

2M11.2692.3

Université de Montréal

Effets synergiques du tacrolimus et du sirolimus
dans le rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat

par

Minh Diem Vu
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

31 décembre 1998

© Minh Diem Vu, 1998



W

4

U58

1999

V.043

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Effets synergiques du tacrolimus et du sirolimus
dans le rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat

présenté par:
Minh Diem Vu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Christian Smeesters . . .président du jury
Huifang Chen.directeur de recherche
Louis Dumont.co-directeur de recherche
Édouard Kouassimembre du jury

Mémoire accepté le:.....99-04-13.....

SOMMAIRE

La transplantation est une intervention primordiale pour conserver la fonction physiologique d'un organe défaillant afin de maintenir la vie du patient ou d'améliorer son état de santé. Malgré les nouvelles stratégies immunosuppressives et l'amélioration des techniques de transplantation d'organes solides, il est connu que les causes majeures d'échec en transplantation sont le phénomène du rejet aigu (60% des cas) et les complications dues aux effets indésirables d'un traitement immunosuppresseur souvent basé sur la cyclosporine A et la prednisone.

L'association d'agents immunosuppresseurs efficaces est une stratégie visant à augmenter leur efficacité à prolonger la survie du greffon tout en minimisant leurs effets indésirables puisqu'ils seront utilisés à des doses réduites. L'association du tacrolimus et du sirolimus devient alors une avenue intéressante puisque ce sont des immunosuppresseurs efficaces contre le rejet aigu. Des données obtenues *in vitro* suggèrent que l'association du tacrolimus et du sirolimus ne possède pas d'effets immunosuppresseurs additifs, mais plutôt des effets antagonistes. Cependant, très peu d'études *in vivo* évaluant l'effet de cette association ont été réalisées. Nous avons donc évalué, dans un modèle de transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat, les effets du tacrolimus et du sirolimus, seul ou en association, sur la survie du greffon.

Des rats receveurs adultes Lewis ont reçu une allogreffe cardiaque hétérotopique de rats donneurs Brown Norway. Pour évaluer la prévention du rejet aigu, des rats receveurs ont été traités dès le jour de transplantation, pendant 14 jours, avec de faibles doses de tacrolimus seul (0.01 – 0.04 mg/kg/jour), avec de faibles doses de sirolimus seul (0.02 - 0.04 mg/kg/jour) ou

avec l'association du tacrolimus et du sirolimus (respectivement, 0.01 mg/kg/jour + 0.02 mg/kg/jour; 0.02 mg/kg/jour + 0.02 mg/kg/jour; 0.04 mg/kg/jour + 0.04 mg/kg/jour). Dans une deuxième série d'expériences visant à évaluer le renversement du rejet aigu installé, des rats Lewis receveurs ont été traités avec de faibles doses de tacrolimus seul (0.01 et 0.02 mg/kg/jour), de sirolimus seul (0.02 mg/kg/jour) ou de leur association, quatre jours après la transplantation, et par la suite pour une période de 14 jours. La survie des allogreffes cardiaques a été évaluée quotidiennement par palpations transabdominales et le rejet aigu est considéré omniprésent lorsqu'il y a cessation des contractions cardiaques. L'interaction (additivité, synergie et antagonisme) entre le tacrolimus et le sirolimus est déterminée à l'aide du principe de l'effet-médian et de la méthode d'index d'association.

Nos résultats se divisent en deux parties. Dans la prévention du rejet aigu, le tacrolimus seul et le sirolimus seul se sont avérés efficaces (survie $\geq 12.3 \pm 2.3$ jours) et cette efficacité immunosuppressive est dose-dépendante. Par ailleurs, il a été bénéfique d'utiliser l'association du tacrolimus et du sirolimus puisque celle-ci apporte un effet immunosuppresseur additif voire même synergique, et ce pour les différentes doses étudiées. Dans le cas du renversement du rejet aigu installé, l'association du tacrolimus et du sirolimus a été également bénéfique puisque la survie des allogreffes cardiaques a été significativement supérieure à celle des allogreffes cardiaques traités avec un seul des deux agents. L'interaction entre ces deux agents est demeurée synergique à toutes les doses utilisées.

En conclusion, nos résultats démontrent l'efficacité de l'association du tacrolimus et du sirolimus pour prolonger la survie d'allogreffes cardiaques hétérotopiques, voire même lorsque le processus de rejet aigu est déjà installé. Dans notre étude, le tacrolimus et le sirolimus se comportent vraisemblablement comme des agents synergiques.

TABLES DES MATIÈRES

SOMMAIREiii
LISTE DES TABLEAUXviii
LISTE DES FIGURESix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONSxi
REMERCIEMENTS.xiii

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Historique de la transplantation d'organes	2
1.1.1 Un mythe devenu réalité	2
1.1.2 Les grandes époques de l'évolution chirurgicale	3
1.2 Phénomène du rejet aigu	5
1.2.1 Les types de greffes: barrières génétiques à la transplantation	5
1.2.2 Concepts de base en immunologie	6
1.2.3 Le rejet aigu	8
1.3 Évolution du traitement immunosuppresseur	10
1.3.1 L'ère de la radiation et des agents chimiques et pharmacologiques	10
1.3.2 L'immunosuppression par l'attaque des lymphocytes T.	11
1.3.3 Les inhibiteurs des cellules régulatrices de la maturation du lymphocyte T.	12
1.3.4 Stratégies immunosuppressives de l'avenir.	14
1.4 Stratégies d'association	15

1.4.1	Limites des stratégies actuelles	15
1.4.2	Stratégies potentielles	19
1.5	Mécanismes d'action	20
1.5.1	Tacrolimus	20
1.5.2	Sirolimus	30
1.5.3	Effets secondaires du tacrolimus et du sirolimus	34
1.6	Interactions entre immunosuppresseurs : synergie, additivité ou antagonisme ?.....	37
1.7	Transplantation hétérotopique cardiaque	47
1.7.1	Historique	47
1.7.2	Physiologie du cœur hétérotopique.....	48
1.7.3	Modèle d'étude	48
1.8	But du projet de recherche	50

CHAPITRE 2: Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat.

2.1	Abstract	54
2.2	Introduction	55
2.3	Materials and methods.....	57
2.4	Results.....	60
2.5	Discussion	61
2.6	Acknowledgments	64
2.7	References.....	65

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1 Critique de la méthodologie	71
3.1.1 Modèle expérimental	71
3.1.2 Méthode d'évaluation d'une interaction synergique, additive ou antagoniste ..	76
3.2 Discussion des résultats	78
3.1.1 Prévention du rejet aigu.	78
3.1.2 Renversement du rejet aigu installé.	90
3.1.3 Mécanismes impliqués.	95
3.3 Perspectives	98

CHAPITRE 4: BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-1.	<i>Comparaison de la validité des différentes méthodes d'analyse d'une association d'agents</i>	<i>40</i>
TABLE 2-1.	<i>Effect of FK506 and RAPA in prevention of acute heart allograft rejection in the rat.</i>	<i>68</i>
TABLE 2-2.	<i>Effect of FK506 and RAPA in reversal of ongoing acute rejection in the rat</i>	<i>69</i>
TABLEAU 3-1.	<i>Interprétation du degré de synergie et d'antagonisme dans des études d'association de médicaments selon la méthode d'index d'association.</i>	<i>77</i>

LISTES DES FIGURES

FIGURE 1-1. <i>Le rejet aigu</i>	7
FIGURE 1-2. <i>Structures chimiques : (a) cyclosporine A, (b) tacrolimus et (c) sirolimus</i>	21
FIGURE 1-3. <i>Mécanisme d'action du tacrolimus</i>	29
FIGURE 1-4. <i>Mécanisme d'action du sirolimus</i>	33
FIGURE 1-5. <i>Exemple d'une association de 2 agents inhibiteurs analysée selon la simple addition mathématique</i>	39
FIGURE 1-6. <i>Relation entre l'équation de l'effet-médian (Chou, 1976) et d'autres équations biochimiques majeures</i>	42
FIGURE 1-7. <i>Exemple d'un graphique de l'effet-médian</i>	43
FIGURE 1-8. <i>Exemple d'un graphique en forme d'isobologramme</i>	45
FIGURE 1-9. <i>Transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat</i>	49
FIGURE 3-1. <i>Effet dose-dépendant du tacrolimus en prévention du rejet aigu de l'allogreffe cardiaque chez le rat</i>	82

- FIGURE 3-2.** *Courbe dose-réponse du tacrolimus en prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat* 83
- FIGURE 3-3.** *Effet dose-dépendant du sirolimus en prévention du rejet aigu de l'allogreffe cardiaque chez le rat* 84
- FIGURE 3-4.** *Courbe dose-réponse du sirolimus en prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat* 85
- FIGURE 3-5.** *Effet additif du tacrolimus (0.01 mg) et du sirolimus (0.02 mg) dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe cardiaque chez le rat* 86
- FIGURE 3-6.** *Effet synergique du tacrolimus (0.02 mg) et du sirolimus (0.02mg) dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe cardiaque chez le rat.* 87
- FIGURE 3-7.** *Effet synergique du tacrolimus (0.04 mg) et du sirolimus (0.04 mg) dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe cardiaque chez le rat* 88
- FIGURE 3-8.** *Droites de régression du tacrolimus, du sirolimus et celle de l'association tacrolimus-sirolimus.* 89
- FIGURE 3-9.** *Effets de l'association du tacrolimus et du sirolimus dans le renversement du rejet aigu présent dans l'allogreffe cardiaque chez le rat.* 92

LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ARN_m, Acide ribonucléique, messenger;

Ca²⁺, Calcium;

CI, Index d'association (combination index);

CMH, Complexe majeur d'histocompatibilité;

Cn, Calcineurine;

DAG, Diacylglycérol

e.g., Par exemple;

FKBP, Protéines de liaison du FK506;

GMCSF, Facteur de stimulation des macrophages et granulocytes;

IFN-(), Interféron ();

Ig(), Immunoglobuline ();

IL-(), Interleukine ();

IL-()R, Récepteur à l'interleukine ();

IP₃, Inositol triphosphate;

Mg²⁺, Magnésium;

mg/kg/j, milligramme par kilogramme par jour;

MMF, Mycophénolate de mofétil;

NFAT, Facteur nucléaire du lymphocyte T activé;

NFAT_c, Composante cytoplasmique du facteur nucléaire du lymphocyte T activé;

NFAT_n, Composante nucléaire du facteur nucléaire du lymphocyte T activé;

PL, Phospholipase;

RAPA, Rapamycine;

TCR, T cell receptor;

TNF, Facteur de nécrose tumorale;

TOR, Cibles de la rapamycine (target of rapamycin);

TK, Tyrosine kinase;

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord exprimer toute ma gratitude à mon directeur de recherche, Docteur Huifang Chen, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir confié ce projet de recherche de grande envergure. Je le remercie d'avoir veillé à ce que je puisse le réaliser avec succès ainsi que de m'avoir permise de participer à d'autres protocoles scientifiques importants que je considère fructifiants et uniques comme expérience de vie.

Je tiens, en outre, à remercier Docteur Louis Dumont pour avoir accepté de me superviser durant ma formation de maîtrise en tant que co-directeur. Merci pour votre grande disponibilité, votre support moral et vos précieux conseils qui m'ont fait découvrir le côté passionnant de la recherche scientifique.

De plus, j'aimerais remercier Docteur Shijie Qi et souligner sa grande compétence en tant que microchirurgien, Docteur Dasheng Xu, Docteur Junzheng Peng, Docteur Ding Yi Liu, Marc Jolicoeur et Carmen Rodriguez pour m'avoir aidée techniquement à réaliser ce projet de recherche, mais surtout d'avoir été de bons amis.

Somme toute, ces deux années de maîtrise n'auraient guère été aussi paisibles et agréables sans le soutien moral de toute ma famille, et la présence chaleureuse des amis et collègues. Merci à toute l'équipe du laboratoire de Docteur Dumont et aux personnels de Primates Caribbean Ltd, St-Kitts et des animaleries des campus Notre-Dame et Hôtel-Dieu, CHUM. Merci Bac Nhung d'avoir permis à mon père de renaître avec un nouveau rein : j'admire votre bonté et votre courage. *Con cảm ơn Bác Nhung đã cho bố con một nếp sống mới. Con rất cảm phục sự can đảm và tình thương vô bờ bến của bác.*

Cám ơn Bố Mẹ

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 HISTORIQUE DE LA TRANSPLANTATION D'ORGANE

Un mythe devenu réalité

La transplantation d'organe a vu le jour depuis plus de trois millénaires. Bien que cet art soit considéré de nos jours comme une pratique médicale acceptée, elle n'a été au départ qu'une simple médecine mythologique. Cependant, réel ou utopique, le remplacement d'organe a toujours véhiculé des valeurs tel que l'acquisition d'une meilleure performance physique, l'amélioration de la qualité de vie ou tout simplement la recherche d'une meilleure longévité. Quoi de mieux que de traiter un organe défaillant en le remplaçant totalement! C'est ainsi que dans chaque pays, dans chaque culture, naissait un bon nombre de divinités ou de héros chimériques. Ganesha, dieu de la sagesse et grand combattant, a été sans doute le premier mais aussi le plus connu du genre humain à recevoir une xénogreffe animale. Ce jeune garçon a vu sa vie se métamorphoser lorsque Shiva, une divinité indienne, lui a greffé une tête d'éléphant (Kahan, 1989).

Plusieurs autres récits faisant allusion à la transplantation ont, par la suite, vu le jour. Tel est le cas de la célèbre histoire de Pien Ch'iao, un chirurgien chinois du temps de Socrate, qui a amélioré la vie de deux malheureux hommes en échangeant leur cœur. L'un avait un esprit faible mais une grande volonté tandis que l'autre possédait peu de volonté mais un esprit fort. En remplaçant le cœur de chacun, Pien Ch'iao a voulu rétablir l'équilibre énergétique chez ces deux hommes (Kahan, 1988). En Occident, vers le quatrième siècle, les frères jumeaux Saint Cosmas et Saint Damian étaient reconnus comme étant des guérisseurs émérites utilisant des pratiques chirurgicales (Kahan, 1983). Enfin, vers l'an 348, la première allusion à la transplantation utilisant un donneur cadavérique a été recensée. Le classique *Leggenda Aurea of Jacopo da Varagine* raconte l'histoire d'un homme atteint de gangrène à une jambe qui a vu

sa vie s'améliorer après qu'il se soit fait transplanter la jambe d'un gladiateur africain récemment décédé (Kahan, 1991).

Les grandes époques de l'évolution chirurgicale

Les premières transplantations à être effectuées et décrites remontent au deuxième siècle avant J.-C., où la pratique d'autogreffes cutanées en rhinoplastie se faisait couramment jusqu'au seizième siècle. À cette époque, le chirurgien italien Gaspare Tagliacozzi semblait être un des seuls hommes de science à reconnaître le principe de l'individualité des transplantations de type autogreffe et à réfuter la possibilité des greffes entre individus ou entre espèces (Kahan, 1991).

L'idée de transplanter l'organe d'un individu dans un autre individu voire même dans un animal n'a été explorée que vers le dix-huitième siècle où John Hunter, surnommé le père de la chirurgie expérimentale, a transplanté une molaire humaine dans un coq (Flye, 1989). Non seulement, la transplantation de type allogreffe a été envisageable mais la xéno greffe était devenue une réalité. À cette époque, on a cru que la dent implantée s'était adaptée à son nouvel environnement.

Le domaine de la chirurgie a pris un tournant en 1905, lorsque Alexis Carrel en collaboration avec Charley Claude Guthrie, a développé une technique d'anastomose vasculaire (Carrel, 1902; dans Kahan, 1991). Cette méthode opératoire révolutionnaire lui a valu le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1912. Dorénavant, la transplantation d'un organe vascularisé était possible et une nouvelle ère essentiellement consacrée à ce type de transplantation a débuté. Les greffes humaines utilisant des organes cadavériques vascularisés étaient réalisables (Hamilton et Reid, 1984) tout comme le développement des nouvelles techniques de transplantation comme la transplantation hétérotopique (Kahan, 1991).

Depuis le début du vingtième siècle jusqu'à aujourd'hui, les techniques de transplantation n'ont cessé de s'améliorer. Les transplantations rénale (Hamilton et Reid, 1984), cardiaque (Lower et coll., 1961), pulmonaire (Hardy et coll., 1963), hépatique (Starzl et coll., 1964), pancréatique (Lillehei et coll., 1969) et cardio-pulmonaire (Reitz et coll., 1981) sont devenues une réalité pour l'homme. Cependant, malgré les nouvelles techniques chirurgicales et les nombreuses stratégies explorées en transplantation, l'essor du domaine de la transplantation se voit freiner par des problèmes comme le rejet aigu et les complications associées à l'utilisation des immunosuppresseurs. Ces problèmes et complications sont observés dans plus de 60% des cas de transplantation d'organe et demeurent l'une des principales causes d'échec des transplantations.

Des développements dans le domaine de l'immunosuppression sont essentiels pour approfondir nos connaissances et nous permettre de découvrir de nouvelles stratégies plus efficaces. Il faut également développer des protocoles qui mettent l'accent sur une immunosuppression plus spécifique.

1.2 PHÉNOMÈNE DU REJET AIGU

Les types de greffes : barrières génétiques à la transplantation

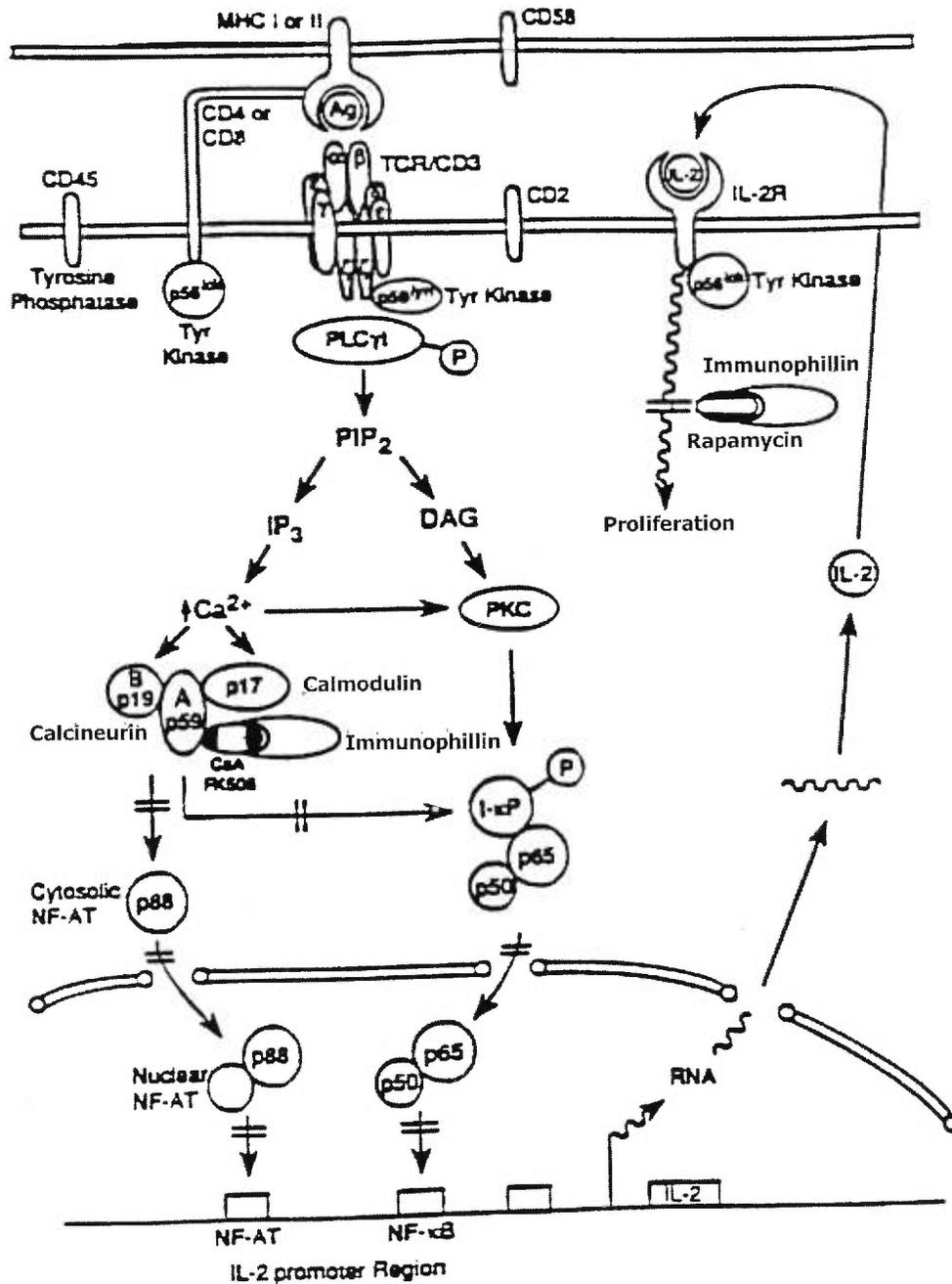
En transplantation d'organe, il existe quatre types de greffe selon la nature des donneurs et des receveurs (Roitt et coll., 1996). L'autogreffe est une intervention chirurgicale qui consiste à implanter un greffon chez le même individu. Le receveur devient alors son propre donneur, tel dans les cas de patients brûlés qui reçoivent une greffe de peau provenant d'une autre partie de leur corps. Comme la compatibilité entre donneur et receveur est intégrale, il n'y a pas de phénomène de rejet de l'autogreffe qui se produise, mais des phénomènes d'inflammation due aux interventions chirurgicales. Bien que le taux de réussite de l'autogreffe soit très élevé, il est impossible d'envisager une transplantation d'organe. La syngreffe est une pratique beaucoup plus rare puisque le donneur et le receveur sont des jumeaux identiques monozygotes. Encore ici, la compatibilité des tissus est totale et il n'y a donc pas de rejet qui se produise suite à une transplantation. Le taux de réussite demeure élevé, par contre le choix des organes à greffer est très limité. L'allogreffe est de loin le type de greffe que l'on rencontre le plus fréquemment en clinique. Le donneur et le receveur sont deux individus distincts, mais de même espèce. Bien que l'on essaie de trouver un donneur le plus compatible possible avec le receveur, afin de limiter la sévérité des phénomènes de rejet, ceux-ci sont inévitables. L'utilisation d'une immunosuppression devient nécessaire afin d'éviter la destruction de la greffe. Dans le cas d'allogreffe venant de donneur décédé, il est pratiquement possible de transplanter toutes les organes disponibles. L'accessibilité des organes à greffer est supérieure à celle de l'isogreffe ou de l'autogreffe. Cependant, le grand inconvénient demeure l'attente d'un organe provenant d'un individu où le taux de compatibilité est acceptable : le temps d'attente étant souvent beaucoup trop long. Le taux de réussite en est aussi réduit dû au rejet aigu et aux effets secondaires associés à l'utilisation des immunosuppresseurs. Le dernier type de greffe est sans doute

l'avenir de la transplantation. La xénogreffe, qui consiste en la transplantation d'un organe provenant d'une espèce différente de celle du receveur. C'est une nouvelle avenue qui permettrait d'augmenter le nombre de greffons disponibles et ainsi réduire le temps d'attente pour les receveurs en attente. Bien que la xénogreffe soit une réalité, elle suscite beaucoup de controverses notamment à caractère éthique. Il faudra réaliser des progrès dans plusieurs domaines avant de bénéficier pleinement de ce type de greffe.

Concepts de base en immunologie

Le corps humain est muni d'un système immunitaire qui veille à sa défense et qui le protège contre des agents pathogènes, des microbes ou des virus, voir de tous corps étrangers y compris une allogreffe. Le système immunitaire permet la distinction entre le soi et le non-soi à l'aide d'un réseau complexe de récepteurs cellulaires et de molécules solubles incluant le complexe majeur d'histocompatibilité qui représente la structure repère pour le soi (Robinson et Kindt, 1989). Les récepteurs lymphocytaires et les anticorps reconnaissent une vaste gamme de structures chimiques présentées par des toxines, des allergènes, des micro-organismes de même que celles présentes sur des tissus néoplasiques ou des greffons. La surveillance immunitaire est assurée par des cellules effectrices et régulatrices, par des facteurs de sécrétion, des anticorps et des lymphokines (molécules régulatrices). Le système immunitaire se divise en deux parties : l'immunité cellulaire et l'immunité humorale. Dans l'immunité cellulaire, la défense de l'organisme se fait essentiellement par des cellules. Elle regroupe les lymphocytes T et B, les cellules cytotoxiques (cellules K, cellules NK, éosinophiles), les cellulaires phagocytaires (monocytes, neutrophiles, éosinophiles) et les cellules auxiliaires (basophiles, mastocytes). Ces cellules participent à l'immunité cellulaire initiée par les infections, l'inflammation, les tumeurs immunitaires, l'auto-immunité et le greffon. L'immunité humorale résulte en la production d'anticorps dans le sang, les fluides corporels et les

sécrétions. L'objectif de la réponse humorale est de maintenir l'homéostasie à travers un processus d'élimination des substances et des organismes étrangers (Roitt et coll., 1996).



Tiré de Suthanthiran M. et al. *Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action*. Am. J. Kidney Dis. 28 : 159.

FIGURE 1-1. Le rejet aigu

Le rejet aigu

Lors d'une transplantation d'organe, le rejet aigu survient dans plus de 60% des cas et représente la cause principale d'échec. Il existe d'autres types de rejet (hyperaigu, chronique, accéléré) mais celui-ci est le processus le plus fréquemment observé en transplantation (Roitt et coll., 1996). Le rejet aigu se manifeste après quelques jours ou quelques semaines et perdure jusqu'à une période de plus de trois mois. Il est principalement dû à l'activation primaire des lymphocytes T et des nombreux mécanismes effecteurs conséquents. Bien que la transplantation d'organe représente un traitement bénéfique aux yeux des cliniciens, l'organe transplanté n'est simplement qu'un corps étranger pour le système hôte. Dans les cas de l'allogreffe ou de la xéno greffe, le système immunitaire du receveur perçoit le greffon comme étant non-soi, il initie alors une cascade d'événements dans le but de détruire l'organe greffé, c'est-à-dire de le rejeter (Figure 1-1).

Les antigènes principalement responsables du rejet de tissus différenciés génétiquement sont communément appelés antigènes d'histocompatibilité, ils représentent la cible du rejet. Ces antigènes sont présentés aux lymphocytes T sous une forme reconnaissable par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et les réactions qui en résultent sont vives. Les molécules du CMH sont exprimées sur des tissus transplantés et elles peuvent être induites par des cytokines comme l'interféron (IFN)- γ et le facteur de nécrose tumorale (TNF).

Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans le phénomène de rejet (Tilney et coll., 1990). Les lymphocytes T qui sont impliqués dans ce processus de défense reconnaissent, via leur récepteur TCR (T cell receptor), les antigènes provenant du donneur et qui sont associés avec le CMH. La structure du récepteur TCR fait en sorte que le lymphocyte T ne peut capter les antigènes peptidiques que s'ils sont associés avec les molécules du CMH (Cantrell et coll.,

1994). Les différences qui existent entre les molécules du CMH du donneur et celles du receveur affectent le niveau d'antigènes présentés au récepteur TCR du receveur. Dans le cas d'une transplantation de tissus génétiquement différents, un très grand nombre d'antigènes étrangers sont exprimés et reconnus par les lymphocytes T auxiliaires du receveur. L'association du complexe peptides antigéniques-molécules du CMH et du récepteur TCR du lymphocyte T auxiliaire inactivé amène l'activation de ce dernier. Le lymphocyte T auxiliaire activé sécrète, suite à une cascade d'événements intracellulaires, des lymphokines dont principalement l'interleukine (IL)-2. Ces lymphokines qui vont provoquer la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques, celle des lymphocytes B et celle des macrophages (Bjorkman et coll., 1987).

Pour atténuer le phénomène du rejet et préserver le greffon de façon maximale, l'activité immunitaire du receveur doit être réduite. Il existe plusieurs traitements immunosuppresseurs, dont certains n'ont eu qu'une utilisation réduite alors que d'autres plus prometteurs sont utilisés à l'heure actuelle.

1.3 ÉVOLUTION DU TRAITEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR

Même si la notion de transplantation d'organe a vu le jour il y a plus de trois millénaires, les premières approches thérapeutiques pour éviter les phénomènes de rejet aigu, ne remontent qu'au début du vingtième siècle. L'immunosuppression a commencé à être utilisée pour préserver le greffon chez les sujets transplantés en même temps que s'est fait le développement de l'immunologie. Maintenant, l'évolution des traitements immunosuppresseurs se fait en parallèle avec le développement des connaissances en immunologie. L'évolution des traitements immunosuppresseurs se divise principalement en quatre étapes : 1) l'ère de la radiation et des agents chimiques et pharmacologiques, 2) l'immunosuppression par l'attaque des lymphocytes T, 3) les inhibiteurs des cellules régulatrices de la maturation des composantes immunitaires et 4) stratégies immunosuppressives de l'avenir (Kahan, 1991).

