

Université de Montréal

Effet synergique du SDZ RAD et du Néoral dans l'inhibition des maladies hôte-vs-greffe et greffe-vs-hôte en la transplantation de l'intestin grêle chez le rat

Par

Stéphane Johnson

Département des Sciences Biomédicale

Faculté des Études Supérieures

Memoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maitre es Sciences (M.Sc.)

En Sciences biomédicales

Janvier, 2000-06-24

©Stéphane Johnson, 2000



W
4
U58
2000
v.051



Identification du Jury

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Effet synergique du SDZ RAD et du Néoral dans l'inhibition des maladies Hôte-vs-greffe et greffe-vs-hôte en la transplantation de l'intestin grêle chez le rat

Présenté par:

Stéphane Johnson

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Louis Dumont	président-rapporteur
Huifang Chen	directeur de recherche
Alain Comtois	membre du jury

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Nous avons évalué les effets de l'association d'un nouvel analogue du sirolimus, le SDZ RAD, et une nouvelle formulation de la CsA, le Néoral, sur la survie d'allogreffe dans le modèle de transplantation orthotopique de l'intestin grêle chez le rat.

Les huit groupes (n=6) inclus dans cette étude comprenaient deux groupes témoins, des allogreffes et des isogreffes, et trois combinaisons pour l'évaluation des réactions immunes HVG [Lewis (LEW) x Brown Norway (BN) (LBN)-F1→LEW], GVH (LEW→F1), et GVH et HVG combinés (BN→LEW). Les deux médicaments étaient administrés par voie orale pour une période allant jusqu'à 90 jours. Deux tests de fonction servaient à évaluer l'état fonctionnel de l'allogreffe: le test de perméabilité au ⁵¹Cr-EDTA et le test d'absorption du maltose. Pour le modèle HVG, le groupe contrôle naïf démontre un temps de survie moyen (MTS) de 9.5 ± 1.0 jours. Les groupes traités avec le SDZ RAD ne démontrent pas une réponse relative à la dose: 1.0 mg/kg/j, MST 17.3 ± 5.4 jours (p=0.001); 2.5 mg/kg/j, MTS 19.2 ± 4.8 jours (p=0.001); il en est de même avec les groupes traités avec le Néoral: 2.0 mg/kg/j, MTS 15.0 ± 1.7 jours (p=0.001); 5.0 mg/kg/j, MTS 28.8 ± 5.7 jours, (p=0.001). Comparée aux résultats de la monothérapie avec chaque médicament, leur association démontre une interaction synergique forte ou très forte: SDZ-RAD 1.0 mg/kg/j + Néoral 2.0 mg/kg/j, MTS 57.8 ± 6.7 jours, (p=0.001, index de combinaison (IC)=0.095); SDZ RAD 2.5 mg/kg/j + Néoral 5.0 mg/kg/j, MTS 70.5±12.8 (p=0.001, CI=0.112). Les mêmes types de résultats sont obtenus dans le modèle de GVH: SDZ RAD 1.0 mg/kg/j + Néoral 2.0 mg/kg/j, MTS 48.5 ± 6.4 jours, (p=0.001, IC=0.027); SDZ-RAD 2.5 mg/kg/j + Néoral 5.0 mg/kg/j, MTS 63.0 ± 13.6 jours, (p=0.001, CI=0.020). Ces résultats démontrent une interaction synergique très forte en comparaison à la monothérapie avec SDZ RAD 1.0 mg/kg/j, MTS 15.3 ± 1.7 jours, (p=0.001); SDZ RAD 2.5 mg/kg/j, MTS 21.7 ± 3.0 jours, (p=0.001); Néoral 2.0 mg/kg/j, MTS 17.7 ± 1.4 jours (p=0.001); Néoral 5.0 mg/kg/j, MTS 27.8 ± 4.4 jours (p=0.001); pour les contrôles naïfs: MTS 8.3 ± 1.2 jours. Pour le modèle de combiné de HVG et GVH, l'association SDZ RAD 1.0 mg/kg/j + Néoral 2.0 mg/kg/j (MTS 52.3 ± 5.4 jours, CI=0.070), SDZ RAD 2.5 mg/kg/j + Néoral 5.0 mg/kg/j (MTS 69.0 ± 5.3 jours, CI=0.301) représente une interaction synergique forte.

Le test de perméabilité au ⁵¹Cr-EDTA révèle une perte de fonction pour les groupes traités à cause du rejet et reflète une crise de rejet durant les 2^{ème} et 3^{ème} semaines postopératoires. Le test d'absorption du maltose ne révèle rien de concluant concernant des crises de rejet. Par contre, il reflète une perte de fonction pour les groupes subissant le rejet.

Nous concluons que la thérapie concomitante SDZ RAD et Néoral procure un effet synergique important dans l'inhibition des réactions immunes HVG, GVH, et HVG-GVH dans le modèle de la transplantation de l'intestin grêle chez le rat.

TABLE DES MATIÈRES

Page titre	i
Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Liste des tables	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements	xiii

CHAPITRE UN

INTRODUCTION	1
1.1.0 Histoire de la transplantation	2
1.1.1 Transplantation au Québec.	4
1.2.0 Rejet de greffe	5
1.2.0 Types de rejet	5
1.2.1 Immunobiologie du rejet	7
1.3.0 Tolérance	11
1.3.1 Anergie.....	11
1.3.2 Répression	12
1.3.3 Suppression.....	12
1.4.0 L'immunosuppression.....	14
1.4.1 Traitements immunosuppresseur.	14
1.4.1.1 <i>Limites de l'immunosuppression</i>	21

1.4.1.2	<i>Association d'immunosuppresseurs</i>	22
1.4.1.3	<i>Solutions du futur</i>	23
1.4.2	Néoral	26
1.4.2.1	<i>Cyclosporine A</i>	28
1.4.2.2	<i>Structure et mécanisme d'action</i>	25
1.4.2.3	<i>Sandimmune vs. Néoral</i>	32
1.4.3	SDZ RAD	35
1.4.3.1	<i>Sirolimus</i>	35
1.4.3.2	<i>Structure et mécanisme d'action</i>	35
1.4.3.3	<i>Sirolimus vs. SDZ RAD</i>	38
1.5.0	Addition, synergie, et antagonisme: modèles d'interactions entre agents immunosuppresseurs	41
1.6.0	Transplantation de l'intestin grêle	52
1.6.1	Chirurgie de transplantation intestinale... ..	44
1.6.2	Rejet	57
1.6.3	Immunosuppression actuelle et ses limites	58
1.6.5.1	<i>Tacrolimus</i>	58
1.6.5.2	<i>Cyclosporine A et Néoral</i>	60
1.6.5.3	<i>Sirolimus et SDZ RAD</i>	61
1.7.0	But du Projet	64
1.7.1	Modèle animal	64
1.7.2	Doses des médicaments	65
1.7.3	Modèle chirurgical	66
1.7.4	Évaluation du greffon.....	68
1.7.5	Protocole	71
1.7.6	Statistiques	72

