire active). ³	21.6 ml/min
Fraction du MPA éliminée dans l'urine. ¹	93 %
Fraction du MPA éliminée dans les selles. ¹	7 %
Demi-vie (T _{1/2}) d'élimination. ^{3,4}	17 heures

TABLEAU 1-VII. Propriétés pharmacocinétiques de l'acide mycophénolique.

Données compilées à partir de 1. Fulton et Markham (1996), 2. Lipski (1996), 3. Sievers *et al.* (1997) et 4. Bullingham *et al.* (1998). (Abréviations. AUC : *area under the curve*, MPAG : MPA-glucuronide, p.o.: *per os*.)

Après ingestion orale, le MMF est entièrement transformé en MPA par les estérases plasmatiques qui précèdent le premier passage hépatique. La concentration sérique maximale est atteinte après une heure. Les bactéries du système digestif ont la capacité de dé-glucuronider le MPA. Elles sont responsables du second pic de concentration sérique du MPA observé entre 8 et 12 heures après la première prise (cycle entéro-hépatique) (Bullingham *et al.*, 1998). Chez les patients récemment transplantés (moins de trois mois), le MMF a une moins bonne biodisponibilité, possiblement à cause d'une dé-estérification moins efficace ou d'une absorption intestinale diminuée (patients urémiques) (Solliger *et al.*, 1992). Pour cette raison, il convient de surveiller en post-transplantation, les taux sériques immédiats de MPA afin d'éviter les épisodes de rejet aigu.

Telle que suggérée par les données du tableau 1-VII, l'absorption systémique de MMF est excellente et très rapide chez les individus sains. La presque totalité du MPA est lié à un radical glucuronide par le foie. Le MPAG (MPA glucuronide) ainsi formé peut facilement être éliminé par le rein grâce à une sécrétion tubulaire active. Chez l'insuffisant rénal, la concentration sérique de MPA et de MPAG varie inversement au taux de filtration. Aussi, les sujets ayant une insuffisance hépatique sévère ont des

niveaux de MPA inférieurs à ceux ayant une insuffisance hépatique modérée (Parker *et al.*, 1998). Les métabolites du MMF n'ont aucune activité immunosuppressive connue.

Le MPA est lié à l'albumine sérique à 98 %. Ce pourcentage n'est pas modifié par le tacrolimus, la cyclosporine et les corticostéroïdes (Bullingham *et al.*, 1998). Par ailleurs, la fraction libre du MPA n'est pas affectée par l'utilisation de warfarin, de phénytoïne ou de digoxine. Seuls les antiacides à base d'hydroxyde d'aluminium ou de magnésium (ex.: Maalox®) nuisent à la cinétique du MMF en diminuant significativement les concentrations sériques. Des études *in vitro* ont montré que le MMF est déplacé de l'albumine par de hautes doses (> 250 mg/L) de salicylate et de furosémide (Lasix®) (Lipski, 1996). Les taux plasmatiques du médicament varient peu après une hémodialyse.

Chez le patient greffé, l'élimination de MPA et de MPAG varie en fonction du temps écoulé depuis la greffe. Tel que cité, la biodisponibilité du MMF diminue chez le patient récemment transplanté. Chez les patients possédant un greffon stable et fonctionnel, les paramètres pharmacocinétiques du MMF se régularisent rapidement pour devenir comparables à ceux d'un individu en bonne santé.

EFFETS SECONDAIRES

Si ce n'est que depuis 1995 que la «*Food and Drug Administration*» américaine a entériné l'utilisation du MMF pour la transplantation rénale, l'acide mycophénolique est utilisée depuis les années 1970 par les dermatologues pour le traitement du psoriasis. Aussi, ont-ils développé une vaste expérience dans l'administration et la surveillance des effets secondaires attribuables au MPA (Kitchin *et al.*, 1997). En transplantation, les informations les plus complètes proviennent des études multicentriques du *European Mycophenolate Mofetil Study Group*, du *US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group* et du *Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group*.

Les effets secondaires sont plus fréquents pour le système gastro-intestinal, hématologique et immunitaire :

- Gastro-intestinal. La très grande majorité des inconforts reliés au MMF sont gastro-intestinaux. L'effet secondaire le plus fréquent est la diarrhée (jusqu'à 35% des patients sous une dose de 3g/die). La nausée, les vomissements, l'anorexie, les crampes abdominales ainsi que la rectorragie sont fréquemment rapportés. Ces effets sont dose-dépendants.
- Hématologique. L'anémie, la leucopénie, la neutropénie et la thrombopénie sont rapportées à des taux similaires à ceux retrouvés avec l'utilisation de l'azathioprine. Ces effets sont dose-dépendants et rapidement réversibles. L'arrêt du MMF en raison de ces effets secondaires est exceptionnel.
- Immunologique. Par rapport au contrôle placebo, les infections opportunistes sont légèrement plus élevées lors du traitement au MMF (jusqu'à 40% selon Sollinger, 1995-b), principalement les infections invasives au cytomégalovirus (CMV) et à l'*herpes simplex*.
- Neurologique. Occasionnels : faiblesse, céphalée, tinnitus et insomnie. Ces effets ont tendance à s'amoinrir avec le prolongement de la thérapie.
- Néoplasique. Les immunosuppresseurs en général sont associés avec une fréquence plus élevée de lymphomes et de cancers de la peau. Il semble que le MMF augmente également l'incidence des syndromes lymphoprolifératifs.

Il demeure impossible de se prononcer sur la tératogénicité du MMF. Il est important de souligner que contrairement au tacrolimus, le MMF n'est pas néphrotoxique, hépatotoxique ou neurotoxique.

1.7 RAPAMYCINE

La rapamycine (sirolimus, Rapamune®) est un macrolide issu de la fermentation naturelle du *Streptomyces hygroscopicus*, un actinomycète isolé pour la première fois sur l'île «Rapa Nui» au début des années 70. La molécule a été développée à Montréal dans les laboratoires de Ayerst par Sehgal et son équipe (Vézina *et al.*, 1975, Sehgal *et al.*, 1975).

La rapamycine présente plusieurs similarités structurales avec le tacrolimus (FK506, Prograf®). Les deux molécules forment un complexe actif avec la molécule de liaison FKBP-12, mais leurs mécanismes d'action sont par la suite forts différents. Aussi, l'identification des voies de signalisation cellulaire inhibées par la rapamycine a grandement contribué à comprendre les mécanismes impliqués dans le rejet d'organes transplantés.

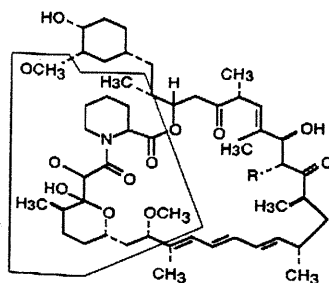


FIGURE 1-10. La rapamycine. L'encadré représente le site interagissant avec la protéine de liaison FKBP12. C'est à ce niveau que la rapamycine présente certaines similarités structurales avec le tacrolimus. Tiré de Kelly *et al.* (1997).

MÉCANISMES D'ACTION

L'activation du lymphocyte survient généralement en deux étapes. La première permet le passage du lymphocyte d'un état de quiescent (G_0) à un état pré-prolifératif (G_1). Cette étape est enclenchée lors du contact entre le lymphocyte et la cellule présentatrice d'antigène (APC). Cette rencontre permet la transduction simultanée de deux signaux : l'activation du récepteur lymphocytaire par l'antigène (complexe TcR/CD3-antigène-APC) et le co-signal B7-CD28. Ce double signal est essentiel à l'activation du lymphocyte et précipite l'activation transcriptionnelle des gènes précoces, incluant ceux des lymphokines. Rapidement, le lymphocyte sécrète des cytokines (IL-2, IL-4...) qui permettront une activation paracrine lymphocytaire. De cette façon, la cellule progresse dans son cycle de division cellulaire, passant de la phase G_1 vers la phase de synthèse S ($G_1 \rightarrow S$) (Figure 1-11).

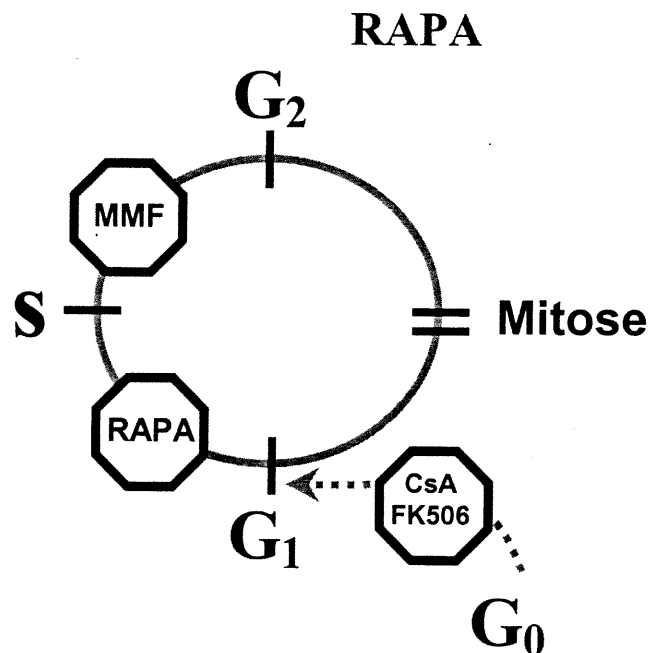


FIGURE 1-11. Sites d'action des immunosuppresseurs sur le cycle cellulaire.

(Illustration originale).

La cyclosporine et le tacrolimus agissent précisément sur la première phase d'activation du lymphocyte ($G_0 \rightarrow G_1$) en empêchant la transduction du signal produit par l'activation du TcR. En fait, CsA et FK506 inhibent la calcineurine, une protéine-

phosphatase calcium/calmoduline-dépendante essentielle à la transduction de ce message. Sans cette première phase activatrice, les diverses cytokines (dont IL-2) ne seront pas produites et l'activation secondaire du lymphocyte ne pourra survenir. L'action de CsA et de RAPA sur des phases distinctes du cycle de prolifération cellulaire permet une explication rationnelle de l'activité synergique des deux médicaments dans la prévention du rejet d'organe (Kahan, 1997, Stepkowski, 1997). Le même raisonnement prévaut pour la combinaison FK506 et RAPA (Vu *et al.*, 1997).

Une vision globale nous permettra de classer la CsA, le FK506 et la RAPA comme des inhibiteurs de l'activation lymphocytaire. L'azathioprine et le MMF seront quant à eux considérés comme des anti-métabolites.

Mécanismes d'action cellulaire.

Ajouté à un milieu contenant des lymphocytes en phases de prolifération, la RAPA mène à l'accumulation de cellules stagnantes, bloquées entre G₁ et S (Terada, 1994). La RAPA inhibe la réponse proliférative induite par IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, bFGF, SCF, PDGF, IGF-1 et CSF (Molnar-Kimber, 1996).

La rapamycine n'est pas spécifique à une lignée cellulaire particulière. La molécule agit aussi bien sur les lignées lymphoïdes que non-lymphoïdes. Il a été rapporté que la RAPA inhibe la prolifération des lymphocytes B, des mastocytes, des cellules lymphoïdes tumorales, des hépatocytes, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires (Dumont et Su, 1996).

Rapamycine : un récepteur intracellulaire et une molécule effectrice.

Tout comme le tacrolimus, la rapamycine se lie au récepteur intracellulaire FKBP-12 (Fruman *et al.*, 1995). Dans une cellule fonctionnelle, FKBP-12 catalyse la *cis-trans* isomérisation des liens peptidyles-prolyles peptidiques (PPIases). Ce point commun entre le tacrolimus et la rapamycine explique l'activité antagoniste des deux molécules *in vitro* lorsque la quantité de FKBP est limitée (Dumont *et al.*, 1990). Paradoxalement, il a été démontré *in vivo* que ces deux mêmes médicaments prolongent de façon synergique la survie d'organes allo-transplantés (Vu *et al.*, 1997).

Le complexe RAPA-FKBP est inactif en lui-même. En fait, la RAPA est constituée de deux domaines moléculaires. Le premier domaine lie la RAPA avec FKBP-12. Le second domaine est dit effecteur parce qu'il lie la RAPA à sa protéine effectrice mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*, FRAP, RAFT-1, SEP, RAPT-1). mTOR est une protéine de 2549 acides aminés (289 KDa) largement distribuée dans les tissus humains (Brown, 1994). La fonction biochimique exacte de mTOR demeure inconnue, mais il a été suggéré qu'elle pourrait être une protéine-lipide kinase apparentée à la famille PI kinase (Dumont et Su, 1996). mTOR active diverses cascades moléculaires essentielles à la prolifération cellulaire.

Un résumé pourrait être fait ainsi; la propriété immunosuppressive de la rapamycine tient de sa liaison avec un complexe trimoléculaire constitué d'une part de FKBP-12, son récepteur intracellulaire, et d'autre part de mTOR, sa molécule effectrice. C'est en bloquant l'action de mTOR que la RAPA perturbe les événements intracellulaires essentiels à la prolifération des lymphocytes.

Mécanismes d'action moléculaire.

La kinase P70^{S6k}

L'effet antiprolifération de la RAPA a donné naissance à des spéculations concernant son mode d'action sur l'interruption de signaux mitogéniques destinés au noyau. La première cible de la RAPA identifiée est la kinase p70^{S6k} (Chung *et al.*, 1992. Price *et al.*, 1992. Calvin *et al.*, 1992). La p70^{S6k} a deux substrats connus à ce jour : la protéine ribosomale S6, impliquée dans la synthèse protéique et le «*c-AMP-responsive element modulator*» (CREM τ), impliqué dans la transcription génique.

Normalement, l'activation de p70^{S6k} survient quelques minutes après un stimulus mitogénique (Kuo *et al.*, 1992). Le complexe RAPA-FKBP, par l'entremise de mTOR, empêche la phosphorylation activatrice de p70^{S6k} (Brown *et al.*, 1995). Le chaînon moléculaire entre RAPA et p70^{S6k} est plausible étant donné l'activité lipase/protéine kinase de mTOR. Sans une phosphorylation, p70^{S6k} ne peut plus soutenir son rôle activateur envers ses deux substrats, S6 et CREM τ .

La protéine ribosomale S6 est responsable d'ancrer les ARN-m/ARN-t lors de la synthèse protéique. $p70^{S6k}$ active ces sites par phosphorylation. Sans la phosphorylation, le ribosome est incapable de traduire les ARN-m en protéines. Il en résulte une chute drastique des réserves protéiques dans la phase G_1 du cycle cellulaire. Le second substrat connu de $p70^{S6k}$, $CREM\tau$, est un facteur de transcription de la famille CREB/AFT. $CREM\tau$ active la transcription de promoteurs géniques responsables de la prolifération cellulaire (Molnar-Kimber, 1996).

L'inhibition par la RAPA de la prolifération lymphocytaire n'est que partielle. Il est fort à parier que plusieurs voies alternatives peuvent suppléer à la phosphorylation de $p70^{S6k}$ et à la transduction des signaux mitogéniques transmis à la cellule (Abraham et Wiederrecht, 1996) (figure 1-12).

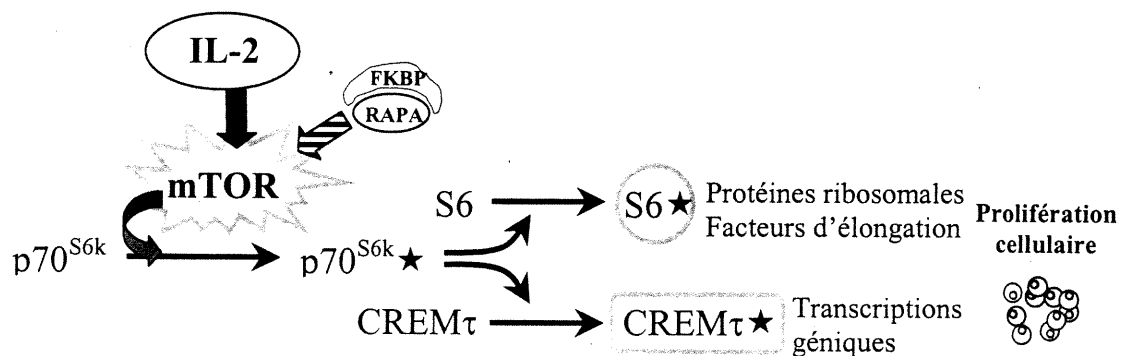


FIGURE 1-12. Mécanisme d'action de la rapamycine sur la kinase $p70^{S6k}$.

mTOR, qui est responsable de la phosphorylation de la kinase $p70^{S6k}$ est incapable d'agir en présence de la RAPA. L'étoile noire indique la phosphorylation. La flèche hachurée indique l'inhibition. $CREM$: «*c-AMP-responsive element modulator*», mTOR : «*mammalian target of rapamycin*», S6: protéine-ribosome S6.

Complexe cycline E-cdk2

Chaque segment du cycle de prolifération cellulaire (i.e. G_1 , S et G_2) est strictement régulé par l'activation/inactivation séquentielle de kinases sérine-thréonine (famille des *cyclin-dependent kinases* ou cdk). Ces kinases agissent comme un point de

contrôle qui empêche la progression plus avant du cycle si des conditions anormales sont retrouvées dans la cellule. IL-2 permet l'activation du complexe cycline E-cdk2 en précipitant l'élimination de l'inhibiteur $p27^{kip1}$.

Via mTOR, la RAPA empêche la dégradation de $p27^{kip1}$ induite par IL-2 (Nourse et al., 1994). Ainsi, $p27^{kip1}$ demeure anormalement élevé durant toute la phase G_1 et se lie à cdk2 pour l'inhiber : la cellule est incapable de progresser vers le phase S du cycle cellulaire. Ainsi, la RAPA empêche la cascade des événements qui surviennent habituellement après l'activation du complexe cycline E-cdk2 : la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), la dissociation de Rb d'avec le complexe E2F, l'augmentation de l'activité du facteur de transcription E2F et la synthèse de nouvelles cyclines et de cdk (Molnar-Kimber, 1996) (figure 1-13).

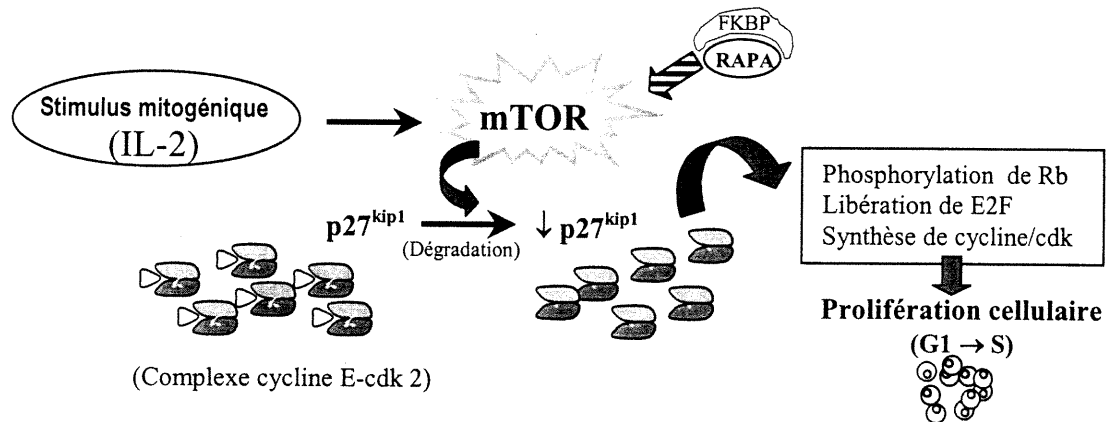


FIGURE 1-13. Mécanisme postulé de l'action de la rapamycine dans l'inhibition du complexe cycline E-cdk2. La RAPA inhibe mTOR qui est alors incapable de «transduire» l'ordre d'élimination de $p27^{kip1}$ donné par le stimulus mitogénique «IL-2». La flèche hachurée indique l'inhibition. Le 6 indique l'inhibition : le : indique l'activation du complexe. (Abréviations. cdk : «cyclin-dependent kinase», mTOR : «mammalian target of rapamycin», Rb : rétinoblastome). (Illustration originale).

Autres actions de RAPA.

En plus des p70^{S6k}, CREM τ et p27^{kip1}, de nouveaux mécanismes d'action moléculaires de la RAPA sont proposés. On a vu précédemment que la présentation d'un antigène au lymphocyte par la cellule présentatrice d'antigène (APC) doit nécessairement combiner un signal principal (*via* le TcR) à un co-signal (*via* l'interaction CD28-B7). De cette façon, un lymphocyte T auxiliaire sera convenablement activé. On se souviendra que les immunosuppresseurs CsA et tacrolimus inhibent le signal principal. Or, il est probable que la RAPA nuise à la «transduction» du co-signal de CD28. En temps normal, CD28 induit la production d'IL-2 *via* l'activation d'un facteur de transcription de la famille c-Rel (Lai et Tan, 1994). La manière dont RAPA inhibe ce système demeure le sujet de vives spéculations (figure 1-14).

La RAPA serait également capable d'empêcher la séparation du complexe PHAS-1/eIF-4^E. eIF-4^E est libéré lors de l'activation du lymphocyte par IL-2. Il joue le rôle d'un facteur d'initiation de la traduction de protéines qui seront nécessaires elles aussi à la progression du cycle cellulaire de G₁ vers S (Lin *et al.*, 1994).

Remarques et déductions

À la lumière des évidences moléculaires décrites dans cette section, il est pertinent de penser que la capacité de la rapamycine à inhiber la transduction de signaux mitogéniques est le fruit d'interférences avec les mécanismes modulant la synthèse des protéines nécessaires pour supporter la progression du cycle cellulaire. Nous retiendrons l'action de RAPA sur p70^{S6k}, CREM τ , cdk 2 et PHAS-1. À mesure que notre compréhension du système s'améliore, des liens entre les divers composants s'établissent. Dumont et Su (1996) s'interrogent sur une possible association entre la p70^{S6k} et le complexe cycline E-cdk2. Dans ce qu'ils appellent la «voie linéaire», ils postulent que mTOR affecte les niveaux de p27^{kip1} et de cdk (phase G₁) en modulant l'effet qu'a p70^{S6k} sur transcription et la synthèse protéique de certains gènes. Chronologiquement, cette affirmation est probante puisque l'inhibition de p70^{S6k} survient bien avant celle du complexe cycline E-cdk2. Voici un schéma intégrant l'ensemble des interactions entre la rapamycine et la machinerie responsable de la division cellulaire.