L'ère de la radiation et des agents chimiques et pharmacologiques

La radiation totale des sujets transplantés a été la première approche thérapeutique immunosuppressive utilisée. C'est en 1908 que la première expérience de radiation totale a été effectuée dans le but de réduire la réponse immunitaire (Benjamin et Sluka, 1908 : dans Kahan, 1991). Les auteurs ont démontré à cette époque que la radiation totale chez des lapins traités au sérum de bovin les empêchaient de produire des anticorps. Ce n'est par contre que vers 1960 que cette pratique a été utilisée dans le traitement du rejet de greffe de moelle osseuse (Mannick et coll., 1960; Rapaport, 1972). Avec la découverte de nouveaux agents chimiques et pharmacologiques, le traitement par radiation totale a été abandonné puisque cette stratégie, dont la réversibilité est très lente, comporte des effets secondaires graves rarement prévisibles et un taux de mortalité élevé à cause des infections.

C'est vers les années 1914 que Murphy (1914 : dans Kahan, 1991) et Hektoen (1916a; 1916b : dans Kahan, 1991) ont étudié et documenté les effets immunosuppresseurs de composés organiques comme le benzène et le toluène. Les moutardes d'azote possèdent aussi des effets similaires (Baker et coll., 1952 : dans Kahan, 1991). Les substances antiprolifératives comme le 6-mercaptopurine et son dérivé, l'azathioprine, dont des études ont permis de démontrer qu'elles possédaient un profil immunosuppresseur en inhibant la production d'anticorps (Hitchings et Elion, 1954 : dans Kahan, 1991) prolongeaient la survie d'allogreffes cutanées chez le lapin et la survie d'allogreffes rénaux dans un modèle canin (Calne et coll., 1962 : dans Kahan, 1991). L'utilisation d'azathioprine en association avec un glucocorticoïde (azathioprine-prednisone) a été la première thérapie d'association utilisée et elle est demeurée pendant plus d'une dizaine d'années la thérapie de choix pour prévenir le rejet d'un allogreffe. Cette association thérapeutique, bien que beaucoup moins agressive que la radiation totale, comportait cependant des effets indésirables importants comme l'aplasie de la moelle osseuse, des perforations intestinales et des infections. Devant les limites de ces traitements, deux tentatives ont été effectuées afin d'améliorer l'efficacité du traitement azathioprine-prednisone : d'abord la radiation locale du greffon (Wolf et coll., 1969), puis le drainage thoracique (Woodruff et Anderson, 1963 : dans Kahan, 1991). Elles ne furent pas bénéfiques.

L'immunosuppression par l'attaque des lymphocytes T

Puis est apparue l'ère de l'immunosuppression par l'attaque des lymphocytes T. Dans les années 1970, on a mis l'emphase sur les agents polyclonaux. Ceux-ci possédaient une forte immunosuppression, une grande efficacité et un large spectre mais malheureusement ils étaient non-spécifiques (Russell et Monaco, 1967 : dans Kahan, 1991). Avec le développement des biotechnologies, le traitement avec des anticorps monoclonaux est devenu envisageable. En plus d'éliminer les cellules portant des marqueurs spécifiques, ils étaient aptes à les neutraliser.

L'anticorps monoclonal OKT3 a été le premier anticorps spécifique à être utilisé en immunosuppression. Bien qu'il soit plus sélectif que les agents polyclonaux, l'administration d'OKT3 s'accompagne de réactions sérieuses même létales (Cosimi et coll., 1981). Elle peut également provoquer le développement de lymphômes lorsqu'il est associé à l'azathioprine, à la cyclosporine A ou à la prednisone. Les problèmes associés à l'immunosuppression actuelle expliquent le développement de nouveaux agents sélectifs : l'inhibiteur du récepteur du lymphocyte T de l'IgG_{2B} (Kurrle et coll., 1989), les anticorps anti-CD4 (Qin et coll., 1989), l'inhibiteur du récepteur de l'IL-2 (Cantarovich et coll., 1989) et les anticorps chimériques (Sweny et coll., 1991).

Les inhibiteurs de la maturation du lymphocyte T

Cette ère débute dans les années 1980 et on peut la qualifier d'ère de l'immunopharmacologie. Les nouvelles substances proposées peuvent être réparties en quatre classes selon leur site d'action : 1) les inhibiteurs de transcription, 2) les inhibiteurs de synthèse de nucléotides, 3) les inhibiteurs des facteurs de croissance du signal de transduction et 4) les inhibiteurs de la différenciation cellulaire.

En plus d'être l'agent prototype le mieux connu et encore le plus utilisé dans le traitement du rejet de greffe, la cyclosporine A fait partie de la classe des inhibiteurs de transcription. Isolée pour une première fois en 1969 du champignon *Tolypocladium inflatum* pour son activité antibiotique, la cyclosporine A a vite été oubliée. Cependant, Borel et coll. (1976) ont ressuscité la cyclosporine A, en démontrant qu'elle possédait un puissant effet immunosuppresseur. Même si les techniques de chirurgie pour une transplantation d'organe solide ont progressé significativement, le succès remarquable de la transplantation d'organe chez l'humain est surtout tributaire du développement d'immunosuppresseurs comme la cyclosporine A. Cet

immunosuppresseur a été le premier agent sélectif anti-lymphocyte T. Les avantages de la cyclosporine A incluent une grande efficacité, la réduction des infections post-opératoires, la diminution des épisodes de rejet et l'absence de myélotoxicité. Cependant, des cas de néphrotoxicité et d'hépatotoxicité et des désordres du système nerveux central ont été observés avec son utilisation. Pour ces raisons, la recherche de nouveaux immunosuppresseurs se poursuit.

Dans la même classe que celle de la cyclosporine A, il y a le tacrolimus (FK506). Ce macrolide d'origine fongique, a été développé originellement pour son activité antibiotique et par la suite pour ses propriétés immunosuppressives (Kino et coll., 1987). Ces agents, bien que distincts, empêchent l'activation du lymphocyte T par des mécanismes similaires. De manière directe ou indirecte, la cyclosporine A et le tacrolimus inhibent l'expression *de novo* des protéines de régulation du noyau et des gènes activateurs du lymphocyte T, comme ceux encodant pour certains proto-oncogènes (ex. *H-ras*, *C-myc*), des cytokines (ex. IL-2) et des récepteurs pour les cytokines dont l'IL-2 (IL-2R).

Le sirolimus (rapamycine; RAPA) se classe parmi les inhibiteurs du signal de transduction des facteurs de croissance. Compte tenu que ce macrolide antibiotique possède une structure chimique très similaire à celle du tacrolimus, des études (Calne et coll., 1989) ont été effectuées pour évaluer son profil immunosuppresseur. En effet, le sirolimus, actuellement en phase III du développement clinique, est un agent immunosuppresseur prometteur. Il inhibe le signal de l'IL-2 et le signal de transduction d'autres facteurs de croissance (Seghal et coll., 1995). Le leflunomide qui agit en inhibant la synthèse de pyrimidine ainsi que le récepteur de facteur de croissance associé à la tyrosine kinase (Kahan, 1991) fait partie de la même classe d'immunosuppresseurs.

Dans la classe des inhibiteurs de la synthèse des nucléotides, on retrouve le mycophénolate de mofétil qui inhibe l'enzyme inosine monophosphate déhydrogénase et prévient la synthèse *de novo* de guanosine et déoxyguanosine. Le mizoribine qui inhibe la biosynthèse de purines et le bréquinar de sodium qui inhibe l'enzyme dihydroorotate déhydrogénase et prévient la synthèse de pyrimidines.

L'autre classe d'immunosuppresseurs de nouvelle génération, les inhibiteurs de différenciation, ne comprend qu'un agent soit le 15-déoxyspergualin. Même si des études ont démontré que cet agent prévient la différenciation des lymphocytes T et B en cellules effectrices matures, son mécanisme d'action demeure jusqu'à ce jour inconnu.

Stratégies immunosuppressives de l'avenir

Le but majeur des recherches en immunosuppression est d'augmenter la sélectivité et la spécificité d'action des molécules. C'est l'activité médiée par les lymphocytes T et B plutôt que celle médiée par les cellules immunitaires non-spécifiques telles les granulocytes, les monocytes et les macrophages qui constitue la cible privilégiée. La compréhension du phénomène de stimulation induite par l'alloantigène, de la transduction du signal et/ou de la voie de maturation des lymphocytes T et B devient essentielle pour le développement d'une immunosuppression efficace et sécuritaire.

Une seconde approche stratégique consiste à exploiter les associations d'immunosuppresseurs. Cette approche pourrait améliorer l'immunosuppression et minimiser la toxicité induite par les immunosuppresseurs en utilisant des doses plus faibles de chaque agent. Dans le présent travail, nous explorons la validité de cette stratégie.

1.4 STRATÉGIES D'ASSOCIATION D'IMMUNOSUPPRESSEURS

Le but de l'utilisation d'immunosuppresseurs en association est d'obtenir des effets thérapeutiques plus favorables que l'utilisation d'un seul agent. Les bénéfices peuvent être soit une augmentation de l'efficacité thérapeutique, la diminution de la toxicité envers l'hôte, l'augmentation de la sélectivité de l'effet ou l'amélioration de l'index thérapeutique, voire la réduction ou le retard dans le processus de résistance à l'agent. Jusqu'à présent, il n'existe aucun agent immunosuppresseur idéal pour le traitement du rejet aigu de greffe. Le principe pharmacologique de la thérapie d'association demeure tout à fait indiqué dans la transplantation d'organe puisqu'il s'agit d'une stratégie qui vise à augmenter l'efficacité thérapeutique des agents mis en association tout en minimisant leurs effets secondaires.

Limites des stratégies actuelles

Les premières associations d'immunosuppresseurs pour traiter le rejet de greffe remontent au milieu des années 60. À l'époque, l'utilisation d'azathioprine-prednisone a permis aux patients d'avoir recours à une thérapie immunosuppressive beaucoup moins drastique que le traitement par radiation. Cette association a permis de diminuer l'incidence du rejet de greffe en même temps que de réduire le taux de mortalité dû aux infections et à la toxicité des médicaments. Avec l'arrivée de nouveaux agents immunosuppresseurs, que ce soit de molécules connues pour lesquelles on a découvert de nouvelles propriétés ou bien de nouvelles molécules, le principe de la thérapie d'association a pris beaucoup d'ampleur en immunosuppression.

Très rapidement, l'association cyclosporine A et prednisone est apparue comme une avenue thérapeutique intéressante puisque ce traitement permet une inhibition de la production d'IL-2 en

plus d'une inhibition de l'expression génique des cytokines autres que l'IL-2 (IL-1, IL-6, INF- γ et TNF). Cependant, le manque de spécificité et de sélectivité des glucocorticostéroïdes et le besoin d'utiliser des doses élevées de cyclosporine A ont rendu cette association peu intéressante compte tenu des effets secondaires observés (Kahan, 1991). De nos jours, les cliniciens administrent la cyclosporine A et des glucocorticostéroïdes aux patients transplantés mais cette fois-ci en association avec l'azathioprine. L'azathioprine est un dérivé du 6-mercaptopurine, un anti-métabolite qui inhibe la biosynthèse de nucléotides. Cette triple association a permis l'utilisation de doses plus faibles de chaque agent permettant de minimiser les effets indésirables. L'administration de la triple thérapie cyclosporine A-azathioprine-prednisone est devenue le traitement immunosuppresseur standard contre le rejet de greffe. Bien que cette thérapie ait apporté d'excellents résultats en terme de diminution de l'incidence des crises de rejet, un traitement qui inclut l'utilisation de glucocorticostéroïdes n'est pas idéal puisque ceux-ci occasionnent des effets indésirables dans plusieurs systèmes. De plus, lorsque le patient répond moins bien aux effets immunosuppresseurs de la cyclosporine A et que par la suite les doses initiales administrées sont augmentées afin d'obtenir le même niveau d'immunosuppression, des effets secondaires importants peuvent survenir.

Avec la découverte des propriétés immunosuppressives du tacrolimus, on a proposé des associations avec ce nouvel agent. Parmi celles-ci, l'association tacrolimus-cyclosporine A a apporté d'intéressants résultats. Le tacrolimus et la cyclosporine A sont des macrolides complètement différents mais qui agissent de la même façon, c'est-à-dire en bloquant l'activité phosphatase de Cn (Bruserud et Pawelec, 1993). Des études (Todo et coll., 1988) ont rapporté que l'association tacrolimus-cyclosporine A était plus efficace qu'une monothérapie au tacrolimus ou à la cyclosporine A pour prolonger la survie d'allogreffes cardiaques, rénales et hépatiques chez le rat. Cependant, aucune étude n'a évalué les effets secondaires de cette

association. Ce n'est que plus tard qu'on a démontré que les effets immunosuppresseurs et les effets secondaires du tacrolimus et de la cyclosporine A étaient explicables par leur mécanisme d'action (Dumont et coll., 1992). Non seulement les effets immunosuppresseurs étaient synergiques dans le cas de l'association tacrolimus-cyclosporine A, mais les effets indésirables également. Tanabe et coll. (1994) ont également démontré que l'association du tacrolimus et des agents anti-métaboliques (mizoribine, azathioprine et mycophénolate de mofétil) procure des effets immunosuppresseurs additifs (tacrolimus-mycophénolate de mofétil) ou synergiques (tacrolimus-mizoribine, tacrolimus-azathioprine). Récemment, l'association tacrolimus-mycophénolate de mofétil a montré des effets synergiques dans la prévention et le renversement du rejet aigu (Ahsan et coll., 1997; Antoniou et coll., 1996; Eckhoff et coll., 1998; Roth et coll., 1998; Taylor, 1997).

Plusieurs autres associations incluant la cyclosporine A, le sirolimus et le mycophénolate de mofétil ont été évaluées expérimentalement et certaines d'entre-elles ont fait l'objet d'études cliniques multicentriques. Entre autre, l'association cyclosporine A-mycophénolate de mofétil a démontré une efficacité contre le rejet d'allogreffe tissulaire chez le rat (Benhaim, 1996). Kahan et coll. (1993) ont rapporté que des traitements combinant la cyclosporine A et des médicaments anti-métaboliques (6-mercaptopurine, mizoribine ou mycophénolate de mofétil) apportaient des effets additifs dans la prolongation de l'allogreffe cardiaque chez le rat. Le bréquinar de sodium associé à la cyclosporine A ou au sirolimus a des effets synergiques dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. L'association cyclosporine A-sirolimus a été explorée par plusieurs chercheurs (Chen et coll., 1992; Kahan et coll., 1991; Stepkowski et coll., 1995, 1996; Wasowska et coll., 1997). Elle semblait synergique tant dans des études *in vivo* que *in vitro*. Certaines études (Chavin et coll., 1994; Takazawa et coll., 1996) évaluant l'association d'anticorps monoclonaux avec des agents immunosuppresseurs ont rapporté des effets synergiques pour la survie des allogreffes

cardiaques (anticorps monoclonal-mycophénolate de mofétil) et pour la tolérance (anticorps monoclonal-tacrolimus).

Des triples thérapies ont également été évaluées. Celle du bréquinar de sodium-cyclosporine A-sirolimus (Kahan et coll., 1993; Stepkowski et Kahan, 1993; Tu et coll., 1995) a procuré des effets synergiques *in vitro* et *in vivo*, celle de la cyclosporine A-prednisone-mycophénolate de mofétil a procuré des effets cliniques significatifs (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Wiesel et Carl, 1998) et celle de la leflunomide-cyclosporine A-mycophénolate de mofétil a été efficace dans le d'une xénogreffe (Wennberg et coll., 1997).

Les stratégies actuelles impliquent l'administration de doses relativement élevées d'agents immunosuppresseurs efficaces. Cependant, le prix à payer pour obtenir une réelle efficacité immunosuppressive demeure la présence d'effets secondaires importants. Il est, en outre, important d'éviter une immunosuppression excessive qui favorise les infections. Une alternative intéressante vise à utiliser une association synergique d'immunosuppresseurs à des doses individuelles sous-thérapeutiques et dépourvues d'effets secondaires. Le concept d'interactions synergiques a été proposé par Hitchings en 1973 (Kahan, 1995); il a démontré que l'utilisation concomitante de sulfaméthoxazole et de triméthoprimine procurait un effet thérapeutique significatif en plus de permettre la réduction des doses individuelles des deux antibiotiques.

La formule de l'effet-médian a été démontrée comme étant très utile pour déterminer les interactions entre agents immunosuppresseurs. Parmi les substances les plus connues en immunosuppression, l'association cyclosporine A-sirolimus représente celle qui a démontré la plus forte synergie (Kahan, 1995) et ce tant dans des études *in vitro* de prolifération et de

cytotoxicité que dans des études *in vivo* de modèles d'allogreffe cardiaque, rénale et pancréatique (Kahan, 1991).

Stratégies potentielles

L'association cyclosporine A-sirolimus a été démontrée comme étant synergique dans le rejet aigu. Bien que cette association semble la plus efficace, il n'en demeure pas moins que la cyclosporine A entraîne des effets secondaires tel que la néphrotoxicité, la neurotoxicité, l'hyperglycémie et une hypertension; même à doses faibles.

L'association tacrolimus-sirolimus est une stratégie potentiellement intéressante puisque le tacrolimus et la cyclosporine A possèdent un mécanisme d'action similaire. Il est alors envisageable de prévoir que l'association tacrolimus-sirolimus aura des effets synergiques à doses réduites, tout comme celle de cyclosporine A-sirolimus. Comme ces agents immunosuppresseurs possèdent des mécanismes d'action différents et qu'ils inhibent le cycle cellulaire à des stades différents, il est possible d'envisager une interaction immunosuppressive synergique.

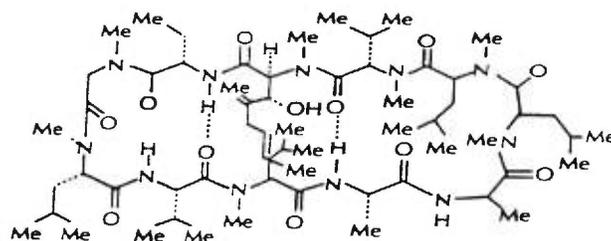
1.5 MÉCANISMES D'ACTION

Le tacrolimus et le sirolimus sont deux agents immunosuppresseurs qui possèdent des structures chimiques semblables et qui se lient au même récepteur. Cependant, leurs mécanismes d'action sont distincts l'un de l'autre et les voies de signalisation qu'ils inhibent sont différentes. De plus, le tacrolimus et le sirolimus affectent le cycle cellulaire à des stades différents. Il est possible que l'association de ces deux agents puisse être bénéfique (additivité ou synergie) et prolonger la survie d'allogreffe cardiaque. Cette association pourrait aussi renverser le rejet aigu présent dans un modèle de transplantation hétérotopique cardiaque chez le rat.

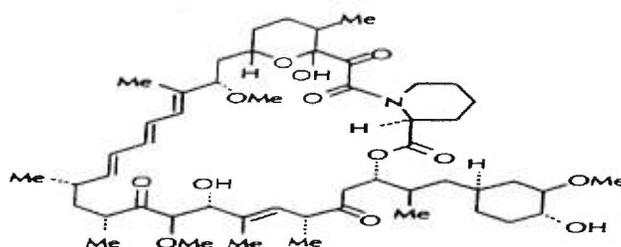
Tacrolimus

Le tacrolimus a été découvert et isolé pour la première fois en 1984 par des chercheurs japonais à partir d'un échantillon de terre à Tsukuba. Tacrolimus est produit par le champignon *Streptomyces tsukubaensis* qui diffère des autres lignées de *Streptomyces* connues, de par ses caractéristiques morphologiques et physiologiques (Kino et coll., 1987). Les caractéristiques pharmacocinétiques du tacrolimus ont été évaluées et présentées dans l'ouvrage de Iwasaki et coll. (1991). Son profil pharmacocinétique comprend les points suivants : 1) le tacrolimus possède une clairance métabolique élevée; 2) il est hautement métabolisé; 3) il ne possède pas de métabolite sans effet immunosuppresseur; 4) à de faibles concentrations, il se distribue préférentiellement dans les cellules sanguines; 5) il se lie hautement aux protéines plasmatiques; 6) il est excrété par la bile principalement. De plus, comme le tacrolimus est un agent hydrophobe, les solutions aqueuses sont difficiles à préparer (Goto et coll., 1991). Le développement d'une nouvelle formulation émulsive comprenant tacrolimus et l'hydroxypropyl

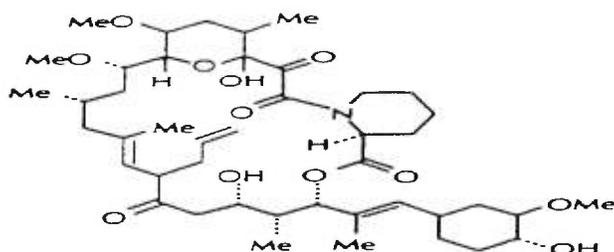
methylcellulose a été introduite par Honbo et coll. (1987) afin de permettre l'administration par voie orale sans nuire à la stabilité du produit.



(a) cyclosporine A



(b) tacrolimus (FK506)



(c) sirolimus (rapamycin)

Tiré de BIERER B.E. *Cyclosporin A, FK506, and rapamycin* : binding to immunophilins and biological action. Chem. Immunol. 59 : 128, 1994.

FIGURE 1-2. Structures chimiques (a) de la cyclosporine A, (b) du tacrolimus et (c) du sirolimus

Ochiai et coll. (1987) ont rapporté que le macrolide tacrolimus possède de puissantes propriétés immunosuppressives. Le tacrolimus a démontré des résultats très positifs dans la réaction mixte du lymphocyte sans toutefois inhiber de manière universelle la prolifération cellulaire (Goto et coll., 1991). Le tacrolimus a suscité beaucoup d'intérêt et il est considéré comme un agent immunosuppresseur très prometteur. Depuis son introduction, le tacrolimus a été évalué dans plusieurs types de greffe d'organe. Les premières études (Peters et coll., 1993) du tacrolimus effectuées chez l'homme ont trait au traitement du rejet aigu d'allogreffes rénales et hépatiques. Plusieurs études multicentriques ont été menées afin d'évaluer l'efficacité de tacrolimus comparativement à celle de la cyclosporine A. Ces études ont démontré que le tacrolimus est tout aussi efficace que la cyclosporine A dans la greffe rénale ou hépatique (The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group, 1994; Williams et coll., 1996). Il y a des évidences que le tacrolimus soit efficace dans d'autres indications comme la maladie de la greffe versus l'hôte suite à une transplantation de la moelle osseuse, la transplantation des organes thoraciques ou la transplantation pancréatique (Gruessner, 1997).

Les effets du tacrolimus sont similaires à ceux de la cyclosporine A (Bruserud et Pawelec, 1993), bien que ces deux agents possèdent des structures chimiques différentes (Figure 1-3). Les effets cellulaires du tacrolimus sont maintenant bien définis (Peters et coll., 1993; Spencer et coll., 1997). Comme la cyclosporine A, le tacrolimus est un macrolide fongique et il exerce des effets inhibiteurs puissants sur l'activation du lymphocyte T. Il se lie spécifiquement aux immunophilines, appelées protéines de liaison (FKBP), qui sont présentes dans le cytoplasme. Ces protéines de liaison fonctionnent comme des isomérases cis/trans peptidyl/prolyl. Leur liaison au tacrolimus inhibe leur activité enzymatique. Même si la formation d'un complexe immunosuppresseur-immunophiline est primordiale pour déclencher une action immunosuppressive, l'inhibition de l'activité isomérase cis/trans peptidyl/prolyl ne semble pas

essentielle. En effet, l'inhibition de l'activité rotamase des immunophilines n'est pas suffisante pour expliquer l'effet immunosuppresseur du tacrolimus et du sirolimus (Bierer et coll., 1990). La formation du complexe immunosuppresseur-immunophiline résulte plutôt en un gain de fonction, c'est-à-dire que le complexe module l'activité d'autres cibles spécifiques intracellulaires (Bierer, 1994; Schreiber et coll., 1991). Morris (1996) a rapporté que FKBP-12 est jusqu'à date l'isoforme connu le plus impliqué dans l'activité immunosuppressive du tacrolimus. À des concentrations *in vitro* de 10 à 100 fois inférieures à celles de la cyclosporine A, le tacrolimus inhibe la transcription des gènes de l'activation pour la production de IL-2 et d'autres promoteurs de croissance de cytokines comme IL-3, IL-4, IFN- γ , le facteur de stimulation du macrophage et du granulocyte (GM-CSF) et TNF- α ; en plus des proto-oncogènes tels *ras*, *myc* et *rel*. Tacrolimus inhibe aussi l'expression de IL-2R et IL-7R (Morris, 1993; 1996; Thomson et coll., 1995). Le tacrolimus inhibe préférentiellement les cytokines produits par les lymphocytes T auxiliaires de type 1 ou T_H1 (comme IL-2, TNF- α et IFN- γ) par rapport aux cytokines produites par des lymphocytes T auxiliaires de type 2 ou T_H2 (comme IL-4, IL-5 et IL-10, qui sont plus impliquées dans l'activation du lymphocyte B et dans la production d'anticorps) (Thomson et coll., 1995). De plus, Peters et coll. (1993) ont rapporté que le tacrolimus inhibe la réaction lymphocytaire mixte, démontrant ainsi l'effet du tacrolimus sur l'activation du lymphocyte T cytotoxique et l'activation du lymphocyte B dépendante du Ca²⁺. Cependant, le tacrolimus ne semble pas inhiber la prolifération secondaire au lymphocyte T activé en réponse à IL-2, ni interférer avec des antigènes de présentation, des mononucléaires phagocytaires, ou des cellules NK (Manez, et coll., 1995). La production de IL-2 et d'autres cytokines par les lymphocytes T auxiliaires est essentielle dans la réponse immunitaire et elle est impliquée dans le processus de rejet de greffe. En effet, des biopsies hépatiques effectuées chez des patients ayant reçu une transplantation démontrent une surexpression de IL-2 et IL-4 durant les stades

de rejet aigu (Gaweco et coll., 1994). De plus, le tacrolimus inhibe la migration lymphocytaire *in vitro* en réponse à plusieurs facteurs chémotactiques. Il existe aussi des effets additionnels qui contribuent aux effets du tacrolimus comme l'inhibition d'autres activités cellulaires comme l'activation de la synthétase de l'oxyde nitrique, l'apoptose et la dégranulation cellulaire (Thomson et coll., 1995). Contrairement à la cyclosporine A qui augmente les taux du facteur de croissance tumorale (TGF)- β dans le greffon, le tacrolimus prévient l'augmentation de TGF- β . FKBP-12 est associé à l'isoforme de type I du récepteur TGF- β et le tacrolimus bloque sélectivement la fonction de ces récepteurs puisque le TGF- β est impliqué dans la fibrinogénèse et la prolifération des cellules musculaires lisses, et dans le développement du rejet chronique (Spencer et coll. 1997). Son inhibition demeure essentielle.

Tacrolimus et stimulation antigénique. Lors du rejet aigu, sur les plans intracellulaire et moléculaire, le signal de transduction et l'activation du lymphocyte T sont contrôlés par l'expression de cytokines (Halloran et coll., 1993; Hutchinson, 1991; Mason, 1986). Lorsqu'une cellule présentatrice d'antigène présente des peptides antigéniques au lymphocyte T auxiliaire qui a préalablement reconnu les antigènes à l'aide de son récepteur TCR, une cascade d'événements en découle (Figure 1-3). Les tyrosines kinases stimulent plusieurs voies de signalisation et de composantes liées à l'activation du lymphocyte T, incluant *ras* et les protéines G, la phospholipase (PL)C- δ 1, les protéines kinases, le phosphatidyl inositol-3-kinase, et bien d'autres (Cantrell et coll., 1994). Le récepteur TCR est couplé à une protéine tyrosine kinase (TK) qui phosphoryle et stimule la PLC- δ 1. La PLC- δ 1 phosphorylée permet ensuite la formation du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP₃) à partir de la dissociation de l'inositol phosphate situé dans la membrane cellulaire. Par la suite, la voie de signalisation diverge vers le DAG qui active la protéine kinase C. Une des voies de signalisation de la protéine kinase C

initie la transcription des gènes qui encodent les facteurs de transcription des gènes de cytokines (e.g. *myc*, *fos*, *jun*), comme la composante nucléaire du facteur nucléaire du lymphocyte T activé (NFAT_n). Du côté de la voie de signalisation de l'IP₃, l'IP₃ se lie aux récepteurs situés sur le réticulum endoplasmique pour stimuler le relargage du calcium (Ca²⁺) dans le cytoplasme. L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire permet l'activation de la calcineurine (Cn) qui est une enzyme dépendante du Ca²⁺. L'association du Ca²⁺ et de Cn, qui est aussi une phosphatase dépendante de la calmoduline, agit sur des substrats encore inconnus qui vont permettre la translocation de la composante cytoplasmique du facteur nucléaire du lymphocyte T activé (NFAT_c) vers le noyau. Des études (Flanagan et coll., 1991) montrent que lors d'une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, NFAT_c demeure inactivé mais passe du cytoplasme au noyau. Lorsque NFAT_c et NFAT_n s'associent pour former le complexe du facteur nucléaire du lymphocyte T activé (NFAT), la transcription de l'ARN messenger (ARN_m) de l'IL-2 débute. Bien que la majorité de l'expression de l'IL-2 se manifeste au site du NFAT, d'autres sites nucléaires peuvent être également importants comme les sites NFκβ et octamère. Le comportement caractéristique des gènes de l'IL-2 requiert l'interaction de plusieurs facteurs de transcription liant ces sites nucléaires (Gaulton et Williamson, 1994). L'IL-2 produit par le lymphocyte T est ensuite relâchée et va se lier à ses récepteurs distribués sur plusieurs types cellulaires. Les cellules deviennent alors aptes à la différenciation, à la mitose et éventuellement à l'expansion clonale. Les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes B et les macrophages activés contribuent ainsi à l'expression du rejet de la greffe.