CHAPITRE DEUX

SYNERGISTIC EFFECTS OF SDZ RAD AND NEORAL ON THE INHIBITION OF GRAFT-VS-HOST AND HOST-VS-GRAFT IMMUNE RESPONSES IN RAT SMALL BOWEL TRANSPLANTATION... ..75

Title Page	76
Footnotes	77
Abbreviations	78
Abstract	79
Introduction	80
Materials and methods	82
Results	86
Discussion	100
Acknowledgements	102
References	103

CHAPITRE TROIS

DISCUSSION	106
4.1.0 Aspects généraux	107
4.2.0 Mono-Thérapies	110

4.3.0	Thérapies associées	114
4.4.0	Tests de fonction	117
4.4.1	<i>Perméabilité</i>	118
4.4.2	<i>Absorption</i>	119
4.5.0	Conclusions	123
4.6.0	Perspectives	124

CHAPITRE QUATRE

BIBLIOGRAPHIE	126
----------------------------	------------

LISTE DES TABLES

TABLE I	Interprétation de la valeur de l'index de combinaison et des différents niveaux de synergie et d'antagonisme... ..	52
TABLE II	Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in HVG, GVH, and HVG-GVH rejection models	92
TABLE III	Différence entre traitements immunosuppresseurs	113
TABLE IV	Significations statistiques du test de maltose.....	122

LISTE DES FIGURES

FIGURES	1.1	Formules chimiques d'agents immunosuppresseurs de petites tailles incluant des macrolides	18
	1.2	Modes d'action de divers agents immunosuppresseurs	20
	1.3	Structure chimique de la cyclosporine A	28
	1.4	Schéma du mode d'action de la cyclosporine A (CsA)	30
	1.5	Voie d'absorption de la cyclosporine A	32
	1.6	Structure chimique du SDZ RAD	37
	1.7	Description d'un graphique d'isobogramme classique	44
	1.8	Quatre équations biochimiques majeures dérivées du principe de l'effet médian	47
	1.9	Exemple d'un graphique Fa-IC	50
	1.10	Graphique d'isobogramme du SDZ RAD et de la CsA	51
	1.11	Modèles de transplantation de l'intestin grêle de rat	56
	1.12	Transplantation orthotopique de l'intestin grêle du rat	69
	2.1	Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in HVG rejection model (F1→LEW)	89
	2.2	Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in GVH rejection model (LEW→F1)	90
	2.3	Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in HVG-GVH rejection model (BN→LEW)	91
	2.4	Tests of permeability to ⁵¹ Cr-EDTA for HVG (F1→LEW) models	93
	2.5	Tests of permeability to ⁵¹ Cr-EDTA for GVH (LEW→F1) models	94
	2.6	Tests of permeability to ⁵¹ Cr-EDTA for the combined HVG-GVH (BN→LEW) rejection models	95

2.7	Maltose absorption test results of groups 3 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses96
2.8	Maltose absorption test results of groups 5 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses97
2.9	Maltose absorption test results of groups 6 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses98
2.10	Maltose absorption test results of groups 7 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses99
3.1	Comparaison de l'effet d'un traitement oral (SDZ RAD et Néoral) et intraveineux (Sirolimus et CsA) en SB-Tx orthotopique chez le rat116

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA: Acide Aminé.
 Ac: Anticorps.
 ADCC: *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*.
 ADN: Acide Déoxyribonucléique.
 Ag: Antigène.
 Ala: Alanine.
 ALS: *Anti-Lymphocyte Serum*.
 ARN: Acide Ribonucléique.
 BN: Rats de type Brown-Norway.
 CDN\$: Dollars Canadiens.
 CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
 CPA: Cellule Présentatrice d'Antigènes.
⁵¹Cr-EDTA: ⁵¹chromium éthylènediaminetétraacétate.
 CsA: Cyclosporine A.
 CTL: *Cytotoxic T cells*.
 CyPA, B, C, D, -40: Cyclophilines A, B, C, D, -40
 Da: Dalton.
 DSG: Déoxyspergualin.
 EBV: Virus Hepstein-Barr.
fa/fu: Fraction affectée/ fraction non-affectée.
 FDA: *Food and Drug Administration*.
 FKBP: *FK-Binding Protein*.
 FK506: Tacrolimus.
 FRAP: *FK-Rapamycin-Associated Protein*.
 GM-CSF: *Granular-Macrophage Colony-Stimulating Factor*.
 GVHD: Maladies Greffe-Versus-Hôte.
 HGVD: Maladies Hôte-versus-Greffe.
 HLA: *Human Lymphocyte antigen*.
 HSV1, 2: *Herpès-Symplex Virus 1 et 2*.
 HVP: Virus Herpès-Papilloma.
 IC: Index de Combinaison ou *CI: Combination Index*.
 IC50: Fraction inhibitrice (50%).
 IFN- γ : Interféron Gamma.
 Ig: Immunoglobulines.
 IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -10: Interleukines-1, 2, 3, 4, 5, 6, 10.
 IMPDH: *Inosine Monophosphate Dehydrogenase*.
 Kg: Kilogramme.
 LBN-F1: Progéniture de Lewis \times Brown Norway

Le: Leucine.
LEW: Rats de type Lewis.
Me: Méthionine.
mg: milligramme.
MMF: Mycophénolate Mofétil.
6-MP: 6-Mercaptopurine.
MTS±ET: Temps de Survie Moyen ± Écart Type.
NÉO ou Néo: Néoral.
NK: *Natural Killer Cells*.
PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*.
P-Gp: P-Glycoprotéine.
RAPA: Rapamycine ou Sirolimus.
SDZ RAD: 40-o-Hydroxyéthyl-rapamycine.
Ser: Sérine.
TCR: *T cell receptor*.
TGF-β: *Transforming Growth Factor beta*.
Th1 et 2: Cellules T auxiliaires 1 et 2.
Thr: Thréonine.
TNF-α: *Tumor necrosis factor alpha*.
Tx: Transplantation.
μCi: MicroCurrie.
Val: Valine.

REMERCIEMENTS

Si l'abondance et le manque existent simultanément dans notre vie comme réalités parallèles, il est notre devoir de choisir quel jardin cultiver... D'oublier les manques pour se rappeler les richesses présentes dans notre vie, l'amour, la santé, la famille, l'amitié, le travail, les joies de la nature et les quêtes personnelles qui entretiennent notre bonheur. Ainsi l'abysse des illusions se retire pour faire place au paradis sur terre.

Sarah Ban Breathnach

L'obtention d'une Maîtrise représente une étape importante vers la réalisation de mes objectifs, et je tiens à remercier ceux dont la contribution et le support m'ont permis d'achever ce mémoire.