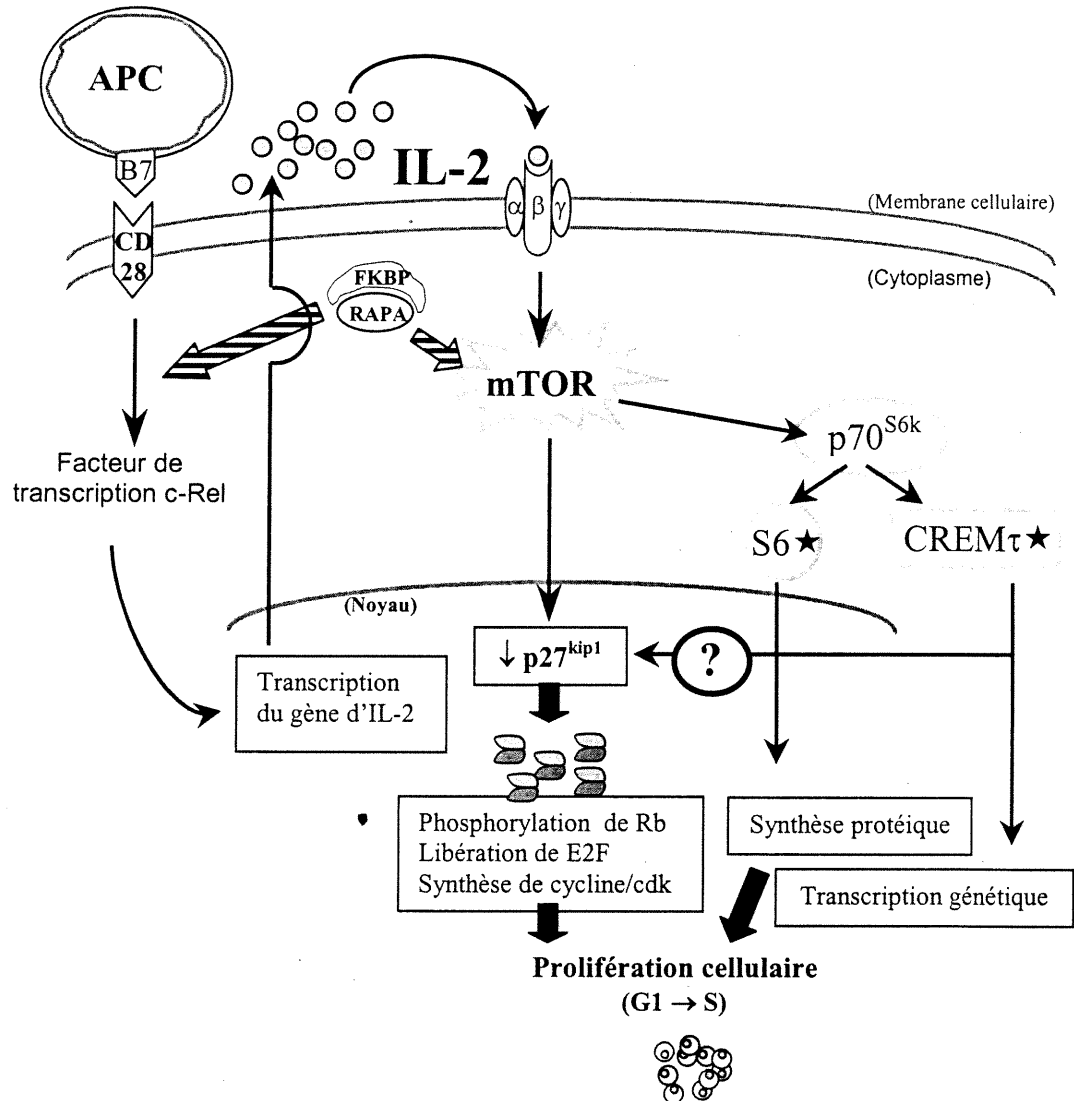


FIGURE 1-14. Vue d'ensemble des mécanismes d'action de la rapamycine.

La flèche marquée d'un point d'interrogation identifie le lien hypothétique entre p70^{S6k} et p27^{kip} (hypothèse linéaire). Les flèches hachurées illustrent l'action inhibitrice de la rapamycine sur les deux phases de l'activation lymphocytaire (co-signal de CD28 et stimulus mitogénique d'IL-2). (Illustration originale).

PHARMACOCINETIQUE

Propriétés pharmacocinétiques de la rapamycine

Concentration plasmatique maximale (Cmax) post absorption p.o. ¹	1.4 ± 1.2 heure
Coefficient de variation intraindividuel de l'AUC ⁵	26 %
Coefficient de variation interindividuel de l'AUC ⁵	52 %
Biodisponibilité p.o. ³	15 %
Volume de distribution ¹	12 ± 5 L/kg
Fraction sérique ¹	2,0 %
Fraction libre sérique ⁴	60 %
Fraction liée aux lipoprotéines sériques ⁴	40 %
Fraction intracellulaire du sang ²	96.5 ± 6.8 %
Fraction intraplasmatique du sang ²	3.1 ± 2.5 %
Clairance p.o. ⁴	127-240 ml/hr/Kg
Demi-vie (T _{1/2}) d'élimination ¹	62 ± 16 heures

TABLEAU 1-VIII. Propriétés pharmacocinétiques de la rapamycine. Données compilées à partir de 1. Zimmerman et Kahan. (1997), 2. Trepanier *et al.* (1998), 3. Yatscoff (1996), 4. Kelly *et al.* (1997), 5. Macdonald *et al.* (2000).

La faible biodisponibilité de la rapamycine après une ingestion orale peut s'expliquer par un métabolisme intestinal et hépatique important. De plus, un contre-transport de RAPA par la pompe p-glycoprotéine (p-GP) présente dans la paroi intestinale contribue à diminuer sa biodisponibilité (Macdonald *et al.*, 2000). L'élimination de RAPA par le foie explique une diminution de 30 % de la dose d'entretien chez les insuffisants hépatiques. Une diète riche en acide gras permet une meilleure absorption car la molécule est liposoluble.

Tout comme la cyclosporine, la rapamycine est métabolisée par l'isoenzyme cytochrome P450 3A4 du foie. Cependant, aucune modification de l'AUC concentration-temps n'est observée lors de l'administration simultanée des deux molécules (Zimmerman et Kahan, 1997). Cependant, l'administration conjointe de diltiazem ou de kétoconazole à la rapamycine augmente la concentration sérique de cette dernière (MacDonald *et al.*, 2000). Finalement, la molécule est transformée en au moins 10 métabolites différents pour lesquels une activité immunosuppressive négligeable a été rapportée (inférieure à 10 %) (Trepanier *et al.*, 1998).

Les principaux problèmes avec la rapamycine sont la grande variabilité intra- et inter-individuelle de sa biodisponibilité ainsi que sa très longue demie-vie. Ceci supporte l'utilisation de dosages sériques chez les patients à qui ont administré le médicament afin d'entretenir des taux thérapeutiques satisfaisants (Shaw, 2000). SDZ-RAD, un dérivé analogue de la rapamycine, a des propriétés pharmacocinétiques plus avantageuses que la rapamycine et devrait permettre, croît-on, de contourner ces problèmes (Schuler *et al.*, 1997. Schuurman *et al.*, 1997).

EFFETS SECONDAIRES

L'utilisation de la rapamycine comme immunosuppresseur chez l'homme a été approuvée en septembre 1999 par la «US Food and Drugs Administration». Les principales informations sur les effets secondaires de la rapamycine nous proviennent d'études cliniques dans lesquelles la molécule a été utilisée en combinaison avec d'autres immunosuppresseurs. La RAPA affecte majoritairement le système métabolique et hématologique:

- **Métabolique.** Chez des transplantés rénaux stables recevant de la cyclosporine et de la prednisone, l'ajout de la rapamycine a augmenté de façon significative les taux de cholestérol par rapport aux témoins placebo (Murgia *et al.*, 1996). Cette augmentation est sans corrélation avec la dose reçue. Par contre, la RAPA n'augmente pas les niveaux sériques de triglycérides, contrairement à la cyclosporine. Cette augmentation du cholestérol est préoccupante étant donné que la dyslipidémie est un facteur de risque important du rejet chronique et des

maladies cardio-vasculaires. Les effets d'une thérapie au long cours demeurent indéterminés.

- Hématologique. La thrombopénie est proportionnelle à la dose de rapamycine utilisée (jusqu'à 38% de réduction avec les doses les plus élevées). Cependant, la thrombopénie atteint rarement un seuil clinique nécessitant l'arrêt de la médication. Les niveaux plaquettaires retournent à leur niveau de base deux semaines après l'arrêt du traitement. La leucopénie induite par la RAPA est significative, mais pas entièrement dose-dépendante.

Par ailleurs, la rapamycine n'influence pas le taux de filtration glomérulaire, la tension artérielle et la fonction hépatique. Contrairement à la cyclosporine et au tacrolimus, la rapamycine n'est pas neurotoxique ni néphrotoxique. Cette dernière propriété est particulièrement appropriée dans un contexte de transplantation rénale.

1.8 PRÉVENTION PHARMACOLOGIQUE DU REJET CHRONIQUE

Nous avons vu plus tôt que le rejet chronique représente la sommation à travers le temps de multiples agressions. Ces attaques finissent par user l'organe et détériorer sa fonction. Rappelons encore que le rein est constitué de quatre compartiments (vasculaire, tubulaire, interstitiel et glomérulaire) qui développent chacun leurs manifestations spécifiques de rejet chronique. Disons-le simplement : le rejet chronique rénal est l'usure accélérée d'un organe sur-utilisé.

Le compartiment vasculaire se retrouve au cœur des hypothèses physiopathologiques contemporaines du rejet chronique. Le modèle de Ross-Häyry propose que les cellules endothéliales sécrètent des cytokines en réponse aux agressions multiples survenant après la transplantation. La libération persistante de médiateurs inflammatoires induit une hypertrophie intimale et une migration massive de cellules musculaires lisses vers la média. Si ce mécanisme de défense est efficace au départ, il devient rapidement inapproprié en intensité et en durée. On assiste à une obstruction inexorable du système d'irrigation vasculaire si grave que les structures d'aval finissent par suffoquer. La dégénérescence ischémique s'installe.

Il est désormais évident que la prévention du rejet chronique devra débuter avec la transplantation elle-même. Paradoxalement, la majorité des patients greffés sont traités avec des cocktails néphrotoxiques (cyclosporine, tacrolimus) et athérosclérogènes (cyclosporine, corticostéroïdes). Les nouvelles molécules utilisées devront combiner les qualités immunosuppressives de leurs prédécesseurs tout en prévenant le rejet chronique.

LES MODÈLES DE REJET CHRONIQUE

En transplantation, trois modèles expérimentaux sont utilisés pour reproduire des lésions histologiques similaires à celles retrouvées lors de la vasculopathie du rejet chronique. Le canevas d'athérosclérose allogreffe proposé par Häyry regroupe sous un même schème physiopathologique les agressions «alloantigène-dépendantes» et «antigène-indépendantes» suggérées par Nagano et Tilney (1997). C'est précisément ces deux familles d'agression que chacun de ces modèles tentent d'isoler.

1. L'angioplastie. La dilatation mécanique artérielle permet de reproduire les événements antigène-indépendants en cause lors de la vasculopathie allogreffe. La dilatation est le plus souvent réalisée à l'aide d'une sonde-ballon dilatable. Ce modèle exclut les influences du système immunitaire.
2. La greffe de segments artériels (aortiques ou fémoraux). Ce modèle tente de reproduire la dysfonction endothéliale survenant après une transplantation. Il permet d'étudier la réponse du système vasculaire aux agressions immunitaires et non-immunitaires. C'est à partir d'observations issues de ce modèle qu'ont pu être énoncées les hypothèses physiopathologiques de la vasculopathie allogreffe.
3. La greffe d'organe solide. Modèle par excellence, il reproduit convenablement les aléas chirurgicaux et immunologiques retrouvés en transplantation clinique.

La lésion vasculaire mécanique est une agression sévère, aiguë et limitée dans le temps. Elle induit un épaissement intimal substantiel à l'intérieur de 2 semaines. Par contraste, la greffe de segments artériels engendre une agression moins intense, mais progressive et continue. Il faut dans ce cas plusieurs semaines pour reproduire le même épaissement intimal. Bien qu'ils impliquent des processus cellulaires différents, les deux modèles exhibent, après un certain temps, des dommages histologiques comparables.

MMF ET REJET CHRONIQUE

Propriétés du MMF

Le mycophénolate mofétil s'impose de plus en plus comme la molécule capable d'atténuer le rejet chronique. Le nombre de publications à ce sujet est en croissance et encore de nouvelles découvertes viennent renforcer cette impression.

Propriétés du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet chronique

Immunosuppresseur.	Revu par Allisson <i>et al.</i> , 1993, Sollinger, 1995-a Sievers <i>et al.</i> , 1997
Inhibe la prolifération des lymphocytes B et T ⁶ .	Ferns <i>et al.</i> , 1995
Inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	Eugui <i>et al.</i> , 1991, Morris <i>et al.</i> , 1991, Steele <i>et al.</i> , 1993, Gregory <i>et al.</i> , 1993-b
Inhibe la production d'anticorps par le lymphocyte B.	Eugui <i>et al.</i> , 1991
Inhibe l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1 et VLA-4), nuisant au recrutement de leucocytes <i>in situ</i> .	Azuma <i>et al.</i> , 1995-b Allison <i>et al.</i> , 1993
Effet néoprotecteur contre l'ischémie-reperfusion.	Jones <i>et al.</i> , 2000
Inhibe les chémokines RANTES et AIF.	Jones <i>et al.</i> , 2000
Atténue les facteurs de risque d'athérosclérose (tension artérielle, cholestérol et triglycérides) induits par la cyclosporine ou les corticostéroïdes.	Keunecke <i>et al.</i> , 2000
Absence d'effet néphrotoxique (en contraste avec cyclosporine et tacrolimus).	Weir <i>et al.</i> , 1999 Glicklich <i>et al.</i> , 1998

TABLEAU 1-IX. Propriétés du mycophénolate mofétil dans la prévention du rejet chronique.

⁶ Le rôle des lymphocytes dans l'athérosclérose allogreffe est encore l'objet de vifs débats. (Ferns *et al.* 1995 versus Hansson *et al.*, 1991).

La plus importante propriété du MPA, outre son activité immunosuppressive, est sa capacité cytostatique sur les cellules impliquées dans le rejet chronique. MPA à dose élevée inhibe la prolifération *in vitro* des fibroblastes et des cellules endothéliales (Eugui *et al.*, 1991) ainsi que des cellules musculaires lisses (Allison, 1993). Plusieurs modèles expérimentaux *in vivo* ont confirmé la capacité du MMF à retarder l'apparition de la vasculopathie allogreffe (Steele *et al.*, 1993. Morris *et al.*, 1993. Gregory *et al.*, 1993).

Le rôle du lymphocyte dans la réponse vasculaire des organes transplantés fait encore l'objet de vifs débats. La polémique n'en demeure pas moins pertinente. En effet, si le lymphocyte T est directement impliqué dans la destruction vasculaire, le contrôle de ses actions dévastatrices devient alors une nouvelle cible thérapeutique. Une première étude rapporte que des angioplasties réalisées sur des carotides de rats congénitalement déficients en lymphocytes n'induisent pas de lésion endovasculaire cicatricielle (Hansson *et al.*, 1991). La même expérience reprise par une seconde équipe n'a pu reproduire ces résultats (Ferns *et al.*, 1993). À cause de son effet inhibiteur très spécifique contre la réplication lymphocytaire, le MPA possède un avantage théorique sur tous les autres immunosuppresseurs. Il demeure cependant impossible de retenir ou d'exclure cette caractéristique du MPA comme hypothèse contributive à ses propriétés anti-rejet chronique.

Le MPA inhibe la production d'anticorps par les lymphocytes B (Eugui *et al.*, 1991). Les anticorps anti-donneurs jouent un rôle majeur dans le rejet aigu *via* une fixation puis une destruction des cellules endothéliales glomérulaires et vasculaires. Lors d'allogreffes rénales chez le rat, Le MMF (15mg/kg/d) a réduit drastiquement le dépôt d'anticorps IgG et de C3 (fragment du complément) au niveau des glomérules et des artères (Azuma *et al.*, 1995-b). Dans cette étude, le MMF retarde l'apparition des lésions du rejet chronique. Ces observations suggèrent qu'en inhibant la production d'anticorps, le MPA réduit l'implication des ces derniers dans l'hypertrophie intimale associée au rejet chronique.

La propriété de MPA à inhiber la synthèse des molécules d'adhésion cellulaire contribue à ses vertus anti-rejet chronique. Des études d'immunoprécipitation ont montré que MPA inhibe la molécule d'adhésion lymphocytaire VLA-4, ligand naturel de VCAM-1 (Allison *et al.*, 1993). Aussi, le MPA diminue l'expression de ICAM-1 et de son ligand

endothélial LFA-1 (CD11a) (Azuma *et al.*, 1995a et 1995b). En corrélation, le traitement au MPA réduit l'infiltration leucocytaire (lymphocytes T et B, macrophages) dans le parenchyme des reins de rats allogreffés. Cette réduction est surtout significative dans les glomérules et les zones péri-vasculaires. Une diminution du nombre de leucocytes dans les tissus transplantés est vraisemblablement associée à une relâche en proportion moins importante de médiateurs inflammatoires responsables d'une dégénérescence parenchymateuse cytotoxique (figure 3-2).

En plus d'être immunosuppresseur, le MPA pourrait être néphroprotecteur. En effet, le MMF combiné au curcumin + quercetin réduirait les conséquences néfastes de l'ischémie-reperfusion sur le rein (Rice-Evans *et al.*, 1996). Issus de la famille des flavines, le curcumin et le quercetin sont des composés polyphénoliques aux propriétés anti-oxydantes puissantes. Les flavines sont des pigments jaunes présents dans les organismes vivants et sont impliqués dans les réactions métaboliques d'oxydoréduction. Ces agents sont retrouvés en abondance dans les fruits et légumes, le thé ainsi que le vin. L'ischémie-reperfusion a été reproduite en clampant pendant trente minutes l'artère rénale de rats controlatéralement néphrectomisés. Le MPA + curcumin/quercetin limitent avec synergie les dégâts de l'ischémie-reperfusion, tel que démontré par une meilleure fonction rénale et des dommages histologiques tardifs moins sévères chez les rats traités. Le MPA administré seul n'agit pas directement sur l'ischémie-reperfusion. Cependant, il en amoindrit les conséquences *via* une régénération accélérée du compartiment tubulaire rénal (Jones *et al.*, 2000).

Cette même étude montre également que le MPA inhibe l'expression des chémokines RANTES et AIF (*Allograft inflammatory Factor*). RANTES est un chimiofacteur pour les monocytes et les lymphocytes et il serait impliqué dans le rejet chronique chez le rongeur. La signification de cette découverte reste encore à être élucidée.

Le rejet chronique est la manifestation finale de multiples agressions additionnées dans le temps. Si l'hypothèse physiopathologique de Häyry met les cellules musculaires lisses au premier plan, il est simpliste de penser qu'une intervention thérapeutique visant exclusivement ces dernières puisse prévenir à elle seule le rejet

chronique. Le MMF semble pouvoir agir simultanément sur plusieurs facteurs et promet d'être un outil de premier plan pour contrer le rejet chronique.

MMF et rejet chronique : expérimentations *in vivo*.

Quelques études seulement, effectuées sur des modèles animaux, ont fait naître l'idée que le MMF pourrait prévenir le rejet chronique. Pris dans leur ensemble, ces études démontrent que le MMF retarde, plutôt que prévient, l'apparition du rejet chronique.

Lors d'angioplasties artérielles sur des carotides de rats, l'administration de MPA (40mg/kg/d) ou de RAPA (1.5mg/kg/d) a réduit l'hypertrophie intimale de 52% et de 45% respectivement ($p < 0.05$) mesurée au 14^e jour après la dilatation. Aucun autre immunosuppresseur évalué (cyclosporine, tacrolimus et déoxyspergualine) n'est parvenu à un tel effet (Gregory *et al.*, 1993)⁷. Cette étude accuse cependant deux lacunes importantes. Tel que discuté, l'angioplastie représente une agression unique et limitée dans le temps. Elle ne saurait reproduire convenablement les agressions continues subites par un organe transplanté. Ensuite, le degré d'hypertrophie intimale est mesuré précocement (14^e jour post-dilatation). On peut difficilement parler de lésion chronique. Au plus, l'étude prouve que MMF et RAPA inhibent les événements initiaux de la vasculopathie du rejet chronique sans pour autant fournir l'évidence qu'ils seront efficaces pour en prévenir le développement à long terme.

Toujours en 1993, le MMF est expérimenté lors de greffes aortiques chez le rat (Steele *et al.*, 1993). Cette fois-ci, les segments d'aorte sont analysés jusqu'à 12 mois post-greffe. Le MMF (30mg/kg/d) prévient l'hypertrophie intimale et la prolifération des cellules musculaires lisses dans la média jusqu'à trois mois après transplantation. À douze mois, tous les greffons, traitements confondus, montrent des lésions de rejet chronique équivalentes. Une étude similaire réalisée deux ans plus tard obtient des résultats superposables (Räsänen-Sokolowski *et al.*, 1995). Ces évidences viennent renforcer l'idée que l'effet bénéfique du MMF contre le rejet chronique est temporaire.

⁷ Cette étude sera reprise deux ans plus tard, par la même équipe, en associant cette fois-ci MMF et RAPA : les résultats sont significatifs.

O'Hair *et al.* (1994) rapporte que le MMF est plus efficace que l'azathioprine (AZA) pour prévenir les lésions vasculaires du rejet chronique dans un modèle de xéno greffe cardiaque hétérotopique entre babouins (*Papio anibus*) et singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*). À la 12^e semaine, le groupe traité avec CsA-méthylprednisone + MMF (70mg/kg/d) montre une baisse drastique des changements vasculaires pathologiques par rapport aux témoins traités avec CsA-méthylprednisone + AZA (4mg/kg/d). Qui plus est, certains animaux traités au MMF n'ont montré qu'un infiltrat cellulaire minime à la biopsie un an post-greffe. Il est possible que la différence observée soit le reflet d'une meilleure immunosuppression dans le groupe MMF.

La meilleure étude à ce jour implique des allogreffes rénales chez le rat (F344→LEW)⁸. Le MMF (15mg/kg/d) prévient la dégradation fonctionnelle du rein transplanté (protéinurie et chute de clairance de la créatinine), la destruction glomérulaire et l'oblitération artérielle (Azuma *et al.*, 1995).

MMF et le rejet chronique : études chez l'homme.