Suite à l'administration du tacrolimus, le complexe tacrolimus-FKBP se forme et celui-ci se lie à Cn et inhibe son activité (Figure 1-3). Les voies de signalisation de la transduction pour les lymphocytes T sont interrompues. En présence de signaux co-stimulants, la liaison d'un antigène au complexe TCR-CD3 sur la surface des lymphocytes T inactivés induit la prolifération

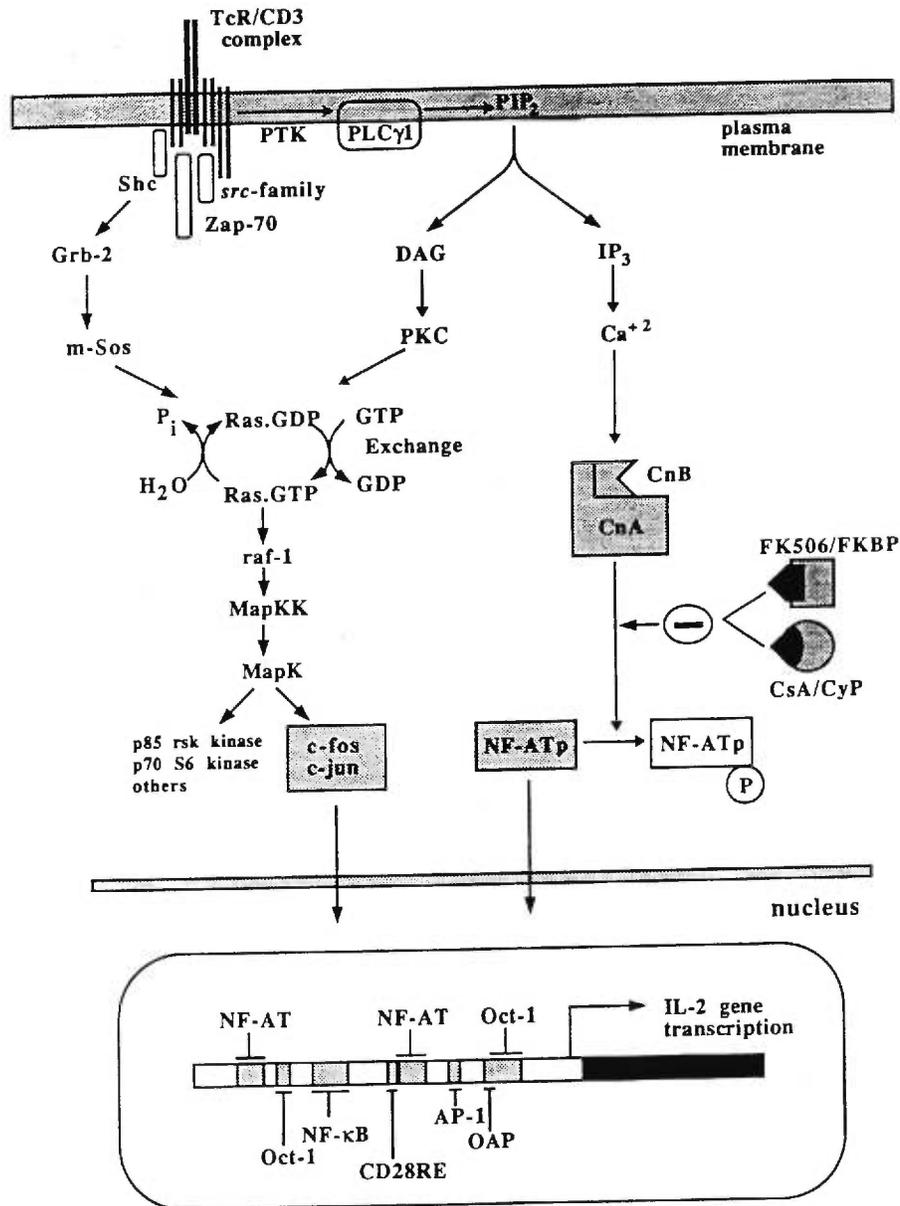
d'autres lymphocytes T et les fonctions effectrices telles la cytotoxicité et la production de lymphokines. L'activation du lymphocyte T résulte en plusieurs événements permettant la transcription de gènes. Le tacrolimus est un agent liposoluble qui traverse la membrane cellulaire des lymphocytes T pour aller se lier à son récepteur FKBP, qui est en abondance dans le cytoplasme. Le tacrolimus devient efficace seulement en présence de son récepteur intracellulaire. Le tacrolimus inhibe plusieurs processus d'activation dépendants du Ca^{2+} , incluant l'activation de la transcription des gènes de lymphokines, l'induction de l'apoptose et la dégranulation. Le tacrolimus inhibe la voie de transduction du signal, caractérisée par une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Liu et coll. (1991) ont démontré que le tacrolimus-FKBP se lie à Cn, une phosphatase sérine/thréonine dépendante de la calmoduline et du Ca^{2+} , confirmant que le complexe médicament-immunophiline est la composante biologique active. Cn est une protéine hétérodimère à deux sous-unités : l'une catalytique, CnA, et l'autre régulatrice, CnB. L'identification de Cn comme une cible sensible à certains immunosuppresseurs suggère que cette phosphatase est une composante essentielle dans les voies de transduction de signal permettant la production de lymphokines.

Des recherches effectuées pour identifier des substrats de Cn dans les lymphocytes T ont mis l'emphase sur les éléments essentiels de l'activation transcriptionnelle du promoteur de IL-2 (Crabtree, 1989). L'activité du facteur de transcription appelé NFAT est primordiale pour la transcription de IL-2, $TNF\alpha$ et d'autres gènes de lymphokines. NFAT est une phosphoprotéine hétérodimère qui possède des composantes cytoplasmiques appelées $NFAT_c$ et *fos* et *jun*, des éléments de la famille de facteurs de transcription AP-1 (Jain et coll., 1992; Northrop et coll., 1993). La translocation de $NFAT_c$ du cytoplasme au noyau se produit suite à l'activation du lymphocyte T. Cette translocation est dépendante du Ca^{2+} et peut être inhibée par le tacrolimus et la cyclosporine A (McCaffrey et coll., 1993). Il a d'ailleurs été rapporté que des ARN_m

encodant NFAT ont été identifiés dans les splénocytes, les thymocytes, les lymphocytes T et B, les cellules NK et les mastocytes. NFAT_c a aussi été identifiée comme substrat de Cn (Jain et coll., 1993). La modulation de la phosphorylation de NFAT_c, et donc l'activité de NFAT_c, explique la sensibilité aux immunosuppresseurs pour la transcription de IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF et TNF- α . Il s'avère que les sites NFAT_c existent dans d'autres promoteurs de lymphokines, mais leur caractérisation n'a pas encore été détaillée. Le tacrolimus ne module pas seulement l'activité du facteur de transcription NFAT_c. Il y a des évidences qui suggèrent que l'activité des facteurs Oct-1/OAP et NF κ B y soit sensible (O'Keefe et coll., 1992). NF κ B est une protéine hétérodimère qui subit une translocation du cytoplasme au noyau lors de son activation. Dans le cytoplasme, NF κ B est stabilisée par sa liaison à une troisième protéine I κ B qui semble être phosphorylée sous sa forme liée. La déphosphorylation de I κ B permet le relâchement de NF κ B et sa translocation vers le noyau ainsi que la dégradation de I κ B. On a émis l'hypothèse que Cn catalyse la déphosphorylation de I κ B. Il existe également d'autres substrats de Cn. La synthétase de l'oxyde nitrique a été récemment identifiée comme un substrat de Cn, mais son rôle dans les lymphocytes T n'a pas encore été élucidé (Dawson et coll., 1993). Des substrats de Cn qui régulent la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques et mastocytes et l'exocytose ont également été rapportés dans la littérature.

Par ailleurs, il existe des controverses concernant l'effet du tacrolimus sur l'apoptose. Migita et coll. (1995) ont démontré que le tacrolimus augmente l'apoptose exclusivement dans les thymocytes et les lymphocytes T activés par une stimulation antigénique, chez la souris. Les auteurs (Migita et coll., 1997) ont également démontré que le tacrolimus augmente l'effet apoptotique des glucocorticoïdes dans les thymocytes. Thompson et coll. (1995), quant à eux, rapportent que l'activation de Cn induit l'apoptose et puisque le tacrolimus bloque l'activité de

Cn, le phénomène de mort programmée serait inhibé. Or, une étude récente (Asada et coll., 1998) suggère que l'induction de l'apoptose dans les thymocytes par les glucocorticoïdes est régulée par l'activation d'une nouvelle protéine kinase calcium-indépendante tandis que l'activation de la protéine kinase calcium-dépendante et l'activité de Cn induisent l'inhibition de l'apoptose et semblent contribuer à la régulation du phénomène de mort programmée dans les thymocytes et les lymphocytes T. On ne sait pas s'il existe une relation entre l'effet apoptotique du tacrolimus et l'activation de cette nouvelle protéine kinase calcium-indépendante.



Tiré de BIERER B.E. *Cyclosporin A, FK506, and rapamycin : binding to immunophilins and biological action.* Chem. Immunol. 59 : 128, 1994.

FIGURE 1-3. Mécanisme d'action du tacrolimus

Le sirolimus (rapamycine). Sirolimus est un macrolide antibiotique produit par *Streptomyces hygroscopicus* (Figure 1-2). Découvert en 1975 à partir d'un échantillon de sol de l'île de Pâques, sirolimus a été isolé à l'origine pour ses propriétés antifongiques. Aujourd'hui, il est reconnu comme un puissant agent immunosuppresseur et antiprolifératif. Sa capacité à inhiber le rejet aigu dans des modèles animaux a suscité un grand intérêt pour des fins cliniques. Son mécanisme d'action unique fait de cet agent un immunosuppresseur très particulier : sirolimus agit principalement en inhibant la prolifération cellulaire et le signal des cytokines tandis qu'il n'a que très peu d'effet sur la production des cytokines.

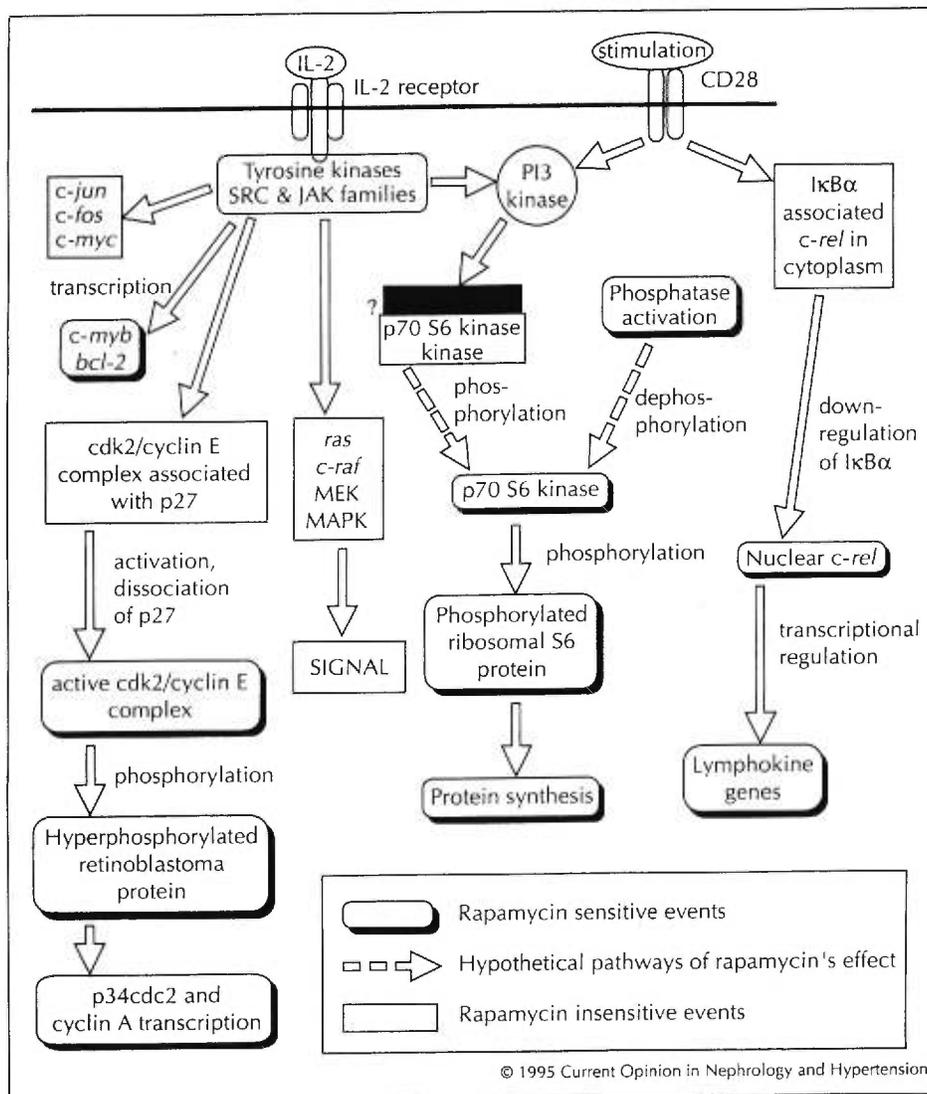
Le sirolimus est un puissant inhibiteur de la prolifération cellulaire médiée par des facteurs de croissance et des cytokines (Sehgal et coll., 1995). Il inhibe, entre autre, la prolifération du lymphocyte T induite par des stimuli calcium-dépendant et calcium-indépendant (Sehgal et coll., 1994; Wood et Bierer, 1994). Aagaard-Tillery et Jelinek (1994) ont démontré que le sirolimus inhibe la prolifération dépendante- et indépendante de IL-2, dans lymphocytes B. De plus, Kim et coll. (1994) ont décrit le sirolimus comme étant un agent qui prévient la différenciation, induite par IL-2 ou IL-6 et de là, résulte une diminution de la production d'immunoglobulines (Ig)M, IgG et IgA. Néanmoins, l'activité anti-prolifératrice du sirolimus n'est pas seulement limitée aux cellules normales du système immunitaire. Il joue un rôle antiprolifératif dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (hépatiques, rénales, ostéoblastiques, myogéniques, mélanocytiques, lymphoïdiennes, nerveuses) et de même que sur les lignées cellulaires tumorales des lymphocytes T et B (Molnar-Kimber et coll., 1994). Un autre fait intéressant a été rapporté par Shi et coll. (1995). Le sirolimus induit l'apoptose (mort cellulaire programmée) dans des cellules tumorales. Il a également été rapporté (Cao et coll., 1995; Marx et coll., 1995) que le sirolimus inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses, après une stimulation avec des facteurs de croissance BFGF et PDGF. Le sirolimus joue aussi un rôle important dans la réponse aux

cytokines. Par exemple, il bloque les réponses prolifératives d'une variété de cytokines telles IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, le facteur de croissance de l'insuline, BFGF et PDGF (Sehgal et coll., 1994; Wood et Bierer, 1994) et IL-12 (Bertagnolli et coll., 1994). Cependant, bien que le sirolimus ait des effets antiprolifératifs et des effets inhibiteurs sur les cytokines, son activité est limitée quant à la production de cytokines, contrairement au tacrolimus dont l'effet est ciblé sur l'inhibition de la production de cytokines. Des études *in vivo* ont rapporté que le sirolimus bloque seulement la production de cytokines inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, IL-8 (Schmidbauer et coll., 1994) et IL-10 (Zheng et coll., 1994).

D'après des études *in vivo*, le sirolimus prolonge la survie d'allogreffes dans plusieurs modèles animaux allant des rongeurs aux primates (Sehgal et coll., 1994). Des études de pharmacocinétique et toxicologie ont démontré qu'une concentration du sirolimus de 5 à 60 ng/ml permet un prolongement maximal de la survie de l'allogreffe chez le rat, le lapin, le chien et le porc, et ce sans effet secondaire significatif (Fluhler et coll., 1994; Fryer et coll., 1993; Granger et coll., 1994). De plus, le sirolimus est très efficace pour prévenir et pour réduire la gravité des maladies auto-immunes chez l'animal (Carlson et coll., 1993). Tout comme le tacrolimus, le sirolimus requiert la liaison à une protéine FKBP (en particulier FKBP-12) pour exercer ses effets immunosuppresseurs. Cependant, à la suite d'une stimulation antigénique, le sirolimus va plutôt agir sur la réponse à IL-2, c'est-à-dire durant les phases G₁-S du cycle cellulaire. Des études *in vitro* (Liu et coll., 1991) ont démontré que le complexe sirolimus-FKBP n'inhibe pas l'activité phosphatase de Cn.

Sirolimus et stimulation antigénique. Le mécanisme d'action du sirolimus est unique et il implique l'association du complexe sirolimus-FKBP aux cibles de RAPA appelées TOR (target of rapamycin), des protéines effectrices impliquées dans l'activité biologique du sirolimus. De

par son mécanisme d'action, le sirolimus influence plusieurs voies de signalisation, dont trois voies majeures (Figure 1-4) : Tout d'abord, suite à une stimulation antigénique impliquant CD28, il s'ensuit une cascade d'événements qui emprunte la voie de la protéine kinase p70s6 et qui résulte en la synthèse de protéines. Lorsque le sirolimus est lié à FKBP, il exerce son activité en inhibant la kinase p70s6. La phosphorylation de la protéine ribosomale s6 est ainsi inhibée et la translation d'importantes protéines de régulation du cycle cellulaire est inhibée (Chung et coll., 1992; Kozma et Thomas, 1994; Sehgal et coll., 1994; Terada et coll., 1994). Une autre voie de signalisation peut être impliquée lors d'un stimulus antigénique impliquant CD28. Cette voie implique $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et résulte en une augmentation de la transcription de gènes de lymphokines. Le sirolimus activé va inhiber la sous-régulation de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Il s'ensuit une inhibition de la translocation au noyau du facteur de liaison de l'élément de réponse de CD28, *c-rel*, et donc l'expression du gène de IL-2 est inhibée (Lai et Tan, 1994). Enfin, lorsque IL-2 se lie à IL-2R, il s'ensuit une cascade d'événements qui résulte en la transcription de plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire. L'activité de ces protéines peut être modulé par le sirolimus. Il en résulte de l'inhibition de l'activité kinase de $\text{p}34^{\text{cdc}2}$, de la production de cycline A, de l'activité de $\text{p}33^{\text{cdk}2}$ et de l'association cycline D1-cdk. Le sirolimus semble aussi réduire l'activité et la phosphorylation de cycline E, une enzyme dont l'activité est augmentée durant la phase G_1 . Il semble qu'une molécule TOR commune soit responsable de toutes ces modulations (Bierer, 1994).



Tiré de SEHGAL S.N., CAMARDO J.S., SCAROLA J.A, MAIDA B.T.
Rapamycin (sirolimus, rapamune). Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 4 : 482, 1995.

FIGURE 1-4. Mécanisme d'action du sirolimus

Effets secondaires du tacrolimus et du sirolimus

Tacrolimus. Bien que des études antérieures aient suggéré que le tacrolimus induit la néphrotoxicité de façon limitée, il existe des études plus récentes (McCauley; 1993; Randhawa et coll., 1996) qui démontrent le contraire : le tacrolimus possède un profil néphrotoxique comparable à celui de la cyclosporine A. La néphrotoxicité induite par le tacrolimus, tout comme la cyclosporine A, se caractérise principalement par une diminution du taux de filtration glomérulaire, une réduction de la perfusion rénale (vasoconstriction), une altération tubulaire et une hypomagnésémie (Bennett et coll., 1994). Il a été démontré qu'une déficience en magnésium (Mg^{2+}) est impliquée dans la physio-pathologie de la neurotoxicité et l'hypertension (Al Khursany et coll., 1992). En effet, une hypomagnésémie entraîne des convulsions résultant d'une sur-stimulation des nerfs et une augmentation des contractions musculaires (Guthrie et Picciano, 1995). Nozue et coll. (1992) ont également proposé que l'hypomagnésémie soit un facteur important dans la pathogénèse de la néphrotoxicité de la cyclosporine A. En outre, Lea et coll. (1994) ont rapporté que le tacrolimus et la cyclosporine A, mais pas le sirolimus, réduisent l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase rénales par l'inhibition de Cn. Il s'en suit une diminution du Mg^{2+} dans les tubules rénaux, puisque la pompe Na^+/K^+ ATPase est impliquée dans la réabsorption par transport actif du Mg^{2+} dans le rein. Le Mg^{2+} est un cation essentiel impliqué dans plusieurs réactions enzymatiques et il agit comme co-facteur à l'adénosine triphosphatase (Al Ghamdi, et coll., 1994). Ceci suggère que le sirolimus ne possède pas d'effets délétères rénaux puisqu'il n'agit pas directement sur Cn. L'inhibition de la biosynthèse de l'oxyde nitrique fait aussi partie des explications des dysfonctions rénales. D'ailleurs, Andoh et coll. (1996) ont rapporté dans une étude récente qu'une diminution des médiateurs vasorelaxants, particulièrement l'oxyde nitrique, joue un rôle important dans la pathogénèse de la vasoconstriction rénale induisant la néphrotoxicité du tacrolimus et de la cyclosporine A. L'oxyde nitrique est produit par la synthétase de l'oxyde nitrique qui est un substrat de Cn

(Dawson et coll., 1993). Bien que le mécanisme précis de la vasoconstriction induite par le tacrolimus et la cyclosporine A n'est pas complètement élucidé, il semble que cette vasoconstriction soit la principale cause d'une dysfonction glomérulaire rénale (Bennett, 1995). Des études (Dumont et coll., 1992) ont démontré que les effets immunosuppresseurs et les effets secondaires du tacrolimus soient liés à leur mécanisme d'action. Il semble que l'inhibition de l'activité de Cn engendre une diminution de IL-2 mais aussi les effets délétères rénaux. Par ailleurs, une étude récente (Shihab et coll., 1997) a suggéré le processus de développement de fibrose comme étant la cause de néphrotoxicité du tacrolimus. Il semble qu'un dérèglement dans l'activité de TNF- β provoque un processus continu de réparation tissulaire. Il a aussi été rapporté que le tacrolimus induit une hyperglycémie (Bennett, 1995). Enfin, il est important de mentionner qu'en raison de la propriété très hydrophobe du tacrolimus et que sa biotransformation se fait par le métabolisme hépatique impliquant le cytochrome P-450, la prise concomitante d'inhibiteurs du cytochrome P-450 à un traitement au tacrolimus (e.g. proadifène, cimétidine, kétoconazole) doit être évitée puisque le tacrolimus est beaucoup plus puissant que son métabolite.

Sirolimus. Le sirolimus ne semble pas avoir d'effet néphrotoxique puisque cet agent n'agit pas sur l'activité phosphatase de Cn. En effet, Ryffel et coll. (1994) ont démontré que le taux de filtration glomérulaire chez des rats normaux traités au sirolimus n'est pas altéré et que la morphologie du rein est normale. Chez le rat hypertendu, des doses thérapeutiques de sirolimus n'ont aucun effet sur la fonction rénale, la tension artérielle et le poids de l'animal. Par contre, à des doses 10 fois supérieures aux doses thérapeutiques, le sirolimus cause des dysfonctions rénales et des altérations histopathologiques (e.g. vasculopathie nécrosante et atrophie tubulaire) chez ces rats hypertendus (DiJoseph et coll., 1994). Dans un modèle porcin, aucune altération sur la fonction rénale n'a été observée autant à des doses

thérapeutiques qu'à des doses supra-thérapeutiques (Golbaekdal et coll., 1994). Ces observations suggèrent que le sirolimus ne possède pas de profil néphrotoxique chez l'humain. Par contre, Hartner et coll. (1995) ont rapporté que le sirolimus a des effets secondaires chez le singe et le porc, en plus d'être particulièrement toxique chez le chien (fièvre, anorexie, vomissement, perte de poids, ulcères gastro-intestinales, vasculite) à des doses de 0.25 mg/kg/j. En outre, de récentes études cliniques (Kahan et coll., 1995; Murgia et coll., 1996) ont démontré que le sirolimus est bien toléré, qu'il ne présente aucun effet néphrotoxique ni d'effet délétère sur la tension artérielle. Cependant, chez ces patients traités avec le sirolimus, on a observé une diminution des plaquettes sanguines (thrombocytopénie) et une augmentation du cholestérol (hyperlipidémie). Ces effets secondaires semblent diminués après la réduction des doses administrées.

1.6 INTERACTION ENTRE IMMUNOSUPPRESSEURS: SYNERGIE, ADDITIVITÉ OU ANTAGONISME?

Dans cette étude, nous avons évalué les effets de l'association tacrolimus-sirolimus, deux immunosuppresseurs distincts, dans le traitement du rejet aigu. Comme notre but principal est de savoir si cette association est bénéfique, il est alors primordial de bien définir le type d'interaction entre ces immunosuppresseurs. Lorsque chaque agent produit un effet, il existe notamment trois manières pour qualifier l'effet associatif de ces agents : une synergie, une additivité et un antagonisme. Dans le cas où un des agents ne produit pas d'effet en soi mais augmente l'effet thérapeutique des autres agents, on parle alors de potentialisation. Malheureusement, encore beaucoup trop d'auteurs définissent ces termes de façon confuse. Par définition, la synergie est un effet plus grand de celui prévu pour l'effet additif et l'antagonisme est un effet moindre de ce qu'on s'attend de l'effet additif. Il va sans dire que l'additivité prévue se doit d'être clairement définie afin de ne pas induire une confusion.

Il existe plusieurs méthodes pour quantifier la synergie et l'antagonisme. Certaines sont de toute évidence erronées et d'autres possèdent des limites. La simple addition mathématique des effets de deux ou de plusieurs agents est une mauvaise façon de calculer l'effet additif prévu ou de conclure à la synergie ou à l'antagonisme. Cette mauvaise habitude de représenter l'additivité comme étant $0.5 + 0.5 = 1$, la synergie, $0.5 + 0.5 > 1$, et l'antagonisme, $0.5 + 0.5 < 1$, demeure une méthode biaisée dans des études d'association. Dans une situation où deux agents produisent chacun un effet inhibiteur de 60%, l'effet additif prévu doit être de 120%, ce qui est théoriquement impossible (Figure 1-5). L'utilisation de la simple addition mathématique, lorsque chaque agent est utilisé pour des études d'association, demeure l'erreur la plus

fréquente. La difficulté à prédire la synergie et l'antagonisme est liée à plusieurs facteurs. Ces facteurs doivent être tenus en compte lors de l'analyse d'interaction entre deux agents. Chaque agent en association possède ses propres effets donc sa propre puissance et sa propre courbe dose-réponse. Ces effets sont également reliés à l'affinité (e.g. K_m et K_i) et l'efficacité (e.g. V_{max}). De plus, la complexité biologique intrinsèque des agents ne permet habituellement pas d'obtenir ces informations, surtout lorsque des facteurs de régulation (e.g. rétroactions négatives) voire des facteurs spatial, temporel et microenvironnemental (e.g. température, force ionique et pH) sont impliqués. Il existe d'autres méthodes mathématiques pour déterminer la synergie et l'antagonisme lors d'associations comme la méthode du produit fractionnel (Webb, 1963 : dans Chou, 1991) ou la méthode d'isobogramme classique (Loewe, 1953 : dans Chou, 1991). Ces méthodes de quantification, bien qu'utilisées par plusieurs auteurs, comportent des limites d'utilisation. Le problème majeur de la méthode du produit fractionnel est que celle-ci ne tient pas compte de la forme (hyperbolique ou sigmoïdale) des courbes dose-effet. De plus, la méthode du produit fractionnel n'est pas applicable dans un système d'ordre plus grand que 1 ni dans un système d'agents mutuellement exclusifs (modes d'action similaires). Cette méthode n'est valide que dans 1 des 4 modèles de systèmes enzymatiques importants pour des études d'association (Tableau 1-1). La méthode d'isobogramme classique comporte également des limites d'utilisation. Elle n'est pas applicable pour des systèmes d'agents mutuellement non-exclusifs de premier ordre ou d'ordre plus grand. Une analyse de deux agents mutuellement non-exclusifs avec cette méthode ne peut que surestimer la synergie ou sous-estimer l'antagonisme puisqu'on assume que ces deux agents sont mutuellement exclusifs. La méthode de l'isobogramme classique n'est valide que dans 2 des 4 modèles de systèmes (Tableau 1-1).