I am most grateful to Dr Huifang Chen, MD. PhD., my thesis and laboratory director for the opportunities, the training and the trust. Working with you has afforded me indispensable experience and knowledge. Your benevolence toward your students and your desire to see them succeed has often been a great source of motivation. Dr Shinjie Qi, and Dr Dasheng Xu, thank you for the time and the patience you have given me.

Je remercie aussi Dr Louis Dumont pour son excellente critique et les étudiants du laboratoire de chirurgie expérimentale, Diem Vu et Dr Marc Jolicoeur pour leur collaboration et amitié. Finalement, je veux exprimer ma profonde gratitude à mes parents, Karl et Ariane Johnson, ainsi qu'à Shirley et Jean-Jacques Hermans. Votre support inconditionnel et votre générosité ont souvent été indispensables et continueront de l'être. Je vous suis à jamais reconnaissant.



Photo par Stéphane Johnson

CHAPITRE UN
INTRODUCTION

1.1.0 Histoire de la Transplantation

Durant les quinze dernières années, la transplantation d'organes a progressé de façon importante. En effet, de nos jours, les problèmes qui lui sont propres ne constituent plus un risque de vie ou de mort pour le patient. Les cliniciens doivent ces progrès à la découverte d'immunosuppresseurs et à l'amélioration des techniques chirurgicales. C'est grâce à ces facteurs qu'un rêve ancien est en voie de se réaliser.

Depuis la nuit des temps, l'homme est fasciné par l'idée d'échanger ses organes avec son semblable ou même avec un animal. Que se soit pour acquérir un aspect désirable d'un autre ou simplement de remplacer un tissu endommagé, la transplantation est un rêve qui semble avoir toujours accompagné l'histoire humaine; plusieurs légendes et fables de l'Antiquité en attestent. Le folklore de l'Inde veut qu'une de ses déesses, Ganesha, soit un humain avec une tête d'éléphant. L'histoire ancienne chinoise raconte que le chirurgien Pien Chao' échangea des cœurs de deux frères pour remédier à leur déséquilibre spirituel (Flye, 1984). Et la mythologie grecque témoigne d'une panoplie de surhommes mi-animaux mi-humains, tel le puissant Minotaure à la tête de taureau, l'hideuse Méduse aux cheveux faits de serpents, et les indomptables Centaures aux corps de chevale (Commelin, 1960).

Ces histoires attestent d'un désir d'immortalité et du surnaturel jadis associé avec la possibilité de partager des parties du corps. De ces deux désirs, seul celui de l'immortalité fera de notre rêve de transplanter, une réalité. Notre obsession à prolonger l'existence nous poussera à étudier les limites physiologiques afin de les repousser.

Durant le Moyen Âge, la transplantation perd son aura magique pour devenir une technique médicale. Certains médecins ambitieux, d'abord Gaspare Tagliacozzi (1545-1599) et ensuite les chirurgiens de la Société Royale du 17^{ème} siècle, entreprennent des expériences visant à réparer les blessures profondes en y greffant des morceaux de peau. Bien que ne connaissant aucun succès, ces médecins estiment que greffer sera un jour possible (Hamilton; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Au 19^{ème} siècle, John Hunter est le premier à reconnaître l'importance de la vascularisation. Après une série d'expériences, il parvient à greffer des os et des dents et nomme ces techniques « transplantation ». De plus, il établit l'expérimentation comme essentielle au progrès médical (Hamilton; dans es Ginns *et al.*, 1999).

C'est avec la chirurgie vasculaire que la transplantation entre dans l'ère moderne. Au début du 20^{ème} siècle, Alexis Carrel essaye de transplanter des reins et se heurte au rejet de la greffe. Il émet alors la théorie qu'un « principe immunitaire » est impliqué. Durant la Deuxième Guerre Mondiale, ce principe est expliqué comme étant l'histocompatibilité génétique (Hamilton; dans es Ginns *et al.*, 1999). En 1942, Peter Medawar et ses collègues publient une étude qui marque le début de la transplantation d'organe comme une réalité. Cette étude identifie des cellules appelées "T" qui reconnaissent les différences génétiques entre donneur et receveur comme étant la cause du rejet (Gibson et Medawar, 1942). C'est ainsi que sont nées les sciences immunologiques.

La transplantation suivra désormais les progrès fait en immunologie. En effet, maintenant que la cause du rejet de greffe est identifiée comme étant une réponse immunologique, comprendre ce phénomène deviendra la clef de l'induction de tolérance. Les années qui

suivront seront marquées par la découverte de méthodes, telle que l'irradiation, et d'agents, les stéroïdes et les macrolides, capables de réprimer la réaction immunitaire et de permettre à l'implant de survivre.

Le domaine de la transplantation doit son existence à un rêve antique qui au fil des siècles s'est matérialisé grâce aux visionnaires qui ont su employer la méthode scientifique.

1.1.1 La Transplantation au Québec

La première transplantation d'organe au Québec se fait en 1958. C'est aussi à partir de cette période que se sont érigés des programmes de transplantation de cœur, de foie, de pancréas, et de poumons. Ces programmes atteignent leur maturité durant les années où la cyclosporine A devient le traitement de base. La province est aujourd'hui le site de quatre programmes universitaires de transplantation: l'université de Montréal, McGill, Laval, et Sherbrooke. En 1991, leurs hôpitaux sont constitués de 7 centres de transplantation rénale, 4 hépatique, 4 cardiaque, 2 pancréatique, et 2 pulmonaire. La disponibilité des organes est gérée par un organisme para-gouvernemental appelé Québec Transplant. (Corman *et al.*, 1991). La plupart des organes sont obtenus d'individus dont le décès est causé par des traumatismes ou des hémorragies cérébrales. Tous les organes sont obtenus par consentement. Malheureusement, comme c'est le cas partout en Amérique du nord, au Québec la demande d'organes excède la disponibilité.

1.2.0 LE REJET DE GREFFE

1.2.1 Types de rejet

Le rejet de greffe est le problème majeur de la transplantation d'organe. Il résulte de plusieurs cascades d'événements immunologiques dont le but est de protéger le receveur contre un implant reconnu comme non-soi. Bien que des facteurs d'ordre mécanique, autres qu'immunologique, contribuent au rejet, la reconnaissance des différences entre le soi du donneur et celui du receveur par le système immunitaire, est le phénomène initiateur du rejet. Le rejet est couramment défini comme une réaction immunologique par le receveur dirigée contre les antigènes (Ag) portés par les molécules d'histocompatibilité du greffon (CMH ou HLA chez l'humain). Cette réaction met en jeu les cellules T et les anticorps (Ac) qui induisent des lésions tissulaires caractéristiques et perturbent les fonctions biologiques de l'organe implanté (Révillard, 1994). Laisée incontrôlée, cette réaction entraînera la perte de l'organe (Ginns *et al.*, 1999).