Depuis quelques années, le MMF est utilisé comme adjuvant en remplacement de l'azathioprine dans la trithérapie AZA + CsA + corticostéroïdes. De plus en plus, on utilise le MMF à titre d'agent principal chez les sujets dont le greffon est stable (Keunecke *et al.*, 2000). Depuis que le rapprochement entre le MMF et la prévention du rejet chronique est établi, diverses études ont été entreprises chez l'homme, mais aucune n'est en mesure pour l'instant de confirmer une telle relation. Ces études se contentent de vérifier si le MMF est efficace pour «renverser» les lésions du rejet chronique rénal établi. Le devis est toujours le même : on recrute des sujets avec un rejet chronique, on substitue la CsA pour le MMF et on observe s'il y a une amélioration de la clairance de la créatinine (marqueur du rejet chronique). Dans l'ensemble, ces études ne constatent aucune amélioration (Smith *et al.*, 1997. Glicklich *et al.*, 1998. Jirasiritham *et al.*, 1998. Campistol *et al.*, 1999). Les quelques publications où le MMF semble favorable sont incapables de préciser si l'amélioration est tributaire d'une diminution de la CsA (néprototoxique) ou d'une éventuelle efficacité du MMF (Inokuchi *et al.*, 1998. Senn *et al.*, 1998. Cho *et al.*, 1999. Kliem *et al.*, 1999). Une seule étude

⁸ Il s'agit également du modèle que nous avons utilisé dans l'étude présentée au second chapitre de cet ouvrage.

rapporte les résultats de biopsies avant et un an après la conversion au MMF : huit patients sur dix montrent une amélioration (1/8) ou une stabilisation (7/8) des paramètres histopathologiques (Weir *et al.*, 1999).

Considérant le potentiel de régénération pratiquement nul du parenchyme rénal, il n'est pas surprenant de constater que le MMF soit inefficace pour améliorer le sort des patients ayant un rejet chronique installé.

MMF et rejet chronique : quelle place le MMF prendra-t'il?

In vitro et *in vivo*, le MMF inhibe la production d'anticorps, nuit à l'expression des molécules d'adhésion, empêche la prolifération des cellules musculaires lisses et il est rénoprotecteur. Ces propriétés en font théoriquement un agent idéal pour prévenir le rejet chronique. Chez l'homme, on ne dispose à l'heure actuelle d'aucune preuve directe d'une telle efficacité. Par contre, il est maintenant reconnu que le MMF n'est pas néphrotoxique ou pro-athérosclérotique (contrairement à la CsA, au tacrolimus et aux corticostéroïdes). Qui plus est, une étude récente propose que des patients greffés et traités au MMF présentent un meilleur profil lipidique (diminution du cholestérol et des triglycérides) et une tension artérielle moins élevée que les sujets traités avec la cyclosporine ou le tacrolimus (Keunecke *et al.*, 2000).

Chez l'animal, le MMF parvient à repousser, mais pas à empêcher, l'apparition des lésions vasculaires du rejet chronique. Cette efficacité circonscrite du MMF remet en question son utilisation à long termes. Il a été démontré qu'après un an de traitement au MMF chez des sujets humains, le médicament à dose fixe perd son pouvoir inhibiteur sur l'IMPDH, enzyme clé dans la synthèse *de novo* des purines. En fait, il y aurait une surproduction d'IMPDH par les lymphocytes de l'hôte (Sanquer *et al.*, 1999). Une telle induction est potentiellement délétère si elle est associée à une hausse de l'activité lymphocytaire. Le problème semble contournable par un ajustement des dosages sériques. Ceci suggère qu'il faudra s'assurer de la persistance des propriétés immunosuppressives du MMF avant d'en recommander l'utilisation à long terme pour la prévention du rejet chronique.

RAPA ET REJET CHRONIQUE

Propriétés de la rapamycine dans la prévention du rejet chronique

Immunosuppresseur.	Revu par Dumont et Su, 1995. Kelly <i>et al.</i> , 1997
Inhibe la migration des CML.	Poon <i>et al.</i> , 1996
Inhibe la synthèse <i>in vitro</i> de l'ADN des CML vasculaires chez l'homme, le rat et le porc.	Cao <i>et al.</i> , 1995 Morris <i>et al.</i> , 1995 Gallo <i>et al.</i> , 1999
Ralentit la prolifération des CML vasculaires <i>in vitro</i> de façon non-spécifique à la cause (hyperphosphorylation de pRb et « <i>down-regulation</i> » de p27 ^{cdk1}).	Gallo <i>et al.</i> , 1999 Vinals <i>et al.</i> , 1999 Marx <i>et al.</i> , 1999
Diminue la production des facteurs de croissance PDGF- α , bFGF et TGF- β dans des modèles allogreffes.	Gregory <i>et al.</i> , 1993 Morris <i>et al.</i> , 1995 Viklicky <i>et al.</i> , 2000
Inhibe la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales <i>in vitro</i> .	Akselband <i>et al.</i> , 1991
Diminue la production d'anticorps anti-CMH (RT1) lors d'allogreffe rénale chez le rat.	Pham <i>et al.</i> , 1998
SDZ-RAD diminue l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM lors d'allogreffe du rein chez le rat.	Viklicki <i>et al.</i> , 2000
SDZ-RAD inhibe le remodelage vasculaire induit par l'ischémie.	Schuurman <i>et al.</i> , 1999
Augmente la production vasculaire d'oxyde nitrique (NO), un puissant inhibiteur de la prolifération des CML (Hypothétique).	Poston <i>et al.</i> , 1999

TABLEAU 1-X. Propriétés de la rapamycine dans la prévention du rejet chronique.

Rapamycine : évidences expérimentales

C'est au début des années 1990 que sont découvertes les applications potentielles de la rapamycine dans la prévention du rejet chronique. À cette époque, la notion de rejet chronique commence à peine à émerger. Il est d'abord démontré que la RAPA inhibe *in vitro* la prolifération spontanée ou induite des cellules endothéliales et des fibroblastes humains (Akselband *et al.*, 1991). *In vivo*, une série d'allogreffes cardiaques chez le rat démontre que 50 jours après la chirurgie, la rapamycine, mais pas la cyclosporine ou le tacrolimus, inhibe ce qui est décrit à l'époque comme la «vasculite» de la transplantation (Meiser *et al.*, 1991).

Les facteurs de croissance PDGF- α , bFGF et TGF- β sont de puissants mitogènes et chimiotacteurs des CML vasculaires (Ohnishi *et al.*, 1982) et jouent un rôle primordial dans la vasculopathie allogreffe. En plus d'en diminuer globalement la sécrétion, la RAPA bloque le potentiel activateur de ces cytokines sur les cellules musculaires lisses. *In vitro*, la RAPA diminue la production d'ADN des CML activées par PDGF- α ou bFGF (Cao *et al.*, 1995. Marx *et al.*, 1995). Cette inhibition est directement proportionnelle à la dose et demeure effective même si la molécule est introduite plusieurs heures après l'activation des cellules.

L'efficacité de la RAPA à prévenir l'épaississement intimal artériel a été étudiée simultanément lors de greffes aortiques et d'angioplasties mécaniques. Dans un modèle comme dans l'autre, la RAPA inhibe significativement l'épaississement intimal (Gregory *et al.*, 1993). Au niveau des greffons aortiques, on constate que l'immunosuppresseur réduit l'infiltration leucocytaire (lymphocyte T et macrophage), l'expression des antigènes du CMH II et la production d'ARN-m traduisant les facteurs de croissance PDGF- α , bFGF et TGF- β .

L'efficacité de la rapamycine à inhiber l'activité des CML et l'hypertrophie obstructive nonobstant la nature immune ou mécanique de l'agression vasculaire est surprenante. En effet, les stimuli induisant la prolifération des cellules musculaires lisses y sont multiples et il est invraisemblable que RAPA puissent tous les inhiber.

Cette déduction à mené Cao *et al.* (1995) à postuler que :

«...If many of the stimuli of vascular smooth muscle cells proliferation cause these cells to enter the S phase through a final common biochemical pathway, a drug such as rapamycin may owe its efficacy to the possibility that it blocks pathways responsible for VSMC proliferation that are common to many VSMC mitogens».

En d'autres termes, on peut supposer que tous les stimuli capables d'induire la prolifération des CML convergent vers une voie d'activation unique et terminale et que cette voie est inhibée par la rapamycine (figure 1-15).

Les effets cytostatiques de RAPA pourraient être attribuable à une inhibition des cyclines/kinases régulant le cycle cellulaire et à une hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome⁹ (pRb). Ces molécules sont des étapes intermédiaires dans les voies biochimiques de la prolifération des CML et il n'est pas exclu qu'elles soient impliquées dans la voie finale commune.

Le complexe RAPA-FKBP inhibe la phosphorylation de pRb, retardant du coup la transition G1/S du cycle de prolifération cellulaire (Marx *et al.*, 1995. Gallo *et al.*, 1996). Aussi, la RAPA diminue l'activité des kinases p33^{cdk2} (impliquées dans la phosphorylation de pRb) et p34^{cdc2}. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire au stade G2/M (Marx *et al.*, 1995).

La cible la mieux connue de RAPA, p70^{S6kinase}, s'avère être essentielle dans la prolifération des CML vasculaires (Vinal *et al.*, 1999). Lors d'un stimulus mitogénique, il y a diminution de l'expression de la p27^{kip1} (figure 1-13). En revanche, l'administration de la RAPA augmente les niveaux de p27^{kip1} et inhibe la phosphorylation de pRb dans les parois vasculaires du porc ayant subis une angioplastie (Gallo *et al.*, 1999).

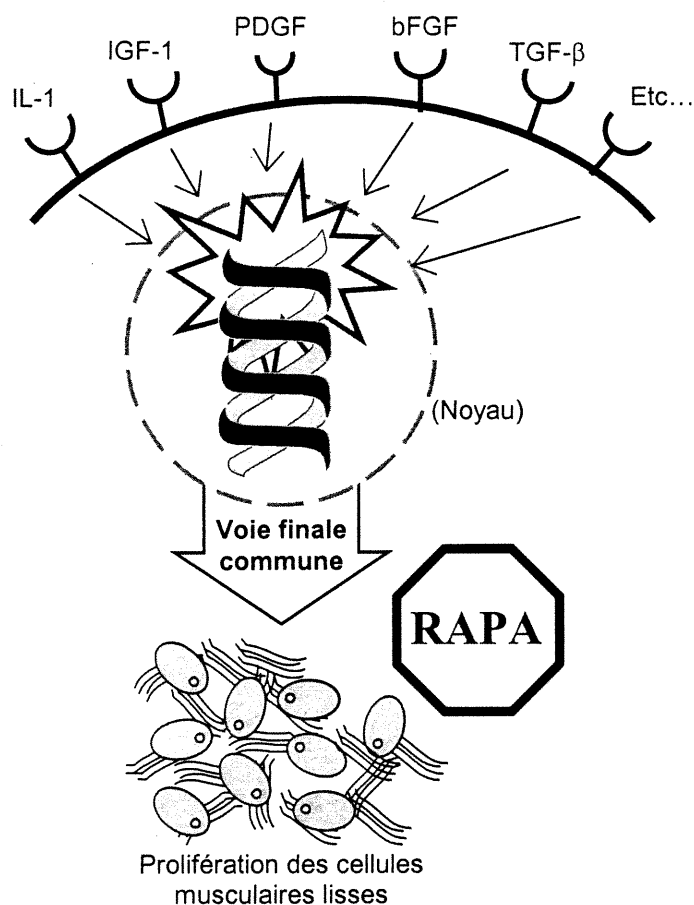


FIGURE 1-15. La voie finale commune de la prolifération des cellules musculaires lisses. Il est présumé que l'ensemble des stimuli activateurs des cellules musculaires lisses convergent vers une voie métabolique unique et terminale. L'existence d'une telle voie expliquerait la capacité de la RAPA à inhiber la prolifération des CML nonobstant la nature du stimulus. (Illustration originale).

La majorité des CML du vaisseau normal se retrouvent dans la média sous phénotype contractile, caractérisé par une abondance cytoplasmique de filaments d'actine et de myosine. L'agression vasculaire active les CML qui acquièrent le phénotype synthétique et migrent vers l'intima. Il a été démontré que la RAPA inhibe *in*

⁹ Le rétinoblastome est un «*cancer suppressor gene*» dont la protéine est ici utilisée comme marqueur de la progression du cycle de prolifération cellulaire. pRb est nécessaire à la duplication des cellules musculaires lisses.

vitro la migration des CML porcines et humaines lorsqu'elles sont activées par PDGF- α (Poon *et al.*, 1996). L'effet est dose-dépendant.

La RAPA, administrée jusqu'à 60 jours après une allogreffe cardiaque chez le rat, inhibe la production d'anticorps dirigés contre le complexe d'histocompatibilité du donneur (RT1 chez le rat, équivalent du HLA chez l'homme). Dans les mêmes conditions, la cyclosporine n'a pas produit cet effet (Poston *et al.*, 1999). La RAPA pourrait agir directement sur la production d'anticorps par le lymphocyte B.

Une dernière étude, revue à la fin de ce chapitre, a montré qu'un traitement au SDZ-RAD, un analogue oral de la RAPA, diminue l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM ainsi que la production de fibronectine + laminine (Viklicki *et al.*, 2000).

Rapamycine : expérimentations *in vivo*

Lors d'angioplasties sur des carotides de rats, seul deux immunosuppresseurs, la rapamycine (1.5mg/kg/d) et le mycophénolate mofétil (40mg/kg/d) sont parvenus à inhiber l'hypertrophie intimale retrouvée dans les témoins non-traités (Morris *et al.*, 1995-a).

Sur des porcs «*miniswine*» (similaires à l'homme au plan de l'anatomie coronarienne), la RAPA s'est avérée être un puissant inhibiteur de la resténose post-angioplastie. En effet, les porcs traités avec la RAPA (du jour 3 au jour 14 post-angioplastie) présentent une occlusion vasculaire de 50 % inférieure en moyenne à celle des témoins non-traités (sacrifice fait au 40^e jour post-angioplastie). Le traitement prévient l'épaississement néo-intimal et amoindrit l'hyperplasie medio-intimale, miroir de l'activité des cellules musculaires lisses (Gallo *et al.*, 1999). Dans un protocole similaire, la RAPA (2mg/kg/d) a diminué la resténose vasculaire d'environ 50 % par rapport au témoin non-traité (Burke *et al.*, 1999). L'effet inhibiteur de la RAPA dans le cas de lésions mécaniques vasculaires est suffisamment convainquant que l'on songe à l'utiliser dans la prévention de la resténose post-angioplastie chez l'homme. L'angioplastie transluminale est utilisée en clinique dans le traitement des sténoses vasculaires critiques, comme c'est le cas lors du syndrome coronarien aigu. Quoique très efficace à court terme, la procédure est associée à une forte incidence de

resténose. À l'instar des expérimentations réalisées en transplantation, la RAPA est actuellement évaluée dans la prévention de ces resténoses.

L'ischémie, inéluctable lors d'une transplantation, est un facteur de risque reconnu du rejet chronique. Elle induit un remodelage vasculaire pathologique. Après une ischémie froide de 24 à 48 heures, des segments aortiques de rat ont été allo-transplantés et examinés 56 jours après la chirurgie. SDZ-RAD (analogue oral de la RAPA) à faible dose (0.31mg/kg/d) et administré dans les deux premières semaines post-greffe inhibe le remodelage vasculaire (Schuurman *et al.*, 1999). La RAPA semble capable d'inhiber les effets de l'ischémie froide, vraisemblablement à cause de ses propriétés cytostatiques sur les CML. Cet effet bénéfique est assuré en autant que le médicament soit présent dans les tissus transplantés lors de la période critique des deux premières semaines post-ischémie.

En transplantant des segments d'artères fémorales de rats de lignées histoincompatibles, Gregory (1993) a démontré que la RAPA (3mg/kg/d) diminue la formation de l'épaississement intimal de 98% par rapport au groupe témoin (40 jours post-greffe). Dans un modèle d'allogreffes de segments de trachée chez le rat, la RAPA en association avec le leflunomide (un dérivé de l'isoxazole) inhibe le rétrécissement luminal, l'inflammation péri-trachéale et l'infiltration leucocytaire (Morris *et al.*, 1995-b). Ce modèle mime la bronchiolite oblitérante, un processus pathologique observé dans le rejet chronique du poumon.

Les meilleures preuves reliant la rapamycine à la prévention du rejet chronique proviennent d'études utilisant la transplantation d'organes solides. L'athérosclérose coronarienne précoce est une pathologie fréquente chez les greffés cardiaques. Lors d'allogreffes cardiaques hétérotopiques chez le rat, la RAPA à doses variables (0.5mg/kg/d et 2.5mg/kg/d) diminue l'incidence de l'hyperplasie intimale concentrique. La dose de 2.5 mg/kg/d inhibe pratiquement tous les changements pathologiques habituellement retrouvés dans les groupes témoins non-traités (Schmid *et al.*, 1999). Dans cette même étude, le MMF (20mg/kg/d) ne s'est pas montré supérieur à la CsA pour inhiber la vasculopathie ! Ce dernier résultat s'intègre mal avec l'ensemble des données actuellement disponibles.

Même si elle est administrée tardivement, la RAPA renverse les lésions histologiques de la vasculopathie allogreffe cardiaque chez le rat (Poston *et al.*, 1999). Dans cette étude, la RAPA (3mg/kg/d) ou la CsA (10mg/kg/d) ont été administrées du jour 60 au jour 90 post-greffe. L'histologie réalisée à intervalles réguliers a objectivé une régression des lésions chez les animaux traités avec la RAPA, mais pas avec la CsA. Cependant, la RAPA n'a pas été plus efficace que la CsA pour diminuer les infiltrations leucocytaires périvasculaires. Plusieurs doutes planent sur la rigueur des conclusions énoncées dans cette étude. D'abord, il s'agit d'une nouvelle combinaison de rats (PVG ;RT1^c → ACI ;RT1^a) qui diffèrent au niveau d'un gène majeur d'histocompatibilité. On ignore encore si ce nouveau modèle génère adéquatement et de façon reproductible les lésions du rejet chronique. De plus, les échantillons tissulaires ont été analysés selon une nouvelle classification histologique pour la vasculopathie allogreffe dont la sensibilité et la spécificité restent encore mal définies. Cette nouvelle classification n'a d'ailleurs pas été confrontée à des échelles plus généralement reconnues (*Banff Working Classification* et CADI). Enfin, bien que les résultats soient statistiquement significatifs, leur valeur clinique demeure équivoque. Un juste compromis serait de dire que la RAPA stoppe (plutôt que renverse) la progression des lésions chroniques de la vasculopathie allogreffe.

Une seule étude évalue directement l'effet de la rapamycine sur les manifestations du rejet chronique dans la transplantation rénale : «*SDZ-RAD Prevents Manifestation of Chronic Rejection in Rat Renal Allografts*» (Viklicki *et al.*, 2000). L'étude utilise un modèle animal reconnu dans l'évaluation du rejet chronique. Brièvement, des reins sont transplantés entre deux lignées de rats histoincompatibles (gène mineur LEW ; RT1^l → F344 ; RT1^{lv1}). Les receveurs sont initialement traités dix jours avec la CsA (1.5mg/kg/d) à faible dose afin d'éviter les épisodes initiaux de rejet aigu. Par la suite, les animaux reçoivent soit du SDZ-RAD (un analogue oral de la RAPA) soit un *placebo*. Le SDZ-RAD (0.5mg/kg/d) prévient l'apparition de la protéinurie retrouvée dans le groupe témoin. La protéinurie reflète une défaillance rénale avancée et elle est souvent utilisée comme un indice de rejet chronique. Le SDZ-RAD diminue également l'importance de la glomérulosclérose (marqueur histologique très spécifique du rejet chronique). Contrairement aux études préalables utilisant la RAPA, cette étude montre que le SDZ-RAD diminue l'infiltration leucocytaire périvasculaire et interstitielle des organes transplantés. Ce résultat peut être attribuable à une meilleure

immunosuppression occasionnée par la cinétique plus stable de RAD par rapport à la RAPA.

Les animaux traités avec SDZ-RAD obtiennent un pointage histologique plus favorable que les témoins non-traités (respectivement 1.3 ± 0.5 versus 3.1 ± 0.8 selon la classification de *Banff*¹⁰). Cependant, un pointage supérieur à 4 sur l'échelle de Banff est nécessaire pour qu'on puisse diagnostiquer le rejet chronique. Le témoin non-traité lui-même ne rejoint pas cette valeur (pointage moyen de 3.1 ± 0.8). Ce constat limite l'ampleur des conclusions de l'étude. Il faut garder à l'esprit que les animaux ont été sacrifiés à 24 semaines seulement (relativement tôt) et qu'il est fort à parier que les dommages histologiques s'accroissent avec le temps.

¹⁰ Cf. section 5-2 (Annexe).

1.9 TRANSPLANTATION RÉNALE ORTHOTOPIQUE

MODÈLE EXPÉRIMENTAL

L'orthotopisme consiste à greffer un organe à son site anatomique habituel. Pour ce faire, on doit préalablement retirer l'organe du receveur afin de céder la place au transplant (figure 1-16). Cette méthode implique généralement des anastomoses termino-terminales. Le protocole de transplantation rénale orthotopique utilisé dans nos expériences constitue une variation importante par rapport à la procédure originalement décrite par Miller *et al.* (1962). Il s'apparente davantage à la méthode reprise par Oosterwitz *et al.* (1983) ainsi que celle de Chen, Smeesters et Daloz (1995) (*cf.* section 5-1). En clinique, la cavité abdominale humaine est suffisamment grande pour accommoder l'installation d'un troisième rein, si bien que la transplantation hétérotopique y est généralement pratiquée.

La transplantation rénale orthotopique réalisée chez le rat mime efficacement le stress et les dommages intrinsèques à l'acte chirurgical, incluant le temps d'ischémie. Sur cette base, les observations issues de ce modèle peuvent être extrapolées à la transplantation rénale chez l'homme. La transplantation rénale orthotopique chez le rat est un modèle fréquemment utilisé dans l'étude du rejet aigu et chronique du rein. Elle est une étape incontournable lors de l'évaluation des nouvelles thérapies immunosuppressives.

La compréhension contemporaine du rejet chronique est grandement redevable au développement de lignées de rats génétiquement contrôlées. Dès 1969, la combinaison des lignées de rats Fisher (F344) et Lewis (LEW) est rapportée comme un modèle reproductible de rejet chronique (White *et al.*, 1969). Le rat Fisher (RT1^{lvr}) est un variant haplotype du rat Lewis (RT1¹) au niveau de RT1-E/C. À ce jour, la combinaison F344 → LEW est reconnue comme l'étalon or dans l'étude animale du rejet chronique du cœur (Adams *et al.*, 1992) et du rein (Azuma *et al.*, 1995-b. Vilklicki *et al.*, 2000). Ce modèle a d'ailleurs servi à l'élaboration des hypothèses physiopathologiques

actuelles du rejet chronique du rein (Diamond *et al.*, 1992. Adams *et al.*, 1992. Hancock *et al.*, 1993).