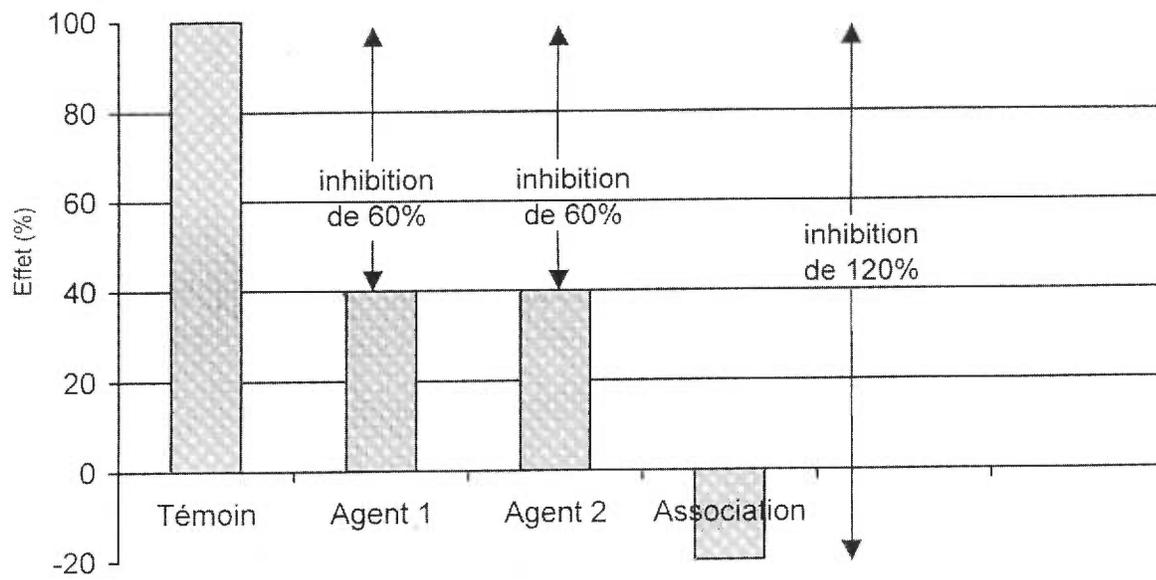


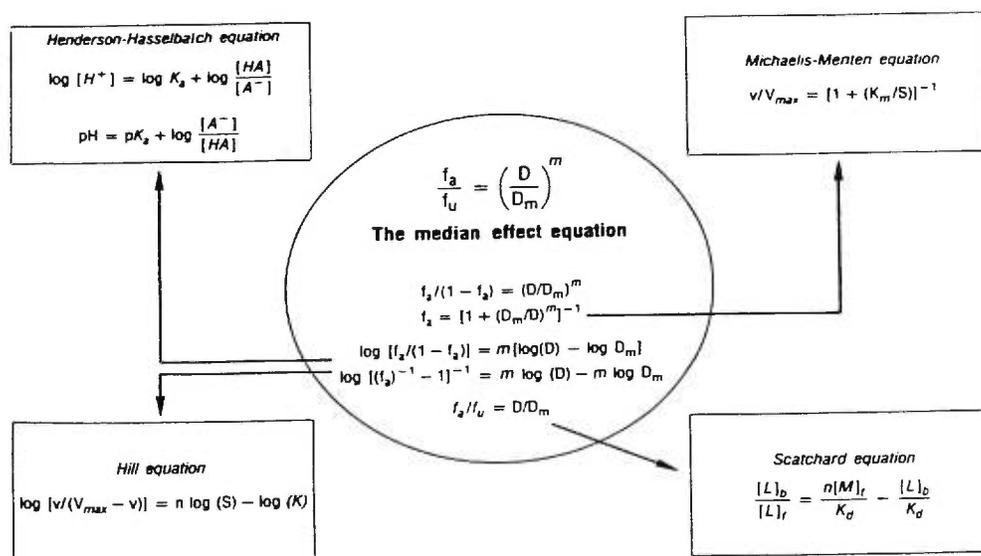
FIGURE 1-5. Exemple d'une association de 2 agents inhibiteurs selon la simple addition mathématique

	Nature des courbes dose-effet et de l'interaction des agents			
	Agents mutuellement exclusifs (mécanisme d'action similaire)		Agents mutuellement non- exclusifs (mécanisme d'action différent)	
	1 ^{er} ordre	> 1 ^{er} ordre	1 ^{er} ordre	> 1 ^{er} ordre
La méthode du produit fractionnel (Webb, 1963)	Non	Non	Oui	Non
La méthode d'isobogramme classique (Loewe, 1957)	Oui	Oui	Non	Non
L'équation de multiples agents-effet (Chou et Talalay, 1984)	Oui	Oui	Oui	Oui

TABLEAU 1-1. Comparaison de la validité des différentes méthodes d'analyse d'une association d'agents

Dans notre étude d'association où nous avons étudié l'interaction entre le tacrolimus et le sirolimus, la méthode de l'index d'association (combination index, CI) (Chou et Talalay, 1983; 1984) a été utilisée afin de déterminer l'additivité, la synergie ou l'antagonisme. Cette méthode semble être la meilleure procédure puisqu'elle tient compte de plusieurs paramètres biochimiques en plus de ne pas posséder de limites d'utilisation : elle est valide dans les 4 systèmes enzymatiques (Tableau 1-1). C'est par une approche physico-chimique impliquant la loi d'action de masse que l'auteur a amené le principe de l'effet médian et le concept de l'index d'association. La loi d'action de masse est la loi de base qui forme la dynamique de l'équilibre chimique, le phénomène d'absorption physique de Langmuir, la théorie des récepteurs biologiques et la cinétique enzymatique. Contrairement aux approches empiriques et statistiques, cette approche physico-chimique permet des modèles bien définis pour des déviations mathématiques lors d'analyses de dose-effet en biologie. Chou a dérivé et rapporté plusieurs centaines d'équations pour différents substrats, produits, types d'inhibition et séquences de réaction (Chou, 1974; 1976; 1977; 1980), dont l'équation de l'effet-médian par l'utilisation de la méthode d'induction et de déduction mathématique (Chou, 1976; Chou et Talalay, 1977). Il a ensuite démontré que cette équation de l'effet-médian peut être facilement utilisée pour dériver quatre grandes équations en biochimie (Figure 1-6) : 1) l'équation de Michaelis-Menten, une équation du ratio de la catalyse enzymatique; 2) l'équation de Hill, représentant la liaison des ligands primaires aux récepteurs biologiques, par exemple l'interaction oxygène-hémoglobine; 3) l'équation de Hendersen-Hasselbach qui définit le pH d'une solution en terme de pKa d'un acide faible et le logarithme du ratio de la concentration d'une base conjuguée sur la concentration d'un acide faible; 4) et l'équation de Scatchard qui représente l'association et la dissociation du ligand à son récepteur (Chou, 1977; 1987; Chou et coll., 1991). En dérivant les équations pour plus d'un inhibiteur dans le but d'inhiber différents mécanismes de réactions enzymatiques, l'équation et le graphique de l'effet-médian sont passés

d'un premier ordre à un ordre plus élevé, à une équation de distribution (Chou, 1974; 1976) et à une équation générale d'agent-effet (Chou et Talalay, 1981). C'est en 1981 que le concept de l'index d'association, incluant l'équation et le graphique Fa-CI, a été introduit (Chou T.C., Talalay P., 1981; 1983; 1984; 1987). Depuis 1985 jusqu'à aujourd'hui, les équations d'effet-médian et de CI ont été publiées dans plus de centaines de journaux biomédicaux mondiaux et de plus en plus de textes scientifiques en font mention.



Tiré de CHOU T.C., RIDEOUT D.C., eds. ***Synergism and Antagonism in chemotherapy.*** Academic Press, San Diego, 1991.

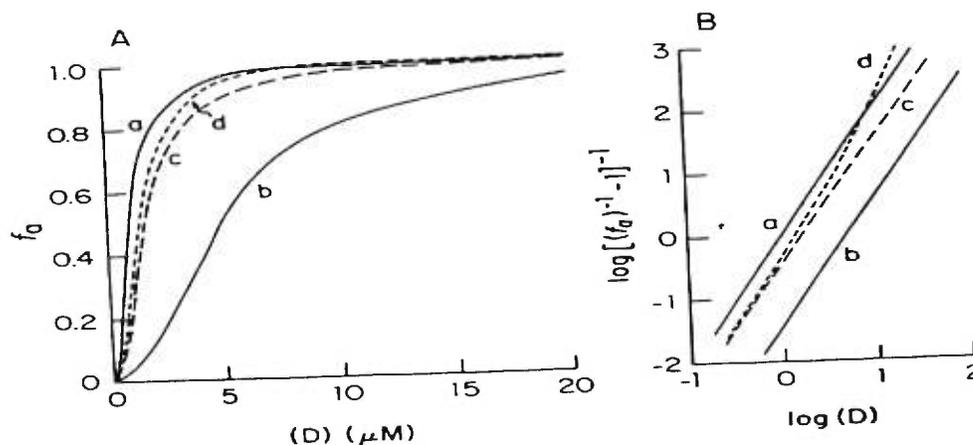
FIGURE 1-6. Relation entre l'équation de l'effet-médian (Chou, 1976) et d'autres équations biochimiques majeures

Le principe de l'effet-médian comprend l'équation et le graphique. L'équation générale de la relation dose-effet a été dérivé par Chou (Chou, 1974; 1976), par l'induction mathématique et avec l'utilisation d'une centaine de modèles de cinétique enzymatique. La corrélation dose et effet se fait dans la forme la plus simple :

$$fa/fu = (D/Dm)^m,$$

où D représente la dose de l'agent; Dm , la dose de l'effet-médian c'est à dire l'efficacité; fa , la fraction affectée par la dose; fu , la fraction non-affectée ($fu = 1 - fa$); et m , la sigmoïdité de la courbe dose-effet qui est déterminée par la pente du graphique. Le graphique de l'effet-médian a été introduit en 1976 (Chou, 1976; 1991) et il est basé sur la forme logarithmique de l'équation de l'effet-médian :

$$\log (fa/fu) = m \log (D) - m \log (Dm).$$



Tiré de CHOU T.C., RIDEOUT D.C., eds. ***Synergism and Antagonism in chemotherapy***. Academic Press, San Diego, 1991.

FIGURE 1-7. Exemple d'un graphique de l'effet-médian

Or, cette équation a la forme d'une ligne droite et la pente de la droite donne la valeur m tandis que les valeurs en abscisse donnent les valeurs de $\log(D_m)$ et donc D_m . Une corrélation linéaire du coefficient r du graphique représente une bonne correspondance des valeurs selon l'équation de l'effet-médian. Habituellement, les valeurs expérimentales de système de récepteurs ou d'enzymes ont un $r > 0.96$, de cultures de tissu, un $r > 0.90$, et de systèmes animaux, un $r > 0.85$.

Le principe de l'index d'association inclut l'équation qui est basée sur l'équation de multiples agents-effet de Chou et Talalay, ainsi que le graphique en forme d'isobogramme. Un isobogramme est un graphique démontrant des doses équipotentes (à effet égal) pour un effet donné. L'équation de l'index d'association ne détermine que l'effet additif et non la synergie ou l'antagonisme. Par ailleurs, les auteurs définissent la synergie comme étant un effet plus grand que l'effet additif et l'antagonisme, un effet moindre que l'effet additif. Chou et Talalay (1983) ont proposé la signification CI égale à 1 ($CI = 1$) comme étant un effet additif. Ainsi, selon l'équation de concentration de deux agents, on obtient la forme :

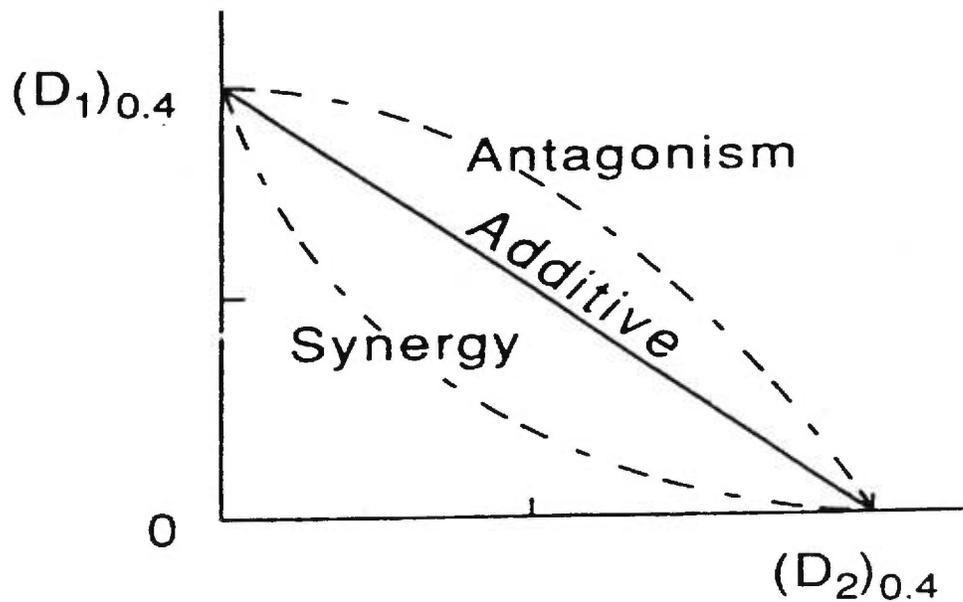
$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

pour des agents mutuellement exclusifs qui ont des modes d'action semblables ou similaires, et la forme :

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} + \frac{(D)_1(D)_2}{(D_x)_1(D_x)_2}$$

pour des agents mutuellement non-exclusifs qui ont des modes d'action totalement indépendants et différents. Dans ces équations, l'agent 1 $(D)_1$ et l'agent 2 $(D)_2$ en association inhibent un certain pourcentage ($X\%$) dans l'expérience, le pourcentage d'inhibition ainsi

observé expérimentalement n'est pas un chiffre rond mais plutôt une fraction décimale; et $(D_x)_1$ et $(D_x)_2$ sont respectivement les doses de l'agent 1 seul et l'agent 2 seul qui ont un effet inhibiteur X% (Chou T.C., Talalay P., 1984; 1987; Chou T.C. 1991).



Tiré de CHOU T.C., RIDEOUT D.C., eds. *Synergism and Antagonism in chemotherapy*. Academic Press, San Diego, 1991.

FIGURE 1-8. Exemple d'un graphique en forme d'isobogramme

Dans cette étude, nous avons évalué l'association de combinaisons d'immunosuppresseurs de ratio non-constant. Même si le choix le plus efficace pour un protocole expérimental demeure un ratio équipotent pour l'association d'agents, l'association des médicaments à un ratio non-constant est également permise. Aussi longtemps que les paramètres m et D_m pour chaque agent seul sont disponibles, les valeurs de CI pour chaque point de résultat de l'association de ratio non-constant peuvent être calculées.

1.7 TRANSPLANTATION CARDIAQUE HÉTÉROTOPIQUE

Historique

La transplantation cardiaque a été effectuée pour la première fois, en 1905, chez le chien. Les auteurs Carrel et Guthrie ont proposé, à cette époque, une technique de transplantation cardiaque hétérotopique qui consistait en l'anastomose entre la veine jugulaire externe du receveur et la veine cave du cœur du donneur et celle de la carotide du receveur et une veine pulmonaire du cœur du donneur. Vers les années 1933, le groupe de Mann a simplifié ces techniques en procédant à une anastomose reliant l'aorte à la carotide interne et l'artère pulmonaire à la veine jugulaire externe (Sueda et coll., 1990). En 1964, Reemtsma (1964 : dans Shumway, 1989) a effectué la transplantation en disposant le cœur hétérotopique dans un circuit en parallèle avec le cœur du donneur. La transplantation cardiaque hétérotopique voyait alors le jour. Ce n'est que deux ans plus tard que McGough et coll. (1966 : dans Shumway, 1989) ont découvert que le rejet de l'allogreffe cardiaque n'entraînait pas nécessairement le décès du receveur.

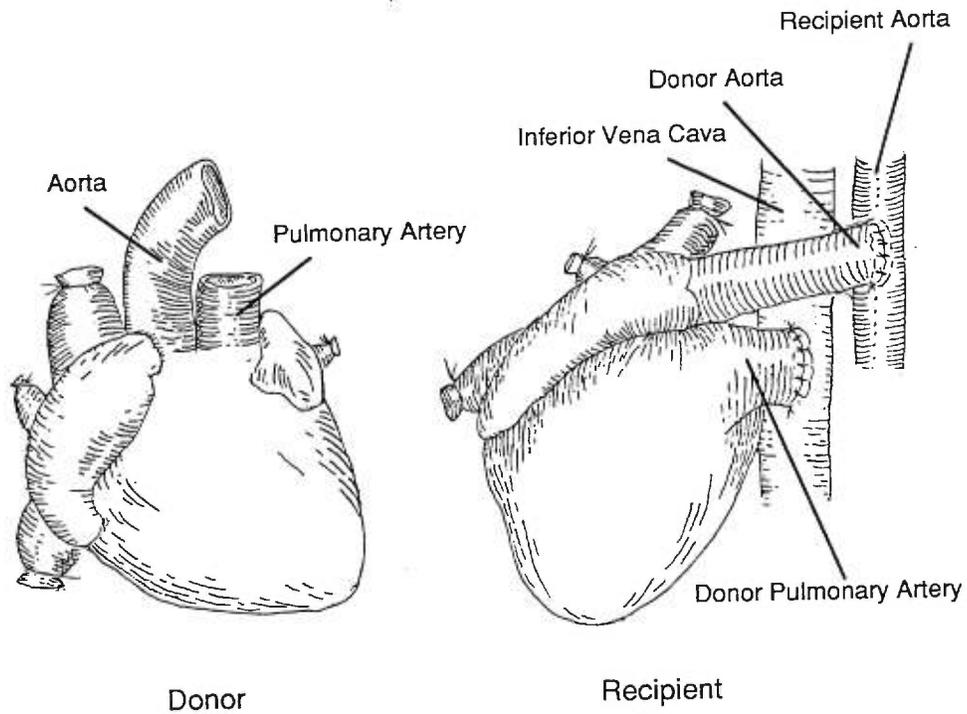
Le premier modèle de transplantation cardiaque hétérotopique chez le rat a été décrit par Abbott et coll. (1964 : dans Chen et Daloze, 1995). Ce modèle comportait beaucoup trop de dissections et d'altérations de l'anatomie et de la physiologie du receveur. Il consistait en l'anastomose de l'artère pulmonaire du cœur du donneur à la veine cave inférieure du receveur et l'anastomose de l'aorte du cœur du donneur à l'aorte du receveur. En 1969, un modèle plus pratique a été introduit par Ono et Lindsey (1969), et il demeure de nos jours la technique de transplantation cardiaque hétérotopique la plus utilisée chez le rat. Par ailleurs, notre groupe effectue les transplantations cardiaques selon cette technique, mais avec quelques modifications (Chen et Daloze, 1995).

Physiologie du cœur hétérotopique

Le modèle de transplantation cardiaque hétérotopique est une technique de microchirurgie qui consiste à anastomoser respectivement l'aorte et l'artère pulmonaire du cœur du donneur à l'aorte et la veine cave inférieure du receveur (Figure 1-9). L'allogreffe cardiaque est implantée dans la cavité abdominale du receveur. Le cœur hétérotopique est placé en circuit parallèle avec le cœur du receveur de façon à ce qu'il soit perfusé par le système circulatoire du receveur. Durant la perfusion, les valves cardiaques du cœur hétérotopique demeurent fermées et les cavités cardiaques vides. La physiologie du cœur hétérotopique est sensiblement la même que celle d'un cœur isolé et perfusé de Langendorff (Döring, Denhnert, 1988)

Modèle d'étude

La transplantation cardiaque hétérotopique est un modèle d'étude de plusieurs champs et domaines biomédicaux. Minanov et coll. (1997) décrivent la méthode de transplantation cardiaque hétérotopique comme étant un excellent modèle pour l'étude de l'immunopathologie du rejet de l'allogreffe et de la xéno greffe. Chen et Daloz (1995) affirment que la transplantation cardiaque chez le rat est probablement le modèle le plus utilisé pour des études de transplantation d'organes et de recherche. De plus, cette méthode de transplantation cardiaque hétérotopique peut être très utile dans l'évaluation des immunosuppresseurs. Des études d'ischémie-reperfusion (Manneschi et coll., 1996; Perrault et coll., 1997) et de cardioprotection (Duguay, et coll., 1996) ont également été effectuées avec ce modèle de transplantation cardiaque hétérotopique. Bien que les expériences de transplantation cardiaque hétérotopique se fassent chez des rats ou des souris, il existe une technique modifiée qui permet l'utilisation de ce modèle chez des primates et des chiens (Minanov et coll., 1997).



Tiré de CHEN H., DALOZE P. *Heart transplantation in the rat*.
 Dans ed. ZHANG F., LINEAWEAVER W.C, KAO S.D., WALKER R., TONKEN H.P.
 Manual of experimental muscle flap and organ transplantation models in the rat.
 Sharpoint. 89, 1995.

FIGURE 1-9. Transplantation cardiaque hétérotopique chez le rat

1.8 BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Le rejet aigu est un phénomène immunologique qui survient dans plus de 60% des cas de transplantations d'organe et il demeure l'une des principales causes d'échec. Un traitement immunosuppresseur s'avère primordial afin de préserver l'intégrité du greffon. L'association de différents agents immunosuppresseurs est une stratégie visant à augmenter la survie du greffon tout en minimisant leurs effets secondaires. Bien qu'il a été rapporté que l'association tacrolimus-sirolimus possède, *in vitro*, des effets antagonistes à des doses pharmacologiques, nous ne connaissons pas l'effet *in vivo* de cette association. L'évaluation de cette association en utilisant de faibles doses de chaque agent demeure une avenue intéressante puisque le tacrolimus et le sirolimus sont des agents immunosuppresseurs très prometteurs. Nous avons donc étudié, *in vivo*, les effets de l'association tacrolimus-sirolimus chez des rats receveurs d'allogreffes cardiaques hétérotopiques.

Des transplantations cardiaques sont effectuées selon le modèle de transplantation hétérotopique (Figure 1-9). Des rats adultes Brown Norway (BN, RT1ⁿ) et Lewis (LEW, RT1^l) ont été utilisés comme donneur et receveur, respectivement. La survie des allogreffes cardiaques a été évaluée quotidiennement par palpation trans-abdominale et le rejet confirmé par la cessation de la contraction cardiaque .

Ce travail comporte deux volets. Dans un premier temps, nous avons évalué, *in vivo*, l'effet de l'association tacrolimus-sirolimus sur le rejet des allogreffes cardiaques. Pour ce faire, les rats receveurs sont traités dès l'implantation, c'est-à-dire du jour 1 jusqu'au jour 14 inclusivement. Le second volet de notre étude a consisté à évaluer, *in vivo*, l'effet de cette même association sur le rejet aigu présent dans des allogreffes cardiaques. Cette fois-ci, les

rats transplantés reçoivent le traitement seulement au jour 4, c'est-à-dire 4 jours après l'implantation. Le rejet aigu est déjà présent de ce cas. Les traitements se terminent au jour 18 post-transplantation.

Dans les deux volets, nous privilégions le traitement avec des doses sub-thérapeutiques (0.01-0.04 mg/kg/jour). L'utilisation de faibles doses permet d'évaluer l'efficacité de cette association à des doses correspondant à celles utilisées cliniquement. De plus, cela permet d'éviter que la survie du greffon ne soit indéfinie ce qui rendrait impossible la comparaison de l'effet du tacrolimus ou du sirolimus seul versus l'effet de l'association tacrolimus-sirolimus. Cette étude nous permettra de déterminer l'efficacité de l'association tacrolimus-sirolimus dans le rejet aigu. De plus, nous pouvons évaluer le type d'interaction (synergie, additivité ou antagoniste) entre ces deux agents selon le principe de l'effet-médian et celui de la méthode d'index d'association.

Jusqu'à ce jour, c'est la triple thérapie (cyclosporine A-azathioprine-prednisone) qui demeure la thérapie immunosuppressive administrée aux transplantés. Cependant, bien qu'efficace, la cyclosporine A et la prednisone demeurent des agents possédant des effets secondaires non-négligeables aux doses thérapeutiques. L'association tacrolimus-sirolimus pourrait constituer une alternative intéressante en immunosuppression.

CHAPITRE II

ARTICLE

**TACROLIMUS (FK506) AND SIROLIMUS (RAPAMYCIN) IN COMBINATION ARE NOT
ANTAGONISTIC BUT PRODUCE EXTENDED GRAFT SURVIVAL IN CARDIAC
TRANSPLANTATION IN THE RAT**

Minh Diem Vu, Shijie Qi, Dasheng Xu, Jiangping Wu, William E. Fitzsimmons, Suren N. Sehgal,
Louis Dumont, Stephan Busque, Pierre Daloze et Huifang Chen

*Laboratories of Experimental Surgery and Transplantation Immunology, Louis-Charles Simard Research
Center, Campus Notre-Dame, CHUM, University of Montreal, Quebec, Canada; Fujisawa USA, Inc.,
Deerfield, Illinois; and Wyeth-Ayerst Research, Princeton, New Jersey*

Transplantation

Vol. 64, No. 12, pp.1853-1856, December 27, 1997.

ABSTRACT

Combined use of tacrolimus (FK506) with sirolimus (rapamycin, RAPA) was examined in a model of vascularized heart allograft in the rat. For prevention of acute rejection, three different combinations of low doses of FK506 and RAPA from day 1 up to day 14 after transplantation produced significantly longer cardiac allograft survival than each agent alone ($P<0.05$). Identical results were observed in a model of reversal of ongoing acute rejection, where two combinations of low doses of FK506 and RAPA from day 4 up to day 18 after surgery also demonstrated significantly longer graft survival than each immunosuppressant alone ($P<0.05$). All the low-dose-treated groups in these two models presented significantly longer heart graft survival than naive controls ($P<0.05$), confirming that both agents are potent immunosuppressants in the models chosen. These results also indicate that, in contrast with in vitro studies, the combined use of FK506 and RAPA in vivo did not produce antagonism, but rather had synergistic effect in prolonging the allograft survival as compared with each agent alone. It appears likely that the abundance of FKBP-12 available for binding in vivo prevents inhibitive competition of the two agents for their receptor.

INTRODUCTION

Tacrolimus (FK506) was first isolated by Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd. from the culture broth of a soil sample at Tsukuba, Japan, in May 1984. The tacrolimus-producing strain subsequently named *Streptomyces tsukubaensis* differed from previously described *Streptomyces* strains on the basis of its morphological, cultural, and physiological characteristics. Ochiai and colleagues reported in 1987 (Ochiai et al, 1987) that FK506, a macrolide, is a new potent immunosuppressive agent of potential great interest. Like cyclosporine (CsA), which is a fungal metabolite, FK506 inhibits the T-lymphocyte immune response via blockade of the calcium-dependent signaling pathway at a step immediately before the induction of interleukin (IL)-2, thus inhibiting IL-2 gene transcription. However, it has been demonstrated that CsA and FK506 have a different cytosolic receptor binding pattern, resulting in somewhat different intracellular biochemical effects. FK506 is capable of inhibiting immune responses with a potency 10- to 100-fold greater than CsA (Chou, 1991; Steptowski et al, 1996). Currently, FK506 is used for prevention and treatment of graft rejection in ongoing clinical studies throughout the world.

Rapamycin (RAPA) is also a macrolide antibiotic, produced by *Streptomyces hygroscopicus* isolated from an Easter Island soil sample in 1975 (Sehgal, 1975) that was originally described as an antifungal agent. However, interest in this molecule was rekindled with the discovery of FK506, which displays many structural similarities with RAPA. RAPA is also a strong immunosuppressant that is 10- to 100-fold more potent than CsA in preventing rejection of vascularized allografts in animal models. It is also effective in alleviating ongoing rejection of kidney, pancreas, and heart allografts in the rat. RAPA has a strong antiproliferative effect on T cells stimulated via the T cell receptor/CD3 pathway. We have reported previously

that RAPA also acts directly on B cells and effectively inhibits Ig production *in vitro* and *in vivo*. An interesting feature of RAPA is that its short-term administration can induce long-term vascularized allograft survival in the rodent, with the surviving organ including heart, kidney, pancreas, and small bowel. We have also shown that RAPA-induced long-term allograft tolerance depends on the persistence of the alloantigen. In spite of its chemical similarity with FK506, RAPA has been shown to act by a different intracellular pathway, which is calcium-independent.

The strategy of multiple immunosuppressive therapy for organ transplantation is to enhance therapeutic efficacy while minimizing the toxicity of individual drugs used in the regimen. The side effects of FK506 and RAPA therapy are indeed the greatest limitation to wider use of these drugs, particularly in autoimmune diseases where prolonged administration may be anticipated. The acute nephrotoxicity of FK506 is similar in prevalence to CsA, whereas neurotoxicity and hyperglycemia are greater. RAPA appears synergistic with CsA for immunosuppressive efficacy. RAPA produces no acute renal dysfunction in the rat; it has been associated in some specific models with vasculitis in dogs, and with myocardial necrosis in rats, which is not the drug effect but has been attributed to preexisting parvovirus in that species.

The structurally related macrolides FK506 and RAPA are both potent immunosuppressants. However, in the same system of *in vitro* study, RAPA acted as a potent antagonist of FK506 suppression (Dumont et al, 4). The present study was initiated to evaluate the combined effect of FK506 and RAPA *in vivo*, providing scientific support for extension of these findings into upper mammal and ultimately to the man.