Le rejet existe sous plusieurs formes classées selon les mécanismes immunopathologiques impliqués et l'intensité de la réaction: le rejet suraigu, aigu, et chronique (Révillard, 1994).

Le Rejet Suraigu

Le rejet suraigu, évident dès les premières minutes après l'implantation, est caractérisé par l'accumulation de globules rouges et la formation de microthrombi dans le système

vasculaire de l'implant. Dans ce cas, la transplantation est un échec immédiat. Ce type de rejet est dû soit à une incompatibilité des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) ou à une pré-sensibilisation aux CMH de classe I par une transfusion sanguine (Roitt, 1997).

Le Rejet Aigu

En transplantation d'organe, le rejet aigu est la cause principale des échecs. Les thérapies immunosuppressives sont conçues pour supprimer les crises de rejet aigu. Le rejet aigu se manifeste en quelques jours ou semaines suivant l'opération, c'est-à-dire n'importe quand après la transplantation. Il est caractérisé d'une forte réponse des cellules T aux allo-antigènes. Cette réponse est initiée directement par des interactions entre les molécules CMH allogéniques et le récepteur des cellules T (TCR) ou indirectement, par les peptides liées aux CMH sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de l'hôte (Orosz *et al.*, 1998). Le rejet aigu, étant chez l'humain une urgence médicale, se présente par des symptômes généraux, tel que la fièvre et le malaise, et spécifiques à l'organe transplanté: hypertension artérielle, oligurie, diminution de la natriurèse et élévation de la créatinémie dans le cas d'une greffe rénale; diminution de la sécrétion d'insuline et de peptide C pour les greffes de pancréas; rétention et insuffisance hépatocellulaire pour les greffes de foie; insuffisance cardiaque et arythmie pour les greffes de cœurs; malnutrition, déshydratation et diarrhée excessive pour les greffes intestinales. L'histologie du rejet aigu révèle l'infiltration de lymphoblastes, de lymphocytes T activés, d'éosinophiles, de monocytes, l'augmentation de l'expression des Ag de CMH sur l'endothélium et l'épithélium, et la production locale des lymphokines IFN- γ et TNF- α (Révillard, 1994).

Le Rejet Chronique

Le rejet chronique est un événement à long terme: une période d'un ou deux ans peut s'écouler avant que le greffon soit ainsi rejeté. Le rejet chronique est caractérisé par une inflammation périvasculaire qui entraîne des dommages persistants et irréversibles à l'endothélium vasculaire de l'allogreffe. Il est proposé que l'allogreffe, en réponse aux crises de rejet aigu, sécrète des facteurs de croissance responsables de la prolifération de cellules musculaires lisses, la sécrétion de matrice cellulaire, et l'invasion de l'intima par des myocytes. Le rejet chronique se définit comme une détérioration du greffon causée par l'inflammation et l'artériosclérose. Chez l'humain, l'histocompatibilité, l'ischémie prolongée, l'âge du donneur, les infections, et les anomalies lipidiques peuvent contribuer au rejet chronique, mais les facteurs les plus importants sont la fréquence et l'intensité des crises de rejet aigu (Hayry, 1996).

Certains immunosuppresseurs sont directement liés à l'installation du rejet chronique dans le greffon. La cyclosporine A et le tacrolimus induisent, dans le greffon, la sécrétion des facteurs de croissance et des cytokines (PDGF, TGF- β 1 et IFN- γ) responsables de la prolifération des cellules musculaires lisses et de la sécrétion de matrice cellulaire (Shirwan, 1999).

1.2.2 Immunobiologie du rejet

Le rejet de greffe est une défense immunitaire classique: le greffon est reconnu comme non-soi par les cellules T qui vont ensuite activer la cascade immunitaire impliquant les anticorps, les cellules cytotoxiques (CTL, NK) et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Il est important de comprendre cette cascade en détails afin de bâtir

une thérapie immunosuppressive efficace, c'est-à-dire qui cible l'inhibition des signaux immunogéniques.

La cascade immunitaire provoquant le rejet débute avec la migration des cellules dendritiques, provenant du greffon, dans les organes lymphoïdes du receveur. Cette migration leur permet d'interagir avec les cellules immunitaires du receveur, stimulant ainsi la réaction de défense (Larsen *et al.*, 1990). Durant cette migration, les cellules dendritiques deviennent des CPA en exprimant, à leur surface, les antigènes du donneur portés par les CMH (Steinman, 1991). Les CMH sont des molécules spécialisées au travers desquelles le Soi est différencié du non-Soi. Ce sont des glycoprotéines membranaires de surface qui portent des peptides provenant de tissus cellulaires. Quand ces peptides proviennent d'un tissu étranger, ces complexes glycoprotéo-peptidiques sont reconnus comme antigènes (Ag) par le TCR. Et c'est suivant une interaction entre le TCR et le CMH que la cellule T devient active.

Les CMH sont divisés en trois classes, chacune différenciée par sa morphologie, ses peptides portés, et les cellules T activées. Les CMH I présentent des peptides intracellulaires et sont exprimés sur tous les types de cellules possédant un nucléus. Ils sont responsables de l'activation des cellules CD8+. Quant aux CMH II, ils portent des peptides extracellulaires et sont exprimés sur les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, et les cellules endothéliales. Ils servent à activer les CD4+ et à maintenir la réponse immunitaire déjà amorcée par les CMH I. L'influence des CMH III sur l'immunité n'est pas encore comprise, et leurs gènes ne sont pas encore caractérisés. Par contre, les gènes des Tumor Necrosis Factor (TNF)- α et β sont placés à l'intérieur de la région codant pour les CMH III. (Dallman ; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Les CPA expriment de hauts niveaux de CMH I et II, leur permettant ainsi d'activer les deux facettes du système immunitaire: les cellules T CD4+ et CD8+. Il y a deux formes d'activation des cellules T: l'activation directe par les CPA du donneur exprimant ses antigènes et l'activation indirecte par les CPA du receveur exprimant les antigènes du donneur (Ginns *et al.*, 1999; Révillard, 1994). L'interaction des cellules T avec les CPA s'effectue par les chaînes α et β du TCR et la transmission du signal d'activation, par la chaîne CD3. Cette interaction amorce les cellules T, et elles passent alors de l'état naïf à actif pour entrer en phase G1 et initier la transcription de gènes de cytokines et de récepteurs, par exemple l'IFN- γ , qui augmente l'expression des CMH et de molécules d'adhésion cellulaires sur les cellules endothéliales et les macrophages, et l'IL-2, qui induit l'expansion clonale des lymphocytes T et des cellules NK (Cantrell, 1996).