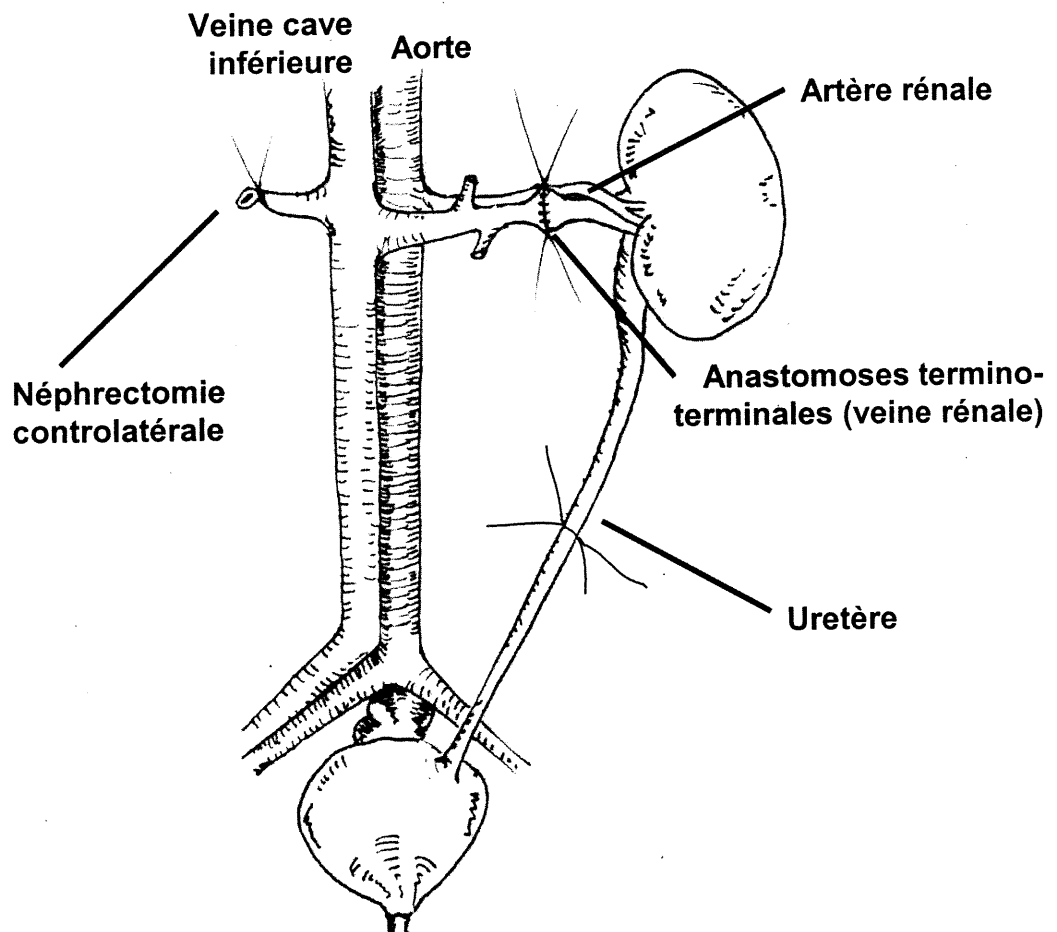


FIGURE 1-16. Transplantation rénale orthotopique.

Protocole chirurgical proposé par Chen, Smeesters et Daloz (1995). Le rein est greffé au site précis de l'organe qu'il remplace. Trois anastomoses termino-terminales seront nécessaires entre les veines rénales, les artères rénales et les uretères. (Illustration originale).

1.10 BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Le rejet chronique du rein constitue la cause dominante de la perte de greffons. En augmentant la durée de vie des reins transplantés, il est permis d'espérer amoindrir la pénurie d'organes. Il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapie efficace pour prévenir le rejet chronique dans cette condition.

La dernière décennie a vu s'accroître la compréhension du phénomène si bien qu'aujourd'hui, il est envisageable de proposer des thérapies ciblant des séquences physiopathologiques précises, telle que la vasculopathie allogreffe. Les nouvelles thérapies proposées devront avoir la puissance des immunosuppresseurs déjà disponibles tout en étant capable d'inhiber l'apparition du rejet chronique.

Le mycophénolate mofétil et la rapamycine sont des molécules relativement nouvelles en transplantation. Indépendamment de leur activité immunosuppressive, des expériences chez l'animal laissent croire que ces deux agents auraient les qualités nécessaires pour prévenir le rejet chronique.

Les expériences présentées dans ce mémoire ont pour but d'évaluer l'efficacité du mycophénolate mofétil et de la rapamycine, seuls ou en association, à prévenir le rejet chronique du rein transplanté chez de rat. L'idée d'associer ces deux médicaments suppose une synergie d'action et un amoindrissement des effets délétères. À partir de sacrifices séquentiels et d'évaluations histologiques lors d'un suivi allant jusqu'à près d'un an, nous avons déterminé comment et à quel moment le MMF et la RAPA modulent les événements physiopathologiques du rejet chronique.

Sur la foi des quelques évidences expérimentales présentées dans le prochain chapitre, nous espérons paver la voie à d'éventuels développements cliniques capables de remédier au problème que constitue le rejet chronique.

CHAPITRE II

ARTICLE ORIGINAL

**COMBINATION THERAPY OF MYCOPHENOLATE MOFETIL (MMF) AND
RAPAMYCIN (RAPA) IN PREVENTION OF CHRONIC RENAL
ALLOGRAFT REJECTION IN THE RAT¹**

E. Marc Jolicoeur², Shijie Qi², Dasheng Xu², Louis Dumont³, Huifang Chen^{2,4}

Laboratory of Experimental Surgery, Research Centre of CHUM, Notre-Dame Hospital;
Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Mailing address: Huifang Chen, MD., PhD., Laboratory of Experimental Surgery,
Research Centre of CHUM, Room Y 1611, Notre-Dame Hospital, University of Montreal,
1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada.

Tel: (514) 890-8000 ext. 27081; Fax: (514) 412-7581

FOOTNOTES

1. This work was supported in part by Roche Bioscience, USA ; and Research Center of CHUM, University of Montreal.
2. Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital, University of Montreal.
3. Department of Pharmacology, University of Montreal.
4. 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. E-mail: hui.fang.chen@umontreal.ca

ABBREVIATIONS

BWC; Banff working classification, Cg; allograft glomerulopathy, Ci; interstitial fibrosis, Ct; tubular atrophy, Cv; vascular fibrous intimal thickening, CsA; cyclosporine, F344; Fischer rat strain, LEW; Lewis rat strain, Mm; mesangial matrix increase, MMF; mycophenolate mofetil, RAPA; rapamycin, SEM; standard error of the mean, VSMC; vascular smooth muscle cell.

ABSTRACT

Background. Chronic rejection is the leading cause of long-term allograft loss. Up to now, no therapy is recognized efficient in its prevention. In addition to their immunosuppressive activity, mycophenolate mofetil (MMF) and rapamycin (RAPA) show diverse properties against vascular smooth muscle cells activity, cell-adhesion molecules expression and ischemia-reperfusion injury. The combination effect of MMF and RAPA was tested to prevent chronic renal allograft rejection in the rat in this study.

Methods. Nephrectomized Lewis recipients were orthotopically transplanted with Fisher (F344) kidneys (allograft groups) or Lewis kidneys (isograft control). Initial episode of acute rejection were controlled with a short course of CsA (1.5 mg/kg/day for 10 days). From week 4 to 20, animals were thereafter treated every other day either with vehicle, MMF (20 mg/kg), RAPA (0.8mg/kg), or MMF(20 mg/kg) + RAPA (0.8 mg/kg) in combination. Animals were sequentially sacrificed over a follow up of 50 weeks, and histological study was performed on harvested kidneys according to Banff working classification for allograft pathology.

Results. Animals treated with MMF or RAPA alone showed a Banff sum score similar to allograft control group (6.31 ± 1.01 and 7.27 ± 1.14 versus 7.21 ± 1.14 , $p>0.05$). When the recipient rat were treated with MMF and RAPA in combination, it resulted in a clinically and statistically significant reduction of Banff sum score (4.21 ± 0.79 , $p<0.01$) with specific inhibition of vascular fibrous intimal thickening, allograft glomerulopathy, and interstitial fibrosis.

Conclusions. Over a 50 weeks of study, concomitant therapy of MMF and RAPA prevents chronic renal allograft rejection, probably through reduction of ischemic and cytotoxic degenerative changes. These results warrant further investigation in the combination of MMF and RAPA as anti-chronic rejection therapy in clinical rejection therapy.

INTRODUCTION

Since the first successful kidney transplantation reported by Ullmann in 1902 (1), the evolution of immunopharmacology allowed reduction of acute rejection incidence. Consequently, surviving organs developed characteristic lesions, originally described by Porter in 1963 as progressive vascular occlusion (2). Chronic allograft rejection now stands as the major cause of kidney functional decline following transplantation and is responsible for up to 7 % of all renal allograft loss every year (3). Over the past 30 years, no therapy was found effective to improve long-term graft survival (4-5).

Chronic rejection of the transplanted kidney is diagnosed by the presence of severe interstitial fibrosis and tubular atrophy, glomerular basement membrane duplication (tram track) and vascular fibrous intimal thickening (6). As expected from Ross' vascular response to an injury model (7), arteries of transplanted organs develop progressive atherosclerotic occlusion. It is postulated that immune response and antigen-independent events induce persistent perivascular inflammation responsible for chronic low grade damage of vascular endothelium (8-9). In response to these aggressions, endothelial cells secrete cytokines and growth factors which in turn promote the migration and proliferation of medial smooth muscle cells into the neointima (3, 10). The resultant arterial occlusion leads to ischemic damage of the glomerular and the tubular system. Over time, glomerular damages favour hyperfiltration and subsequent allograft failure (11).

Mycophenolate mofetil (MMF, RS 61443) is the morpholinoethylester pro-drug of mycophenolic acid (MPA) isolated from the mold *Penicillium glaucum* more than 100 years ago (12). MMF acts on the de novo synthesis of guanosine nucleotide through a

reversible and non-competitive inhibition of a key enzyme inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), resulting in a selective antiproliferative effect on B and T lymphocytes (13). In clinical transplantation, the popularity of MMF is expanding. Since 1996, the use of MMF has increased from 6.5% to 35.8%, while the use of azathioprine has decreased from 50.0% to 35.8% (14). In combination with cyclosporine and corticosteroids, MMF reduced the 3-year graft loss rates when compared to placebo (15) but not to azathioprine (16). In rat kidney transplantation model, MMF was shown efficient to delay early degenerative changes of chronic renal allograft rejection (17). Although promising, MMF failed to provide long term benefit.

Rapamycin (sirolimus, RAPA) is a macrolide antibiotic derived from *Streptomyces hygroscopicus* (18). RAPA binds to FKBP12 to form a complex that inhibits the activity of cell-cycle regulatory protein mTor. RAPA blocks signal transduction of cytokines through critical action on p70 S6 kinase (19-21) and p27^{kip} (22-23), two key proteins needed for mammalian cell cycle progression from G1 to S. In phase III clinical trials in kidney transplants the efficacy and safety of RAPA was demonstrated (24-26) and the drug gained FDA approval for use in kidney transplantation in 1999. RAPA seems very promising in the prevention of chronic allograft rejection. It inhibits activation, proliferation, and migration of vascular smooth muscle cells in several animal models (27-30). It also prevents neointimal formation after angioplasty in porcine and rat models (31-34). Most importantly, RAPA reduces the severity of chronic graft vascular disease in cardiac and kidney transplant models (35-37).

The combination of MMF and RAPA significantly reduces intimal thickening and favours endothelial replacement after mechanical arterial injury in the rat (38). We have previously demonstrated the synergistic effect of MMF with RAPA in the prevention of

acute rejection of solid organ allografts (39). The present study was designed to evaluate the efficacy of MMF and RAPA alone or in combination therapy for the prevention of chronic renal allograft rejection in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Adult (9-11 week-old) male Lewis (LEW; RT1¹) and Fisher (F344; RT1^{lv1}) rats were obtained from Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). The rats were in 12 hours controlled light/dark cycles and allowed free access to water and rat chow.

Drugs. MMF was donated in powder form by Roche Bioscience (Palo Alto, CA) and prepared daily by suspension in carboxymethyl cellulose with carbopal gel at 20 mg/ml. RAPA was donated by Wyeth-Ayerst Research (Rouse Point, NY) and diluted in a vehicle containing tween 80 (10%), N-N-dimethylacetamide (20%), and polyethylene glycol 400 (70%). Cyclosporine (CsA) was dissolved in olive oil. All drugs were administered by gavage.

Kidney Transplantation. Orthotopic kidney transplantation was performed by a modification of the method of Fisher and Lee (40). The left kidney of the donor rat (Fisher F344) was perfused through the aorta with 4°C heparinized Ringer's lactate solution and harvested en bloc, after transecting the ureter, the renal artery close to the aorta, and the renal vein near the vena cava. The kidney was preserved in the same solution at 4°C for less than 30 min. The recipient rat was anaesthetized and a left nephrectomy was performed after transecting the renal artery, the renal vein, and the ureter. End-to-end anastomoses of the donor and recipient renal artery and vein were performed using 10-0 nylon suture. After releasing the vascular clamps, an end-to-end anastomosis of the donor and recipient ureters was made using 10-0 nylon suture. Before closing the abdomen, the native right kidney of the recipient was removed. Animals that died within 3 days following transplantation (less than 5%) were considered technical failure and were excluded from the analysis.

Experimental design. According to a well established model of chronic rejection (41), Lewis recipients received Fisher donors kidneys (F344→LEW), as allograft, and received LEW donor kidneys as isograft (LEW→LEW). All transplanted animals were treated with a short course of CsA (1.5 mg/kg/day orally for 10 days) in order to avoid acute rejection episode (42). From week 4 to 20, MMF and RAPA were thereafter administered every other day according to 5 treatment groups: Group 1; untreated allograft, Group 2; untreated isograft, Group 3; MMF 20 mg/kg, Group 4; RAPA 0.8 mg/kg, and Group 5; MMF 20 mg/kg + RAPA 0.8 mg/kg (n=18 for each group). After week 20, no further immunosuppressive therapy was continued.

Harvesting of the graft. Under general anaesthesia, one rat in every group was sacrificed randomly according to the following schedule: week 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 50 and kidneys were harvested. Representative portions were fixed in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin for standard light microscopy or were covered with O.C.T. organic compound (Division Miles Laboratories, Naperville, IN), snap-frozen in isopentane over dry ice and then stored at -80°C for gelatin zymographies and further immunohistology.

Histology. Damages were evaluated semi-quantitatively (scale of 0 to 3) for interstitial fibrosis (ci), tubular atrophy (ct), allograft glomerulopathy (cg), mesangial matrix increase (mm), arteriolar hyaline thickening (ah) and vascular fibrous intimal thickening (cv) according to Banff 1997 working classification (BWC) of renal allograft pathology (6, 43). A Banff sum score (0 to 18) was estimated. The trichrome stain (TAFIP) was used to evaluate ci and ct, periodic acid-Schiff (PAS) reaction served for mm and cv while periodic acid-silver methenamine (PASM) helped identifying double contour in cg. Every slide was evaluated by an observer blind to the protocol.

Statistical analysis. Data are expressed as mean \pm SEM unless otherwise stated. A Statistical difference between groups was calculated with *block designed one-way-*

ANOVA and Tukey's *post hoc* comparison test (computer program PRISM 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA). A p value of less than 0.05 were considered statistically different.

RESULTS

Efficacy of the model and Banff sum score. In the present study, we used a rat model of chronic allograft rejection which is able to reproduce histological damages similar to what is found in humans (44-48). As expected, renal allografts developed severe chronic rejection while renal isografts remained almost lesions free (7.21 ± 0.97 vs. 2.25 ± 0.74 , $p < 0.05$). This result confirmed the validity of our model that mimics chronic renal allograft rejection (figure 2-1). Renal allografts developed most of the lesions described in the BWC (6), except for arteriolar hyaline thickening (ah) that was virtually absent. For this reason, hyaline thickening was not considered in the overall Banff sum score.

RAPA and MMF act specifically on allograft glomerulopathy and on vascular fibrous intimal thickening. Analysing the effect of MMF and RAPA on every specific lesion of the Banff working classification helps to understand how they modified the pathophysiology of chronic allograft rejection. MMF and RAPA in combination significantly decreased the severity of interstitial fibrosis (figure 2-1a), allograft glomerulopathy (figure 2-1d) and vascular fibrous intimal thickening (figure 2-1e) in allografted kidneys (figure 2-2). Allograft glomerulopathy and vascular fibrous intimal thickening are recognized as the most specific histological criterions of kidney chronic rejection (6). None of these improvements were observed when MMF or RAPA was used alone. The course of tubular atrophy (figure 2-1b), mesangial matrix increase (figure 2-1c), and arteriolar hyaline thickening was not modified by immunosuppressive agents.

RAPA and MMF in combination prevent chronic allograft rejection. RAPA and MMF administered in combination from week 4 to week 20 post-transplantation prevented the apparition of chronic allograft rejection. Significant statistical and clinical differences in Banff sum score were observed between combination group (4.21 ± 0.74) and allograft control (7.21 ± 0.97) ($p < 0.001$) (figure 2-3). A protective effect seems to persist despite arrest of the medication (week 20) since groups were compared over a follow-up of 50 weeks. This observation suggests that a prompt therapeutic action against early lesions of chronic rejection (which are known to happen between week 4 and 12 in our model) will result in a long-term benefit. In contrast, neither MMF nor RAPA used alone significantly prevented chronic allograft rejection (6.31 ± 1.01 and 7.27 ± 1.14 versus 7.21 ± 0.97 in allograft control). The reduction of Banff sum score observed when both drugs are administered indicates synergy of action.

DISCUSSION

The Banff classification groups together under the term “chronic allograft nephropathy”, the histological findings of chronic rejection, chronic cyclosporine toxicity, hypertensive vascular disease and chronic infection (43). In this study, we had to exclude the criterion arteriolar nodular hyalinosis (ah) from the Banff sum score as this type of lesion was almost never observed. It has been widely recognized that ah is a consequence of chronic cyclosporine toxicity more than immune-mediated chronic rejection itself (49). However, the dosage of CsA we used (1.5 mg/kg/day x 10 days) was not sufficient neither in dosage nor in length to induce classical ah lesions. This finding was previously validated in transplantation studies using short course of CsA in rats (37, 50). In experimental CsA nephrotoxicity, arteriolar change was found neither in Fisher nor in Lewis rat strains when treated with very high dosage of cyclosporine (50 mg/kg/day x 14 days) (51). While acute nephrotoxic effects of CsA can be easily seen in animal models, its chronic effects is observed exclusively in humans (52). In this context, we suppose that ah should not be considered in evaluation of chronic renal allograft rejection on rats when CsA was not used over a long-term.

In this study, we combined both drugs in a recognized model of chronic allograft renal rejection in the rat. MMF has been tested in diverse models of chronic allograft atherosclerosis; rat mechanical arterial injury (38, 53), rat aortic allograft (54-55) or primate cardiac xenograft (56). These studies suggest that MMF might inhibit the early pathological injuries responsible for allograft vascular disease. In a kidney transplantation model similar to ours, MMF was associated with a decrease functional and morphological degeneration associated with chronic rejection (17). RAPA was shown to be a potent inhibitor of chronic vascular disease on mechanic rat carotid injury

(29, 31), rats artery allograft (31) and porcine coronary angioplasty (33-34). RAPA was shown to prevent chronic allograft rejection in cardiac allografts rat model (32, 35-36, 57). Some evidences suggest that RAPA might also reverse chronic vascular disease in such model (36). On a kidney (F344→LEW) transplantation model, SDZ-RAD (orally active rapamycin analogue) reduced proteinuria, glomerulosclerosis, and total Banff sum score over a 24 weeks follow-up (compared to placebo) (37). RAPA is a very promising agent against allograft atherosclerosis. Its efficacy to prevent chronic allograft rejection as a whole phenomenon remains to be established.

MMF and RAPA in association resulted in a drastic reduction of parenchymatous mononuclear cells infiltration as shown by a decrease severity of interstitial fibrosis (figure 2-2b). The combination also protected glomeruli against global ischemic wrinkling and diffuse thickening of their basement membrane (tram track) (figure 2-2a). More importantly, MMF with RAPA inhibited the dense fibrous intimal thickening that was otherwise responsible for severely occlusive vascular disease observed on allograft control kidneys (figures 2-2c and 2-2d). When they compared to allograft control, neither MMF nor RAPA alone showed a clinical significant reduction of Banff sum score. Our results conflict with similar trials using MMF (17) or RAPA alone (37). These differences might be a dose-related effect since concentrations of drug administered in these studies were almost twice as much as those we used [MMF 15 mg/kg/day (17) or RAPA 0.5 mg/kg/day (37) *versus* MMF 20 mg/kg or RAPA 0.8 mg/kg every other day]. The significant reduction of Banff sum score observed in MMF with RAPA treated group suggests that both drugs act synergistically in prevention of chronic allograft rejection.

MMF and RAPA seem to prevent chronic rejection through specific inhibition of both allograft vascular disease and parenchymatous leukocytes infiltration. According to contemporary models, chronic allograft atherosclerosis mainly originates from massive proliferation and migration of VSMC from media to intima with subsequent accumulation of extracellular matrix (7, 10). RAPA is a well known inhibitor of smooth muscle cell migration (30). In vivo, it decreases the production of cytokines PDGF-a, bFGF and TGF-b implicated in activation of VSMC (29, 37, 53). In vitro, RAPA inhibits synthesis of DNA on rat, pig, and human activated VSMC (27, 29, 33). It has been hypothesized that RAPA owes its efficacy to a block of the final biochemical pathway common to all VSMC mitogens (21, 28, 33). In a same way, MMF was proven to inhibit in vitro and in vivo the proliferation of VSMC, fibroblasts, and endothelial cells on humans (58), and rats (53-55, 59). The protection provided by MMF combined with RAPA against vascular occlusive disease is thought to prevent further ischemic degeneration of glomerules and tubules responsible for organic failure.

The reduction of parenchymatous mononuclear cell infiltration observed in MMF and RAPA treated animals could be explained through a modulatory effect of these drugs on cell-adhesion molecules. In the rat renal allografts, RAPA is known to down-regulate the expression of ICAM-1 and VCAM (37), while MMF decreases the expression of ICAM-1 and VLA-4 (17). As a consequence, the diminution of invading leukocytes should decrease the massive release of inflammatory proteins and the subsequent cytotoxic destruction of interstitial parenchyma.

Regardless their immunosuppressive activity, MMF and RAPA seem to act against non-immune risk factors of chronic rejection. Both SDZ-RAD and MMF decreased damages and facilitated endothelial repair in rats models of ischemia-

reperfusion injury (60-61). Clinically, it is expected that the use of MMF instead of cyclosporine in kidneys grafted patients will result in a lower incidence of high blood pressure, elevated blood cholesterol and overall chronic allograft rejection (62).