MATERIALS AND METHODS

Adult (9 to 11 weeks old) male Brown Norway (BN, RT1ⁿ), and Lewis (LEW, RT1^l) rats were purchased from Charles River Laboratories (Quebec, Canada). The rats were housed in controlled light/dark cycles and allowed free access to water and rat chow. FK506 was donated by Fujisawa USA Inc. (Deerfield, IL). After initial dissolving in 100% ethanol (10 mg/ml), FK506 was then diluted in Cremophor EL (0.1 mg/ml), a derivative of castor oil and ethylene oxide. Final FK506 doses were diluted in normal saline according to the recipient's weight. FK506 was administered intramuscularly daily for 14 days. RAPA was obtained from Wyeth-Ayerst Research (Rouses Point, NY) and diluted in a vehicle containing polyethylene glycol 400 (70%), N,N-dimethylacetamide (20%), and Tween 80 (10%). The drug was delivered intravenously via a 14-day 2002 osmotic pump (Alzet, Palo Alto, CA) filled with RAPA. The pumps were always primed for 2-3 hr in sterile saline at 37°C and were then inserted into a recipient lumbar vein immediately after finishing the operation of transplantation. Heterotopic heart transplants were placed intra-abdominally by a method described by Ono and Lindsey with some modifications. End-to-side anastomoses of the donor aorta to the recipient aorta and the donor pulmonary artery to the recipient vena cava were performed. The function of the transplanted heart was evaluated by daily abdominal palpation. The time of rejection was defined as last day of palpable cardiac contraction, and the rejection was confirmed histologically after laparotomy. Animals that lost palpable activity of the graft within 3 days after surgery were classified as technical failures (less than 3%) and were omitted from data analysis. In prevention of acute cardiac rejection model, LEW recipient rats received BN heart and were treated with FK506 intramuscularly and/or RAPA intravenously at different doses from day 1 after transplantation for up to 14 days. Nine groups (n≥6) were involved in this part of study (Table 2-1). In reversal of

ongoing acute cardiac rejection model, LEW recipient rats received BN heart, and were treated with FK506 intramuscularly and/or RAPA intravenously at different doses from day 4 after transplantation for up to 14 days. Six groups (n=6) were involved in this part of study (Table 2-2).

For statistical analysis, heart allograft survivals are presented as a mean survival time (MST \pm SD) with comparison among groups performed by Gehan's survival test. The median-effect principle (Chou, 1991; Steptowski et al, 1996) is based on the premise that the effect of each agent is related to its dose and therefore be calculated using the following equation:

$$(fa/fu) = (D/Dm)^m \quad (1)$$

where fa and fu represent the fractions of the system that are affected (% inhibition or rather days of survival beyond controls) and unaffected ($1 - fa$), respectively, by the drug at dose D . Full protection ($fa = 1$) is defined at least a 60-day survival of heart allograft. Dm is the dose required for 50% inhibition (ED_{50}), the median-effect; m is a coefficient that describes the sigmoidicity of the dose-effect curve. The interaction between two drugs, synergism, summation, or antagonism is assessed by the combination index (CI),

$$CI_x = \frac{D_1 \text{ combined}}{D_1 \text{ alone}} + \frac{D_2 \text{ combined}}{D_2 \text{ alone}} + \frac{(D_1 \text{ combined})(D_2 \text{ combined})}{(D_1 \text{ alone})(D_2 \text{ alone})} \quad (2)$$

where D_1 combined and D_2 combined represent the amount of drug 1 and drug 2, respectively. D_1 and D_2 each display $x\%$ inhibition for the mutually exclusive case where both drugs have

different modes of action. According to Chou's interpretation, CI values less than 1.0 (<1) suggest synergism, whereas those equal to 1.0 ($=1$) indicate summation, and those above 1.0 (>1) show antagonism. A computer software program was used to assess the dose-effect parameters (D_m , m and r) and CI values (Calculusyn, Biosoft).

RESULTS

In untreated LEW recipient rats receiving BN heart allografts, a mean graft survival time of 6.5 ± 0.6 days was observed. LEW recipients treated with low dose of FK506 (0.01 mg/kg/day i.m.) or low dose of RAPA (0.02 mg/kg/day i.v.) for up to 14 days had a significantly prolonged BN heart allograft survival with an MST of 12.3 ± 2.3 and 14.0 ± 3.4 days, respectively, compared with naive controls. When low doses of FK506 (0.01 mg/kg/day) and RAPA (0.02 mg/kg/day) were combined for 14 days, nearly additive interaction of FK506 and RAPA was observed with an MST of 28.0 ± 7.5 days ($P < 0.001$; CI=1.027, Table 2-1). Furthermore, combined use of FK506 (0.02 mg/kg/day) and RAPA (0.02 mg/kg/day) produced synergistic interaction when compared with FK506 (0.02 mg/kg/day) or RAPA (0.02 mg/kg/day) used alone ($P < 0.001$; CI=0.643). Moderate synergism was observed in combined use of FK506 (0.04 mg/kg/day) and RAPA (0.04 mg/kg/day), which maintained the BN allograft survival for an MST of 49.0 ± 4.3 days ($P < 0.001$; CI=0.755) when compared with FK506 or RAPA used alone. The results of graft survival after treatment with low doses of FK506 and/or RAPA starting from day 4 after transplantation until day 18 are detailed in Table 2-2. The MST of BN cardiac allograft was 28.8 ± 2.9 days in LEW recipients treated with combined low dose of FK506 (0.01 mg/kg/day) and RAPA (0.02 mg/kg/day) produced moderate synergistic interaction than that in individual immunosuppression groups ($P < 0.001$; CI=0.710). Furthermore, FK506 (0.02 mg/kg/day) and RAPA (0.02 mg/kg/day) in combination prolonged heart graft survival to an MST of 38.2 ± 11 days which represented synergistic interaction compared with monotherapy of FK506 or RAPA ($P < 0.001$; CI=0.684). All the treated groups had a significantly longer MST than the controls ($P < 0.05$).

DISCUSSION

In this study, we evaluated whether concomitant use of FK506 with RAPA would result in a synergistic or antagonistic effect in prolonging vascularized heart allograft survival. Our results clearly indicate that combined use of FK506 and RAPA *in vivo* did not produce antagonism, but synergistically prolonged allograft survival compared with each agent alone. This was observed in preventing acute allograft rejection and in reversal of ongoing acute rejection. Our results are well in agreement with Morris' early report (Morris, 1991) in which combinations of RAPA plus CsA or RAPA plus FK506 interacted synergistically to prolong the survival of mouse heart tissue allografts (Morris, 1991). These preliminary *in vivo* results are in contrast with *in vitro* studies detailed by Dumont et al (1990; 1992).

Dumont et al (1990) first demonstrated that a 50-100 molar excess of RAPA antagonized the immunosuppressive effects of FK506 when added to T-cell cultures. RAPA blocked FK506- but not CsA-mediated inhibition of IL-2 mRNA induction. When splenic T cells were stimulated with IL-2 + phorbol myristate acetate, FK506, but not CsA, reversed the suppressive effect of RAPA on proliferation. FK506 also antagonized RAPA-mediated inhibition of the induction of Ly-6E Ag expression by IFN in YAC cells. They further explored the competition between these two agents. Both FK506 and RAPA, but not CsA, inhibited the binding of the probe in YAC cells. They demonstrated that FK506 and RAPA antagonized each other's biologic activity and physically interacted with a common receptor in T cells, FKBP-12 (Dumont et al, 1992; Bierer et al, 1990a). They also documented the ability of RAPA to block the effects of FK506 in many systems *in vitro*, e.g., T- and B-cell proliferation (Bierer et al, 1990a); T-cell IL-2 production, IL-2R α expression, exocytosis, nuclear factor of activated cell (NFAT)-dependent transcription, and apoptosis (Bierer et al, 1990a); and exocytosis of human neutrophils and basophils (De Paulis et

al, 1991). Dumont et al (1992) also used L-685,818, the C18-hydroxy, C21-ethyl derivative of FK506 to explore further the role of FKBP-12 in the immunosuppressive action of FK506. They proved that L-686,818 is a potent antagonist of the immunosuppressive activity of both FK506 and RAPA.

Why do the immunosuppressive macrolides FK506 and RAPA, acting as antagonists *in vitro*, result in synergistic effect in preventing allograft rejection *in vivo* ? First, both FK506 and RAPA interact with FKBP-12, which is abundant and ubiquitous *in vivo*. It is a member of a larger family of FKBP, and this abundance *in vivo* could prevent inhibitive competition (Sigal and Dumont, 1992; Bierer et al, 1990b). Second, only a small fraction of the cellular pool of FKBP needs to be occupied by the drugs in order to achieve maximal immunosuppression (De Paulis et al, 1991). In addition, although FK506 and RAPA both bind to and inhibit the isomerase activity of FKBP-12, such an interaction with FKBP-12 is not sufficient to explain inhibition of T-cell function (Bierer et al, 1990b; Sigal et al, 1991) and to mediate immunosuppression (Dumont et al, 1992). This suggests that the complex formed by the drugs and their major binding proteins affects cell function by other mechanisms that could be different for each drug.

Actually, RAPA was shown to block p70^{S6k} and to modulate the stability of some cytokine mRNAs during the G₀-G₁ stage. RAPA's major inhibitory effects on the proliferation of T cells is from the G₁ to S phase of the cell cycle, and blocks both IL-2R signaling and growth-factor-mediated signal transduction (Morris, 1996)). RAPA is known to influence several biochemical events and the activity of a number of proteins that are critical in cell-cycle regulation (Sehgal et al, 1995). RAPA also inhibits the Ca²⁺-independent CD28/B7 costimulatory pathway. The CD28 pathway participates in down-regulation of I_kB_α; down-regulation of I_kB_α promotes the

translocation of *c-Rel* into the nucleus, where it is implicated in the transcriptional activation of several lymphokine genes. The kinase activity of additional cell-cycle regulatory proteins, the cyclin-dependent kinases-2 and -4, is also inhibited by RAPA (Sehgal, 1995).

On the other hand, FK506 and CsA have similar mechanisms (including same side-effects) despite their striking structural differences (Morris, 1996; Sehgal, 1995). They mediate their action in the G₀-G₁ phase of the cell cycle during activation of T cells, principally via inhibition of cytokine production. FK506 and CsA inhibit transcription of the IL-2 gene in T cells induced by Ca²⁺-dependent stimulant such as antigen. FK506 and CsA, when complexed with their respective immunophilins, appear to sequester and inhibit calcineurin ability to dephosphorylate peptide substrates and the cytoplasmic subunit of NFAT, which is required for efficient translocation and activation of the transcription factors NFAT. NFAT induces the transcription of cytokine genes, such as IL-2 gene (Sehgal, 1994). In contrast, RAPA has no effect on calcineurin activity.

In conclusion, we have shown that, in contrast with *in vitro* studies, the combined therapy of FK506 and RAPA *in vivo* does not produce antagonism but rather has synergistic effects in prolonging vascularized allograft survival as compared with each agent alone. This initial study appears to warrant further evaluation of different doses combinations to assess pharmacokinetic interaction effects in primates and potentially in phase I human trial.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Fujisawa USA, Inc., and Wyeth-Ayerst Research for the supply of FK506 and RAPA, and Dr. Ciro D. Caravaggio for helpful discussions.

REFERENCES

BIERER B.E., MATTILA P.S., STANDAERT R.F., ET AL. ***Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin.*** Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 9231, 1990a.

BIERER B.E., SOMERS P.K., WANDLESS T.J., BURAKOFF S.T., SCHREIBER S.L. ***Probing immunosuppressant action with nonnatural immunophilin ligand.*** Science 250 : 56, 1990b.

CHOU T.C. ***The median-effect principle and combination index for quantitation of synergism and antagonism.*** In: Chou T.C., Rideout D., eds. Synergism and antagonism in chemotherapy. San Diego, Academic Press, 61, 1991.

DE PAULIS A., CIRILLO R. CICCARELLI A., CONDORELLI M., MARONE G. ***FK506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human FcεRI + cells.*** J. Immunol. 146 : 2374, 1991.

DUMONT F.J., MELINO M.R., STARUCH M.J., KOPRAK S.L., FISCHER P.L., SIGAL N.A. ***The immunosuppressive macrolides FK506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells.*** J. Immunol. 144 : 1418, 1990.

DUMONT F.J., STARUCH M.J., KOPRAK S.L., ET AL. ***The immunosuppressive and toxic effects of FK506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK506 and rapamycin.*** J. Exp. Med. 176 : 751, 1992.

MORRIS R.E. ***New immunosuppressive drugs.*** In: Busuttil R.W., Klintmalm G.B., eds. Transplantation of the liver. Philadelphia: WB Saunders 760, 1996.

MORRIS R.E., MEISER B.M., WU J., SHORTHOUSE R., WANG J. ***Use of rapamycin for suppression of alloimmune reactions in vivo: Schedule dependence, tolerance induction, synergy with cyclosporin and FK506, and effect on host-versus-graft and graft-versus-host reactions.*** Transplant. Proc. 23 : 521, 1991.

OCHIAI T., NAKAJIMA K., NAGATA M., ET AL. ***Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat.*** Transplant. Proc. 19 : 1284, 1987.

SEHGAL S.N., BAKER H., VEZINA C. ***Rapamycin (AY-22.989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization.*** J. Antibiot. (Tokyo) 28 : 727, 1975.

SEHGAL S.N., CAMARDO J.S., SCAROLA J.A., ET AL. ***Rapamycin (sirolimus, rapamune).*** Curr. Opin. Nephrol. Hyperten. 4 : 482, 1995.

SEHGAL S.N., MOLNAR-KIMBER K., OCAIN T.D., WEICHMAN B.M. ***Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide.*** Med. Res. Rev. 14 : 1, 1994.

SIGAL N.H., DUMONT F.J. ***Cyclosporin A, FK506, and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction.*** Ann. Rev. Immunol. 10 : 519, 1992.

SIGAL N.H., DUMONT F., DURETTE P., ET AL. *Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A?* J. Exp. Med. 172 : 619, 1991.

STEPTOWSKI S.M., NAPOLI K.L., WANG M.E., QU X., CHOU T.C., KAHAN B.D. *Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporin on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats.* Transplantation 62: 986, 1996.

TABLE 2-1. Effect of FK506 and RAPA in prevention of acute heart allograft rejection in the rat.

Groups ^{a,b}	Survivals (days)	MST ± SD (days)	P values	CI values ^c
1. Control	6, 6, 6, 7, 7, 7	6.5 ± 0.6		
2. FK506 0.01 mg/kg/day	10, 11, 11, 12, 14, 16	12.3 ± 2.3	0.01	
3. FK506 0.02 mg/kg/day	27, 28, 29, 31, 31, 33	29.8 ± 2.2	0.01	
4. FK506 0.04 mg/kg/day	21, 26, 28, 32, 41, 56	34.0 ± 12.7	0.01	
5. RAPA 0.02 mg/kg/day	8, 13, 14, 15, 17, 17	14.0 ± 3.4	0.01	
6. RAPA 0.04 mg/kg/day	17, 21, 22, 30, 30, 32	25.5 ± 6.1	0.01	
7. FK506 0.01 mg/kg/day RAPA 0.02 mg/kg/day	20, 22, 28, 32, 33, 35	28.0 ± 7.5	0.001	1.027
8. FK506 0.02 mg/kg/day RAPA 0.02 mg/kg/day	42, 44, 45, 47, 50, 50	46.3 ± 3.3	0.001	0.643
9. FK506 0.04 mg/kg/day RAPA 0.04 mg/kg/day	44, 45, 49, 50, 50, 56	49.0 ± 4.3	0.001	0.755

P versus control group

a. FK506 delivered intramuscularly for 14 days from day 1 after transplantation

b. RAPA delivered by osmotic pump for 14 days from day 1 after transplantation

c. CI values for FK506 and RAPA interaction calculated as shown in statistical analysis

TABLE 2-2. Effect of FK506 and RAPA in reversal of ongoing acute heart allograft rejection in the rat.

Groups ^{a,b}	Survivals (days)	MST ± SD (days)	P values	CI values ^c
1. Control	6, 6, 6, 7, 7, 7	6.5 ± 0.6		
2. FK506 0.01 mg/kg/day	7, 7, 7, 7, 8	7.2 ± 0.4	0.038	
3. FK506 0.02 mg/kg/day	10, 14, 21, 33, 39, 39	26.0 ± 12.7	0.01	
4. RAPA 0.02 mg/kg/day	9, 11, 25, 26, 26, 27	20.7 ± 8.3	0.01	
5. FK506 0.01 mg/kg/day RAPA 0.02 mg/kg/day	26, 27, 28, 28, 30, 34	28.8 ± 2.9	0.001	0.710
6. FK506 0.02 mg/kg/day RAPA 0.02 mg/kg/day	28, 31, 33, 38, 39, 60	38.2 ± 11.0	0.001	0.684

P versus control group

a. FK506 delivered intramuscularly for 14 days from day 4 after transplantation

b. RAPA delivered by osmotic pump for 14 days from day 4 after transplantation

c. CI values for FK506 and RAPA interaction calculated as shown in statistical analysis

CHAPITRE III

DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1 CRITIQUE DE LA MÉTHODOLOGIE

Tacrolimus et sirolimus sont des macrolides antibiotiques qui possèdent des effets immunosuppresseurs dans divers modèles *in vitro* (e.g. réaction du lymphocyte mixte) et *in vivo* (e.g. allogreffes). Cependant, certaines études *in vitro* (Dumont et coll., 1990) ont mis en doute l'efficacité de l'association de ces deux agents pour inhiber certaines cytokines (e.g. IL-2) responsables de la stimulation de cellules immunitaires causant le rejet aigu. Bien que les études *in vitro* demeurent très utiles pour évaluer l'immunosuppression, ils ne peuvent représenter la réalité *in vivo*. Dans un contexte social où le nombre de patients ayant reçu ou en attente d'une transplantation d'organe ne cesse de s'accroître, il s'avère primordial d'utiliser un modèle expérimental *in vivo* qui nous permet de reproduire le plus fidèlement les phénomènes, tel le rejet aigu. Notre projet de recherche consiste donc à évaluer, *in vivo*, les effets immunosuppresseurs de l'association du tacrolimus et du sirolimus dans des allogreffes cardiaques.

Modèle expérimental

Le modèle expérimental que nous avons utilisé dans cette étude est la transplantation cardiaque hétérotopique. Ainsi, la transplantation cardiaque hétérotopique chez le rat constitue une méthode simple et économique. De plus, le cœur est un organe qui possède une moins forte réactivité envers les agents étrangers que celle des organes du système digestif, excréteur ou circulatoire puisque son environnement ne l'expose pas à des microorganismes extérieurs. Le rejet aigu demeure alors plus lent : l'infiltration cellulaire est modérée et la nécrose progressive, ce qui donne plus de temps aux agents immunosuppresseurs pour agir.

Le modèle hétérotopique cardiaque offre plusieurs avantages comparativement au modèle orthotopique, qui consiste à une excision complète du cœur du receveur et un remplacement par le cœur du donneur. Ce dernier n'est pas réalisable dans des petits animaux. Les avantages du modèle utilisé incluent une mortalité chirurgicale réduite pour le receveur; une réduction considérable des coûts et une augmentation du taux de survie du receveur après un rejet de greffe (Minanov et coll., 1997). Une étude (Sueda et coll., 1990) a démontré que l'œdème pulmonaire causé par une circulation extracorporelle, nécessaire dans un modèle orthotopique, est la cause majeure de mortalité chez des chiens receveurs qui ont subi une transplantation cardiaque orthotopique. Dans des études animales, la transplantation cardiaque hétérotopique comporte d'autres avantages, tel l'utilisation non obligatoire d'une circulation extracorporelle, et donc une réduction des coûts et une homéostasie normale sans héparine.

Dans la transplantation hétérotopique, même si le cœur transplanté ne contribue pas au système circulatoire du receveur, ceci n'est pas critique pour des études qui évaluent la nature du rejet et les effets des immunosuppresseurs. Comme ce modèle est un modèle de transplantation cardiaque non-fonctionnelle, on serait porté de croire que le processus de rejet aigu peut être différent du modèle de transplantation cardiaque orthotopique. Néanmoins, une comparaison entre les résultats d'une étude de transplantation cardiaque orthotopique (Billingram et coll., 1973) et de transplantation cardiaque hétérotopique (Sueda et coll., 1990) a démontré que la pathologie des allogreffes cardiaques de chien dans ces deux modèles est semblable.

La transplantation cardiaque hétérotopique chez le rat demeure un excellent modèle d'étude pour l'évaluation du rejet aigu et des agents immunosuppresseurs. Dès

que la chirurgie est terminée, le cœur du donneur bat normalement et la fonction du cœur peut être détectée de façon simple et efficace par une palpation trans-abdominale du cœur et des enregistrements électrocardiographiques (Chen et Daloz, 1995). L'animal est rétabli peu de temps après l'intervention et l'administration des immunosuppresseurs peut se faire dès le jour de la transplantation. La transplantation cardiaque hétérotopique intra-abdominale a été rapportée par plusieurs groupes. Pour être utile et efficace en temps et en coûts, une procédure chirurgicale doit être relativement simple et rapide à réaliser et techniquement possible. La transplantation cardiaque hétérotopique rencontre toutes ces conditions.

Bien que la méthode de transplantation cardiaque hétérotopique soit bien indiquée pour l'étude du rejet aigu et des effets de l'association tacrolimus-sirolimus, elle comporte toutefois des inconvénients. Tout d'abord, lors de la vérification quotidienne de la fonction cardiaque, la méthode de palpations trans-abdominales est simple et adéquate. Cependant, elle ne fournit pas de données histopathologiques ni de données physiologiques (e.g. données électrophysiologiques) de l'allogreffe cardiaque. L'arrêt de la fonction contractile cardiaque n'est qu'une interprétation du rejet intégral de l'allogreffe, et l'évolution réelle du processus de rejet aigu ne peut être évaluée.

En général, la palpation trans-abdominale est une méthode simple et efficace pour déterminer le jour du rejet terminal de l'allogreffe, lorsque la différence du temps de survie des allogreffes est évidente. Cependant, lorsqu'on s'attend à ce que la différence soit moins prononcée, des méthodes plus objectives sont requises. Il existe beaucoup de controverses dans la littérature concernant l'évaluation adéquate du rejet aigu dans un modèle de cœur hétérotopique. Mottram et coll. (1988) ont étudié le rôle de l'électrocardiographie pour déterminer le temps de rejet chez le cœur hétérotopique

transplanté chez la souris et ils ont conclu qu'une évaluation électrocardiographique combiné à une palpation et à l'histologie demeure la méthode la plus efficace pour définir le rejet de greffe. Néanmoins, Voiglio et coll. (1995) ont rapporté que l'électrocardiographie n'est pas un bon moyen d'évaluation car l'examen clinique ne corrèle avec aucun des paramètres électrocardiographiques qui ont été évalués. De plus, l'électrocardiographie est une technique difficile à effectuer et elle requiert une anesthésie quotidienne. Plusieurs études histopathologiques (Billingham, 1981; Hammond et coll., 1991; Herskowitz et coll., 1987) ont démontré l'utilité de cette méthode d'évaluation pour définir le rejet de greffe cardiaque chez des patients. Par contre, une étude menée par les départements de pathologie et de chirurgie de l'Université d'Utah (Xu et coll., 1992) ont démontré que les études histologiques ne sont pas utiles comme méthode d'évaluation du rejet de greffe cardiaque hétérotopique puisque les résultats ont démontré que l'allogreffe cardiaque possédait toujours une fonction contractile détectable bien que les données histologiques révélaient un rejet avancé.

Enfin, il faut mentionner que l'allogreffe cardiaque vascularisée ne subit pas de stress mécanique relié à la fonction contractile et donc ne travaille pas autant qu'un coeur transplanté de façon orthotopique. Les paramètres hémodynamiques de l'allogreffe cardiaque hétérotopique sont différents de ceux de l'allogreffe cardiaque orthotopique. Il faut aussi préciser que la dénervation de l'allogreffe cardiaque est un facteur qui est inévitable dans les 2 modèles. Ainsi, l'utilisation du modèle hétérotopique pour des études de cardioprotection doit tenir compte de ce fait, sachant que certains agents cardioprotecteurs peuvent jouer un rôle sur la composante nerveuse. Dans le cadre de notre étude, le modèle de transplantation cardiaque hétérotopique constitue

donc un moyen adéquat pour vérifier l'efficacité de l'association tacrolimus et sirolimus pour prévenir et pour renverser le rejet aigu.

Méthode d'évaluation d'une interaction synergique, additive ou antagoniste.

Dans notre étude où nous évaluons l'interaction entre tacrolimus et sirolimus, le principe de l'effet-médian et la méthode d'index d'association sont utilisés afin d'en déterminer la synergie, l'additivité ou l'antagonisme. Cette méthode d'index d'association semble être la meilleure procédure puisqu'elle tient compte de plusieurs paramètres biochimiques en plus de ne pas posséder de limites d'utilisation. Contrairement aux approches empiriques et statistiques, cette approche physico-chimique permet des modèles bien définis pour des déviations mathématiques lors de l'analyse de courbes dose-effet en biologie. La formule de l'effet-médian a été démontrée comme étant très utile pour déterminer les interactions entre agents immunosuppresseurs. Parmi les substances les plus connues en immunosuppression, l'association cyclosporine A-sirolimus représente celle qui a démontré la plus forte synergie (Kahan, 1995) tant dans des études *in vitro* de prolifération et de cytotoxicité que dans des études *in vivo* de modèles d'allogreffe cardiaque, rénale et pancréatique (Kahan, 1991).

Un point important à souligner est de savoir à quelle intensité de synergie est la relation synergique. Pour répondre à cette question, plusieurs points doivent être considérés : l'exactitude des mesures, la viabilité biologique et les conditions expérimentales (e.g. la température, la pression d'oxygène, le pH) peuvent affecter les résultats et les conclusions. Un tableau descriptif (Tableau 3-1) du niveau de synergie, d'additivité et d'antagonisme a été élaboré afin de déterminer de façon adéquate la relation qui existe entre les agents associés (Chou, 1991).

TABLEAU 3-1. Interprétation du degré de synergie et d'antagonisme dans des études d'association de médicaments selon la méthode d'index d'association^a

Intervalle d'index d'association	Description
<0.10	Très forte synergie
0.10 - 0.30	Forte synergie
0.30 - 0.70	Synergie
0.70 - 0.85	Synergie modérée
0.85 - 0.90	Légère synergie
0.90 - 1.10	Plutôt additif
1.10 - 1.20	Léger antagonisme
1.20 - 1.45	Antagonisme modéré
1.45 - 3.30	Antagonisme
3.30 - 10	Fort antagonisme
>10	Très fort antagonisme

- a. La méthode d'index d'association est basée sur les descriptions de Chou et Talalay (1977, 1981), le logiciel informatique de Chou et Chou (1987) et Calcsyn (1996). $CI < 1$, $CI = 1$ et $CI > 1$ indiquent respectivement la synergie, l'additivité et l'antagonisme.

3.2 DISCUSSION DES RÉSULTATS

Prévention du rejet aigu

Dans la présente étude, nous avons évalué si l'utilisation concomitante de tacrolimus et de sirolimus induisait des effets additifs ou bien antagonistes dans la prolongation de la survie et le renversement de rejet aigu présent dans des allogreffes cardiaques de rat. Mais auparavant, il a fallu vérifier l'efficacité de ces agents en monothérapie dans ce modèle expérimental. Les allogreffes de rats n'ayant reçu aucun traitement immunosuppresseur ont un temps de survie moyen de 6.5 ± 0.6 jours et constituaient le groupe témoin.

Tacrolimus. Lorsqu'un traitement à faible dose de tacrolimus seul (0.01 mg/kg/j) est administré pendant une période de 14 jours, le temps de survie moyen des allogreffes a augmenté significativement jusqu'à 12.3 ± 2.3 jours comparativement au groupe témoin (Figure 3-1). Par ailleurs, nous avons augmenté les doses de tacrolimus à 0.02 mg/kg/j et 0.04 mg/kg/j et le temps de survie moyen des allogreffes ont augmenté davantage jusqu'à $29.8 \pm 2.2 \text{ j}$ et $34.0 \pm 12.7 \text{ j}$, respectivement (Figure 3-1). Ces résultats suggèrent que tacrolimus semble efficace pour prévenir le rejet des allogreffes. De plus, l'efficacité immunosuppressive de tacrolimus est dose-dépendante et cet agent semble efficace même à de très faibles doses (0.01 mg/kg/j). La courbe dose-réponse (Figure 3-2) de tacrolimus est sigmoïdale. La pente de la courbe est très prononcée entre les doses 0.01 mg/kg/j et 0.02 mg/kg/j , tandis que l'effet de tacrolimus à prolonger la survie semble plafonnée (autour de 30 jours) avec les plus fortes doses (0.02 et 0.04 mg/kg/j). Tacrolimus semble efficace à faible dose et les doses élevées n'offrent pas d'avantages.

Sirolimus. Par ailleurs, lorsqu'un traitement à faible dose de sirolimus seul (0.02 mg/kg/j) est administré pendant une période de 14 jours, le temps de survie moyen des allogreffes a augmenté de façon significative jusqu'à 14.0 ± 3.4 jours comparativement au groupe témoin (Figure 3-3). De même que le traitement des rats à une dose supérieure de sirolimus (0.04 mg/kg/j) a démontré des allogreffes cardiaques vascularisées avec un temps de survie moyen prolongé, soit 25.5 ± 6.1 jours (Figure 3-3). Ces résultats suggèrent que sirolimus semble également efficace pour prévenir le rejet des allogreffes. En outre, l'efficacité immunosuppressive de sirolimus est dose-dépendante et il semble efficace même à de très faibles doses (0.02 mg/kg/j). La courbe dose-réponse (Figure 3-4) de sirolimus possède une pente moins prononcée que celle de tacrolimus. Sirolimus semble moins efficace que tacrolimus à prolonger la survie des allogreffes cardiaques aux mêmes doses. Cependant, il ne semble pas y avoir de plafonnement de l'effet dans l'écart de doses utilisées. L'évaluation de doses plus élevées de sirolimus serait nécessaire pour déterminer les doses correspondantes au plafonnement de l'effet.