L'activation complète d'un lymphocyte T (CD4+ ou CD8+) nécessite des signaux de co-stimulation sans lesquels il devient anergique, c'est-à-dire non-réactif (Schwartz, 1997). Plusieurs protéines de surface, les CD54, CD2, CD11a/CD18 et CD15, exprimées par les CPA et cellules T, sont impliquées dans la co-stimulation. Récemment, un intérêt particulier a été accordé à CD28, ses ligands, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2), et CD40/CD40L pour leurs rôles dans la différenciation en Th1 ou Th2 (Ginns *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 1996). Ces deux formes de cellules T auxiliaires génèrent deux types de réaction immunitaire : l'immunité cellulaire par Th1, et humorale par Th2. Plusieurs travaux suggèrent une association du rejet aux Th1, et la tolérance aux Th2, mais aucune il n'existe aucune explication adéquate pour ce phénomène (Dallman, 1995). L'immunité cellulaire engendrée par les Th1 implique les cellules cytotoxiques (CTL) et les macrophages. L'immunité humorale est amorcée avec la sécrétion, par les

Th2, des cytokines (IL-4, IL-5 et IL-6) qui induisent sécrétion des immunoglobulines par les lymphocytes B (Ginns *et al.*, 1999).

Suivant l'activation immunitaire, les lymphocytes T doivent migrer dans le greffon par l'endothélium vasculaire. Cette migration est contrôlée par des chimiokines (RANTES, IL-8 et MCP-1) et les molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine). Pendant que les chimiokines attirent les cellules effectrices, les molécules d'adhésion permettent leur attachement à l'endothélium vasculaire et ensuite l'invasion du greffon (Oppenheim *et al.*, 1996).

La cascade immunitaire du rejet culmine avec la destruction des cellules du greffon. Les effecteurs de la destruction sont les anticorps, les cellules cytotoxiques (CTL) et les lymphokines (Dallman, 1995). Les anticorps causent des lésions cellulaires en se fixant sur les antigènes portés par l'endothélium du greffon. Les anticorps peuvent aussi induire la cytotoxicité dépendant d'anticorps (ADCC) en attirant les cellules K, des lymphocytes munis de récepteurs aux anticorps portés par des cellules cibles (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1996).

Les cellules cytotoxiques elles, sous l'influence des cytokines, lysent les cellules exprimant des CMH étrangers, c'est-à-dire les cellules du greffon. Les évidences expérimentales suggèrent que les CTL soient les cellules les plus impliquées dans le rejet. Les CTL détruisent leurs cibles en sécrétant des granzymes, le Facteur de Nécrose Tumorale (TNF- α), et en activant de la voie de la mort cellulaire Fas-FasL, un récepteur d'activation de l'apoptose (Hayry et Defendi, 1970; Walsh *et al.*, 1996).

Les macrophages jouent des rôles d'intermédiaire durant le rejet. Suivant leur activation, ils sécrètent des cytokines comme le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-1, et l'IFN- γ , dont les deux dernières servent à recruter et à activer les CTL. Ils sécrètent aussi le Facteur de Croissance ($\text{TGF-}\beta$) et le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), provoquant la prolifération de cellules musculaires lisses vasculaires et la sécrétion de protéines de matrice cellulaire comme l'élastine et le collagène (Paul et Benediktsson, 1993). La sécrétion de ces protéines induit l'augmentation de la densité fibreuse de l'espace interstitiel, processus qui sert de cicatrisation au tissu endommagé par le rejet de greffe (Tilney; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Avant d'aboutir aux différents types de rejet, la réponse immunitaire suit plusieurs étapes dont chacune représente une cible pour un immunosuppresseur. Et puisque presque chaque type de cellule immunitaire est impliqué dans le rejet, la tolérance d'un greffon dépend de l'inhibition d'une des deux parties de la réaction immunitaire: soit la reconnaissance du non-soi pour empêcher l'amorce de l'immunité ou des mécanismes effecteurs pour entraver la réaction immunitaire déjà activée.

1.3.0 TOLÉRANCE

L'administration d'une thérapie immunosuppressive adéquate dépend non seulement de la connaissance des mécanismes effecteurs du système immunitaire, mais aussi d'une compréhension du phénomène de tolérance. La tolérance du greffon par le système immunitaire est le but principal de tout régime immunosuppresseur du fait que sa réalisation est essentielle à la survie du greffon.

Le but principal de la tolérance est donc de prévenir la reconnaissance des alloantigènes du greffon par les cellules T du receveur. Ceci peut s'effectuer grâce à des mécanismes spécifiques: l'anergie, la répression, et la suppression.

1.3.1 Anergie

Un lymphocyte T est considéré anergique quand il ne peut être complètement activé par des antigènes étrangers qui devraient être reconnus par le TCR. La cascade immunitaire protectrice est alors inhibée et le greffon accepté. Dans le cas des lymphocytes T, l'anergie est associée à une inhibition de la réponse à l'IL-2 ou à une co-stimulation incomplète et inadéquate (Dallman *et al.*, 1992).

Pour les lymphocytes B, l'anergie peut être le résultat de la perte d'expression des récepteurs aux Ig (Goodnow, 1992). Par contre, l'anergie des lymphocytes est réversible avec une infection ou la suppression des antigènes. Si les lymphocytes s'inactivent suivant un stimulus antigénique, la perte de ce stimulus ou l'arrivée d'un autre peut les réactiver (Rocken, 1992).

1.3.2 Répression

La tolérance du greffon peut être l'inhibition de la réponse des lymphocytes déjà réactifs contre les allo-antigènes. Cette forme d'inhibition, appelée la répression, se fait au niveau de la réponse des lymphocytes T à l'activation. Par exemple des anticorps anti-TCR peuvent désamorcer les lymphocytes et ainsi réprimer leur capacité de réponse. Il y a aussi la cytokine *Transforming Growth Factor* (TGF- β) qui a un effet inhibiteur sur les CTL (Sykes et Sach; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Il est possible que la répression se fasse en relation avec les Th1 et Th2. Les réponses des Th1 et 2 sont mutuellement exclusives et il semble que l'IL-4 et l'IL-10 qui activent les Th2, soient des cytokines associées avec la tolérance du greffon tandis que l'IFN- γ et l'IL-2 qui activent les Th1, lui seraient néfastes. Dans ce cas, réprimer les Th1 avec des anticorps ou avec des cytokines, induirait un état tolérance des antigènes étrangers (Sykes, 1999).

1.3.3 Suppression

Chez les enfants, où le thymus est encore actif, la manière idéale d'induire la tolérance serait de supprimer les lymphocytes réactifs contre le greffon déjà au niveau du thymus. Quand des lymphocytes présents dans le thymus, réagissent contre des peptides/CMH du

soi, exprimés aussi dans le thymus; ils subissent alors l'apoptose et sont ainsi éliminés (Allen, 1994). Supprimer les lymphocytes réactifs de cette manière serait un moyen d'induire la tolérance puisque toutes cellules nocives au greffon seraient absentes, et la défense immunitaire de l'hôte resterait intacte.