Over a follow-up of 50 weeks, the combination of MMF with RAPA resulted in a remarkable protective effect against chronic allograft rejection even though animals were treated only for a brief course after transplantation. In the F344 to LEW kidney transplantation model, most of the functional and morphological changes characteristic of chronic rejection become progressively apparent between weeks 4 and 12 after graft (46). Surprisingly, these early pathological lesions were found to be reversible when allograft kidneys were retransplanted into a syngeneic host (F344→LEW→F344) before 12 weeks (63). Over this critical time point, retransplantation could not reverse chronic rejection process and the graft destruction intensified. This elegant experiment supports the notion that early pathologic events happening soon after transplantation are critical to the genesis of chronic rejection (9, 17, 46, 63). In our study, prompt administration of MMF with RAPA might have block the progression of early lesions into definitive scarring damages of chronic allograft rejection. This hypothesis suggests that prophylaxis against chronic rejection should begin as soon as possible after transplantation.

In conclusion, this study shows that MMF and RAPA in combination are synergistic in prevention of chronic allograft rejection of the kidney in a rat model. To our knowledge, this is the first study to clearly demonstrate the efficacy of a treatment in prevention of chronic allograft kidney rejection with this combination on animals. Because of their multiple properties against immune and non-immune mediated injuries, MMF and RAPA now stand as the first molecules of a new class of medication: anti-chronic rejection drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Walter Schürch, Department of Pathology, CHUM, University of Montreal, for his invaluable advice for the completion of this study; and Dr. Marie-Claude Guertin for assistance with statistical analysis.

REFERENCES

1. Ullmann E. Experimentelle nierentransplantation. *Wein Klin. Wochenschr* 1902; 15: 281.
2. Porter KA, Thompson WB, Owen K, Kenyon JR, Mowbray JF, Peart WS. Obliterative vascular changes in four human homotransplants. *British Medical Journal* 1963; 2: 639.
3. Häyry P, Mennander A, Yilmaz S, et al. Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection. *The Clinical Investigator* 1992; 70: 780.
4. Terasaki PI, Cecka JM, Cho Y, et al. Overview. In: Terasaki PI, ed. *Clinical transplants*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Lab, 1990: 585.
5. Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ, et al. Causes of Renal Allograft Loss : Progress in the 1980s, Challenges for the 1990s. *Annals of Surgery* 1991; 214: 679.
6. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff working classification of renal allograft pathology. *Kidney International* 1999; 55: 713.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *New England Journal of Medicine* 1986; 314: 488.
8. Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 313.
9. Nagano H, Tilney NL. Chronic allograft failure : the clinical problem. *American Journal of Medical Sciences* 1997; 313: 305.
10. Häyry P. Pathophysiology of chronic rejection. *Transplantation Proceedings* 1995; 28: S7.
11. Beckingham IJ, Stubington SR, Dennis MJS, Bishop MC, Rigg KM. Experimental studies of the pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transplantation Proceedings* 1995; 27: 2129.

12. Suzuki S, Kimura T, Ando K, et al. Antitumor activity of mycophenolic acid. *Journal of Antibiotics* 1969; 22: 297.
13. Sievers TM, Rossi SJ, Ghobrial RM, et al. Mycophenolate mofetil. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 1178.
14. Benfield MR, Stablein D, Tejani A. Trends in immunosuppressive therapy: a report of the north american pediatric renal transplantation cooperative study (NAPRTCS). *Pediatric Transplantation* 1999; 3: 27.
15. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. *Transplantation* 1999; 68: 391.
16. US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation. *American Journal of Kidney Diseases* 1999; 34: 296.
17. Azuma H, Binder J, Heemann U, et al. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59: 460.
18. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* 1975; 28: 712.
19. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd protein kinase. *Cell* 1992; 69: 1227.
20. Price DJ, Grove RJ, Calvo V, Avruch J, Bierer BE. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 1992; 257: 973.

21. Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J. p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 26776.
22. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, et al. Interleukine-2-mediated elimination of the p^{27kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994; 372: 570.
23. Molnar-Kimber KL. Mechanism of action of rapamycin (sirolimus, rapamune). *Transplantation Proceedings* 1996; 28: 964.
24. Kahan BD, for the USA Rapamune Study Group. Pivotal phase III multicenter, randomized blinded trial of sirolimus versus azathioprine in combination with cyclosporine and prednisone in primary renal transplants. *Transplantation* 1999; 67: S559.
25. MacDonald AS, for the Rapamune Global Study Group. A randomised trial of sirolimus, cyclosporine, and prednisone vs cyclosporine-prednisone alone in recipients of mismatched first kidney grafts: results at one year. *Transplantation* 1999; 67: S545.
26. Mathew TH, for the Rapamune Global study Group. The safety and efficacy of sirolimus/cyclosporine for the prevention of acute rejection in primary renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; 69: S360.
27. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, et al. Effects of rapamycine on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. *Transplantation* 1995; 59: 390.
28. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, et al. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1995; 76: 412.
29. Morris RE, Cao W, Huang X, et al. Rapamycin (Sirolimus) inhibits vascular smooth muscle DNA synthesis in vitro and suppresses narrowing in arterial allografts and in

- balloon-injured carotid arteries: evidence that rapamycin antagonizes growth factor action on immune and nonimmune cells. *Transplantation Proceedings* 1995; 27: 430.
30. Poon M, Marx SO, Gallo R, et al. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 2277.
 31. Gregory CR, Huie P, Billingham ME, et al. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. *Transplantation* 1993; 55: 1409.
 32. Morris RE, Huang X, Gregory CR, et al. Studies in experimental models of chronic rejection: use of rapamycine (sirolimus) and isoxazole derivatives (leflunomide and its analogue) for the suppression of graft vascular disease and obliterative bronchiolitis. *Transplantation Proceedings* 1995; 27: 2068.
 33. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by regulators of cell cycle. *Circulation* 1999; 99: 2164.
 34. Burke SE, Lubbers NL, Chen YW, et al. Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in Yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1999; 33: 829.
 35. Schmid C, Heemann U et Azuma H, et al. Comparison of rapamycin, RS 61443, cyclosporine, and low-dose heparin as treatment for transplant vasculopathy in a rat model of chronic allograft rejection. *Transplantation Proceedings* 1995; 27: 438.
 36. Poston RS, Billingham M, Hoyt EG et al. Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model. *Circulation* 1999; 100: 67.
 37. Viklicky O, Zou H, Müller V, et al. SDZ-RAD prevents manifestation of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 2000; 69: 497.

38. Gregory CR, Huang X, Pratt RE, et al. Treatment with rapamycin and mycophenolate mofetil reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995; 59: 655.
39. Vu MD, Qi S, Xu D, et al. Synergistic effect of mycophenolate mofetil and sirolimus in prevention of acute heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1998; 66: 1575.
40. Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research: with special reference to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965; 58: 904.
41. Hancock WH, Withley WD, Tullius SG, et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56: 643.
42. Diamond JR, Tilney NL, Frye J, et al. Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1992; 54: 710.
43. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International* 1993; 44: 411.
44. White E, Hildemann WH, Mullen Y. Chronic kidney allograft reactions in rats. *Transplantation* 1969; 8: 602.
45. Tanabe K, Toma H, Sagara R, et al. Experimental model of chronic renal allograft rejection in rats and therapeutic efficacy of a new selective thromboxane A₂ (TXA₂) synthetase inhibitor (CV-4151). *Transplantation Proceedings* 1989; 21: 293.
46. Hancock WH, Withley WD, Tullius SG, et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56: 643.

47. Paul LC. Experimental models of chronic renal allograft rejection. *Transplantation Proceedings* 1996; 27: 2126.
48. Guttman RD, Forbes C, Zheng SX. The pathophysiology of chronic rejection. *The American Journal of Medical Sciences* 1997; 313: 302.
49. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. Morphological criteria of chronic rejection : differential diagnosis, including cyclosporine nephropathy. *Transplantation Proceedings* 1993; 35: 2031.
50. Tullius SG, Heemann U, Hancock WW, et al. Long-term kidney isograft develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Annals of Surgery* 1994; 220, 425.
51. Ryffel B, Siegl H, Theil G, et al. Experimental cyclosporine nephrotoxicity. In : Burdick JF, Racusen LC, Solez K and Williams GM, eds. *Kidney transplant rejection*. New-York: Marcel Dekker Inc, 1992; 601.
52. Keown PA, Stiller CR, Wallace C. Nephrotoxicity of cyclosporine A. In : Burdick JF, Racusen LC, Solez K and Williams GM, eds. *Kidney transplant rejection*. New-York: Marcel Dekker Inc, 1992; 637.
53. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, et al. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplantation Proceedings* 1993; 25: 770.
54. Steele DM, Hullet DA, Bechstein WO, et al. Effects of immunosuppressive therapy on the rat aortic allograft model. *Transplantation Proceedings* 1993; 25: 754.
55. Räsänen-Sokolowski A, Vuoristo P, Myllarniemi M, et al. Mycophenolate mofetil inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts. *Transplantation Immunology* 1995; 3: 342.

56. O'Hair DP, McManus RP, Komorowski R. Inhibition of chronic vascular rejection in primate cardiac xenografts using mycophenolate mofetil. *Annals of Thoracic Surgery* 1994; 58: 1311.
57. Meiser BM, Billingham ME, Morris RE. Effect of cyclosporine, FK 506 and rapamycin on graft-vessel disease. *Lancet* 1991; 338: 1297.
58. Eugui EM, Almquist S, Mueller CD, et al. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxy-guanosine nucleotid depletion. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1991; 33: 161.
59. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunossuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and non-human primate recipients of heart allograft. *Transplantation Proceedings* 1991; 23: S19.
60. Schuurman HJ, Pally C, Weckbecker G, et al. SDZ RAD inhibits ischemia-induced vascular remodeling. *Transplantation Proceedings* 1999; 31: 1024.
61. Jones EA, Shoskes DA. The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavanoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. *Journal of Urology* 2000; 163: 999.
62. Keunecke C, Rothenpieler U, Zanker B, et al. Mycophenolate mofetil monotherapy: an example of safe nephrotoxicity/aterogenicity-free immunosuppressive maintenance regimen in a selected group of kidney-transplanted patients. *Transplantation Proceedings* 2000; 32: S6.
63. Tullius SG, Hancock WW, Heemann UW, et al. Reversibility of chronic renal allograft rejection : critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependant and immune independant phases of progressive Injury. *Transplantation* 1994; 58: 93.

FIGURE LEGENDS

Figure 2-1. Effect of MMF and RAPA on histological criterions of the Banff working classification.

Figure 2-2. Photomicrographs representative of the effect of MMF and RAPA in combination on chronic renal allograft rejection.

Figure 2-3. Effect of MMF and RAPA on chronic renal allograft rejection the rat (F344→LEW).

(Tables of data are available in annexe 3)

Figure 2-1. Effects of RAPA and MMF on histological criteria of the Banff working classification.

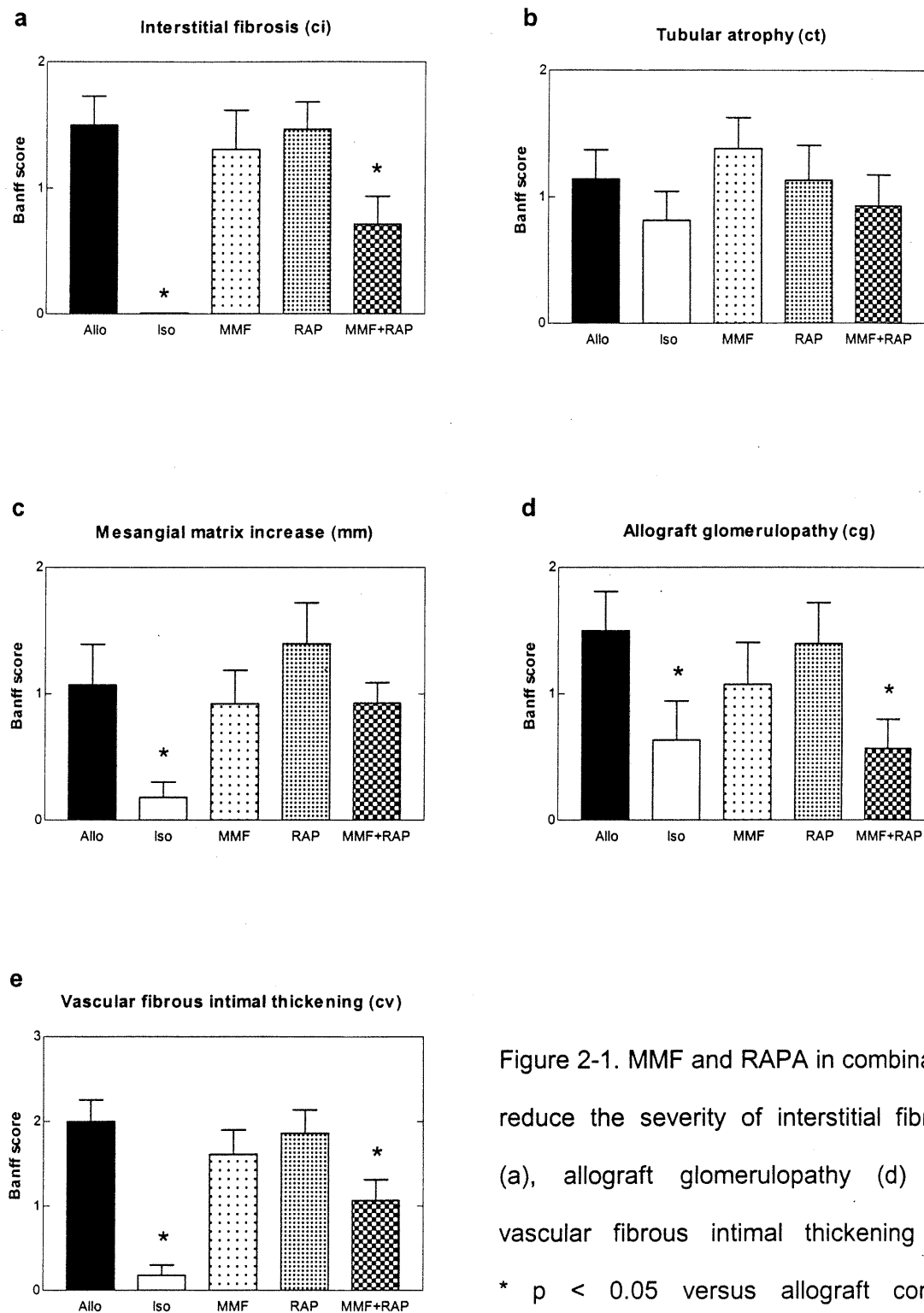


Figure 2-1. MMF and RAPA in combination reduce the severity of interstitial fibrosis (a), allograft glomerulopathy (d) and vascular fibrous intimal thickening (e). * $p < 0.05$ versus allograft control. (Table of data is available in annexe 3).

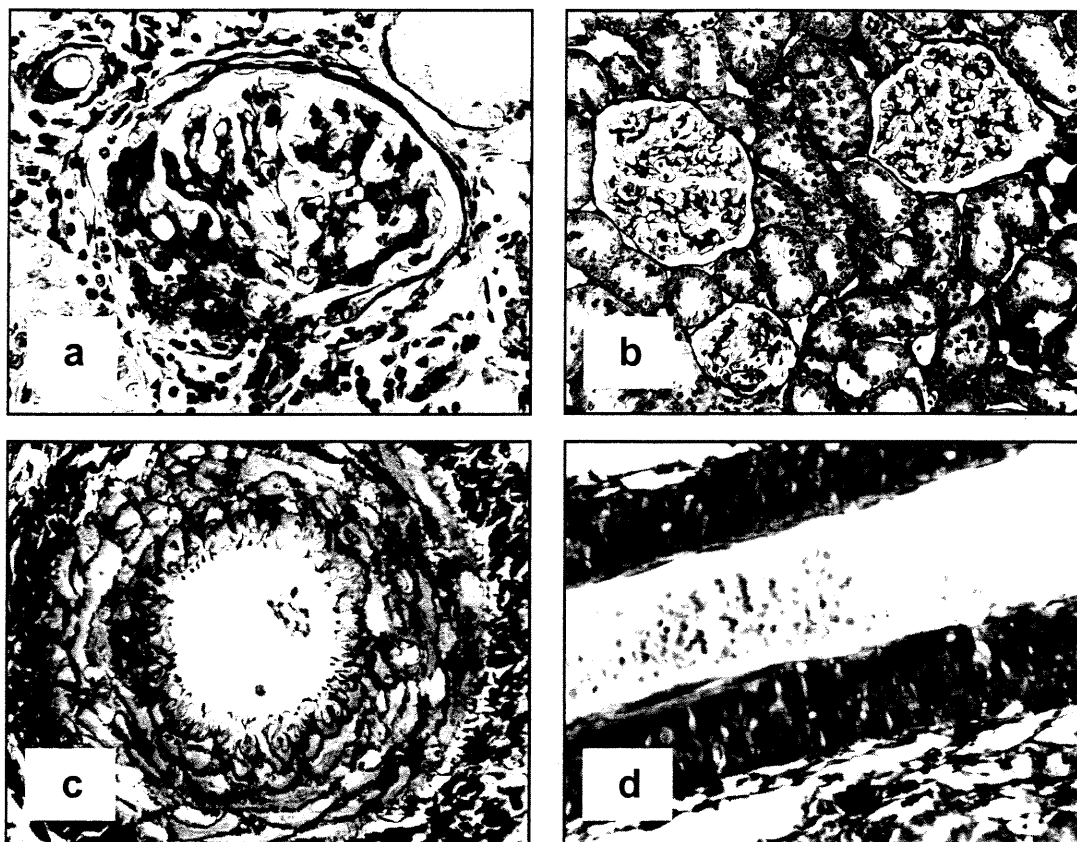


FIGURE 2-2. Photomicrographs representative of the effect of MMF and RAPA in combination on chronic renal allograft rejection. a) The architecture of the glomerulus is distorted by an increased mesangial matrix and a diffuse duplication of the basement membranes, the so-called "tram track." The right half of the glomerulus is less severely involved. (Allograft control group, week 45. PASM, X400). b) Section of normal glomeruli and tubules in a 45-week-old allograft treated with MMF and RAPA, showing minimal atrophy and absence of interstitial fibrosis. (MMF + RAPA group, week 45. PASM, X250). c) Normal artery in a rat treated with MMF and RAPA. (MMF + RAPA group, week 45. TAFIP, X400). d) Severe chronic allograft vascular disease (arteriosclerosis) with multiple duplications (lamellae) of the subintima and diffuse accumulation of extracellular matrix in the media. (Allograft control group, week 40. PASM, X400).

Figure 2-3. Effects of MMF and RAPA on chronic allograft rejection the rat (F344→LEW).

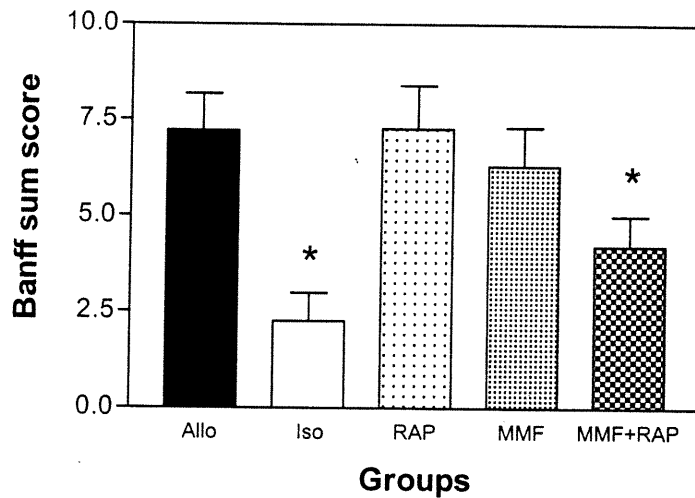


Figure 2-3. Effect of MMF and RAPA on chronic allograft rejection in the rat (F344 → LEW). Group treated with MMF and RAPA showed a Banff sum score statistically lower than allograft control group. (Data collected from week 4 to 50). * $p < 0.05$ versus allograft control. (Table of data is available in annexe 3).

CHAPITRE III

DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1 CRITIQUE DE LA MÉTHODOLOGIE

JUSTIFICATION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL

L'utilisation du rat comme modèle expérimental présente plusieurs avantages: son faible coût, un minimum d'entretien ainsi que le peu d'espace nécessaire. En transplantation, le vaste répertoire de lignées disponibles chez cette espèce permet l'utilisation de multiples combinaisons, rendant possible autant de variations sur la forme que prendra la réponse du système immunitaire. Aussi, l'expérience acquise avec certaines lignées assure une grande uniformité des résultats.

La compréhension contemporaine du rejet chronique est grandement redevable au développement de lignées de rats génétiquement contrôlées. Lors d'une allogreffe, l'intensité du rejet de l'organe dépend de la disparité génomique entre le donneur et le receveur. Ainsi, plus la divergence du complexe majeur d'histocompatibilité est grande, plus la réponse du système immunitaire sera intense. Certaines combinaisons engendrent des rejets tellement aigus que l'organe et son receveur ne survivent pas assez longtemps pour développer un rejet chronique.

Dès 1969, la combinaison des lignées de rats Fisher (F344) et Lewis (LEW) est rapportée comme un modèle reproductible de rejet chronique (White *et al.*, 1969). Le rat Fisher (RT1^{lvr}) est un variant haplotype du rat Lewis (RT1^l) au niveau de RT1-E/C. Les deux lignées possèdent des complexes majeurs d'histocompatibilité RT1-A et RT1-B identiques (Guttman *et al.*, 1994). Cependant, elles diffèrent sur au moins deux *loci* RT1-C et sur de multiples *loci* RT6 (non-CMH) (Hancock *et al.*, 1993). Lors d'une transplantation, la faible disparité génomique entre F344 et LEW induit une réponse immunitaire atténuée qui permet au greffon de survivre suffisamment longtemps pour développer les lésions typiques du rejet chronique (Guttman *et al.*, 1997).

Dans cette étude, il aurait été utile de documenter la variation de la protéinurie et de la créatinémie selon les différentes stratégies immunosuppressives employées. Ces marqueurs reflètent de façon non-spécifique le rejet chronique et sont largement utilisés en clinique pour le suivi des patients transplantés.