Dans notre étude, nous avons utilisé des doses faibles de tacrolimus (0.01 – 0.04 mg/kg/j) et de sirolimus (0.02 et 0.04 mg/kg/j). Nous voulions, dans un premier temps, être capable de démontrer une possible interaction synergique ou additive entre ces agents. En utilisant de faibles doses de tacrolimus ou sirolimus, nous voulions observer le phénomène du rejet dans les allogreffes. Comme le temps de survie est mesuré jusqu'à un maximum de 60 jours, il ne fallait pas que les doses de tacrolimus et de sirolimus soient trop élevées. Il était alors possible de vérifier la synergie ou l'additivité entre ces agents sur une période de temps inférieure à cette limite.

Association tacrolimus-sirolimus. Par ailleurs, lorsque les rats receveurs LEW sont traités pendant 14 jours avec une association de faibles doses de tacrolimus et sirolimus de ratio 1:2 (tacrolimus 0.01 mg/kg/j + sirolimus 0.02 mg/kg/j), le temps de survie moyen des allogreffes a augmenté significativement jusqu'à 28.0 ± 7.5 jours ($P < 0.01$), lorsque comparé aux groupes traités à tacrolimus 0.01 mg/kg/j (12.3 ± 2.3 jours) ou sirolimus 0.02 mg/kg/j (14.0 ± 3.4 jours) (Figure 3-5). Selon le principe de l'effet-médian et la méthode d'index d'association, l'interaction entre tacrolimus et sirolimus à ces faibles doses de ratio 1 :2 est additive (Index d'association, combinaison index; CI= 1.027). Par contre, lorsque les rats ont reçu un traitement de ratio 1:1 à des doses plus élevées, l'interaction entre tacrolimus et sirolimus est synergique. En effet, un traitement de tacrolimus (0.02 mg/kg/j) combiné à sirolimus (0.02 mg/kg/j) a prolongé la survie des allogreffes jusqu'à 46.3 ± 3.3 jours comparativement à chaque agent seul ($P < 0.001$, CI= 0.643) (Figure 3-6). De même, un traitement de tacrolimus (0.04 mg/kg/j) et sirolimus (0.04 mg/kg/j) a prolongé davantage le temps de survie moyen des allogreffes cardiaques à 49.0 ± 4.3 jours ($P < 0.01$, CI= 0.755) (Figure 3-7). Le temps de survie moyen est également prolongé de façon significative comparativement aux traitements seuls de tacrolimus et sirolimus.

Lorsqu'on compare les droites de régression dose-réponse (Figure 3-8) du tacrolimus, du sirolimus et de l'association tacrolimus-sirolimus, on peut voir que l'association tacrolimus-sirolimus permet de prolonger significativement la survie comparativement aux agents seuls. Cependant, lorsqu'on regarde la pente des droites, on remarque que les pentes de tacrolimus et sirolimus sont plus prononcées que celle de l'association tacrolimus-sirolimus. Comme la survie des allogreffes est évaluée jusqu'à un maximum de 60 jours, les valeurs de survie des groupes d'association sont

plafonnées. Ceci expliquerait sans doute pourquoi la pente de l'association tacrolimus-sirolimus est plus faible que celle de tacrolimus ou sirolimus seul. En outre, il est à noter que le nombre limité de points de mesure (2 ou 3) peut également être une source d'explication.

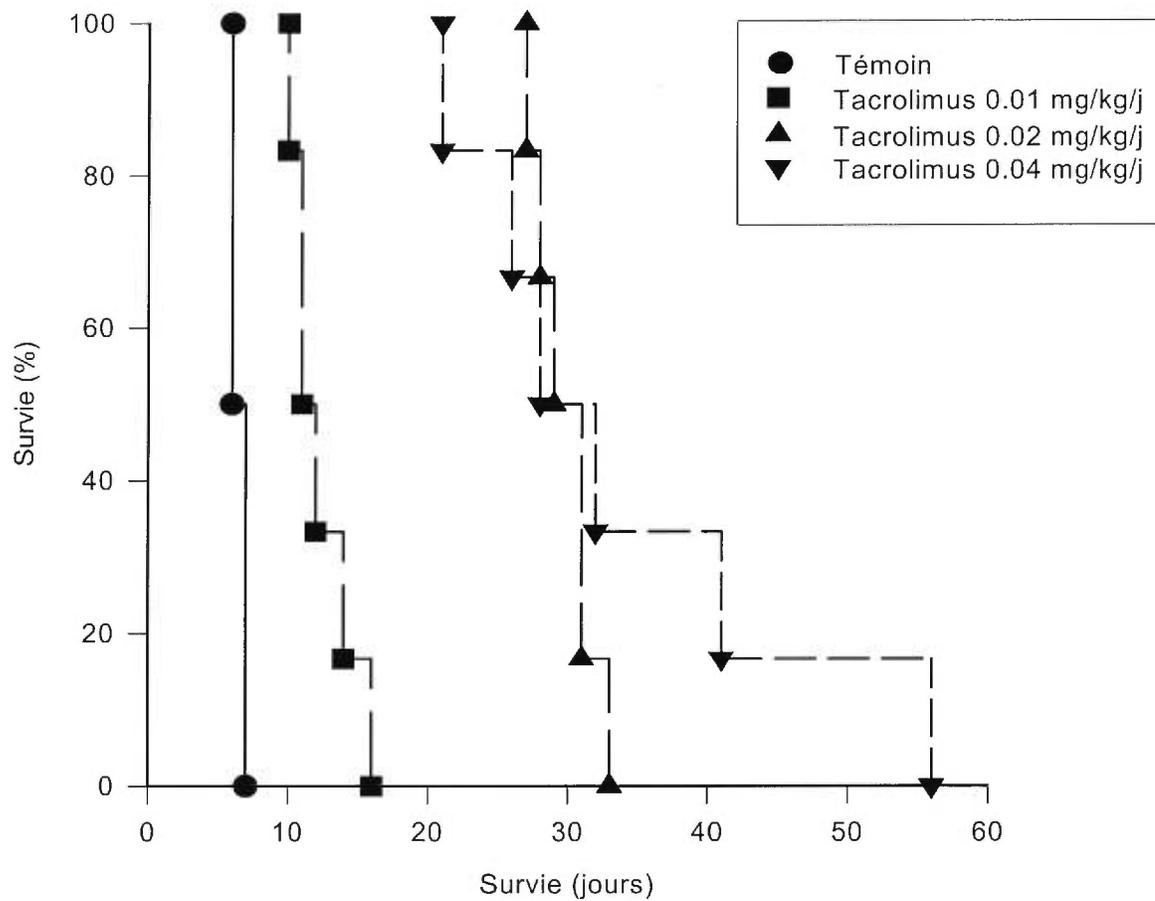


FIGURE 3-1. Effet dose-dépendant de tacrolimus en prévention contre le rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat. Différentes doses de tacrolimus sont administrées par voie intramusculaire pendant 14 jours. Tous les groupes traités possèdent un temps de survie moyen significativement plus long que celui du groupe témoin ($P < 0.001$, test de Student t).

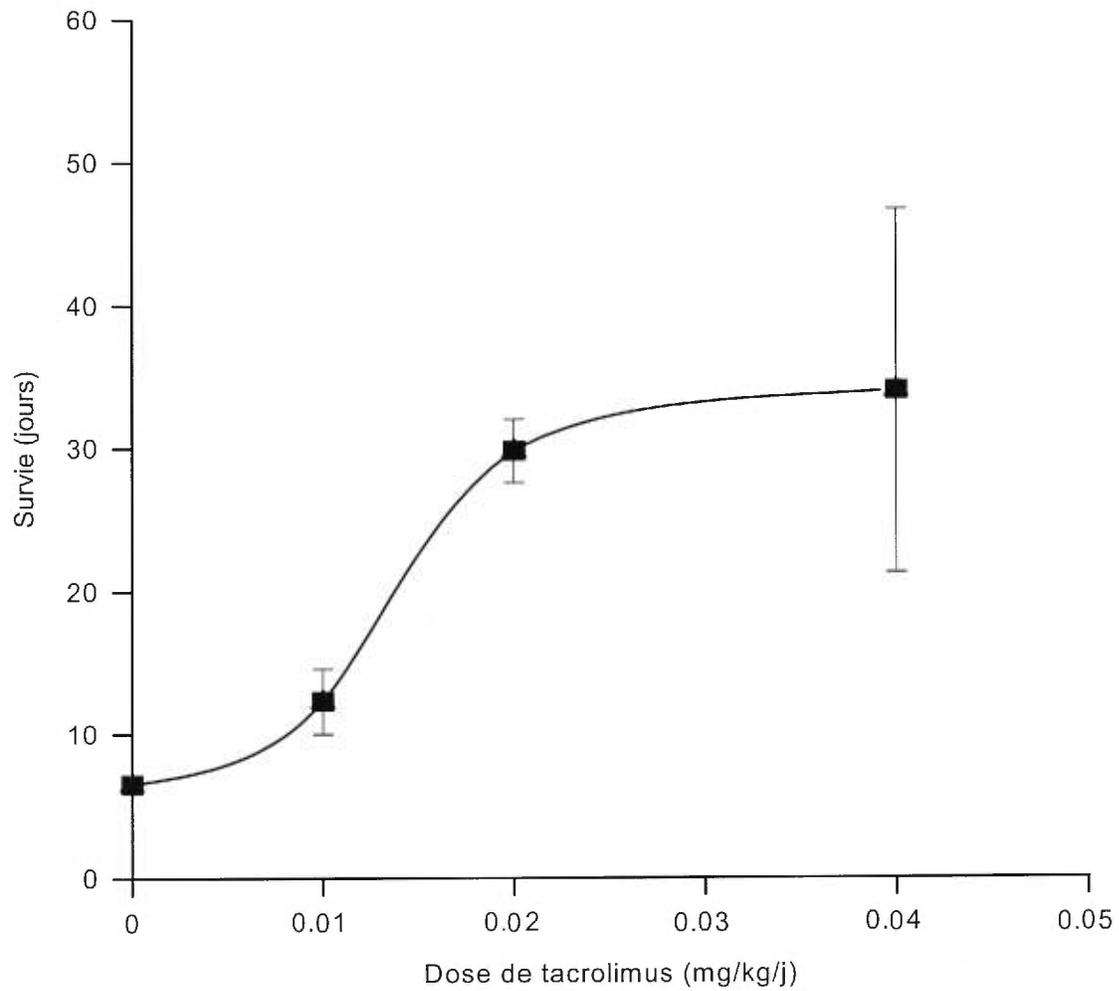


FIGURE 3-2. Courbe dose-réponse du tacrolimus en prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat

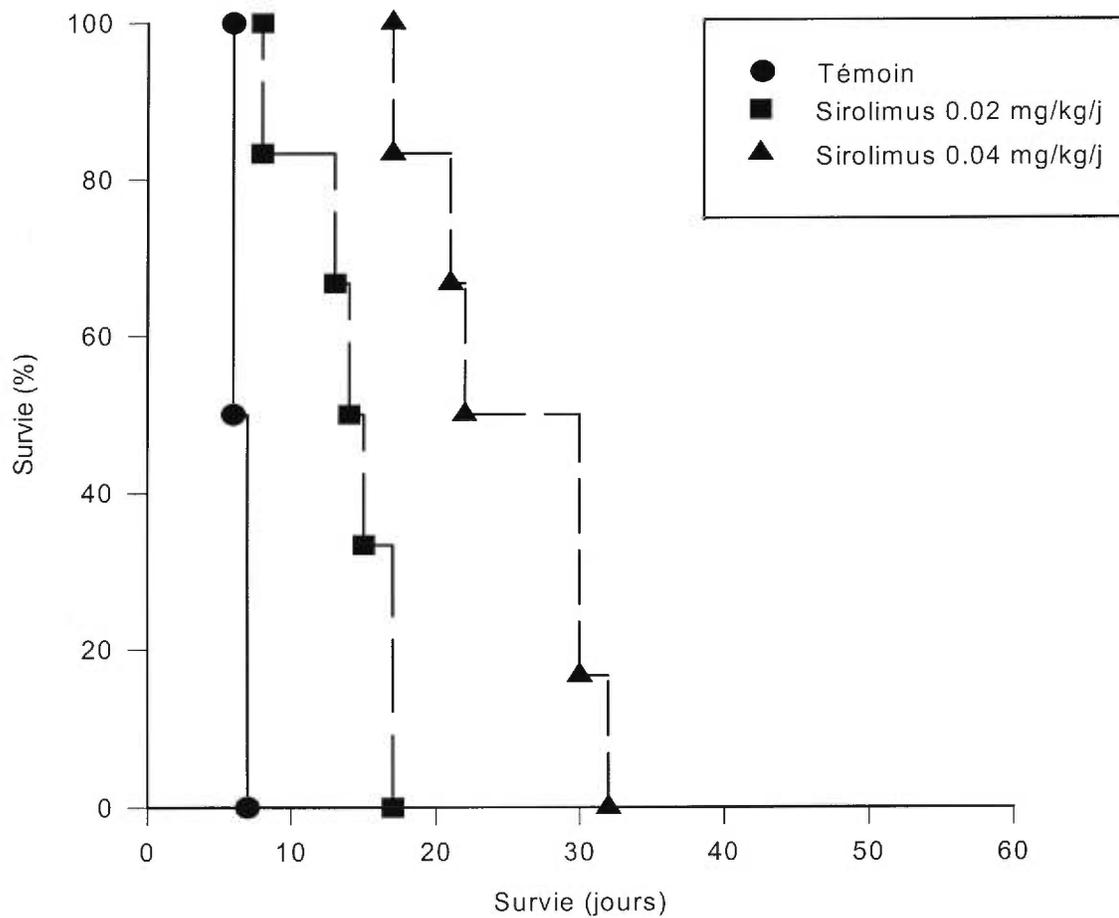


FIGURE 3-3. Effet dose-dépendant de sirolimus en prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat. Différentes doses de sirolimus sont administrées par voie intraveineuse pendant 14 jours. Tous les groupes traités possèdent un temps de survie moyen significativement plus long que celui du groupe témoin ($P < 0.001$, test de Student t).

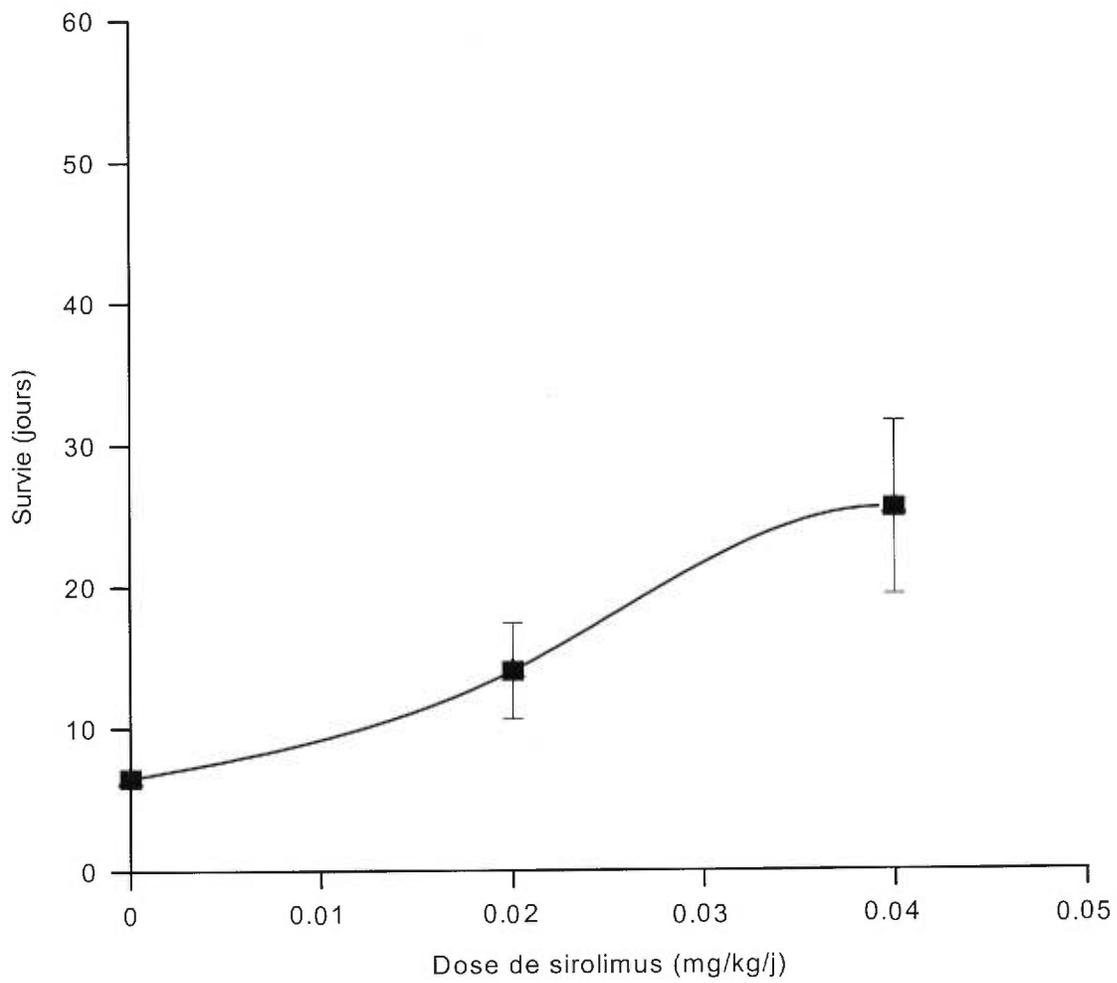


FIGURE 3-4. Courbe dose-réponse du sirolimus en prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat

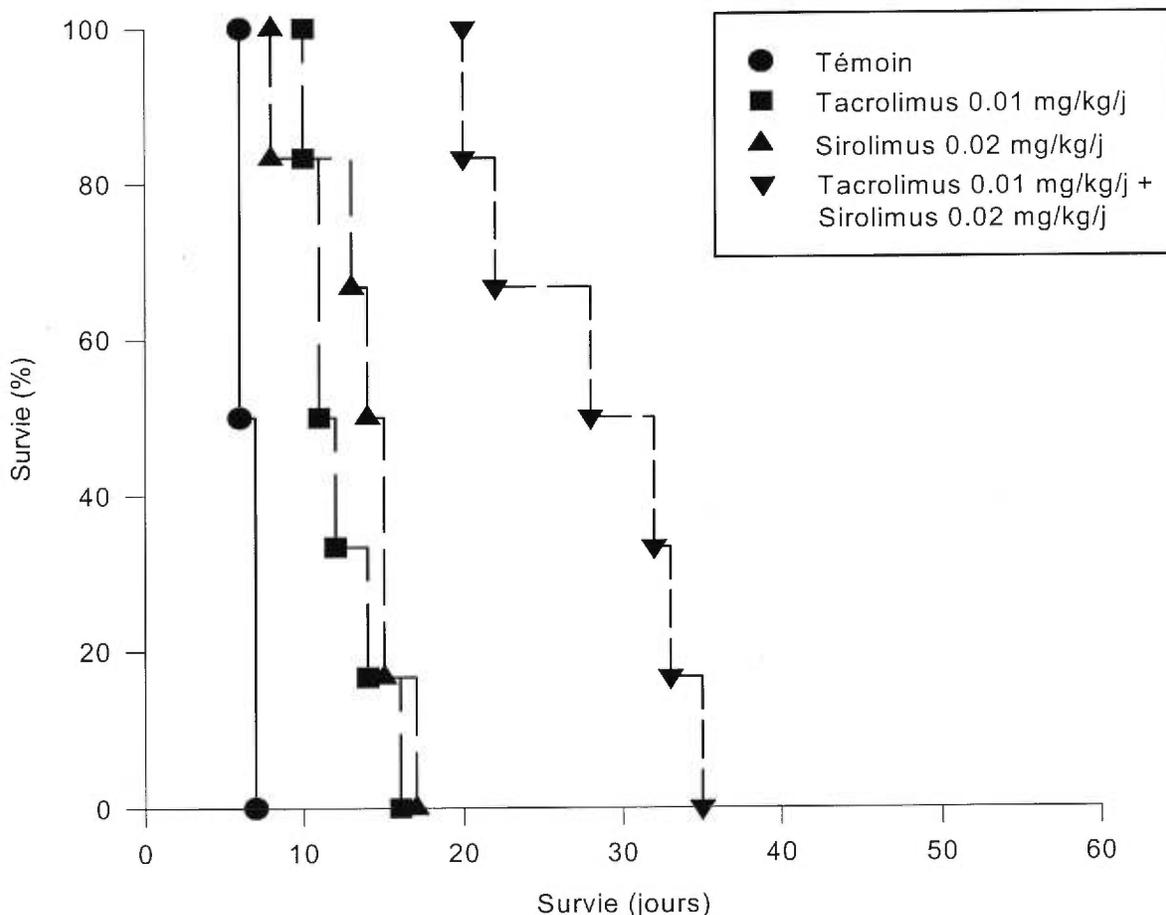


FIGURE 3-5. Effet additif de l'association tacrolimus et sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat. Différentes doses de tacrolimus et/ou sirolimus sont administrées par voies intramusculaire et intraveineuse respectivement, pendant 14 jours. Tous les groupes traités possèdent un temps de survie moyen significativement plus long que celui du groupe témoin ($P < 0.001$, test de Student *t*). Le groupe d'association, de ratio 1:2, a une survie significativement plus longue (effet additif, CI=1.027) que celui des groupes de monothérapie aux doses correspondantes ($P < 0.01$).

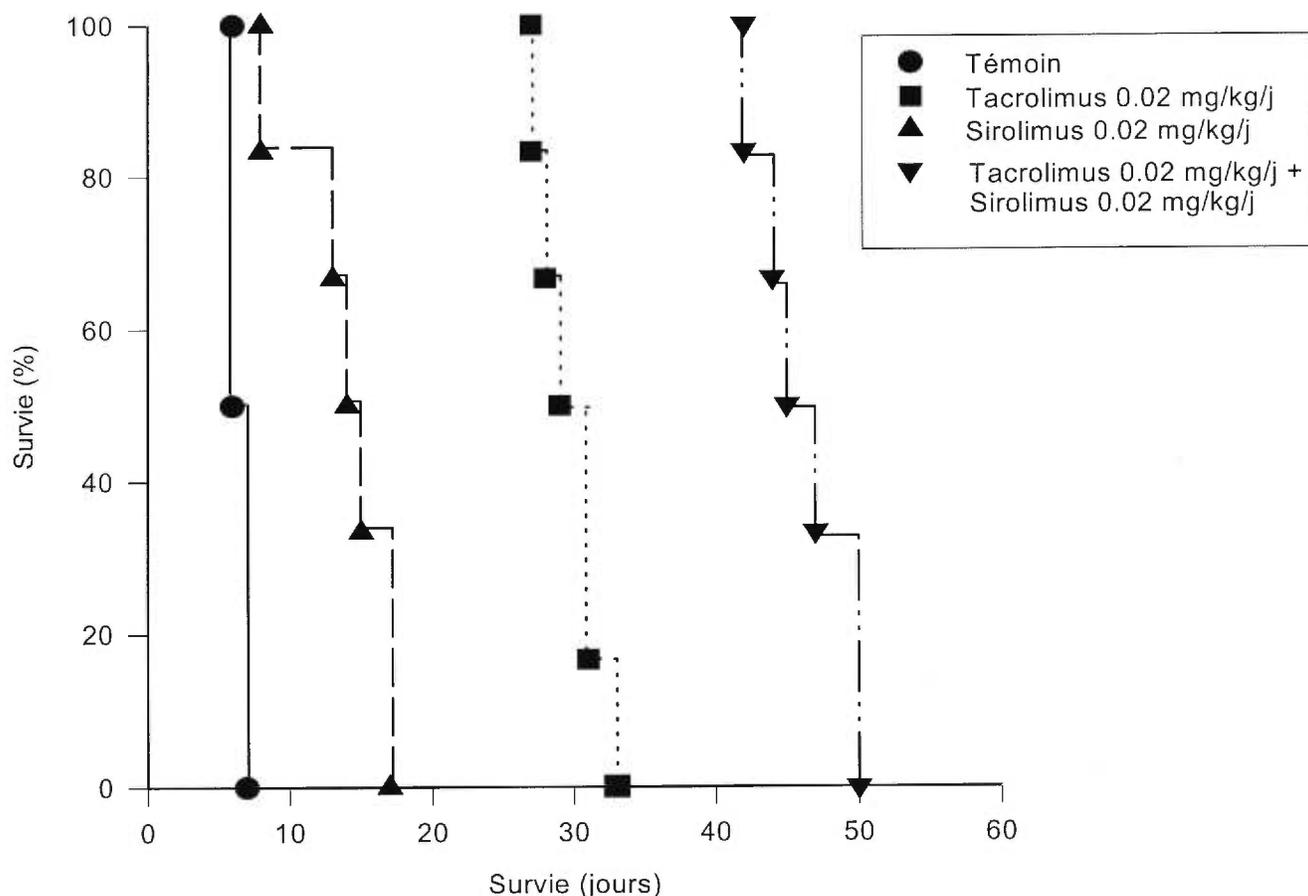


FIGURE 3-6. Effet synergique de l'association tacrolimus et sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat. Différentes doses de tacrolimus et/ou sirolimus sont administrées par voies intramusculaire et intraveineuse respectivement, pendant 14 jours. Tous les groupes traités possèdent un temps de survie moyen significativement plus long que celui du groupe témoin ($P < 0.001$, test de Student t). Le groupe de combinaison, de ratio 1:1, a une survie significativement plus longue (effet synergique, $CI=0.643$) que celui des groupes de monothérapie aux doses correspondantes ($P < 0.01$).

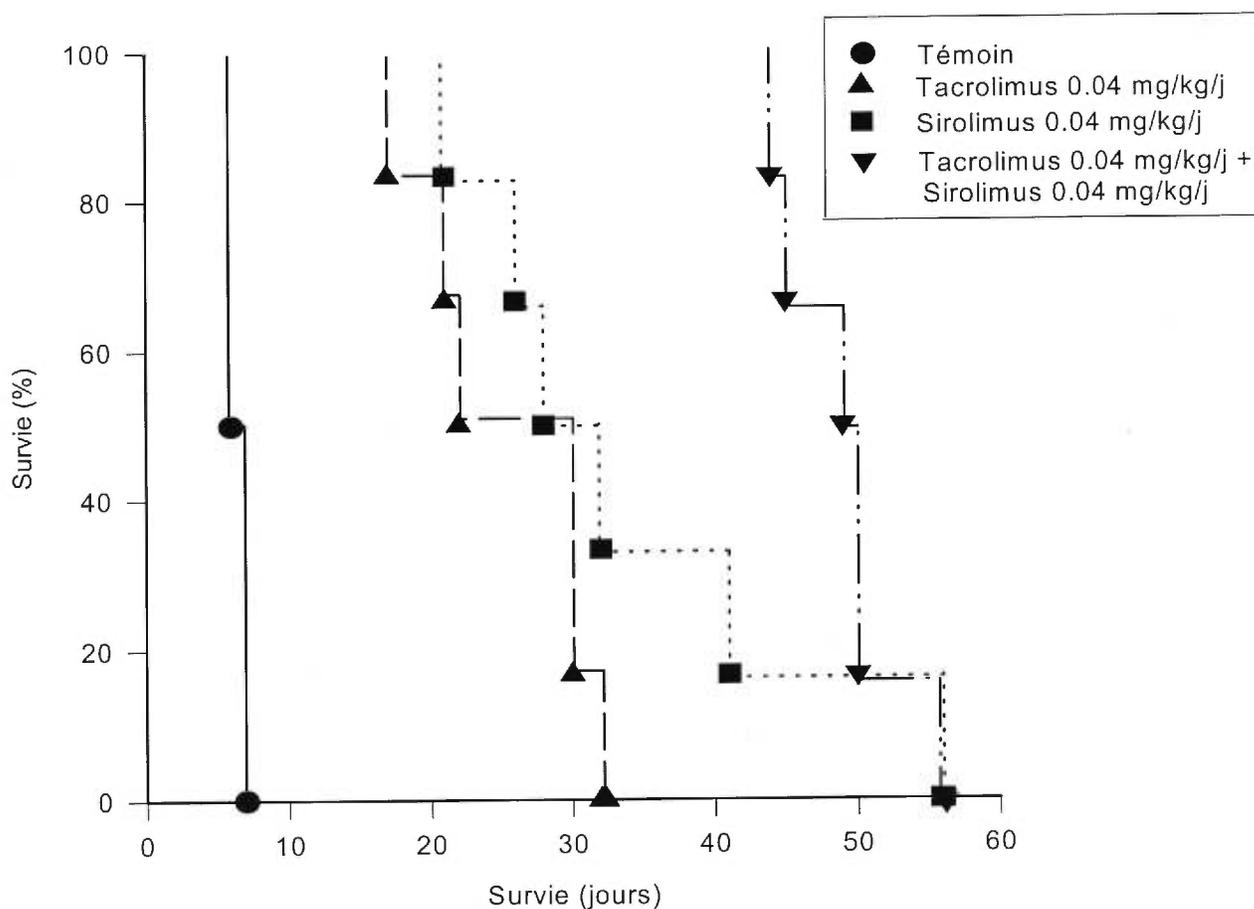


FIGURE 3-7. Effet synergique de l'association tacrolimus et sirolimus dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat. Différentes doses de tacrolimus et/ou sirolimus sont administrées par voies intramusculaire et intraveineuse respectivement, pendant 14 jours. Tous les groupes traités possèdent un temps de survie moyen significativement plus long que celui du groupe témoin ($P < 0.001$, test de Student *t*). Le groupe de combinaison, de ratio 1:1, a une survie significativement plus longue (effet synergique, $CI = 0.755$) que celui des groupes de monothérapie aux doses correspondantes ($P < 0.01$).