De par ces approches, la tolérance à un corps étranger est donc théoriquement possible. Il faut maintenant trouver des agents capables d'induire un ou plusieurs de ces états de tolérance. Dans l'histoire de la transplantation, grâce à l'immunosuppression, la fin du vingtième siècle est consacrée à la relève de ce défi.

1.4.0 L'IMMUNOSUPPRESSION

La réaction immunitaire contre le greffon se développe en quelques heures. Si efficace est-elle qu'il devient primordial de trouver rapidement un moyen de minimiser ces effets: la survie d'un greffon en dépend. Durant les années 40, après la découverte des lymphocytes T par Sir Peter Medawar, il devient évident que le rejet est un phénomène immunologique. On comprend alors que la survie d'un greffon dépend de la suppression de la réaction immunitaire. Ainsi apparaît une nouvelle branche de recherche médicale propre au vingtième siècle: l'immunosuppression. Son évolution est très lente et traîne derrière celle de l'immunologie. Le développement du traitement immunosuppresseur se divise en plusieurs étapes commençant avec l'irradiation, et se poursuivant avec les découvertes d'agents antimitotiques et antiprolifératifs. Ces moyens de suppression immune seront les thérapies cliniques de choix jusqu'à la découverte fortuite de la cyclosporine et ensuite des macrolides (Ginns *et al.*, 1999).

1.4.1 Traitements immunosuppresseurs

L'irradiation par rayons ultraviolets ou rayons X est la première thérapie visant à contenir le rejet. Elle consiste en une irradiation totale ou locale des lymphoïdes. L'irradiation a pour effet d'altérer l'ADN des cellules lymphoïdes du receveur provoquant ainsi leur mort (Révillard, 1994). Malgré cette technique, seul les transplantations entre des jumeaux identiques ou entre individus complètement HLA-compatibles ont du succès. Toutes autres transplantations d'organe aboutissent au rejet

aigu, suraigu, et au même décès du receveur. L'irradiation provoque des effets secondaires importants, tel un déficit profond de l'ensemble du système immunitaire et les patients meurent d'infections généralisées. Si une méthode plus efficace n'était pas développée, la transplantation serait vouée à l'échec (Calne; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Les Antimitotiques

La recherche contre le cancer permet la découverte du premier agent antiprolifératif utile en transplantation: la thiopurine 6-mercaptopurine (6-MP). La 6-MP substitue les purines durant la transcription ou la traduction de l'ADN. En bloquant la synthèse de novo des purines, la division des lymphocytes T et B est abrogée (Elion *et al.*, 1955). C'est en 1962, à l'hôpital Peter Bent Brigham, que la 6-MP, sous le nom du médicament azathioprine, fait son début dans les protocoles d'immunosuppression comme inhibiteur de la division des lymphocytes T. Malheureusement, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants et il faut compléter le régime de glucocorticostéroïdes: la prednisolone et la prednisone (Walker, 1999; dans es Ginns *et al.*, 1999). Ces agents inhibent la prolifération des lymphocytes T induite par les ionophores calciques suivant le lien du TCR avec l'antigène (Dupont *et al.*, 1986). Ils inhibent aussi l'activation des gènes d'IL-1, IL-2, et IL-6, les cytokines responsables de l'activation et prolifération des lymphocytes T qui précède l'inflammation d'un tissu. Ceci leur procure des propriétés anti-inflammatoires (Révillard, 1994).

Grâce à ces nouvelles thérapies, les transplantations rénales ont un certain succès, mais les effets secondaires sont dévastateurs: non seulement ces régimes suppriment l'hématopoïèse et toute résistance immunitaire mais ils engendrent toute sorte de complications allant de la croissance retardée chez l'enfant à l'ostéonécrose et

l'ostéoporose. L'aspect cushingoïde, le diabète, l'hypertension, l'ulcère gastrique, et même l'instabilité émotionnelle sont d'autres problèmes qui peuvent émerger suite à ces thérapies (Révillard, 1994). Malgré cela, les régimes incluant la 6-MP et les corticostéroïdes sont, pour les vingt années qui suivront, les seules thérapies immunosuppressives disponibles. Quoique l'association d'agents antimétaboliques permet un pas important vers la tolérance, ce n'est pas suffisant pour inspirer l'optimisme: ces agents sont trop toxiques et les transplantations de cœur, de foie, et de pancréas ne sont pas encore envisageables (Calne, 1999; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Les Macrolides

En 1976, durant des tests routiniers d'extraits fongiques pour leur activité antibactérienne, Borel découvre des caractéristiques immunosuppressives à un macrolide dérivé du fungus *Tolypocladium inflatum Gams*: la cyclosporine A (CsA). La CsA amène un changement important: sa sélectivité envers les lymphocytes T actifs améliore la spécificité du traitement. La cyclosporine A permet des progrès considérables de la survie des greffes de cœur, de foie et de pancréas (Révillard, 1994).

Le mécanisme d'action de la CsA met en jeu la cyclophiline A (CyPA). En se liant à CyPA, la CsA inhibe la calcineurine et ainsi bloque la transcription des gènes de l'IL-2, étape importante pour l'activation des lymphocytes (Keown, 1999; dans es Ginns *et al.*, 1999) La CsA ne neutralise donc pas complètement le système immunitaire, et ces effets sont synergiques avec ceux des glucocorticoïdes (Révillard, 1994). Ces avantages confèrent à la CsA une place de choix dans les régimes immunosuppresseurs. En clinique, on utilise maintenant la "triple thérapie" avec la CsA comme médicament de base et un supplément d'azathioprine et de glucocorticoïde (Hiesse, 1985).