LIMITES DE L'ÉTUDE HISTOLOGIQUE

Tout diagnostic de rejet chronique du rein doit être confirmé par une biopsie. Reconnue comme l'étalon or, la «*Banff Working Classification of Renal Allograft Pathology*» propose une échelle semi-quantitative regroupant six critères histologiques spécifiques pour le rejet chronique (cf. annexe 5-II). Pour chaque critère, un pointage (de 0 à 3+) proportionnel à l'intensité des dommages est attribué. La sommation des pointages permet d'obtenir le «*Banff sum score*» qui assure le diagnostic de rejet chronique lorsqu'il est supérieur à 4 ou 5 sur 18 (Racusen *et al.*, 1999).

Au cours de cette étude, tous les critères histologiques du rejet chronique décrits dans la classification de Banff ont été observés, à l'exception de l'hyalinose nodulaire artériolaire (ah). Précisons que la classification de Banff regroupe sous le terme «*chronic allograft nephropathy*» les lésions résultantes du rejet chronique, de la toxicité à la cyclosporine, de la maladie vasculaire hypertensive et de l'infection chronique (Solez *et al.*, 1993).

Il est largement reconnu que l'hyalinose nodulaire artériolaire est la conséquence d'une toxicité chronique à la CsA plutôt qu'un effet du système immunitaire comme tel (Mihatsch *et al.*, 1993). Or, la dose de CsA administrée dans notre étude (1.5 mg/kg/d durant 10 jours) n'est pas suffisante, ni en concentration ou en durée, pour induire l'hyalinose nodulaire artériolaire. Ceci a préalablement été constaté chez le rat au cours d'études utilisant des doses équivalentes de CsA (Hancock *et al.*, 1993. Tullius *et al.*, 1994. Viklicky *et al.*, 2000). Lors d'une étude de toxicologie, aucune lésion artériolaire n'a été observée chez les lignées Fisher ou Lewis en dépit de doses massives de CsA (50 mg/kg/d durant 14 jours) (Ryffel *et al.*, 1992). Tandis que les effets aigus de la CsA sont observables chez les rongeurs, les effets chroniques n'ont été rapportés que chez l'humain (Keown *et al.*, 1992).

Dans ce contexte, il semble inapproprié de retenir l'hyalinose nodulaire artériolaire comme critère histologique lors de l'évaluation du rejet chronique chez le rat. Qui plus est, l'utilisation sans cesse décroissante de la CsA en transplantation clinique oblige à emploi vigilant et approprié de ce critère chez l'homme.

LIMITES DE LA MÉTHODE STATISTIQUE

L'étude présentée dans ce mémoire est constituée d'une cohorte initiale de 90 rats observés sur 50 semaines et comptant pour un suivi total de plus de 9300 jour-animaux.

Le devis en grappe et la comparaison intra-groupe

En statistique, la capacité d'un test à détecter une différence (puissance) est proportionnelle à la taille (n) des échantillons comparés. Classiquement, les études de transplantation consignent en grappes (*clusters*) l'exécution des sacrifices animaux (figure 3-1). La mise en grappe consiste à sous-grouper les éléments d'un même ensemble afin d'obtenir des échantillons avec un nombre « n » significatif. En général, la mise en grappe se fait avant et après l'introduction d'une variable externe dont on désire quantifier l'effet. Ce devis permet l'utilisation de tests statistiques pour comparer l'effet de la variable externe sur les diverses grappes d'un même ensemble (comparaison intra-groupe).

Prenons un exemple. Supposons que nous désirions étudier l'impact d'un nouveau médicament (la variable externe) sur le poids du cerveau et que nous disposions pour ce faire d'une cohorte de 15 chiens (l'ensemble). Afin d'avoir la puissance nécessaire pour la comparaison statistique, il est calculé que des groupes de 5 animaux seront nécessaires. Ainsi, 5 chiens sont sacrifiés au début, 5 autres à mi-chemin et 5 à la fin du traitement (la mise en grappe). Après chaque sacrifice, le cerveau est soigneusement pesé (l'effet). À la fin de l'étude, on calcule la moyenne du poids des cerveaux pour chacune des grappes et on compare ces moyennes à l'aide du test statistique préalablement convenu.

Cette méthode a l'indéniable avantage de permettre une comparaison statistique intra-groupe avant et après une intervention.

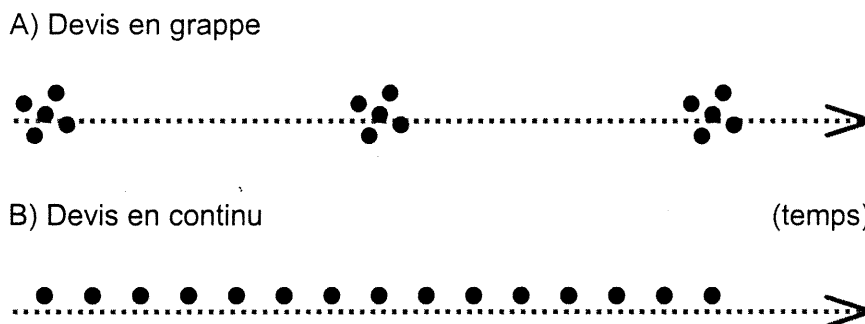


FIGURE 3-1. Répartition chronologique des sacrifices. Chaque point sur l'échelle du temps représente un sacrifice. A) Le devis en grappe permet la comparaison statistique intra-groupe avant et après l'introduction d'une variable externe. B) Le devis en continu permet le suivi dynamique d'un phénomène en évolution.

Le devis en continu

Le patron de notre étude diverge du traditionnel devis en grappe. Pour chacun des cinq groupes traités, un animal choisi au hasard a été sacrifié selon le calendrier suivant : semaine 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 puis 25, 35, 40, 45, 50. Les sacrifices à intervalles rapprochés, par opposition aux grappes, permettent un suivi plus dynamique de la genèse du rejet chronique. De plus, le devis en continu permet de varier le rythme des observations selon la nécessité. Par exemple, il est connu que dans le modèle de transplantation F344 → LEW, la majorité des lésions du rejet chronique se manifeste et se consolide entre les semaines 4 et 20 post-transplantation (Hancock *et al.*, 1993). Un plus grand nombre de sacrifices dans cette période s'avérait donc nécessaire.

Malgré l'incontestable bénéfice de la comparaison intra-groupe, il eut été hasardeux d'opter pour le devis en grappe dans notre étude : nous étions en terre inconnue! Cette exclamation sous-entend quelques appréhensions. D'abord, lors d'un

suivi post-greffe du rein prolongé, la mortalité spontanée des animaux est difficile, voire impossible à anticiper. À mesure que le temps progresse, cette mortalité amenuise les chances d'avoir le nombre de rats nécessaire à la formation de la prochaine grappe. En choisissant le devis en grappe, une grande quantité d'informations aurait pu être perdue. Précisons que la littérature est quasi exempte de donnée sur les suivis post-transplantation du rein chez le rat au-delà de 20 à 30 semaines. En rétrospective, force est de constater qu'il s'agissait là d'une crainte injustifiée car la mortalité spontanée a été minime pour tous les groupes de l'étude (inférieure à 10 %).

ANOVA à mesures répétées

Le test statistique ANOVA est utilisé pour comparer les moyennes de plus de deux groupes. Il est possible d'accroître la puissance de ce test en appariant ensemble des sujets aux caractéristiques similaires. ANOVA à mesures répétées (*block designed one-way ANOVA*) permet un tel appariement (ou *match*). L'utilisation de ce test n'est possible que si les sujets sont indépendants les uns des autres et que les données analysées suivent une distribution gaussienne.

L'appariement a le net avantage d'éliminer les facteurs dits confondants¹ qui contribuent à la variation entre les groupes de l'étude (Dawson-Saunders et Trapp, 1994). ANOVA à mesures répétées permet de contrôler le biais de variabilité expérimentale entre les individus parce qu'il scinde la variabilité inter-sujet de la variabilité intra-sujet. Concrètement, nous avons jumelé entre-eux les pointages de Banff obtenus pour tous les rats sacrifiés à une même date. L'utilisation de ce test aura permis d'éliminer les facteurs confondants de nature chronologique qui auraient pu fausser à notre insu les résultats de l'étude.

¹ Au moment de comparer deux groupes, le facteur confondant est une variable qui a plus de chances de se retrouver dans un groupe que dans l'autre et qui influence le résultat de l'étude.

Si le devis en continu et le test ANOVA à mesures répétées rendent plus certaines nos conclusions statistiques, ils en limitent cependant la portée. Il n'est possible de tirer que des conclusions issues de la comparaison inter-groupe et portant sur l'ensemble du suivi. Comme nous le verrons dans la prochaine section, cette limite influence grandement la nature de nos conclusions.

3.2 DISCUSSION DES RÉSULTATS

EFFICACITÉ DU MODÈLE

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de rejet chronique capable de générer des lésions histologiques similaires à celles retrouvées en transplantation du rein chez l'homme (Hancock *et al.*, 1993. Paul, 1996. Guttman *et al.*, 1997). À l'histologie, les témoins allogreffes ont développé un rejet chronique sévère tandis que les témoins isogreffes n'ont présenté que des lésions minimales (pointage de Banff respectifs de 7.21 ± 0.97 et 2.25 ± 0.74 , $p < 0.01$).

MMF ET RAPA EN MONOTHÉRAPIE

En moyenne, les animaux traités avec un seul médicament, soit le MMF ou la RAPA, n'ont pas montré d'amélioration cliniquement ou statistiquement significative de leur pointage de Banff par rapport aux témoins allogreffes (pointages de Banff respectifs de 6.31 ± 1.01 , 7.27 ± 1.14 versus 7.21 ± 0.97 , $p > 0.05$) (tableau 2-1 et figure 2-1). Ces résultats vont à l'encontre d'études similaires utilisant le MMF (Azuma *et al.*, 1995) et la RAPA (Viklicky *et al.*, 2000) où un effet bénéfique contre le rejet chronique avait été observé. Cette divergence pourrait n'être qu'une question de dose puisque les quantités d'immunosuppresseurs administrées dans ces études (MMF 15 mg/kg/d ou SDZ-RAD 0.5 mg/kg/d) étaient près de deux fois supérieures à celles reçues par nos animaux (MMF 20 mg/kg ou RAPA 0.8 mg/kg à intervalle de deux jours).

Précisons que l'étude de Viklicky *et al.* (2000) employait le SDZ-RAD qui est un analogue oral de la rapamycine développé pour en accroître la biodisponibilité (Schuurman *et al.*, 1997. Schuler W *et al.*, 1997). Si une cinétique plus stable du SDZ-RAD peut expliquer en partie la divergence des résultats observés, l'effet protecteur rapporté par Viklicki demeure néanmoins équivoque. Si l'on applique strictement les critères de la classification de Banff à son étude, le groupe témoin allogreffe n'a pas

développé de rejet chronique² (pointage de Banff de 3.1 ± 0.8 , exprimé en moyenne \pm SEM, suivi de 24 semaines). Dans ce contexte, l'amointrissement du pointage de Banff observé pour le groupe traité avec le SDZ-RAD (1.3 ± 0.5) perd une part de la pertinence clinique qu'il aurait été possible de lui attribuer autrement.

MMF ET RAPA EN ASSOCIATION PRÉVIENNENT LE REJET CHRONIQUE : OÙ ET QUAND ?

MMF et RAPA administrés en association entre les semaines 4 et 20 post-transplantation préviennent le rejet chronique du rein chez le rat. Il existe une différence cliniquement et statistiquement significative entre le groupe traité avec le MMF associé à la RAPA et le témoin allogreffe (pointages de Banff respectifs de 4.21 ± 0.74 versus 7.21 ± 0.97 , $p < 0.01$) (tableau 2-I et figure 2-1).

À ce jour, très peu de choses sont connues sur l'association du MMF et de la RAPA. Notre équipe de recherche a préalablement démontré que le MMF et la RAPA prolonge de façon synergique la survie des allogreffes rénales chez le rat (Vu *et al.*, 1998). Une étude *in vivo* chez le rat a décrit que l'association du MMF et de la RAPA favorise le remplacement endothélial et diminue la resténose post-angioplastie carotidienne (Gregory *et al.*, 1995). En transplantation clinique, il semble qu'un traitement associant RAPA + MMF + corticostéroïdes entraîne une incidence de rejet aigu et une survie du couple sujet-greffon similaires à celles de la triple thérapie CsA + MMF + corticostéroïdes (Kreis *et al.*, 2000).

Le MMF et la RAPA inhibent le rejet chronique en amoindrissant la sévérité de la fibrose interstitielle, de la glomérulopathie et, plus important que tout, de la vasculopathie allogreffe (tableau 2-II, figure 2-2 et figure 2-3). Aucun effet statistiquement significatif n'a été observé pour l'hypertrophie de la matrice mésangiale et pour l'atrophie tubulaire. L'effet bénéfique observé sur le maladie vasculaire du rejet chronique entretient l'espoir né des modèles *in vitro* et *in vivo*.

² Un pointage de Banff supérieur à 4 ou 5 est requis pour diagnostiquer un rejet chronique (Racusen *et al.*, 1999).

Vraisemblablement, le MMF et la RAPA préviennent la fibrose interstitielle grâce à leur vertu immunosuppressive ainsi qu'à leurs propriétés inhibitrices sur l'expression des molécules d'adhésion cellulaire et sur la sécrétion de diverses cytokines (cf. section 3-3).

Notion de période critique

Sur un suivi de 50 semaines, l'association du MMF et de la RAPA s'est avérée bénéfique bien que les animaux aient été traités exclusivement entre les semaines 4 et 20. Cette observation laisse croire que l'effet anti-rejet chronique persiste au-delà de la présence tissulaire des molécules. Il se pourrait bien que le moment auquel on administre les immunosuppresseurs soit aussi important que les médicaments eux-mêmes.

Une étude préalablement réalisée à l'aide du modèle de rat F344→LEW démontre que la majorité des lésions histologiques à l'origine du rejet chronique du rein se manifestent entre 4 et 12 semaines après la greffe (Hancock *et al.*, 1993). Étonnamment, ces lésions précoces s'avèrent réversibles si les reins allogreffes sont re-transplantés dans de nouveaux receveurs isogreffes (F344→LEW→F344) à l'intérieur d'un délai de douze semaines (Tullius *et al.*, 1994). Passé ce point, la re-transplantation est inefficace et les organes progressent inexorablement vers le rejet chronique.

Cette élégante expérience suggère l'existence d'un point critique où les lésions précoces se consolident en cicatrisations irréversibles. Sous une perspective de prévention, cette hypothèse supporte la nécessité d'une intervention thérapeutique suffisamment prompte pour empêcher la conversion, voire même l'apparition, des lésions initiales de rejet chronique.

Étant donné que nous avons administré le MMF et la RAPA entre les semaines 4 et 12 post-transplantation, il est possible que l'effet bénéfique prolongé de la double-thérapie soit attribuable à un ralentissement dans la progression des lésions précoces du rejet chronique. En considérant l'ensemble des propriétés reconnues au mycophénolate mofétil et à la rapamycine (cf. tableau 1-IX et tableau 1-X), l'hypothèse semble encore plus probable. Cependant, il est impossible d'élever cette supposition au

rang de conclusion. En effet, nous ne disposons pas d'échantillons tissulaires antérieurs à la semaine 4. Si tel avait été le cas, une comparaison histologique avant et après l'instauration du traitement aurait permis d'objectiver tout changement significatif. Il aurait aussi fallu opter pour un devis statistique en grappe plutôt qu'en continu.

3.3 LA PHYSIOPATHOLOGIE DU REJET CHRONIQUE REVISITÉE

Forte des quelques découvertes issues de nos expérimentations et appuyée par les évidences littéraires compilées dans ce mémoire, cette section propose une mise à jour de la physiopathologie du rejet chronique.

Les hypothèses contemporaines tentant d'expliquer le rejet chronique gravitent autour de la vasculopathie allogreffe. Pris isolément, ce canevas s'éloigne de la finalité pathologique du rejet chronique du rein qui est la détérioration de la fonction filtre de l'organe. Le schéma proposé ici tente de resituer le néphron, véritable unité fonctionnelle du rein, au cœur des manifestations.

En association, le MMF et la RAPA préviennent le rejet chronique grâce à une inhibition de la fibrose interstitielle, de la vasculopathie allogreffe et de la glomérulopathie allogreffe. Tel que nous le concevons, le rejet chronique origine de la convergence de deux mouvements exclusifs : l'occlusion vasculaire progressive et l'infiltration leucocytaire parenchymateuse (figure 3-2).

La fibrose interstitielle est le reflet de l'infiltration des leucocytes dans les tissus de l'organe transplanté. Par le biais d'une sécrétion massive de protéines inflammatoires, l'insurrection cellulaire est responsable d'une dégénérescence cytotoxique des éléments constitutifs du parenchyme, incluant le glomérule et le tubule.

La vasculopathie allogreffe est entretenue conjointement par les agressions mécaniques intrinsèques à la transplantation et par les attaques soutenues du système immunitaire. L'oblitération vasculaire progressive qui en résulte est responsable d'une dégénérescence ischémique des structures irriguées en aval.

Dans ce contexte, la notion de mouvements convergents sous-entend que la vasculopathie allogreffe et l'infiltration leucocytaire se rejoignent vers une résultante finale commune qui est la destruction du néphron. Si l'occlusion vasculaire et la sécrétion de protéines inflammatoires sont conjointement inhibées, les glomérules et les tubules seront épargnés. C'est dans cette hypothèse que réside par ailleurs tout l'attrait du mycophénolate mofétil et de la rapamycine. □

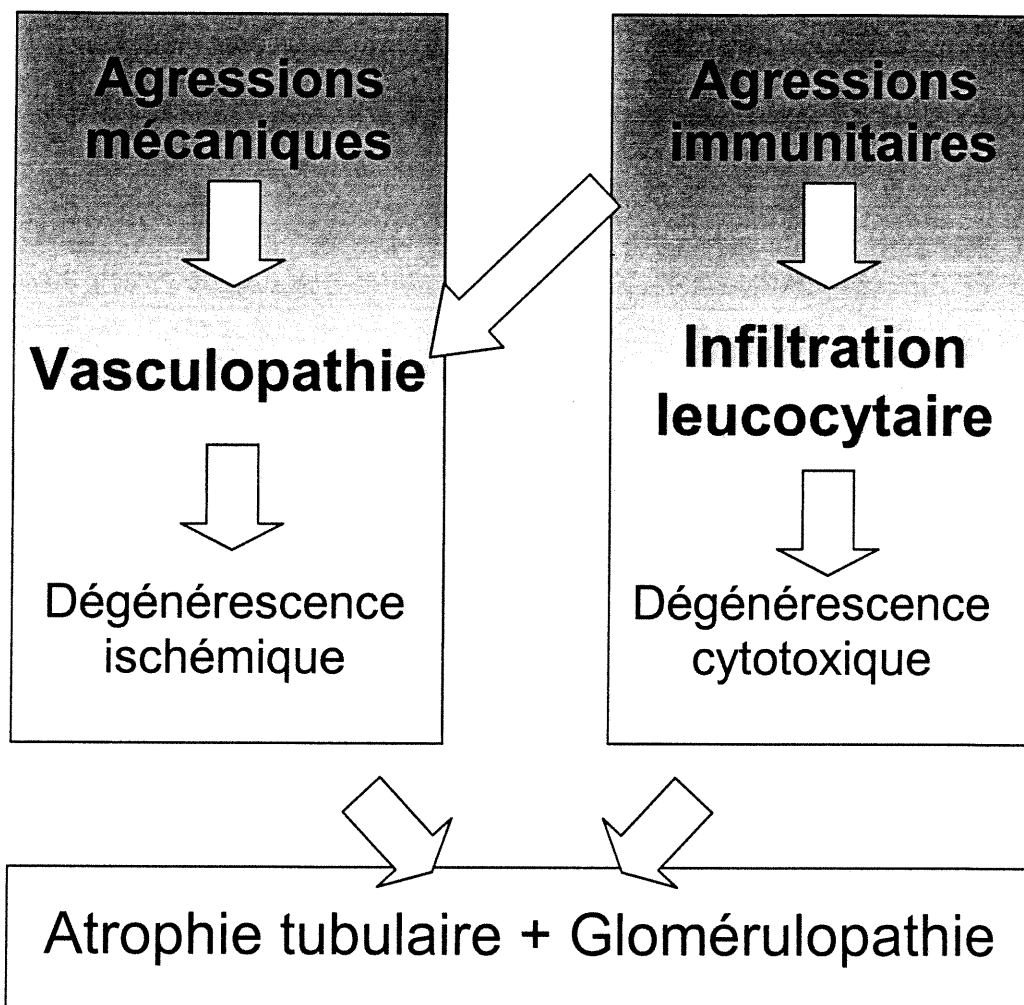


FIGURE 3-2. Modèle convergent de la physiopathologie du rejet chronique. La vasculopathie allogreffe et l'infiltration leucocytaire parenchymateuse aboutissent à la destruction du néphron. En plus d'illustrer la dualité des agressions de la vasculopathie allogreffe, le schéma situe cette dernière au rang de pathologie intermédiaire. Le schéma insiste également sur l'importance de la dégénérescence cytotoxique.

3.4 PERSPECTIVES

En transplantation, la pénurie d'organes est un phénomène planétaire. Le rejet chronique du rein compte parmi les principales causes de perte des allogreffes. Une thérapie capable de prévenir le rejet chronique constitue un espoir concret d'amointrissement la morbidité et la souffrance humaine reliées à l'attente d'un organe.

Dans ce contexte, il convient de se demander si l'effet bénéfique du mycophénolate mofétil et la rapamycine observé chez le rat sera reproductible chez d'autres espèces, en particulier chez l'homme. Parallèlement, des études seront nécessaires afin de déterminer si les deux immunosuppresseurs préviennent le rejet chronique lors de la greffe d'organes solides autres que le rein.

L'utilisation du mycophénolate mofétil et de la rapamycine pourrait bien trouver des nouvelles applications médicales. Plusieurs pathologies retrouvées en clinique sont issues de mécanismes similaires à ceux impliqués dans la maladie vasculaire de l'allogreffe. C'est notamment le cas de l'occlusion des prothèses endovasculaires du shunt porto-systémique (*TIPS*) ou encore de la resténose post-angioplastie coronarienne qui sont responsables d'échecs thérapeutiques fréquents. Plusieurs études sont d'ailleurs en cours chez l'humain afin d'évaluer l'efficacité de la rapamycine à prévenir la resténose artérielle post-angioplastie.

La médecine évolue aujourd'hui à un rythme étonnant. Aussi, la dernière décennie a vu s'émaner la médecine vasculaire, une spécialisation consacrée aux manifestations athérosclérotiques et thrombo-emboliques de la maladie. L'importance accordée à la cellule musculaire lisse y est prépondérante. Il est à espérer que les connaissances provenant de cette science finiront par croiser celles de la transplantation car l'avenir en prévention du rejet chronique n'est plus dans l'immunosuppression; la clé est dans le contrôle de la maladie vasculaire.