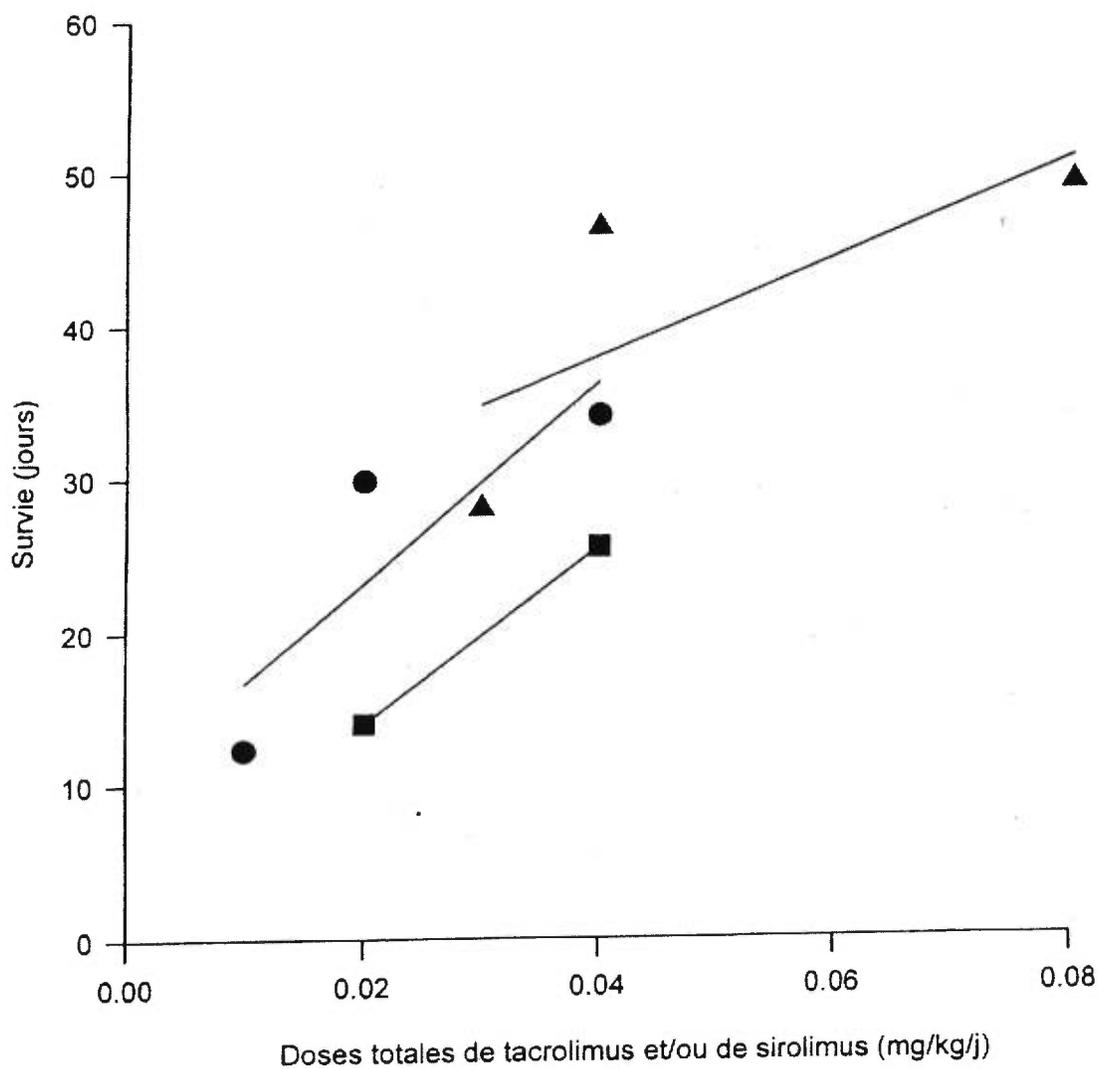


FIGURE 3-8. Droites de régression du tacrolimus (●), du sirolimus (■) ou de l'association tacrolimus-sirolimus (▲). Les droites sont tracées et calculées à partir de l'équation de régression $Y = a + bX$, où a et b représentent respectivement l'intercepte et la pente de la droite. Les valeurs des coefficients de corrélation (r^2) des droites sont $r^2 = 0.744$ (tacrolimus), $r^2 = 1$ (sirolimus) et $r^2 = 0.547$ (association tacrolimus-sirolimus).

Renversement du rejet aigu installé

Pour vérifier si l'association tacrolimus-sirolimus est efficace pour renverser un rejet aigu déjà présent, nous avons traité des rats receveurs LEW 4 jours après la transplantation, et ce pendant 14 jours, c'est-à-dire jusqu'au jour 18. Nous pouvions ainsi déduire que le processus de rejet est à un stade modéré au jour 4, compte tenu que les allogreffes du groupe témoin possédaient un temps de survie moyen de 6.5 ± 0.6 jours. Les allogreffes de rats receveurs ayant reçu un traitement à faibles doses de tacrolimus seul (0.01 mg/kg/j et 0.02 mg/kg/j) ou sirolimus seul (0.02 mg/kg/j) avaient un temps de survie moyen augmenté de façon significative jusqu'à 7.2 ± 0.4 jours ($P < 0.038$), $26.0 \pm 12.7 \text{ j}$ ($P < 0.01$) et $20.7 \pm 8.3 \text{ j}$ ($P < 0.01$), respectivement (Figure 3.9). Les allogreffes cardiaques traités à l'association de ces deux agents (tacrolimus 0.01 mg/kg/j + sirolimus 0.02 mg/kg/j et tacrolimus 0.02 mg/kg/j + sirolimus 0.02 mg/kg/j) possédaient un temps de survie moyen prolongé significativement jusqu'à 28.8 ± 2.9 jours et 38.2 ± 2.9 jours, comparativement à chaque agent seul. Dans les deux groupes, l'interaction entre tacrolimus et sirolimus est synergique comme le témoignent respectivement les valeurs de $CI = 0.710$ et $CI = 0.684$.

À un traitement de 0.02 mg/kg/j de sirolimus, le groupe de prévention du rejet aigu semble avoir une survie moins grande que celle du groupe de renversement du rejet aigu installé (14.0 ± 3.4 jours vs 20.7 ± 8.3 jours, respectivement). Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative ($P = 0.10$).

L'efficacité de l'association tacrolimus-sirolimus pour prolonger la survie des allogreffes cardiaques a été démontrée dans notre étude. De plus, cette association est efficace pour prolonger la survie des allogreffes même si le processus du rejet aigu est

déjà présent. Tacrolimus et sirolimus se sont comportés comme des agents synergiques ou du moins additifs, selon les doses utilisées.

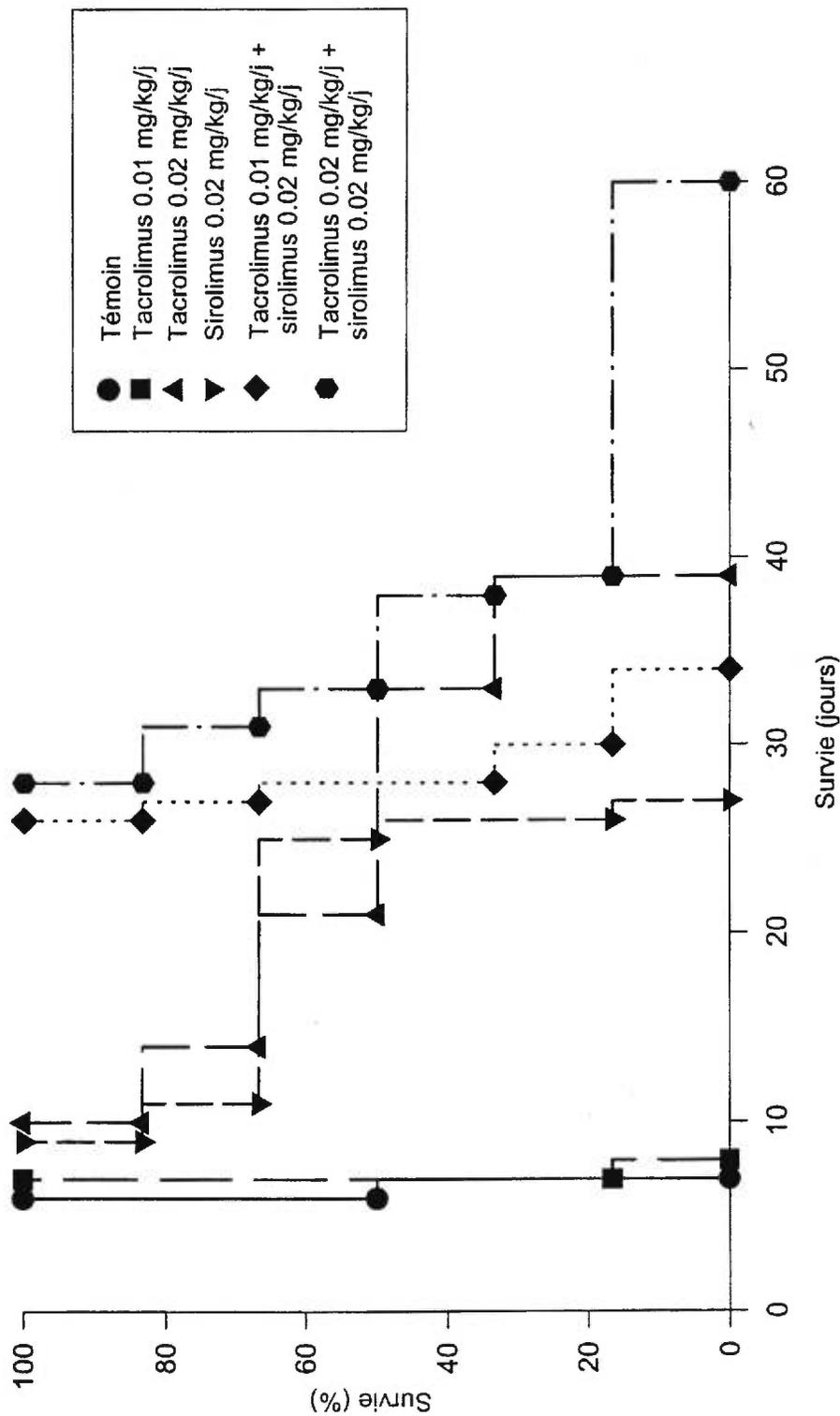


FIGURE 3-9. Effet synergique de l'association tacrolimus et sirolimus à différentes doses dans le renversement du rejet aigu présent d'allogreffe cardiaque chez le rat. Différentes doses de tacrolimus et sirolimus sont administrées 4 jours après la transplantation, par voies intramusculaire et intraveineuse respectivement pour une période de 14 jours. Sauf pour le groupe traité au tacrolimus seul (0.01 mg/kg/j), tous les groupes traités possèdent un temps de survie moyen significativement plus long que celui du groupe témoin ($P<0.001$, test de Student *t*). Les groupes d'association de ratios 1:2 et 1:1 ont une survie plus longue (effet synergique, $CI=0.710$ et $CI=0.684$) que celui des groupes de monothérapie aux doses correspondantes ($P<0.01$).

Nous avons évalué si l'association de tacrolimus et sirolimus apporte un effet synergique, additif ou antagoniste dans la prolongation de la survie d'allogreffes cardiaques et dans le renversement du rejet aigu. Nos résultats démontrent clairement que cette association tacrolimus-sirolimus n'a pas produit d'effet antagoniste mais a plutôt prolongé la survie des allogreffes comparativement à celle observée avec chaque agent seul. Ceci est observé tant dans la prévention du rejet aigu que dans le renversement du rejet aigu. Nos résultats vont dans le même sens que l'étude de Morris et coll. (1991) dans laquelle, les associations sirolimus-cyclosporine A ou sirolimus-tacrolimus interagissent de manière synergique pour prolonger la survie des allogreffes. Cependant, les résultats *in vivo* de notre étude sont en contradiction avec les études *in vitro* de Dumont et coll. (Dumont et coll., 1990 ; 1992).

Jusqu'à ce jour, très peu d'associations d'immunosuppresseurs induisant des effets antagonistes ont été rapportées. Des études *in vitro* (Vathsala et coll., 1990) ont rapporté que la cyclosporine A en association avec l'enisoprost (un analogue méthyl ester des prostaglandines) ou le tacrolimus démontre des effets antagonistes dans l'inhibition de l'incorporation du 3H-thymidine dans l'ADN par des lymphocytes T stimulés par des mitogènes. Vathsala et coll. (1991) ont également rapporté que l'association tacrolimus-cyclosporine A comporte des effets antagonistes dans la production de IL-2 et dans la prolifération des lymphocytes T suite à une réaction lymphocytaire mixte ou à une stimulation avec un anticorps anti-CD3. Le groupe a, de plus, vérifié cette association antagoniste dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat. Enfin, des études *in vitro* (Schultz et coll., 1991) ont rapporté que la cyclosporine A en association avec son métabolite M17 permet un effet antagoniste dans la prolifération lymphocytaire induite par la phytohémagglutinine.

Dumont et coll. (1990) ont été les premiers à démontrer qu'un excès de 50-100 M de sirolimus inhibe les effets immunosuppresseurs du tacrolimus dans les cultures de lymphocytes T. Sirolimus empêche l'inhibition de l'induction d'ARNm de IL-2 par tacrolimus sans toutefois empêcher cette inhibition lorsqu'elle est induite par la cyclosporine A. Lorsque les cellules thymiques sont stimulées avec IL-2 et l'acétate de phorbol de myristate, le tacrolimus et non pas la cyclosporine A renverse l'effet inhibiteur du sirolimus sur la prolifération des lymphocytes T. De plus, il a été démontré que le tacrolimus empêche le sirolimus d'inhiber l'expression de l'antigène Ly-6E induit par IFN dans des cellules YAC. Ce groupe a, en outre, étudié la compétition existant entre ces deux agents. Autant le tacrolimus que le sirolimus, mais pas la cyclosporine A, compétitionne pour lier leurs cellules-cibles. Ceci est observé par le fait que le tacrolimus et le sirolimus inhibent la liaison de la sonde H-dihydro-tacrolimus dans les cellules YAC. Ils ont démontré que le tacrolimus et le sirolimus inhibent mutuellement leur activité et interagissent physiquement avec le même récepteur dans le lymphocyte T, soit le FKBP-12 (Dumont et coll., 1990; Bierer et coll., 1990a). Dans leur étude, Dumont et coll. ont également mentionné la propriété du sirolimus de bloquer l'effet du tacrolimus sur plusieurs systèmes. Par exemple, le sirolimus peut bloquer la prolifération des lymphocytes T et B (Bierer et coll., 1990), la production de IL-2 par les lymphocytes T, l'expression du gène IL-2R α , l'exocytose, la transcription dépendante de NFAT, l'apoptose (Bierer et coll., 1990a), voire l'exocytose des neutrophiles et basophiles humains (De Paulis et coll., 1991). Dans une étude subséquente (Dumont et coll., 1992), les auteurs ont utilisé le L-685,818, un dérivé de FK506 C18-hydroxy C21-éthyl, pour étudier davantage le rôle de FKBP-12 dans l'effet immunosuppresseur de tacrolimus. Ils ont démontré que L-685,818 est un antagoniste efficace contre l'activité immunosuppressive du tacrolimus ou du sirolimus.

Mécanismes impliqués

En tenant compte des résultats de notre étude et des données existantes sur l'association du tacrolimus et du sirolimus, une question primordiale se doit d'être posée : pourquoi les macrolides immunosuppresseurs tacrolimus et sirolimus se comportent-ils comme des antagonistes réciproques *in vitro* et comme des agents synergiques *in vivo* ? Une des hypothèses permettant d'expliquer ce paradoxe est que le tacrolimus et le sirolimus interagissent avec FKBP-12, lequel est présent abondamment *in vivo* et de façon universelle. FKBP-12 fait partie de la grande famille des FKBP et son abondance *in vivo* pourrait prévenir la compétition inhibitrice entre le tacrolimus et le sirolimus observée *in vitro* (Sigal et coll., 1992; Bierer et coll., 1990b).

Un autre fait pourrait appuyer et expliquer ce phénomène paradoxal : il suffit qu'une faible fraction du pool cellulaire de FKBP soit occupée par les agents pharmacologiques pour observer une immunosuppression maximale (De Paulis et coll., 1991). De plus, même si le tacrolimus et le sirolimus se lient tous les deux à FKBP-12 et qu'ils inhibent son activité isomérase, une telle interaction physique avec FKBP-12 n'est pas suffisante pour expliquer l'inhibition de la production des cytokines (Bierer et coll., 1990b; Sigal et coll., 1991) et l'immunosuppression (Dumont et coll., 1992). Ceci indique que le complexe formé par les agents immunosuppresseurs et leurs principales protéines de liaison affecte la cellule immunocompétente par des mécanismes distincts.

Le sirolimus bloque l'enzyme kinase p70s6 et module la stabilité des ARN_m de certaines cytokines durant la phase G₀-G₁ du cycle cellulaire. Les principaux effets inhibiteurs du sirolimus sur la prolifération des lymphocytes T se produisent durant la période comprise entre les phases G₁ et S du cycle cellulaire. Le sirolimus bloque autant la transduction du signal induite par IL-2R que celle induite par des facteurs de

croissance (Morris, 1996). Le sirolimus est reconnu comme un agent qui influence plusieurs événements biochimiques et qui module l'activité d'une multitude de protéines qui sont importantes dans la régulation du cycle cellulaire (Sehgal et coll., 1995). Le sirolimus inhibe également la voie de signalisation CD28 indépendante de Ca^{2+} . Cette voie de signalisation participe à la sous-régulation de $I\kappa B\kappa$. La sous-régulation de $I\kappa B\kappa$ provoque la translocation de *c-rel* dans le noyau, lequel est impliqué dans l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes de lymphokines. L'activité kinase d'autres protéines de régulation du cycle cellulaire, les kinases-2- et -4-dépendantes de la cycline, sont aussi inhibées par le sirolimus (Sehgal et coll., 1995).

D'un autre côté, le tacrolimus et la cyclosporine A possèdent des mécanismes d'action communs malgré leur structure chimique différente (Morris, 1990; Sehgal et coll., 1995). Ces agents agissent dans la phase G_0 - G_1 du cycle cellulaire principalement par l'inhibition de la production de cytokines. Le tacrolimus et la cyclosporine A inhibent la transcription du gène de IL-2 dans les lymphocytes induite par un stimulus empruntant une voie dépendante du Ca^{2+} (e.g. antigène). Le tacrolimus et la cyclosporine A, lorsqu'ils sont liés à leurs immunophilines respectives semblent empêcher l'activité de la calcineurine à déphosphoryler des substrats peptidiques et NFAT_c, nécessaires à la translocation et l'activation des facteurs de NFAT. En effet, NFAT est responsable de la transcription des gènes de cytokines, comme celui de IL-2 (Sehgal et coll., 1994). Le sirolimus, contrairement au tacrolimus et à la cyclosporine A, n'a pas d'effet sur l'activité de la Cn.

En conclusion, nous avons démontré que l'association tacrolimus-sirolimus ne produit pas d'effets antagonistes mais plutôt des effets synergiques dans un modèle de greffe cardiaque hétérotopique. Cette étude démontre l'importance et la pertinence des

études *in vivo*. Bien que les études *in vitro* sont importantes, leurs résultats doivent être vérifiés par des études chez l'animal puisque l'environnement *in vitro* ne reflète pas la réalité *in vivo*. Par rapport aux autres associations couramment utilisées, l'association tacrolimus-sirolimus ne se situe encore qu'au stade préclinique. Cette étude démontre l'intérêt d'une évaluation supplémentaire de l'association de différentes doses de tacrolimus et de sirolimus chez les primates et chez l'homme.

3.3 PERSPECTIVES

Dans la présente étude, nous avons exploré une nouvelle stratégie pour le traitement du rejet aigu. Contrairement aux études *in vitro* qui n'accordaient aucune conclusion favorable à l'association tacrolimus-sirolimus, nos résultats suggèrent que le tacrolimus et le sirolimus en association prolongent la survie de l'allogreffe et renversent le rejet aigu. Les perspectives d'avenir de cette association sont nombreuses.

Ce traitement immunosuppresseur novateur peut être une thérapie alternative en clinique. Comme le traitement immunosuppresseur de base demeure la triple thérapie (cyclosporine A-azathioprine-prednisone) et qu'un bon nombre de patients transplantés ne la tolèrent pas ou font face à de nombreux effets secondaires, une thérapie additionnelle sans cyclosporine A et glucocorticostéroïde est indiquée. Cette thérapie doit être au moins aussi efficace et elle doit comporter moins d'effets secondaires. L'association tacrolimus-sirolimus apparaît comme une alternative intéressante. Nous avons, en premier lieu, étudié l'effet immunosuppresseur du tacrolimus et du sirolimus dans un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique. Il serait approprié d'évaluer cette association pour d'autres organes transplantés et dans d'autres espèces. Notre équipe a d'ailleurs rapporté, depuis, que cette association procure des effets additifs sur la survie dans un modèle de transplantation de l'intestin grêle chez la souris (Chen et coll., 1998). De plus, il demeure primordial d'étudier l'effet de cette association chez des primates avant d'initier des études cliniques; notre équipe a récemment effectué des recherches dans ce domaine. Les résultats (non publiés) montrent que le tacrolimus et le sirolimus en association induisent une tolérance chez des primates traités avec de faibles doses de chaque agent. Des études additionnelles pour évaluer

le mécanisme de tolérance de l'allogreffe rénale induit par cette association doivent être effectuées afin de promouvoir son utilisation chez l'homme.

Il existe, en outre, un point important à vérifier. Bien que les résultats de la présente étude aient démontré un bénéfice à utiliser le tacrolimus et le sirolimus en association, il demeure qu'on ne connaît pas le type d'interaction (additive, synergique ou antagoniste) pour leurs effets secondaires. De ce fait, il apparaît prématuré d'affirmer que cette association est sécuritaire dans le traitement du rejet aigu. En effet, une récente étude effectuée par Andoh et coll. (1998) rapporte que l'addition du sirolimus au traitement avec le tacrolimus amplifie les effets néphrotoxiques de ce dernier. Les auteurs ont suggéré que la néphrotoxicité induite par le tacrolimus résulte d'un mécanisme qui ne requiert pas l'inhibition de Cn mais que ce mécanisme serait amplifié par le sirolimus. On suggère aussi la possibilité que les doses de sirolimus ne seraient pas suffisantes pour déplacer le tacrolimus de son site de liaison intracellulaire.

CHAPITRE IV

BIBLIOGRAPHIE

4.0 BIBLIOGRAPHIE

AAGAARD-TILLERY K.M., JELINEK D. ***Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin.*** Cell. Immunol. 156 : 493, 1994.

ABBOTT C.P., LINDSEY E.S., GREECH O. JR, DEWITT C.W. ***A technique for heart transplantation in the rat.*** Arch. Surg. 89 : 645, 1964.

ADAMS D.H., LIU Q. ***FK506 inhibits human lymphocyte migration and the production of lymphocyte chemotactic factors in liver allograft recipients.*** Hepatology 23 : 1476, 1996.

AHSAN N., HOLMAN M.J., KATZ D.A., ABENDROTH C.S., YANG H.C. ***Successful reversal of acute vascular rejection in a renal allograft with combined mycophenolate mofetil and tacrolimus as primary immunotherapy.*** Clin. Transplantation 11 : 94, 1997.

AL GHAMDI S.M., CAMERON E.C., SUTTON R.A. ***Magnesium deficiency : Pathophysiologic and clinical overview.*** Am. J. Kidney Dis. 24 : 737, 1994.

AL KHURSANY I., THOMAS T.H., HARRISON K., WILKINSON R. ***Reduced erythrocyte and leukocyte magnesium is associated with cyclosporin treatment and hypertension in renal transplant patients.*** Nephrol. Dial. Transplant. 7 : 251-255, 1992.

ANDOH T.F., BURDMANN E.A., FRANSECHINI N., HOUGHTON D.C., BENNETT W.M. ***Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506.*** Kidney Int. 50 : 1110, 1996.

ANDOH T.F., RUTTAN G.C., BENNETT W.M. ***The combination of tacrolimus and sirolimus worsens nephrotoxicity.*** Transplantation Society XVII World Congress Abstract Book 199 : 54, 1998.

ASADA A., ZHAO Y., KONDO S., IWATA M. **Induction of thymocyte apoptosis by ca^{2+} -independent protein kinase C (nPKC) activation and its regulation by calcineurin activation.** J. Biol. Chem. 273 (43) : 28392, 1998.

BAKER R., GORDON R., HUFFER J., MILLER G.H. JR. **Experimental renal transplantation : I. Effect of nitrogen mustard, cortisone and splenectomy.** Arch. Surg. 65 : 702, 1952 :
Dans KAHAN B.D. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

BENHAIM P., ANTONY J.P., FERREIRA L., BORSANYI J.P., MATHES S.J. **Use of combination of low-dose cyclosporine and RS-61443 in a rat hindlimb model of composite tissue allotransplantation.** Transplantation 61 (4) : 527, 1996.

BENJAMIN E., SLUKA E. **Antikörperbildung nach experimenteller schädigung des hamatopoetischen systems durch rontgenstrahlen.** Wien Klin Wochenschr 21 : 311, 1908.
Dans KAHAN B.D. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

BENNETT W.M. **The nephrotoxicity of immunosuppressive drugs.** Clin. Nephrol. 43 (suppl. 1) : 53, 1995.

BENNETT W.M., BURDMANN E.A., ANDOH T.H., HOUGHTON D.C., LINDSLEY J., ELZINGA L.W. **Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs.** Nephrol. Dial. Transplant. 9 (suppl. 4) : 141-145, 1994.

BERTAGNOLLI M.M., YANG L., HERRMANN S.H., KIRKMAN R.L. **Evidence that rapamycin inhibits interleukin-12-induced proliferation of activated T lymphocytes.** Transplantation 58 : 1091, 1993.

BIERER B.E. **Cyclosporin A, FK506, and rapamycin : Binding to immunophilins and biological action.** Chem. Immunol. 59 : 128, 1994.

BIERER B.E., MATTILA P.S., STANDAERT R.F. **Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 9231, 1990a.

BIERER B.E., SOMERS P.K., WANDLESS T.J., BURAKOFF S.J., SCHREIBER S.L. **Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand.** Science 250 : 556, 1990b.

BILLINGHAM M.E. **Diagnosis of cardiac rejection by endomyocardial biopsy.** J. Heart Transplant. 1 : 25, 1981.

BJORKMAN P.J., SAPER M.A., SAMRAOUI B., BENNETT W.S., STROMINGER J.L., WILEY D.C. **The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.** Nature, 329 : 512, 1987.

BOREL J.F., FEURER C., GUBLER H.U. **Biological effects of cyclosporin A : a new antilymphocytic agent.** Agents Actions 6 : 468, 1976.

BRUSERUD Ø., PAWELEC G. **Cyclosporine A and FK506 show similar immunosuppressive effects on long-term in vitro T-cell proliferation.** J. Immunopharmac. 15 (2) : 93, 1993.

CALNE R.Y., ALEXANDRE G.P., MURRAY J.E. **A study of the effects of drugs in prolonged survival of homologous renal transplants in dogs.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 99 : 743, 1962 : Dans KAHAN B.D. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

CALNE R.Y., COLLIER D.S., LIM S. **Rapamycin for immunosuppression in organ allografting.** Lancet 2 : 227, 1989.

CANTAROVICH D., LEMAUFF B., HOURMANT M., GIRAL M., JACQUES Y, SOULILLOU J.P. **Anti-interleukin 2 receptor, monoclonal antibody in the treatment of ongoing acute rejection episode of human kidney graft : a pilot study.** Transplantation 47 : 454, 1989.

CANTRELL D., IZQUIERDO-PASTOR M., REIF K., WOODROW M. **Signal transduction by the T-cell antigen receptor : regulation and function of p21^{ras} and PtdIns-3 kinase.** Dans SAMUELSON L.E., ed. Lymphocyte activation. Chem. Immunol. Basel, Karger, 59 : 115, 1994.

CAO W., MOHACSI P., SHORTHOUSE R., PRATT R., MORRIS R.E. **Effect of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis.** Transplantation 59 : 390, 1995.

CARLSON R.P., BAEDER W.L., CACCESE R.G., WARNER L.M., SEHGAL S.N. **Effects of orally administered rapamycin in animal models of arthritis and other autoimmune diseases.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 685 : 86, 1993.

CARREL A. **La technique opératoire des anastomoses vasculaires, et la transplantation des viscères.** Lyon. Med. 98 : 859, 1902.

CHAVIN K.D., QIN L., WOODWARD J.E., LIN J., BROMBERG J.S. **Anti-CD2 monoclonal antibodies synergize with FK506 but not with cyclosporine or rapamycin to induce tolerance.** Transplantation 57 (5) : 736, 1994.

CHEN H., DALOZE P. **Heart transplantation in the rat.** Dans ed. ZHANG F., LINEAWEAVER W.C., KAO S.D., WALKER R., TONKEN H.P. Manual of experimental muscle flap and organ transplantation models in the rat. Sharpoint, 86, 1995.