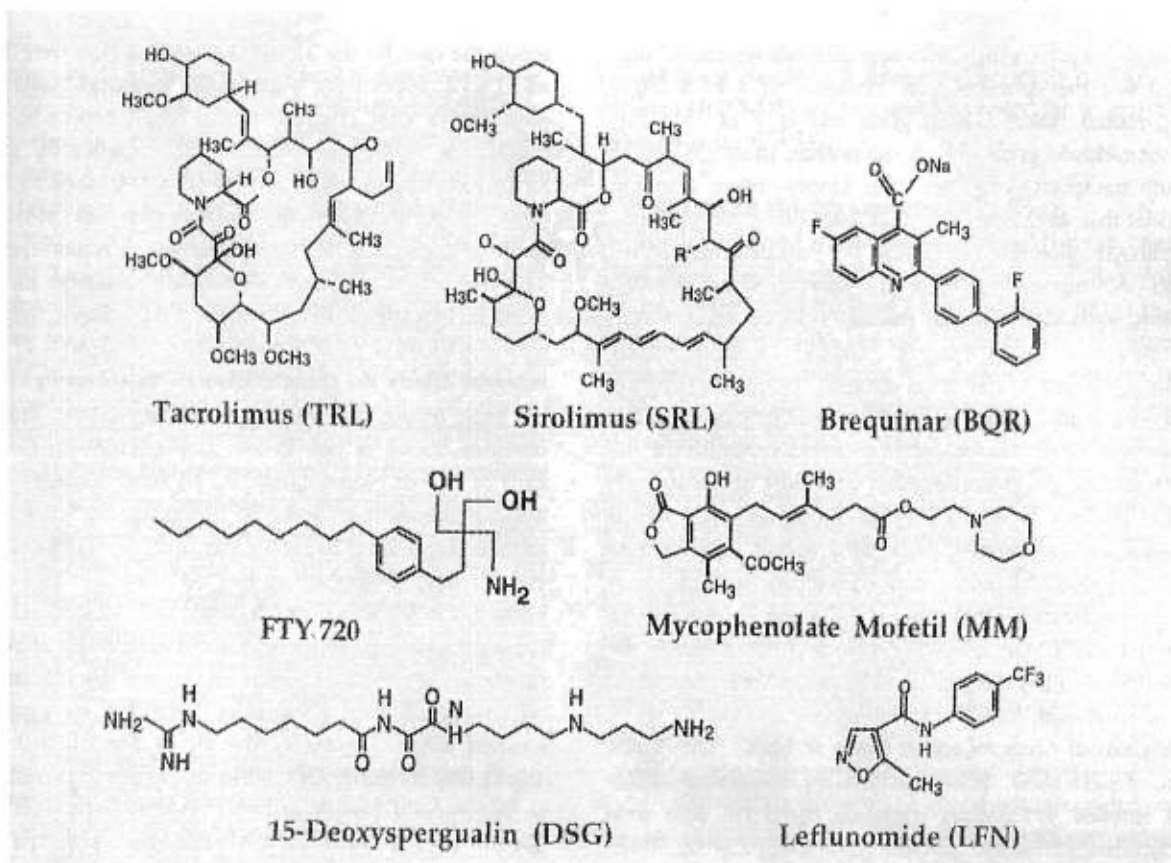


FIGURE 1.1. Formules chimiques d'agents immunosuppresseurs de petite taille incluant des macrolides. (Senel F, Kahan BD. **New Small Molecule Immunosuppressive Agents.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). Transplantation. Blackwell Sciences. Malden, Mass: 1999; p174.)

Les régimes à base de CsA sont caractérisés par leur néphrotoxicité, c'est-à-dire l'induction de la nécrose des cellules vasculaires rénales et la fibrose interstitielle causant ainsi la diminution de la filtration glomérulaire. Les effets néfastes de CsA ne se limitent pas aux reins, en effet, l'hépatotoxicité et quelquefois le cancer s'ajoutent aux effets secondaires. Chez certains patients, des syndromes d'ordre neurologique, les convulsions et la dépression, peuvent être observés (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999). Une discussion détaillée sur la CsA est présentée dans le prochain chapitre.

Le niveau de toxicité des immunosuppresseurs dépend entre autre de la dose du traitement, et le but des recherches en transplantation devient de l'attenuer sans en réduire les propriétés immunosuppressives. La découverte d'autres macrolides (Fig. 1.1), le sirolimus (SLR), le tacrolimus (FK506), et le mycophénolate mofétyl (MMF), rend possible l'atteinte de cet objectif. Ces agents sont des macrolides fongiques qui ciblent des étapes distinctes de l'activation des lymphocytes. Ceci rend leurs effets immunosuppresseurs synergiques avec ceux de la CsA, permettant ainsi une immunosuppression accrue à doses diminuées (Keown; Ginns *et al.*, 1999).

Sirolimus (Rapamycine) bloque les signaux intracellulaires induit par la liaison de l'IL-2 à son récepteur en se liant aux protéines cytoplasmiques *FK-binding proteins* (FKBP) pour empêcher l'expansion clonale des lymphocytes T (Fig. 1.2) (Discuté en détails dans la section 1.4.3.1). Cette différence de mécanisme d'immunosuppression entre le sirolimus et la CsA qui explique la synergie. Le sirolimus n'est pas néphrotoxique, mais génère des complications telle que la thrombocytopénie ou l'hypercholestérolémie (Révillard, 1994; Senel et Kahan; dans es Ginns *et al.*, 1999).

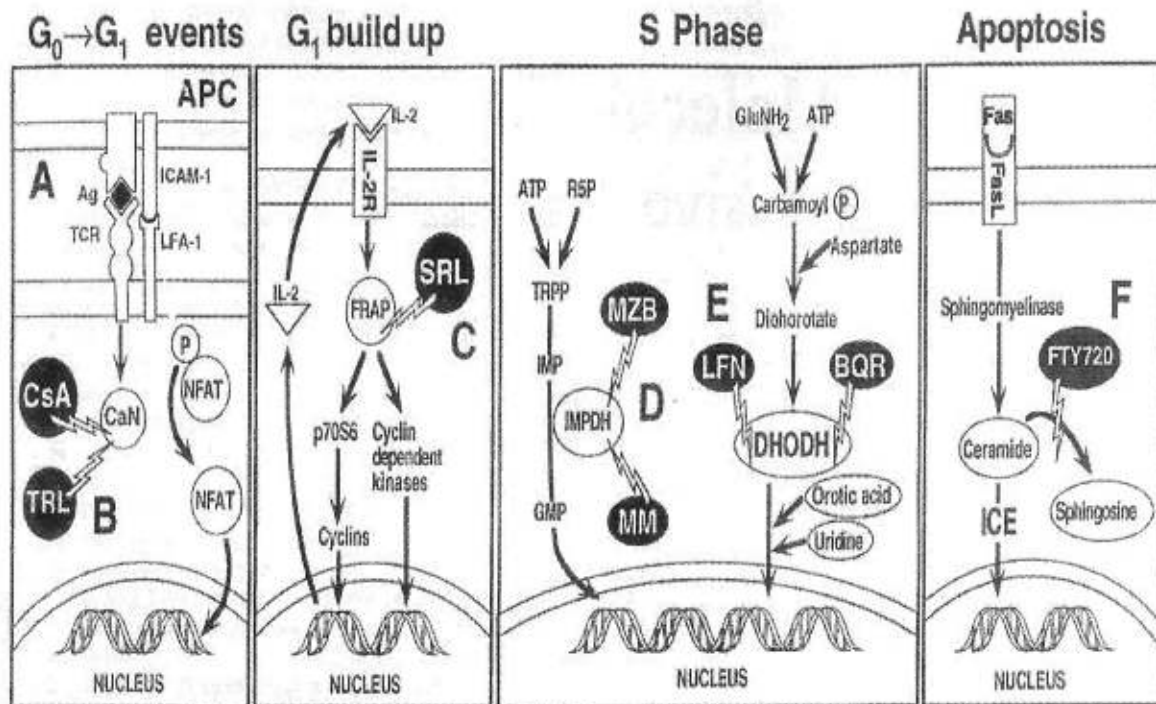


FIGURE 1.2: Modes d'action de divers agents immunosuppresseurs (Senel F, Kahan BD. **New Small Molecule Immunosuppressive Agents**. Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation*. Blackwell Sciences. Malden, Mass: 1999; p174.).