CHAPITRE IV

SOURCES DOCUMENTAIRES

•

4.0 SOURCES DOCUMENTAIRES

Abraham RT, Wiederrecht GJ. «Immunopharmacology of rapamycin.» Annual Review of Immunology 14 : 483-510, 1996.

Acland RD. Dans: Practice manual for microvascular surgery. 2^e édition, St-Louis, The C.V. Mosby Company, 1989, pp 134 .

Adams DH, Tilney NL, Collins JJ, Karnosky MJ. «Experimental graft arteriosclerosis: The Lewis-to-F344 allograft model». Transplantation 53 (5): 1115-9, 1992.

Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. «Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor β -stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts.» Transplantation Proceedings 23(6): 2833-6, 1991.

Allison AC, Eugui EM. «Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and ester prodrug : mycophenolate mofetil.» Immunol. Rev. 136 : 5-28, 1993-a.

Allison AC, Eugui EM. «Mycophenolate mofetyl, a rationally designed immunosuppressive drug.» Clinical Transplantation 7: 96, 1993-c.

Allison AC, Eugui EM. «Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF).» Clinical Transplantation 10(1 pt 2) : 77-84, 1996.

Allison AC, Hovi T, Watts RWE, Webster AD. «The role of de novo purine synthesis in lymphocyte transformation.» CIBA Foundation Symposium 48: 221-7, 1977.

Allison AC, Kowalski WJ, Muller CD, Eugui EM. «Mechanisms of action of mycophenolic acid.» Annals New York Academy of Sciences 696: 63-87, 1993-b.

Almond SP, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R et Najarian JS. «Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients.» *Transplantation* 55(4) : 752-7, 1993.

Anonyme. «SDZ RAD. Rapamycin SDZ.» *Drugs in R & D* 1(1): 97-9, 1999.

Anonyme. «Sirolimus. AY 22989, NSC 226080, NSC 606698, rapamycin, rapamune.» *Drugs in R & D* 1(1): 100-7, 1999.

Auchincloss H Jr. «Antigen presentation.» Dans : *Transplantation immunology*. Bach FH et Auchincloss H, ed. Chapitre 4, New York, Wiley-Liss, 1995, pp. 87-103.

Azuma H, Binder J, Heemann U, Tullius SG, Tilney NL. «Effect of RS61443 on chronic rejection of rat kidney allografts.» *Transplantation Proceedings* 27(1): 436-7, 1995-a.

Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. «Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts.» *Transplantation* 59(4): 460-6, 1995-b.

Beckingham IJ, Stubington SR, Dennis MJS, Bishop MC, Rigg KM. «Experimental studies of the pathogenesis of chronic allograft rejection.» *Transplantation Proceedings* 27 (3), 2129-30, 1995.

Benfield MR, Stablein D, Tejani A. «Trends in immunosuppressive therapy: a report of the north american pediatric renal transplantation cooperative study (NAPRTCS).» *Pediatric Transplantation* 3(1): 27-32, 1999.

Brattström C, Säwe J, Tydén G, Herlenius G, Claesson K, Zimmerman J, Gtoth CG. «Kinetics and dynamics of single oral doses of sirolimus in sixteen renal transplant recipients.» *Therapeutic Drug Monitoring* 19(4): 397-406, 1997.

Brown EJ, Alberts MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. «A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex.» *Nature* 369(6483) : 756-8, 1994.

Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J, Shin TB, Schreiber SL. «Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP *in vivo*.» *Nature* 377(6548) : 441-6, 1995.

Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. «Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil.» *Clinical Pharmacokinetics* 34(6): 429-55, 1998.

Burke SE, Lubbers NL, Chen YW, Hsieh GC, Mollison KW, Luly JR, Wegner CD. «Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in Yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin.» *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33(6): 829-35, 1999.

Campistol JM, Mazuecos A, Segura J, Osuna A, Herrero JC, Andres A, Oppenheimer F, Gomez de la Camara A, Martinez MA, Morales JM. «Mycophenolate mofetil slows the decline of renal function in patients with biopsy-proven chronic-rejection: a collaborative pilot study.» *Transplantation Proceedings* 31(6): 2267-9, 1999.

Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Shourhouse R, Pratt R, Morris RE. «Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis.» *Transplantation* 59(3): 390-5, 1995.

Chen H, Smeesters C, Daloz P. «Kidney transplantation.» Dans: Manual of experimental muscle flap and organ transplantation models in the rat. Feng Zhang, ed. Chapitre 17. Stanford, Sharpoint, 1995, pp. 73-76.

Chertrow GM, Brenner BM, Mackenzie HS, Milford EL. «Non-immunological predictors of chronic renal allograft failure : data from the united network of organ sharing.» *Kidney International* 48(Suppl. 52) : S48-S51, 1995.

Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. «Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation and signalling by the 70 kd protein kinase.» *Cell* 69(7) : 1227-36, 1992.

Dawson-Saunders B, Trapp RG. «Comparing three or more means.» Dans: Basic and clinical biostatistics. Beth Dawson-Saunders et Robert G. Trapp, 2^e édition. Chapitre 8, Norwalk, Appelton et Lange, 1994, pp125-42.

Demetris AJ, Murase N, Fung JJ, Starzl TE. «The immunolympathic theory of chronic rejection.» Transplantation Proceedings 29(6), 2615-6, 1997.

Diamond JR, Tilney NL, Frye J, Ding G, McElroy J, Pesek-Diamond I et Yang H. «Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection.» Transplantation 54(4): 710-6, 1992.

Demetris AJ, Zerbe T, Banner T. «Morphology of solid organ allograft arteriopathy : identification of proliferating intimal cell population.» Transplantation Proceedings 21(4) : 3677-9, 1989.

Dumont FJ, Su Q. «Minireview : mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin.» Life Science 58(5) : 373-95, 1996.

Dumont FJ, Melino MR, Staruch MJ, Koprak SL, Fisher PA et Sigal NH. «The immunosuppressives macrolides FK506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells» The Journal of Immunology 144: 1418-24, 1990.

Eugui EM, Almquist S, Mueller CD, Allison AC. «Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid *in vitro*: role of deoxy-guanosine nucleotid depletion.» Scandinavian Journal of Immunology 33: 161-173, 1991.

European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. «Placebo controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporine and corticosteroids for prevention of acute rejection.» Lancet 345(8961): 1321-5, 1995.

European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. «Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial.» Transplantation 68(3): 391-6, 1999.

Ferns GA, Reidy MA, Ross R. «Balloon catheter de-endothelialization of the nude rat carotid. Response to injury in the absence of functional T lymphocytes.» *American Journal of Pathology* 138(4) : 1045-57, 1991.

Fisher B, Lee S. «Microvascular surgical techniques in research: with special reference to renal transplantation in the rat.» *Surgery* 58: 904, 1965.

Fischer-Lindahl K, Wilson DB. «Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes II. Estimates of frequency and specificity of precursor.» *Journal of Experimental Medicine* 145 : 508-522, 1977.

Foster MC, Dennis MJS. «Chronic renal graft rejection.» Dans : Organ transplantation : long-term result. Paul C Leendert et Kim Solez, ed. Chapitre 7, New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp. 153-72.

Fulton B, Markham A. «Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation.» *Drugs* 51(2): 278-298, 1996.

Fruman D, Wood M, Gjertson C, Katz H, Burakoff S, Bierer B. «FK506 binding protein 12 mediates sensitivity to both FK506 and rapamycin in murine mast cell.» *European Journal of Immunology* 25(2) : 563-71, 1995.

Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. «Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by regulators of cell cycle.» *Circulation* 99(16): 2164-70, 1999.

Giblett ER, Anderson JA, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. «Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity.» *Lancet* 2(7786) : 1067-9, 1972.

Glicklich D, Gupta B, Schurter-Frey G, Greenstein SM, Schechner RS, Tellis VA. «Chronic renal allograft rejection: no response to mycophenolate mofetil.» *Transplantation* 66(3): 398-9, 1998.

Gregory CR, Huang X, Pratt RE, Dzau VJ, Shourthouse R, Billingham ME, Morris RE. «Treatment with rapamycin and mycophenolate mofetil reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement.» *Transplantation* 59(5): 655-61, 1995.

Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. «Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury.» *Transplantation* 55(6): 1409-18, 1993-a.

Gregory C, Morris RE, Pratt R. «The use of a new antiproliferative immunosuppressant is a novel and highly effective strategy for the prevention of vascular occlusive disease.» *Journal of Heart and Lung Transplantation* 11: 197, 1992.

Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Shourthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE. «Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury.» *Transplantation* 55(6): 1409-18, 1993-a

Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shourthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE. «Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo.» *Transplantation Proceedings* 25(1): 770-1, 1993-b.

Guttmann RD, Forbes RDC, Zheng S, Busque S. «Cyclosporine and the reversibility of chronic vascular rejection.» *Transplantation Proceedings* 26 (5) : 2564-6, 1994.

Guttmann RD, Forbes C, Zheng SX. «The pathophysiology of chronic rejection». *The American Journal of Medical Sciences* 313(5): 302-4, 1997.

Hale MD, Nicholls AJ, Bullingham RES, Hene R, Hoitsma A, Squifflet JP, Weimar W, Varenterghem Y, Van de Woude FJ, Verpooten GA. «The pharmacokinetic-

pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation.» *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 64(6): 672-83, 1998.

Hamilton D, «Kidney transplantation: a history.» Dans : Kidney transplantation, principles and practice. Peter J. Morris, 4e édition. Chapitre 1, Montréal, W.B. Saunders company, 1994, pp.1-17.

Hancock WH, Withley WD, Tullius SG, Heemann UW, Wasowska B, Baldwin III WM, Tilney NL. «Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts.» *Transplantation* 56(3): 643-50, 1993.

Hansson GK, Holm J, Holm S, Fotev Z, Hedrich HJ, Fingerle J. «T lymphocytes inhibit the vascular response to injury.» *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88(23): 10530, 1991.

Häyry P, Myllärniemi M, Aavik E. «Chronic allograft rejection.» *Transplantation Proceedings*, 28(4) : 2337-8, 1996.

Häyry P, Myllärniemi AM, Räisänen-Sokolowski A, Lemström K. «Cellular and molecular biology of chronic rejection.» *Transplantation Proceedings* 27(1) : 71-4, 1995-a.

Häyry P. «Pathophysiology of chronic rejection.» *Transplantation Proceedings* 28(6)(suppl. 1) : S7-S10, 1995-b.

Häyry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemström K, Räisänen-Sokolowski A, Koskinen P, Ustinov J, Lautenschlager I, Taskinen E, Krogerus L, Aho P, Paavonen T. «Chronic allograft rejection.» *Immunological Reviews* 134 : 33-81, 1993-a.

Häyry P, Mennander A, Yilmaz S, Ustinov J, Räisänen A, Miettinen A, Lautenschlager I, Lemström K, Bruggeman CA, Paavonen T. «Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection.» *The Clinical Investigator* 70 : 780-90, 1992.

Heemann UW, Tullius SG, Azuma H. «Reduced functioning kidney mass accelerates chronic rejection in rats.» *Surgery Forum* 24 : 418-20, 1993.

Hutchinson IV. «Immunological mechanisms of long-term graft acceptance.» Dans : Organ transplantation : long-term result. Paul C Leendert et Kim Solez, ed. Chapitre 1, New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp. 1-32.

Inokuchi S, Bohannon LL, Warvariv V. «Mycophenolate mofetil may slow the progression of chronic renal transplant rejection.» *Journal of American Society of Nephrology* 8: 686A, 1997.

Ishibashi M, Azuma H, Tilney NL. «Prevention of chronic rejection of renal allograft in rats using a synthetic inhibitor of macrophage effector activation». *Transplantation Proceedings* 27(1): 564-5, 1995.

Isoniemi HM, Krogerus L, Von Willebrand E., Taskinen E, Ahonen E, Häyry P. «Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney International*, 41(1): 155-60, 1992.

Jirasiritham S, Sumethkul V, Mavichak V, Chiewsilp P, Leenanupunth C, Kochakarn W. «Treatment of chronic rejection in renal transplantation by mycophenolate mofetil (MMF): a preliminary report of six-month experience.» *Transplantation Proceedings*. 30 (7): 3576-7, 1998.

Jones EA, Shoskes DA. «The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair». *Journal of Urology* 163(3): 999-1004, 2000.

Kahan BD. «Sirolimus : A new agent for clinical transplantation.» *Transplantation Proceedings* 29(1-2), 48-50, 1997.

Kahan BD, Murgina MG, Slaton J, Napoli K. «Potential applications of therapeutic drug monitoring of sirolimus immunosuppression in clinical renal transplantation.» *Therapeutic Drug Monitoring* 17(6): 672, 1995.

Kasike BM. «Atherosclerosis in organ transplant recipient.» Dans : Organ transplantation : long-term result. Paul C Leendert et Kim Solez, ed. Chapitre 14 , New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp. 283-301.

Kelley VR, Strom TB. «A paradigm in 1994 : the allograft response.» Blood purification. 13(3-4) : 199-205, 1995.

Kelly PA, Scott A, Behbod F, Kahan BD. «Sirolimus, a new immunosuppressive agent.» Pharmacotherapy 17(6) : 1148-56, 1997.

Keown PA, Stiller CR, Wallace C. «Nephrotoxicity of cyclosporin A.» Dans : Kidney transplant rejection. Burdick JF, Racusen LC, Solez K et Williams GM, 4e édition. Chapitre 22, New-York, Marcel Dekker Inc, 1992, pp. 637-74.

Keunecke C, Rothenpieler U, Zanker B, Schneeberger H, Illner WD, Theodorakis J, Stangl M, Land W. «Mycophenolate mofetil monotherapy: an example of safe nephrotoxicity/aterogenicity-free immunosuppressive maintenance regimen in a selected group of kidney-transplanted patients.» Transplantation Proceedings 32(Suppl 1A): 6S-8S, 2000.

Kitchin JES, Pomeranz MK, Pak G. «Rediscovering mycophenolic acid: A review of its mechanism, side effects, and potential uses.» Journal of the American Academy of Dermatology 37(3): 445-9, 1997.

Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. «Qantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinises.» Analytical Biochemistry 218(2): 325-329, 1994.

Kliem V, Boeck A, Eisenberger U, Petersen R, Radermacher J, Hiss M, Pethig M, Koch KM, Nashan B, Brunkhorst R.« Treatment of chronic renal allograft failure by addition of mycophenolate mofetil: single-center experience in 40 patients.» Transplantation Proceedings. 31 (1-2): 1312-3, 1999.

Kreis H, Cisterne JM, Land W, Wrammer L, Squifflet JP, Abramowicz D, Campistol JM, Morales JM, Grinyo JM, Mourad G, Berthoux FC, Brattstrom C, Lebranchu Y, Vialtel P.

«Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients.» *Transplantation* 69(7): 1252-60, 2000.

Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J. «Rapamycin selectively Inhibits Interleukin-2 Activation of p70 S6 Kinase.» *Nature* 358(6381) : 70-3, 1992.

Kuss R, Legrain M, Mathe G, Nedley R, Camey M. «Homotransplantation rénale chez l'homme hors de tout lien de parenté : survie jusqu'au dix-septième mois.» *Rev Franc Études Clin Biol* 7 : 1048-1066, 1962.

Lai JH, Tan TH. «CD28 signaling cause a sustained down regulation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin.» *Journal of Biological Chemistry* 269 (30) : 77-80, 1994.

Lechler RI, Simpson E, Bach FH. «Major and minor histocompatibility antigens : an introduction. Dans : *Transplantation immunology*. Bach FH et Auchincloss H, ed. Chapitre 1, New York, Wiley-Liss, 1995, pp. 1-34.

Lechler RI, Batchelor JR. «Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells.» *Journal of Experimental Medicine* 155(6) : 31-41, 1982.

Lemster B, Woo J, Strednack J, Wang SC, Todo S, Starzl TE, Thomson AW. «Cytokine gene expression in murine lymphocytes activated in the presence of FK 506, bredinin, mycophenolic acid or brequinar sodium.» *Transplantation Proceedings* 24(6): 2845-6, 1992.

Lin TA, Kong X, Haystead TAJ, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC. «PHAS-1 as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation.» *Science* 266(5185) : 653-6, 1994

Lipsky JJ .«Mycophenolate mofetil.» *Lancet* 348(9038): 1357-9, 1996.

MacDonald A, Scarola J, Burke JT, Zimmerman JJ. «Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus». *Clinical Pharmacology* 22 (suppl B): B101-21, 2000.

Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks RA. «Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells.» *Circulation Research* 76(3): 412-7, 1995.

Massy ZA, Guijarro C, Kasiske BL. «Clinical predictors of chronic renal allograft rejection.» *Kidney International* 48(Suppl. 52) : S85-S88, 1995.

Meiser BM, Billingham ME, Morris RE. «Effect of cyclosporine, FK 506 and rapamycin on graft-vessel disease.» *Lancet* 338(8787) :1297-8, 1991.

Mennander A, Tiisala S, Halttunen J, Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P. «Chronic rejection in rat aortic allograft. An experimental model for transplant arteriosclerosis». *Arteriosclerosis Thrombosis* 11(3): 671-80, 1991.

Mennander A, Tiisala S, Paavonen T, Halttunen J, Häyry P. «Chronic rejection of rat aortic allograft. II Administration of cyclosporine induces accelerated arteriosclerosis». *Transplant International* 4(3): 173-9, 1991.

Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. «Morphological criteria of chronic rejection : differential diagnosis, including cyclosporine nephropathy.» *Transplantation Proceedings* 35(2): 2031-7, 1993.

Miller BF, Gonzalez E, Wilchins LJ. «Kidney transplantation in the rat.» *Nature*. 194: 309-310, 1962.

Molnar-Kimber KL. «Mechanism of action of rapamycin (sirolimus, rapamune).» *Transplantation Proceedings* 28(2) : 964-9, 1996.

Morice WG, Brunn GJ, Wiederrecht G, Siekierka JJ, Abraham RT. «Rapamycin-induced inhibition of p34^{cdc2} kinase activation is associated with G₁/S-phase growth arrest in T lymphocytes». *The Journal of Biological Chemistry* 268(5) : 3734-8, 1993.

Morris RE, Cao W, Huang X, Gregory CR, Billingham ME, Rowan R, Shourthouse RA. «Rapamycin (sirolimus) inhibits vascular smooth muscle DNA synthesis in vitro and suppresses narrowing in arterial allografts and in balloon-injured carotid arteries: evidence that rapamycin antagonizes growth factor action on immune and nonimmune cells.» *Transplantation Proceedings* 27(1): 430-1, 1995-a.

Morris RE, Huang X, Gregory CR, Billingham ME, Rowan R, Shourthouse R, Berry GJ. «Studies in experimental models of chronic rejection: use of rapamycin (sirolimus) and isoxazole derivatives (leflunomide and its analogue) for the suppression of graft vascular disease and obliterative bronchiolitis.» *Transplantation Proceedings* 27(3): 2068-9, 1995-b.

Morris RE, Wang J, Blum JR, Flavin T, Murphy MP, Almquist SJ, Chu N, Tam YL, Kaloostian M, Allison AC, Eugui EM. «Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and non-human primate recipients of heart allograft.» *Transplantation Proceedings* 23(suppl 2): 19-25, 1991.

Murgia GM, Jordan S, Kahan BD. «The side effect profile of sirolimus: A phase 1 study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients». *Kidney International* 49(1): 209-216, 1996.

Nagano H, Tilney NL. «Chronic allograft failure : the clinical problem.» *American Journal of Medical Sciences* 313(5) : 305-309, 1997.

Natsumeda Y, Carr SF. «Human type I and II IMP dehydrogenase as targets.» *Annals New York Academy of Sciences* 696: 88-93, 1993.

Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. « Interleukine-2-mediated elimination of the p^{27kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin.» *Nature* 372(6506) : 570-3, 1994.

Oesterwitz H, Althaus P, May G, Schroder K, Strobelt V, Kaden J. «Microvascular surgery in experimental and clinical kidney transplantation.» *International Urology and Nephrology* 15(4): 347-357, 1983.

O'Hair DP, McManus RP, Komorowski R. «Inhibition of chronic vascular rejection in primate cardiac xenografts using mycophenolate mofetil.» *Annals of thoracic Surgery* 58(5): 1311-5, 1994.

Ohnishi H, Yamaguchi K, Shimada Y, Sato M, Funato H, Katsuki Y, Dabasaki T, Suzuki Y, Saitoh Y, Kumagai A. «Evidence for response to injury hypothesis.» *Life Sciences* 31(23): 2595-602, 1982.

Oslen TS. «Pathology of allograft rejection.» Dans : Kidney transplant rejection, 2^e ed. Burdick JF, Racusen LC, Solez K ed. Chapitre , New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp 333-357.

Parker G, Bullingham R, Kamm B, Hale M. «Pharmacokinetics of oral mycophenolate mofetil in volunteer subjects with varying degrees of hepatic oxidative impairment.» *Journal of Clinical Pharmacology* 36(4): 332-44, 1996.

Paul LC. «Immunobiology of chronic renal transplant rejection.» *Blood Purification* 13(3-4): 206-18, 1995.

Paul LC. «Experimental models of chronic renal allograft rejection.» *Transplantation Proceedings* 27(3): 2126-8, 1996.

Paul LC, Häyry P, Foegh M, Dennis MJ, Mihatsch MJ, Larsson MJ, Fellström B. «Diagnostic criteria for chronic rejection / accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants : joint proposal from the fourth Alexis Carrel conference on chronic rejection from accelerated arteriosclerosis in transplanted organs.» *Transplantation Proceedings* 25(2) : 2022-3, 1993.

Paul LC, Solez K. «Chronic rejection of vascularized organ allografts.» Dans : Organ transplantation : long-term result. Paul C Leendert et Kim Solez, ed. Chapitre 5, New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp. 99-133.

Paul LC, Baldwin WM, Van Es LA. «Vascular endothelial alloantigens in renal transplantation.» Transplantation **40(2)** : 117-23, 1985.

Peeters J, Roels L, Vanrenterghem Y (Leuven Collaborative Group for Transplantation). «Chronic renal Allograft Failure : Clinical Overview.» Kidney International **48(Suppl. 52)** : S97-S101, 1995.

Pham SM, Shears LL, Kawaharada N, Li S, Venkataramanane K, Sehgal S. «High local production of nitric oxide as a possible mechanism by which rapamycin prevents transplant arteriosclerosis.» Transplant Proceedings **30(4)**: 953-4, 1998.

Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB et Marks AR. «Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration.» Journal of Clinical Investigation **98(10)**: 2277-83, 1996.

Porter KA, Thompson WB, Owen K, Kenyon JR, Mowbray JF, Peart WS. «Obliterative vascular changes in four human homotransplants.» British Medical Journal **2** : 639-645, 1963.

Porter KA. «Renal transplantation.» Dans : Pathology of the kidney. Heptinstall RH, 4e edition. Chapitre 27, Boston, Little, Brown and Company, 1992, pp 1799-1933.