CHEN H., QI S., XU D., VU M.D., FITZSIMMONS W.E., BEKERSKY I., PEETS J., SEHGAL S.N., DALOZE P. **FK506 and rapamycin in combination are not antagonistic but produce extended small bowel graft survival in the mouse.** Transplant. Proc. 30 : 1, 1998.

CHEN H., WU J., LIU H., DALOZE P. **Synergistic effect of rapamycin and cyclosporine in pancreaticoduodenal transplantation in the rat.** Transplant. Proc. 24 (3) : 892, 1992.

CHEN H., XU D., DALOZE P. **Applications of transplantation techniques in research.** Dans ed. ZHANG F., LINEAWEAVER W.C., KAO S.D., WALKER R., TONKEN H.P. Manual of experimental muscle flap and organ transplantation models in the rat. Sharpoint, 55, 1995.

CHOU T.C. *Relationships between inhibition constants and fractional inhibitions dans enzyme-catalyzed reactions with different numbers of reactants, different reaction mechanisms, and different types of mechanisms of inhibition.* Mol. Pharmacol. 10 : 235-247, 1974.

CHOU T.C. *Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands.* J. Theoret. Biol. 39 : 253-276, 1976.

CHOU T.C. *On the determination of availability of ligand binding sites in steady-state systems.* J. Theoret. Biol. 65 : 345-356, 1977.

CHOU T.C. *Comparison of dose-effect relationships of carcinogens following low-dose chronic exposure and high-dose single injection : An analysis by the median-effect principle.* Carcinogenesis 1 : 203-213, 1980.

CHOU T.C. *Quantitative dose-effect analysis and algorithms : A theoretical study.* Asia Pacific J. Pharmacol. 2 : 93-99, 1987.

CHOU T.C. *The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism .* Dans CHOU T.C., RIDEOUT D.C., eds. Synergism and antagonism in chemotherapy. Academic Press, San Diego, 61, 1991.

CHOU T.C., RIDEOUT D., CHOU J., BERTINO J.R. *Chemotherapeutic synergism, potentiation and antagonism.* Dans DULBECCO R.D., ed. Encyclopedia of Human Biology, Academic Press, 2 : 371, 1991.

CHOU T.C., TALALAY P. *A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetics systems.* J. Biol. Chem. 252 : 6438-6442, 1977.

CHOU T.C., TALALAY P. *Generalized equations for the analysis of inhibitors of Michaelis-Menten and higher order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors.* Europ. J. Biochem. 115 : 207-216, 1981.

CHOU T.C., TALALAY P. ***Analysis of combined drug effects : A new look at a very old problem.*** Trends Pharmacol. Sci. 4 : 450-454, 1983.

CHOU T.C., TALALAY P. ***Quantitative analysis of dose-effect relationships : The combined effects of multiples drugs or enzyme inhibitors.*** Adv. Enz. Regul. 22 : 27-55, 1984.

CHOU T.C., TALALAY P. ***Applications of the median-effect principle for the assessment of low-dose risk of carcinogens and for the quantitation of synergism and antagonism of chemotherapeutic agents.*** Dans HARRAP K.R., ed. New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy, Bristol-Myers Symposium series, Academic Press, New York, 37, 1987.

CHUNG J., KUO C.J., CRABTREE G.R., BLENIS J. ***Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases.*** Cell 69 : 1227, 1992.

COSIMI A.B., COLVIN R.B., BUSTON R.C. ***Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunological monitoring and treatment in recipient of renal allografts.*** N. Engl. J. Med. 305 : 308, 1981.

CRABTREE G. ***Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation.*** Science 243 : 355, 1989.

DALLMAN M.J., CLARK G.J. ***Cytokines and their receptors in transplantation.*** Curr. Opin. Immunol. 3 : 729, 1991.

DAWSON T.M., STEINER J.P., DAWSON V.L., DINERMAN J.L., UHL G.R., SNYDER S.H. ***Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity.*** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 9808, 1993.

DE PAULIS A., CIRILLO R., CICCARELLI A., CONDORELLI M., MARONE G. ***FK506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human FceRI + cells.*** J. Immunol. 146 : 2374, 1991.

DIJOSEPH J.F., MIHATSCH M.J., SEHGAL S.N. ***Renal effects of rapamycin in the spontaneously hypertensive rat.*** Transplant. Int. 7 : 83, 1994.

DÖRING H., DENHNERT H. ***The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff.*** 1st English Edition. 1988.

DUBOST C. ***Résultats d'une tentative de greffe rénale.*** Bull. Soc. Med. Hop. Paris 67 : 1372, 1951.

DUGUAY P., CHEN H., DALOZE P., DUMONT L. ***Cardioprotective effects of the lazaroïd U74389G following cold preservation and transplantation of rat hearts.*** Transplantation. 61 (7) : 1023, 1996.

DUMONT F.J., MELINO M.R., STARUCH M.J., KOPRAK S.L., FISCHER P.L., SIGAL N.A. ***The immunosuppressive macrolides FK506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells.*** J. Immunol. 144 : 1418, 1990.

DUMONT F.J., STARUCH M.J., KOPRAK S.L., SIEKIERKA J.J., LIN C.S., HARRISON R., SEWELL T., KINDT V.M., BEATTIE T.R., WYVRATT M., SIGAL N.H. ***The immunosuppressive and toxic effects of FK506 are mechanistically related: Pharmacology of a novel antagonist of FK506 and rapamycin.*** J. Exp. Med. 176 : 751, 1992.

ECKHOFF D.E., MCGUIRE B.M., FRENETTE L.C., CONTRERAS J.L., HUDSON S.L., BYNON J.S. ***Tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil combination therapy versus tacrolimus in adult liver transplantation.*** Transplantation 65 (2) : 180, 1998.

EUROPEAN MYCOPHENOLATE MOFETIL COOPERATIVE STUDY GROUP. ***Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection.*** Lancet 345 : 1321, 1995.

FLUHLER E.N., DIJOSEPH J.F., ARMSTRONG J., HICKS D.R., BEIRERLE F., SEHGAL S.N. ***Pharmacokinetic and pharmacodynamics of oral rapamycin in rat receiving heterotopic heart to ear allografts.*** Pharmacol. Res. 11 (suppl. 10) : S-344, 1994.

FLYE M.W. *History of transplantation* dans *Principles of organs transplantation*. 1989.

FRYER J., YATSCOFF R.W., PASCOE E.A., THLIVERIS P.J. *Relationship of blood concentrations of rapamycin and cyclosporine to suppression of allograft rejection in a rabbit heterotopic heart transplant model*. *Transplantation* 55 : 340, 1993.

GAULTON, G.N., WILLIAMSON P. *Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor complex*. Dans SAMUELSON L.E., ed. *Lymphocyte activation*. Chem. Immunol. Basel, Karger, 59 : 91, 1994.

GAWECO A.S., OTTO G., OTTO H.F. *Distinct intragraft cytokine gene expression patterns during acute hepatic rejection under cyclosporine versus FK506 primary immunosuppression*. *Transpl. Proc.* 26 : 3111, 1994.

GOLBAEKDAL K., NIELSEN C.B., DJURHUUS J.C., PEDERSEN E.B. *Effects of rapamycin on renal hemodynamics water and sodium excretion, and plasma levels of angiotensin II, aldosterone, atrial natriuretic peptide and vasopressin in pigs*. *Transplantation* 58 : 1153, 1994.

GOTO T., KINO T., HATANAKA H., OKUHARA M., KOHSAKA M., AOKI H., IMANAKA H. *FK506 : Historical perspectives*. *Transplant. Proc.* 23 (6) : 2713, 1991.

GRANGER D.K., CROMWELL J.W., CHEN S.C., GOSWITZ J.J., MORROW D.T., BEIERLE F.A., SEHGAL S.N., CANAFAX D.L., MATAS A.J. *Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oral rapamycin monotherapy*. *Transplantation* 59 : 340, 1994.

GRUESSNER R.W.G. *Tacrolimus in pancreas transplantation : a multicenter analysis*. *Clin. Transplantation* 11 : 299, 1997.

GUTHRIE H.A., PICCIANO M.F. eds. *Human nutrition*. Mosby 326, 1995.

HALL B.M., DORSCH S., ROSER B. *The cellular basis of allograft rejection in vivo. I. The cellular requirements for first-set rejection of heart graft*. *J. Exp. Med.* 148 : 878, 1978.

HALLORAN P.F., BROSKI A.P., BATIUK T.D., MADRENAS J. ***The molecular immunology of acute rejection : an overview.*** Transplant. Immunol. 1 :3, 1993.

HAMILTON D.N.H., REID W.A. ***Yu. Yu. Voronoy and the first human kidney allograft.*** Surg. Gynecol. Obstet. 159 : 289, 1984.

HAMMOND E.H., YOWELL R.L., NUNODA S. ***Vascular (humoral) rejection in heart transplantation : pathologic observations and clinical implications.*** Transplant. Proc. 23 (2) : 26, 1991.

HARDY J.D., WEBB W.R., DALTON M.L. ***Lung homotransplantation in man : report of the initial case.*** JAMA 186 : 1065, 1963.

HARTNER W.C., VAN WERF W.J., LODGE J.P.A., GILCHRIST B., DE FAZIO S.R., MARKEES T.G., YATKO C., MONACO A.P., GOZZO J.J. ***Effect of rapamycin on renal allograft survival in canine recipients treated with antilymphocyte serum, donor bone marrow, and cyclosporine.*** Transplantation 60 : 1347, 1995.

HEKTOEN L. ***The effect of benzene on the production of antibodies.*** J. Infect. Dis. 19 : 69, 1916a : Dans KAHAN B.D., ed. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

HEKTOEN L. ***The effect of toluene on the production of antibodies.*** J. Infect. Dis. 19 : 737, 1916b : Dans KAHAN B.D., ed. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

HERSKOWITZ A., MELLITS E.D., TRAILL T.A. ***Histologic predictors of acute cardiac rejection in serial human biopsies : a multivariate analysis.*** J. Am. Coll. Cardiol. 9 : 802, 1987.

HITCHINGS G.H., ELION G.B. ***The chemistry and biochemistry of purine analogs.*** Ann. N.Y. Acad. Sci. 60 : 195, 1954 : Dans KAHAN B.D., ed. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

HONBO T., KOBAYASHI M., HANE K. Transplant. Proc. 19 : 17 (suppl.), 1987.

HUTCHINSON I.V. ***Cellular mechanisms of allograft rejection.*** Curr. Opin. Immunol. 3 : 722, 1991.

JAIN J., MCCAFFREY P.G., MINER Z., KERPPOLA T.K., LAMBERT J.N., VERDINE G.L., CURRAN T., RAO A. ***The T-cell transcription factor NF-AT_p is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun.*** Nature 365 : 352, 1993.

JAIN J., MCCAFFREY P.G., VALGE-ARTHUR V.E., RAO A. ***Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun.*** Nature 356 : 801, 1992.

KAHAN B.D. ***Cosmas and Damian revisited.*** Transplant. Proc. 15 (suppl. 1) : 2211, 1983.

KAHAN B.D. ***Pien Ch'iao, the legendary exchange of hearts, traditional Chinese medicine, and the modern era of cyclosporine.*** Transplant. Proc. 20 (suppl. 2) : 3, 1988.

KAHAN B.D. ***Ganesha : the primeval Hindu xenograft.*** Transplant. Proc. 21 (suppl. 1) : 1, 1989.

KAHAN B.D. ***Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality.*** Transplantation 51 : 1, 1991.

KAHAN B.D., GIBBONS S., TEJPAL N., STEPKOWSKI S.M., CHOU T.C. ***Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human peripheral blood lymphocytes in vitro.*** Transplantation 51 (1) : 232, 1991.

KAHAN B.D., JORDAN S., HOLMES S., KATZ S., VAN BUREN C.T., NAPOLI K.L. ***Dose/concentration relation to outcome in sirolimus treated renal allograft recipient.*** Am. Soc. Transp. Surg. 21 : 203, 1995.

KAHAN B.D., TEJPAL N., GIBBONS-STUBBERS S., TU Y., WANG M., STEPKOWSKI S., CHOU T.C. ***The synergistic interactions in vitro and in vivo of brequinar sodium with cyclosporine or rapamycin alone and in triple combination.*** Transplantation 55 (4) : 894, 1993.

KIM H.S., RASKOVA J., DEGIANNIS D., RISK K.J. ***Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cells.*** Clin. Exp. Immunol. 96 : 508, 1994.

KINO T., HATANAKA H., HASHIMOTO M. ***FK506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biochemical characteristics.*** J. Antibiot. 40 : 1249, 1987.

KOZMA S.C., THOMAS G. ***P70s6K/P85s6K :Mechanism of action and role in mitogenesis.*** Semin. Cancer Biol. 5 : 255, 1994.

KURRLE R., KANZY E.J., RACENBERG J., LANG W., SEILER F.R. ***BMA031 – a TcR-specific monoclonal antibody for clinical application.*** Transplant. Proc. 21 : 1017, 1989.

KUSS R., TEINTURIER J., MILLIEZ P. ***Quelques essais de greffe de rein chez l'homme.*** Mem. Acad. Chir. 77 : 755, 1951.

LAI J.H., TAN H. ***CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin.*** J. Biol. Chem. 269 : 30077, 1994.

LECHLER R.I., LOMBARDI G., BATCHELOR J.R., REINSMOEN N., BACH F.H. ***The molecular basis of alloreactivity.*** Immunol. Today 11 (3) : 83, 1990.

LILLEHEI R.C., IDEZUKI Y., UCHIDA H. ***Pancreatic allotransplantation in the dog and man.*** Br J Surg 56 : 699, 1969.

LIU J., FARMER J.D.J., LANE W.S, FRIEDMAN J., WEISSMAN I., SCHREIBER S.L. ***Calcineurine is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes.*** Cell 66 : 807, 1991.

LOWER R.R., PRIESTLEY J.T., SHUMWAY N.E. ***Homovital transplantation of the heart.*** J. Thorac. Cardiovas. Surg. 41 : 196, 1961.

MANEZ R., JAIN A., MARINO I.R. ***Comparative evaluation of tacrolimus (FK506) and cyclosporin A as immunosuppressive agents.*** Transplant. Rev. 9 (2) : 63, 1995.

MANNESCHI L.I., FORMIGLI L., TANI A., PERNA A.M., ORLANDINI S.Z. ***Ultrastructural evidence of myocardial alterations in the course of heterotopic heart transplantation.*** J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 28 (3) : 401, 1996.

MANNICK J.A., LOCHTE H.L. JR, ASHLEY C.A. ***Autografts of bone marrow in dogs after lethal body radiation.*** Blood 15 : 255, 1960 : Dans KAHAN B.D., ed. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

MARX S.O., JYARAMAN T., GO L.O., MARKS A.R. ***Rapamycin-FKBP inhibit cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cell.*** Circ. Res., 76 : 412, 1995.

MASON D.W. ***Effector mechanisms in allograft rejection.*** Ann. Rev. Immunol. 4 : 119, 1986.

MCCAFFREY P.G., PERRINO B.A., SODERLING T.R., RAO A. ***NF-AT_p a T lymphocyte DNA-binding protein is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs.*** J. Biol. Chem. 268 : 3747, 1993.

MCCAULEY J. ***The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine.*** Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 662, 1993.

MCGOUGH E.C., BRENER P.L., REEMTSMA K. ***The parallel heart studies of intrathoracic auxiliary cardiac transplants.*** Surgery 60 : 153, 1966.

MIGITA K., EGUCHI K., KAWABE Y. ***FK506 augments activation-induced programmed cell death of T lymphocytes in vivo.*** J. Clin. Invest. 96 : 727, 1995.

MIGITA K., EGUCHI K., KAWABE Y., ORIGUCHI T., TOMINAGA M., NAGATAKI S. ***FK506 potentiates steroid-induced T-cell apoptosis.*** Transplantation 64 (9) : 1365, 1997.

MINANOV O.P., KWIATKOWSKI P., POPILSKIS S., MICHLER R.E. ***Modified technique for heterotopic heart transplantation in small primates.*** Ann. Thorac. Surg. 63 : 258, 1997.

MOLNAR-KIMBER K.L., RHOAD A., WARNER L., CHEN H., CAGGIANO T., STEFFAN R., SEHGAL S.N. ***Evidence that the anti-tumor and immunosuppressive effects of rapamycin are mediated via similar mechanisms.*** Cold Spring Harbor Meeting on Cell Cycle. 141, 1994 : Dans SEHGAL S.N., CAMARDO J.S., SCAROLA J.A., MAIDA B.T. ***Rapamycin (sirolimus, rapamune).*** Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 4 : 482, 1995.

MORRIS R.E. ***Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs.*** Kidney Int. 49 (suppl. 53) : 26, 1996a.

MORRIS R.E. ***New immunosuppressive drugs.*** Dans BUSUTTIL R.W., KLINTMALM G.B., eds. Transplantation of the liver. W.B. Saunders, Philadelphia, 760, 1996b.

MORRIS R.E., MEISER B.M., WU J., SHORTHOUSE R., WANG J. ***Use of rapamycin for the suppression of alloimmune reactions in vivo : schedule dependence, tolerance induction, synergy with cyclosporin and FK506, and effect of host-versus-graft and graft-versus-host reactions.*** Transplant. Proc. 23 : 521, 1991.

MOTTRAM P.L., SMITH J.A., MASON A., MIRISKLAVOS A., DUMBLE L.J., CLUNIE G.J. ***Electrocardiographic monitoring of cardiac transplants in mice.*** Cardiovasc. Res. 22 : 315, 1988.

MURGIA M.G., JORDAN S., KAHAN B. *The side effect profile of sirolimus : A phase I study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients.* Kidney Int. 49 : 209, 1996.

MURPHY J.B. *Heteroplastic tissue grafting effected through roentgen ray lymphoid destruction.* JAMA 62 : 1459, 1914 : Dans KAHAN B.D. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

NORTHROP J.P., ULLMAN K.S., CRABTREE G.R. *Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT).* J. Biol. Chem. 268 : 2917, 1993.

O'KEEFE S.J., TAMURA J., KINCAID R.L., TOCCI M.J., O'NEILL E.A. *FK506- and CsA-sensitive activation of the interleukine-2 promoter by calcineurin.* Nature 357 : 692, 1992.

ONO K., LINDSEY E.S. *Improved technique of heart transplantation in rats.* J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 57 : 225, 1969.

OPELZ G. *Effect of HLA matching in heart transplantation.* Transplant. Proc. 21 : 794, 1989.

PELLIS N.R., BALCH C.M. *Basic concepts in immunology.* Dans O'LEARY J.P., ed. The physiologic basis of surgery. 112, 1993.

PERRAULT L.P., BIDOUARD J.P., JANIAC P., VILLENEUVE N., BRUNEVAL P., VILAINE J.P., VANHOUTTE P.M. *Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation.* J. Heart Lung Transplant. 16 : 643, 1997.

PETERS D.H., FITTON A., PLOSKER G.L. *Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation.* Drugs 46 : 746, 1993.

QIN S., COBBOLD S., BENJAMIN R., WALDMANN H. ***Induction of classical transplantation tolerance in the adult.*** J. Exp. Med. 169 : 779, 1989.

RANDHAWA P.S., TSAMANDAS A.C., MAGNONE M. ***Microvascular changes in renal allografts associated with FK506 (tacrolimus) therapy.*** Am. J. Surg. Pathol. 20 : 306, 1996.

RAPAPORT F.T., CANNON F.D., BLUMENSTOCK D.A. ***Induction of unresponsiveness to canine renal allografts by total body irradiation and bone marrow transplantation.*** Nature 235 : 191, 1972.

REITZ B., BIEBER C., RANEY A.A. ***Orthotopic heart and combined heart and lung transplantation with cyclosporin A immune suppression.*** Transplant. Proc. 13 : 393, 1981.

ROBINSON M.A. et KINDT T.J. ***Major histocompatibility complex antigens and genes.*** Dans PAUL W.E., ed. Fundamental Immunology, Second Edition, Raven Press, 489, 1989.

ROITT I., BROSTOFF J., MALE D. ***Transplantation and rejection.*** Dans ed. Immunology, Fourth Edition, Mosby, 26.1, 1996.

ROTH D., COLONA J., BURKE G.W., CIANCIO G., ESQUENAZI V., MILLER J. ***Primary immunosuppression with tacrolimus and mycophenolate mofetil for renal allograft recipients.*** Transplantation 65 (2) : 248, 1998.

RUSSELL P.S., MONACO A.P. ***Heterologous antilymphocyte sera and some of their effects.*** Transplantation 5 : 1086, 1967 : Dans KAHAN B.D. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

RYFFEL B., CAR B., WEBER E., MIHATSCH M.J. ***Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats : comparison of macrolides with cyclosporin.*** Exp. Nephrol. 2 : 324, 1994.

SCHMIDBAUER G., HANCOCK W.W., WASOWSKA B., BADGER A.M., KUPIEC-WEGLINSKI J.W. ***Abrogation by rapamycin of accelerated rejection in sensitized rats by inhibition of***

alloantibody responses and selective suppression of intragraft mononuclear and endothelial cell activation, cytokine production, and cell adhesion. *Transplantation* 57 : 933, 1994.

SCHULTZ J.C., LENSMEYER G.L., WENDAL T.D, SHAHIDI N.T., WIEBE D.A., CARLSON I.H. **Synergistic and antagonistic effects of combinations of cyclosporine A and its metabolites on inhibition of phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in vitro.** *Biochem. Pharmacol.* 42 (7) : 1403, 1991.

SEHGAL S.N., CAMARDO J.S., SCAROLA J.A., MAIDA B.T. **Rapamycin (sirolimus, rapamune).** *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 4 : 482, 1995.

SEHGAL S.N., MOLNAR-KIMBER K., OCAIN T.Ø., WEICHMAN B.M. **Rapamycin : a novel immunosuppressive macrolide.** *Med. Res. Rev.* 14 : 1, 1994.

SERVELLE M., SOULIE P., ROUGEULLE J. **La greffe du rein.** *Rev. Chir.* 70 : 186, 1951.

SHI Y., FRANKEL A., RADVANYI L.G., PENN L.Z., MILLER R.G., MILLS G.B. **Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro.** *Cancer Res.* 55 : 1982, 1995.

SHIHAB F.S., BENNETT W.M., TANNER A.M., ANDOH T.F. **Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity.** *Transplantation* 64 : 1829, 1997.

SHUMWAY S.J., BAUGHMAN K.L., TRAILL T.A., CAMERON D.E., FONGER J.D., GARDNER T.J., ACHUFF S.C., REITZ B.A., BAUMGARTNER W.A. **Persistent pulmonary hypertension after heterotopic heart transplantation : a case report.** *J. Heart Transplant.* 8 : 387, 1989.

SIGAL N.H., DUMONT F.J. **Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction.** *Annu. Rev. Immunol.* 10 : 519, 1992.

SPENCER C.M., GOA K.L., GILLIS J.C. **Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation.** *Drugs* 54 (6) : 925, 1997.

STARZL T.E., MARCHIORO T.L., HUNTLEY R.T. ***Experimental and clinical homotransplantation of the liver.*** Ann. N.Y. Acad. Sci. 120 : 739, 1964.

STEINMULLER D. ***Which T cells mediate allograft rejection ?*** Transplantation 40 : 3, 1985.

STEPKOWSKI S.M., KAHAN B.D. ***Synergistic activity of the triple combination : cyclosporine, rapamycin, and brequinar.*** Transplant. Proc. 25 (3) Suppl. 2 : 29, 1993.

STEPKOWSKI S.M., NAPOLI K.L., WANG M.E., QU X., CHOU T.C., KAHAN B.D. ***Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporine on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats.*** Transplantation 62 (7) : 986, 1996.

SUEDAT., MATSUURA Y., MATSUSHIMA T., MUKAI S., ISHIHARA H., KAJIHARA H. ***A functional new experimental biventricular model of heterotopic cardiac transplantation.*** Hiroshima J. Med. Sci. 38 : 23, 1988.

SUEDA T., MATSUURA Y., MATSUSHIMA T., MUKAI S., KAJIHARA H. ***A heterotopic cardiac transplantation model for evaluation of rejection using transvenous endomyocardial biopsy.*** Hiroshima J. Med. Sci. 39 (1) : 15, 1990.

SWENY P., AMLOT P., FERNANDO O. ***Pilot study of a chimeric human/mouse CD7 monoclonal antibody in renal transplantation.*** Transplant. Proc. XXXXX, 1991.

TAKAZAWA K., HOSODA Y., BASHUDA H., SEINO K., YAGITA H., TAMATANI T., MIYASAKA M., OKUMURA K. ***Synergistic effects of mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) and anti-LFA-1/CAM-1 monoclonal antibodies on the prolongation of heart allograft survival in rats.*** Transplant. Proc. 28 (3) : 1980, 1996.

TANABE M., TODO S., MURASE N., IRISH W., MIYAZAWA H., FUJISAKI S., STARZL T.E. ***Combined immunosuppressive therapy with low dose FK506 and antimetabolites in rat allogeneic heart transplantation.*** Transplantation 58 (1) : 23, 1994.

TAYLOR D.O. *The use of tacrolimus and mycophenolate mofetil after cardiac transplantation.* Cur. Opin. Cardiol. 12 : 161, 1997.

TERADA N., PATEL H.R., TAKASE K., KOHNO K., NAIRN A.C., GELFAND E.W. *Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins.* Proc. Natl Acad. Sci. USA 91 : 11477, 1994.

THE U.S. MULTICENTER FK506 LIVER STUDY GROUP. *A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation.* N. Eng. J. Med. 331 : 1110, 1994.

THOMSON A.W., BONHAM C.A., ZEEVI A. *Mode of action of tacrolimus (FK506) : molecular and cellular mechanisms.* Ther. Drug Monit. 17 : 584, 1995.

TILNEY N.L. ET KUPIEC-WEGLINSKI J.W. *The biology of acute transplant rejection.* Ann. Surg. 214 (2) : 98, 1990.

TODO S., MURASE N., UEDA Y., PODESTA L., CHAPCHAP P., KANH D., OKUDA K., IMVENTARZA O., CASAVILLA A., DEMETRIS J., MAKOWKA L., STARZL T.E. *Effect of FK506 in experimental organ transplantation.* Transplant. Proc. 20 (1) : 215, 1988.

TU Y., STEPKOWSKI S.M., CHOU T.C., KAHAN B. *The synergistic effects of cyclosporine, sirolimus, and brequinar on heart allograft survival in mice.* Transplantation 59 (2) : 177, 1995.

VATHSALA A., CHOU T.C., KAHAN B.D. *Analysis of interactions of immunosuppressive drugs with cyclosporine in inhibiting DNA proliferation.* Transplantation 49 (2) : 463.

VATHSALA A., GOTO S., YOSHIMURA N., STEPKOWSKI S., CHOU T.C., KAHAN B.D. *The immunosuppressive antagonism of low doses of FK506 and cyclosporine.* Transplantation 52 (1) : 121, 1991.

WAGNER K., HERGET S., HEEMANN U. ***Experimental and clinical experience with the use of tacrolimus (FK506) in kidney transplantation.*** Clin. Nephrol. 45 (5) : 332, 1996.

WASOWSKA B., HANCOCK W.W., ONODERA K., KOROM S., STADLBAUERT.H.W., ZHENG X.X., STROM T.B., KUPIEC-WEGLINSKI J.W. ***Rapamycin and cyclosporine A treatment : a novel regimen to prevent chronic allograft rejection in sensitized hosts.*** Transplant. Proc. 29 : 33, 1997.

WENNBERG L., KARLSSON-PARRA A., SUNDBERG B., RAFAEL E., LIU J., ZHU S., GROTH C.G., KORSGREN O. ***Efficacy of immunosuppressive drugs in islet xenotransplantation.*** Transplantation 63 (9) : 1234, 1997.

WIESEL M., CARL S. pour EUROPEAN MYCOPHENOLATE MOFETIL COOPERATIVE STUDY GROUP. ***A placebo controlled study of mycophenolate mofetil used in combination with cyclosporine and corticosteroids for the prevention of acute rejection in renal allograft recipients : 1-year results.*** J. Urology 159 : 28, 1998.

WILLIAMS R., NEUHAUS P., BISMUTH H., MCMASTER P., PICHLMAYR R., CALNE R., OTTO G., GROTH C. ***Two-year data from the European multicentre tacrolimus (Fk506) liver study.*** Transpl. Int. 9 (suppl.1) : S144, 1996.

WOLF J.S., MCGAVIC J.D., HUME D.M. ***Inhibition of the effector mechanism of transplant immunity by local graft irradiation.*** Surg. Gynecol. Obstet. 584 : 128, 1969.

WOOD M.A., BIERER B.E. ***Rapamycin : biological and therapeutic effects, binding by immunophilins and molecular targets of action.*** Persp. In Drug Disc. Des. 2 : 163, 1994.

WOODRUFF M.F.A., ANDERSON N.A. ***Effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocyte serum on the survival of skin homografts in rats.*** Nature 20 : 702, 1963 : Dans KAHAN B.D. Transplantation timeline, mankind's three millennia – one maverick's three decades in the struggle against biomedical individuality. Transplantation 51 : 1, 1991.

ZHENG X.X., STROM T.B., STEELE A.W. ***Quantitative comparison of rapamycin and cyclosporine effects on cytokine gene expression studied by reverse transcriptase-competitive polymerase chain reaction.*** Transplantation 58 : 87, 1994.