Poston RS, Billingham M, Hoyt EG, Pollard J, Shourhouse R, Morris RE, Robbins RC. «Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model.» Circulation **100(1)**:67-74, 1999.

Price DJ, Grove RJ, Calvo V, Avruch J, Bierer BE. «Rapamycin-induce inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase.» Science **257(5072)** : 973-7, 1992.

Racusen LC, Solez K, Colvin RB. «The Banff 97 working classification of renal allograft pathology.» *Kidney International* 55(2): 713-23, 1999.

Räisänen-Sokolowski A, Aho P, Myllärniemi M, Kallio E, Häyry P. «Inhibition of early chronic rejection in rat aortic allografts by mycophenolate mofetil.» *Transplantation Proceedings* 27 (1): 435, 1995.

Räisänen-Sokolowski A, Vuoristo P, Myllärniemi M, Yilmaz S, Kallio E, Häyry P. «Mycophenolate mofetil inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts.» *Transplantation Immunology* 3(4): 342, 1995

Rice-Evans CA, Miller NJ, Halloran PF. «Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.» *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933, 1996.

Ross R. «The pathogenesis of atherosclerosis- An update.» *New England Journal of Medicine* 314(8): 488-500, 1986.

Ryffel B, Car BD, Eugster HP, Woerly G. «Transplantation agents.» Dans: Immunotoxicology and immunopharmacology. (Target organ toxicology series). Jack H. Dean et al., éditeurs, 2^e édition. Chapitre 15, New-York, Raven Press, Ltd., 1994, pp. 267-290.

Ryffel B, Siegl H, Theil G. «Experimental cyclosporine nephrotoxicity.» Dans : Kidney transplant rejection. Burdick JF, Racusen LC, Solez K et Williams GM, 4e édition. Chapitre 20, New-York, Marcel Dekker Inc, 1992, pp. 601-27.

Sanquer S, Breil M, Baron C, Dhamane D, Astier A, Lang P. «Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil.» *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 65(6): 640-8, 1999.

Sayegh MH, Carpenter CB. «Tolerance and chronic rejection.» *Kidney International*, 51 (Suppl. 58) : S11-S14, 1997.

Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. «Comparison of rapamycin, RS 61443, cyclosporine, and low-dose heparin as treatment for transplant vasculopathy in a rat model of chronic allograft rejection.» *Transplantation Proceedings* 27(1): 438-9, 1995.

Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Häberlin B, Schulz M, Schuurman HJ, Zenke G, Zerwes HG, Schreier MH. «SDZ RAD, a new rapamycin derivative, pharmacological properties in vitro and in vivo.» *Transplantation* 64(1): 36-42, 1997.

Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, Joergensen J, Meerloo T, Sedrani R, Tanner M, Zenke G, Schuler W. «SDZ RAD, a new rapamycin derivative, synergism with cyclosporine.» *Transplantation* 64(1): 32-5, 1997.

Schuurman HJ, Pally C, Weckbecker G, Schuler W, Bruns C. «SDZ RAD inhibits ischemia-induced vascular remodeling.» *Transplantation Proceedings* 31(1-2): 1024-5, 1999.

Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Gores PF, Dunn DL, Sutherland DER, Najarian JS. «Causes of renal allograft loss : progress in the 1980s, challenges for the 1990s.» *Annals of Surgery* 214(6) : 679-88, 1991.

Sehgal SN, Baker H, Vezina C. «Rapamycine (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. fermentation, isolation and characterization.» *The Journal of Antibiotics* 28 : 727-32, 1975.

Senn B, Rochat P, Schwarzkopf AK, Weinreich T, Biswanger U. «Mycophenolate mofetil in ongoing chronic kidney allograft dysfunction.» *Transplantation Proceedings*. 30(8): 4075-6, 1998.

Shackleton CR, Ettinger SL, Mcloughlin MG, Scudamone CH, Miller RR, Keown PA. «Effect of recovery from ischemic injury on class I and class II MHC antigen expression.» *Transplantation* 49(3) : 641-644, 1990.

Shaw LM. «Advances in therapeutics drug monitoring for immunosuppressants : a review of sirolimus.» *Clinical Therapeutics* 22 (suppl. B): 2000.

Sievers TM, Rossi SJ, Ghobrial RM, Arriola E, Nishimura P, Kawano M, Holt CD. «Mycophenolate mofetil.» *Pharmacotherapy* 17(6) : 1178-97, 1997.

Smith MT, Newby BS, Roa RN. «Response to MMF in patients with chronic renal allograft rejection.» *American Society of Transplant Physicians, 16th Annual Meeting (abstract 197)*: 134, 1997.

Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H *et al.* «International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology.» *Kidney International* 44(1): 411-22, 1993.

Sollinger HW. «Mycophenolate mofetyl.» *Kidney International* 48 (Suppl. 52): S14-S17, 1995-a.

Sollinger HW, Deierhoi MH, Belzer FO, Diethelm AG, Kaufman RS. «RS-61443- a phase I clinical trial and pilot rescue study.» *Transplantation* 53(2): 428-32, 1992.

Sollinger HW, Eugui EM, Allison AC. «RS-61443 : mechanism of action, experimental and early clinical results.» *Clinical Transplantation* 5 :523-6, 1991.

Sollinger HW, US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. «Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients.» *Transplantation* 60(3): 225-32, 1995-b.

Steele DM, Hullet DA, bechstein WO, kowalski J, Smith LS, Kenedy E, Allison AC, Sollinger HW. «Effects of immunosuppressive therapy in the rat aortic allograft model.» *Transplantation Proceedings*. 25(1 pt 1): 754-5, 1993.

Stepkowski SM, Tian L, Napoli KL, Ghobrial R, Wang ME, Chou C, kahan BD. «Synergistic mechanisms by which sirolimus and cyclosporin inhibit rat Heart and kidney allograft rejection.» *Clinical and Experimental Immunology* 108(1) : 63-68, 1997.

Striker G, Striker LJ, D'Agati V. «Role of the renal biopsy in the evaluation of renal disease.» Dans: The renal biopsy. Striker G, Striker LJ et D'Agati V, 3e édition. Chapitre 1, Saunders, 1997, Montréal, pp 1-36.

Striker G, Striker LJ, D'Agati V. « Transplantation.» Dans: The renal biopsy. Striker G, Striker LJ et D'Agati V, 3e édition. Chapitre 11, Saunders, 1997, Montréal, pp 242-57.

Suzuki S, Kimura T, Ando K.« Antitumor activity of mycophenolic acid.» Journal of Antibiotics 22: 297-302, 1969.

Tanabe K, Toma H, Sagara R Takahashi K, Teraoka S, Ota K. «Experimental model of chronic renal allograft rejection in rats and therapeutic efficacy of a new selective thromboxane A2 (TXA2) synthetase inhibitor (CV-4151)». Transplantation Proceedings 21(1) : 293-5, 1989.

Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC. «Rapamycin selectively inhibit translation of mRNA encoding elongation factors and ribosomal proteins.» Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 91(24): 11477-81, 1994.

Terasaki PI, Cecka JM, Cho Y, Cicciarelli J, Cohn M, Gjertson D. «Overview.» Dans : Clinical transplants, Teraski PI, ed., Los Angeles, UCLA Tissue Typing Lab, 1990, pp 585-601.

Thorogoog J, Van Houwelingen HC, Rood JJV, Zantvoort FA, Schreuder GMT, Persijn GG. «Long-term results of kidney transplantation in eurotransplant.» Dans : Organ transplantation : long-term result. Paul C Leendert et Kim Solez, ed. Chapitre 2 , New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp. 33-301

The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. «A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation.» Transplantation 61(7): 1029-37, 1996.

Tilney NL, Whitley WD, Diamond JR, Kupiec-Weglinski JW, Adams DH. «Chronic rejection-an undefined conundrum.» *Transplantation* 52(3): 389-98, 1991.

Trepanier DJ, Gallant H, Legatt Df, Yatscoff RW. «Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations: an update.» *Clinical Biochemistry* 31(5): 345-51, 1998.

Tullius SG, Nieminen M, Bechstein WO, Jonas S, Steinmüller T, Qun Y, Pratschke J, Graser E, Sinha P, Volk HD, Neuhaus P, Tilney NL. «Contribution of early rejection episode to chronic rejection in rat kidney retransplantation model.» *Kidney International* 53(2) : 465-72, 1998.

Tullius SG, Tilney NL. «Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection.» *Transplantation* 59(3) : 313-8, 1995.

Tullius SG, Hancock WW, Heemann UW, Azuna H, Tilney NL. «Reversibility of chronic renal allograft rejection : critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and immune independent phases of progressive injury. *Transplantation* 58(1) : 93-9, 1994-a.

Tullius SG, Heemann U, Hancock WW, Azuma H, Tilney NL. «Long-term Kidney isograft develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection.» *Annals of Surgery* 220(4), 425-435, 1994-b.

Ullmann E. Experimentelle Nierentransplantation. *Wein Klin. Wochenschr.* 15: 281, 1902.

US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. «Mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation.» *American Journal of Kidney Diseases* 34(2): 296-303, 1999.

Van Es A, Herman J, Van Bockel JH, Persijn GG, Van Hoff JP, De Graeff J. «Effect of warm ischemic time in HLA (A and B) matching on renal cadaveric graft survival and rejection episodes.» *Transplantation* 36(3) : 255-8, 1983.

Vasquez EM. «Sirolimus: a new agent for prevention of renal allograft rejection.» *American Journal of Health-System Pharmacy* 57(5):437-48, 2000.

Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. «Rapamycine (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.» *The Journal of Antibiotics* 28 : 712-26, 1975.

Viklicky O, Zou H, Müller V, Lacha J, Szabo A, Heemann U. «SDZ-RAD prevent manifestation of chronic rejection in rat renal allografts.» *Transplantation* 69(4): 497-502, 2000.

Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J. «p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation.» *Journal of Biological Chemistry* 274(38):26776-82, 1999.

Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, Dumont L, Busque S, Daloz P, Chen H. «Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonist but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the Rat.» *Transplantation* 64(12) : 1853-6, 1997.

Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Jiangping W, Daloz P, Sehgal SN, Leduc B, Chen H. «Synergistic effect of mycophenolate mofetil and sirolimus in prevention of acute heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat.» *Transplantation* 66(12): 1575-80, 1998.

Ward HJ, Glassock RJ. «Glomerular disease in renal transplant.» Dans : Organ transplantation : long-term result. Paul C Leendert et Kim Solez, ed. Chapitre 13, New York, Marcel Dekker, Inc., 1992, pp. 261-282.

Weir MR, Fink JC, Hanes DS, Gardner J, Klassen DK, Cangro C, Schweitzer E, Bartlett ST. «Chronic allograft nephropathy : effect of cyclosporin reduction and addition of mycophenolate mofetil on progression of renal disease.» *Transplantation Proceedings* 31(2): 1286-7, 1999.

White E, Hildemann WH, Mullen Y. «Chronic kidney allograft reactions in rats». *Transplantation* 8(5): 602-17, 1969.

Yatscoff RW. «Pharmacokinetics of rapamycine». *Transplantation Proceedings* 28(2): 970-3, 1996.

Zimmerman JJ, Kahan BD. «Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration». *Journal of Clinical Pharmacology* 37(5): 405-415, 1997.

CHAPITRE V

ANNEXES

ANNEXE 1

**TRANSPLANTATION RÉNALE ORTHOTOPIQUE :
PROTOCOLE MICROCHIRURGICAL**

5.1 TRANSPLANTATION RÉNALE ORTHOTOPIQUE; PROTOCOLE MICROCHIRURGICAL

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Le protocole opératoire représente une variation considérable par rapport au premier modèle décrit par Miller *et al.* (1962). Il s'apparente davantage à la méthode reprise par Oesterwitz *et al.* (1983) ainsi que Chen, Smeesters et Daloze (1995).

INSTRUMENTS CHIRURGICAUX

Les instruments les plus fins et les plus petits possibles doivent être utilisés. À cause du système immunitaire permissif du rat, l'asepsie n'est pas essentielle. Les instruments nécessaires à la transplantation rénale sont ceux décrits par Fisher et Lee (1975). Un microscope Zeiss grossissant jusqu'à 40 fois est utilisé.

ANESTHÉSIE ET PRÉPARATION OPÉRATOIRE

Les animaux sont anesthésiés avec du phénobarbital administré par la voie intrapéritonéale à un dosage de 0,7 ml/kg dissout dans un petit volume de salin. Après immobilisation du rat sur des plaque chauffante, l'animal est rasé au niveau de l'abdomen afin d'éviter la contamination des champs opératoires. L'abdomen est ensuite ouvert sur toute sa longueur par une incision médiane.

PRÉLÈVEMENT DU DONNEUR

Le rein gauche est celui qui est prélevé pour 2 raisons. D'abord, le rein gauche est mieux exposé à cause du foie moins encombrant. Ensuite, les vaisseaux rénaux y sont plus longs, étant donné la disposition anatomique plus latérale qu'à droite. La chirurgie débute par la ligature de l'uretère gauche. Les veines tributaires de la veine rénale (surrénale et spermatique) sont elles aussi ligaturées et coupées afin d'éviter les

complications hémorragiques et thrombotiques. À la suite de ces manipulations, l'artère et la veine rénale sont séparées du tissu conjonctif les unissant. La séparation de ces vaisseaux doit se faire de la base du pédicule jusqu'à leur insertion sur les grands vaisseaux. À ce stade de l'opération, le rein est libéré du tissu adipeux qui l'entoure.

Une fois la dissection terminée, on doit préparer le donneur pour la perfusion du rein. La perfusion *in situ* consiste en l'injection de 3 à 5 ml d'une solution héparinisée (Euro-Collins) refroidie à 4° Celsius. Cette étape permet de refroidir rapidement le rein et de le rincer du sang résiduel qu'il contient, prévenant ainsi la formation de thrombi dans le système vasculaire. Le tout s'effectue à l'aide d'une canulation de l'aorte avec un cathéter silastique fin. L'aorte est d'abord ligaturée à l'aide de nœuds de soie 4-0 au-dessous du pédicule rénal et en distal du site prévu de canulation. Cette méthode a l'avantage de prévenir les hémorragies massives lors de l'incision de l'aorte tout en permettant une perfusion rénale continue. L'aorte est ainsi canulée jusqu'à l'origine du pédicule rénal. Le cathéter mis en place sera stabilisé par un autre nœud de soie 4-0.

Avant de débiter la perfusion, il faut empêcher tout nouveau sang de parvenir au rein. Un nœud de soie 4-0 sera donc fait autour de l'aorte, au-dessus du pédicule rénal. Dès ce moment, la solution héparinisée sera injectée lentement afin d'éviter les dommages de perfusion. On procède à la néphrectomie le plus rapidement possible. L'artère et la veine rénale sont coupées le plus près possible de leur origine. Le rein est retiré *en bloc*. Le transplant est finalement placé dans une solution de NaCl 0.9% à une température approximative de 4° Celsius.

PRÉPARATION DU RECEVEUR

Le receveur est préparé d'une manière semblable au donneur jusqu'à ce que la veine et l'artère rénale doivent être séparées. À ce moment, l'irrigation sanguine du rein est bloquée à l'aide de micro-clampes vasculaires placées à l'origine de l'artère et de la veine rénale. Les vaisseaux sont coupés le plus près possible de l'organe. La plus grande partie possible de l'uretère sera aussi conservée. Le rein gauche du rat receveur est alors retiré; l'animal est prêt à être transplanté.

TRANSPLANTATION

La transplantation est réalisée à l'aide d'anastomoses vasculaires termino-terminales. Le rein du donneur est d'abord déposé au fond de la cavité abdominale gauche, sur le mur postérieur. L'artère rénale est anastomosée la première. L'anastomose *fin-à-fin discontinue* entre l'artère du receveur et du donneur est réalisée à l'aide d'une aiguille montée sur fil de nylon 10-0. Deux sutures de stabilité sont préalablement placées à 140° l'une de l'autre autour du vaisseau. L'anastomose du mur antérieur de l'artère est complétée par 4 à 5 sutures interrompues. Le mur postérieur de l'artère est complété après avoir retourné le vaisseau sur 180°. Cinq sutures y sont faites. La veine rénale est plus grande que l'artère rénale, mais elle est beaucoup plus fragile. Une extrême minutie est de mise. L'anastomose termino-terminale en deux héli-surjets est préférable étant donné sa rapidité d'exécution (diminution du temps d'ischémie). Cette méthode, moins résistante que celle utilisée pour l'artère, est ici adéquate à cause de la faible pression retrouvée dans le système veineux. Le fil nylon 10-0 est utilisé. Deux sutures de stabilité sont préalablement mises à 180° l'une de l'autre. L'anastomose est complétée par deux sutures demi-circulaires continues sur chaque côté de la veine.

Afin de permettre la reperfusion, les micro-clampes vasculaires seront retirées. La clampes veineuse sera retirée la première. Un saignement instantané est normal. Ce dernier est contrôlé à l'aide d'une pression exercée avec un écouvillon sec pendant 1 minute. À partir de ce moment, le rein est de nouveau fonctionnel. Une bonne idée du succès de la transplantation peut être obtenue si, en quelques minutes, le rein excrète à nouveau de l'urine. La dernière étape de la transplantation consiste à anastomoser les uretères du donneur et du receveur. Une anastomose termino-terminale en ponts séparés est faite avec 2 sutures de stabilité mise à 180° l'une de l'autre. L'anastomose est complétée par 1 à 2 sutures de chaque côté de l'uretère. Une néphrectomie controlatérale est effectuée. L'abdomen sera finalement refermé selon les plans musculaires et cutanés, en 2 couches, à l'aide d'un fil 4-0.

ANNEXE 2

Banff Working Classification of Renal Allograft Pathology; chronic rejection
(Racusen *et al.*, 1999).

5.2 Banff Working Classification of Renal Allograft Pathology; chronic rejection (Racusen et al., 1999).

1. Interstitial fibrosis (ci)

ci 0 – interstitial fibrosis in up to 5% of cortical area

ci 1 – *mild* – 6 to 25%

ci 2 – *moderate* – 26 to 50%

ci 3 – *severe* – > 50%

2. Tubular atrophy (ct)

ct 0 – no tubular atrophy

ct 1 – tubular atrophy in up to 25% of the area of cortical tubules

ct 2 – 26 to 50%

ct 3 – > 50%

3. Allograft glomerulopathy (cg)

cg 0 – no glomerulopathy – double contours in < 10% of peripheral capillary loops in most severely affected glomerulus

cg 1 – double contours affecting up to 25% of peripheral capillary loops in the most affected of nonsclerotic glomeruli

cg 2 – 26 to 50%

cg 3 – > 50%

(Note the number and the % sclerotic)

4. Vascular fibrous intimal thickening (cv)

cv 0 – no chronic vascular change

cv 1 – vascular narrowing of up to 25% luminal area by fibrointimal thickening of arteries ± breach of internal elastic lamina or presence of foam cell or occasional mononuclear cells

cv 2 – 26 to 50%

cv 3 – > 50%

(Note lesions characteristic of chronic rejection: breaks in the elastica, inflammatory cells in fibrosis, formation of neointima)

5. Arteriolar hyaline thickening (ah)

ah 0 – no PAS-positive hyaline thickening

ah 1 – *Mild-to-moderate* PAS-positive hyaline thickening in at least one arteriole

ah 2 – *Moderate-to-severe* PAS-positive hyaline thickening in more than one arteriole

ah 3 – *Severe* PAS-positive hyaline thickening in many arterioles

6. Mesangial matrix increase (mm)

mm 0 – no mesangial matrix increase

mm 1 – up to 25% of nonsclerotic glomeruli affected (at least moderate matrix increase)

mm 2 – 26 to 50%

mm 3 – > 50%

(The threshold criterion for the moderately increase “mm” is the expanded mesangial interspace between adjacent capillaries. If the width of the interspace exceeds two mesangial cells on the average in at least 2 glomerular lobules the “mm” is moderately increase).

ANNEXE 3

TABLEAUX DES DONNÉES : POINTAGES DE BANFF

5.3 TABLEAUX DES DONNÉES : POINTAGES DE BANFF

TABLEAU 5-I. Effets du MMF et de RAPA sur les critères histologiques de la classification de Banff.

Groupe	ci	ct	mm	cg	cv
Témoïn allogreffe	1.50 ± 0.22	1.14 ± 0.23	1.07 ± 0.32	1.50 ± 0.31	2.00 ± 0.26
Témoïn isogreffe	0.00 ± 0.00*	0.81 ± 0.22	0.18 ± 0.12*	0.64 ± 0.31*	0.18 ± 0.12*
MMF (20 mg/kg)	1.31 ± 0.31	1.39 ± 0.24	0.92 ± 0.26	1.08 ± 0.33	1.61 ± 0.29
RAPA (0.8 mg/kg)	1.47 ± 0.21	1.33 ± 0.27	1.40 ± 0.32	1.40 ± 0.32	1.87 ± 0.27
MMF (20 mg/kg)+ RAPA (0.8 mg/kg)	0.71 ± 0.22*	0.92 ± 0.25	0.93 ± 0.16	0.57 ± 0.22*	1.07 ± 0.24*

MMF et RAPA en association réduisent la sévérité de la fibrose interstitielle, de la glomérulopathie allogreffe et de l'hypertrophie intinale fibreuse. Les résultats sont ici exprimés par la moyenne ± erreur-type, telles qu'obtenues après «One-way ANOVA» et «Tukey's post hoc comparaisons». * $p < 0.05$ *versus* le groupe témoïn allogreffe.

(ci; fibrose interstitielle, ct; atrophie tubulaire, mm; hypertrophie de la matrice mésangiale, cg; glomérulopathie allogreffe, cv; hypertrophie intinale fibreuse).

TABLEAU 5-II. Effets du MMF et de RAPA sur le rejet chronique allogreffe du rein chez le rat (F344 → LEW).

Groupe	Pointage de Banff	<i>p</i> value
Témoin allogreffe	7.21 ± 0.97	----
Témoin isogreffe	2.25 ± 0.74	< 0.001*
MMF (20 mg/kg)	6.31 ± 1.01	> 0.05
RAPA (0.8 mg/kg)	7.27 ± 1.14	> 0.05
MMF (20 mg/kg) + RAPA (0.8 mg/kg)	4.21 ± 0.79	< 0.001*

Un pointage de Banff a été estimé pour tous les reins transplantés. Le groupe allogreffe sans traitement a été utilisé comme témoin lors des analyses statistiques. Le groupe traité avec l'association du MMF et de la RAPA a présenté le pointage de Banff le plus bas, suggérant une synergie d'action. Les résultats sont ici exprimés par la moyenne ± erreur-type, telles qu'obtenues après «One-way ANOVA» et «Tukey's post hoc comparisons». * $p < 0.05$ versus le groupe témoin allogreffe.