La cible directe du tacrolimus (FK506), macrolide parent au sirolimus, est aussi une FKBP: FKBP-12 ou FRAP (Fig. 1.2). Les propriétés immunosuppressives du tacrolimus sont voisines à celles de la CsA parce que le complexe FK506-FKBP-12 inhibe l'action de la calcineurine (CaN) et ainsi bloque la transcription des gènes de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF- α et GM-CSF (Jiang *et al.*, 1991).

Le troisième macrolide, le mycophénolate de mofétyl (MMF), agit sur la synthèse de novo des purines par inhibition de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH)-II, une enzyme dont l'activation est propre au lymphocytes T en développement (Fig. 1.2). La IMPDH-II convertit l'inosine monophosphate en guanosine monophosphate. L'inhibition de cet enzyme entrave la synthèse du guanosine, un substrat vital à la transcription d'ADN durant la prolifération des lymphocytes T. La prolifération lymphocytaire est donc abrogée par ce manque de substrat (Rayhill et Sollinger; dans es Ginns *et al.*, 1999). Bien que le MMF soit toxique pour le système gastro-intestinal et hématologique, il confère l'avantage d'inhiber la production d'anticorps et la prolifération des lymphocytes. Le MMF peut donc agir simultanément sur les deux branches de l'immunité, la réponse humorale et cellulaire, offrant une protection plus complète contre le rejet. Les cibles d'action du MMF incluent aussi les facteurs de prolifération de cellules musculaires lisses vasculaires qui sont d'importants inducteurs du rejet chronique (Groth et Brattsrom: dans es Ginns *et al.*, 1999).

Les Agents biologiques

Les agents biologiques sont récemment venus s'ajouter à la panoplie de médicaments immunosuppresseurs. Leur découverte est le résultat de recherches

visant à améliorer la spécificité et la sélectivité des traitements immunosuppresseurs. Des sérums d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-lymphocytaires (ALS) et des protéines de fusion se sont avérés efficaces comme suppléments aux thérapies immunosuppressives. Ces agents agissent en se liant aux récepteurs exprimés par les lymphocytes T et aux médiateurs solubles comme les cytokines (Chatenoud; dans es Ginns *et al.*, 1999). Par exemple, les anticorps Simulect (Novartis) et Zenapax (Hoffman-LaRoche), dirigés contre les récepteurs d'IL-2, quand ils sont associés avec la CsA, procurent d'importantes réductions des taux de rejet aigus sans toutefois augmenter la toxicité du traitement (Nashan *et al.*, 1997). Les protéines de fusion peuvent être dirigées contre les molécules de co-stimulation, comme la CTLA-4Ig, une glycoprotéine exprimée sur les lymphocytes T en activation (Chatenoud; dans Ginns *et al.*, 1999)

La spécificité de ces agents est conférée par l'expression de leurs cibles sur des lymphocytes en voie d'activation. Cet aspect immunorégulateur, mais non destructif, minimise les effets de déficit immunitaire communs aux régimes immunosuppresseurs (Chatenoud; dans es Ginns *et al.*, 1999).

1.4.1.1 Limites de l'immunosuppression

Bien que chaque médicament ait ses propres effets néfastes caractéristiques, la thérapie immunosuppressive, en générale, entraîne des complications dont la réduction fait l'objet de recherches intensives. Effectivement, en supprimant la réaction contre le greffon, ces traitements entraînent des déficits immuns iatrogènes, c'est-à-dire que la protection immune est diminuée à tel point que le receveur devient sujet aux infections opportunistes. Suivant la transplantation, les receveurs doivent souvent être

gardé à l'hôpital sous supervision d'un médecin au risque de contracter des infections bactériennes: pneumocystose, toxoplasmose, listériose, légionellose, aspergillose, et cryptosporidiose. Ils deviennent aussi susceptibles aux infections virales, en autres l'herpès HSV1 et 2, le virus Hepstein-Barr (EBV), le papillome (HPV) et la varicelle-zona (VZV). De telles infections chroniques peuvent conduire à certains types de cancer. Certains cancers, comme l'épithéliome cutané, les lymphomes, et l'hépatocarcinome, sont favorisés par le traitement immunosuppresseur (Révillard, 1994). Bien que les recherches dans le domaine soient axées vers la réduction de ces risques, leur élimination n'est pas encore possible.

Les perturbations immunitaires non spécifiques ne sont pas les seuls effets secondaires dont les chercheurs n'arrivent pas à se débarrasser. Jusqu'à présent, la CsA est toujours la base des régimes immunosuppresseurs et malgré la découverte de puissants macrolides efficaces à faible dose, la CsA reste indispensable mais accompagnée de sa néphrotoxicité. En effet, la détérioration rénale associée à CsA est importante, particulièrement dans les transplantations rénales. La cyclosporine A semble causer une ischémie rénale prolongée en promouvant la croissance de muscles lisses vasculaires. Cette croissance augmente la résistance vasculaire et diminue le flot sanguin rénal (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999). En plus de son caractère vasoconstricteur, la CsA induit l'apoptose et l'accumulation de fibres de collagène autour des cellules tubulo-interstitielles. Chez les individus transplantés du rein, cette néphrotoxicité contribuent largement au rejet chronique, et sa diminution est maintenant le but principal des recherches en immunosuppression (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999).

1.4.1.2 Association d'immunosuppresseurs

Les grands problèmes associés aux thérapies immunosuppressives sont la néphrotoxicité, le rejet chronique et le manque de spécificité et de sélectivité. Ces obstacles sont contournés à l'aide de stratégies d'association qui consistent à jumeler les médicaments dont les effets sont soit additifs ou idéalement synergiques. En association, les immunosuppresseurs permettent de réduire leur posologie et leur toxicité (Révillard, 1994). Des agents tel que le tacrolimus, le mycophenolate mofetil ou le sirolimus sont plus puissants que la CsA et, dans le cas du mycophenolate mofetil et du sirolimus, relativement non-toxiques. Leur mode d'action, plus ou moins sélectifs pour les lymphocytes T activés, permet une thérapie plus sélective (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Les stratégies d'association puisent leurs avantages des effets synergiques entre médicaments (traité en détail dans Synergie). Par exemple, associer la CsA et le MMF en clinique permet une réduction de 20% des taux de rejets aigus (Halloran, 1997), et l'association CsA-RAPA permet d'obtenir entre 10% et 30% de réduction (Kahan, 1995).

Avec de tels résultats, certains hôpitaux remplacent déjà l'azathioprine par un de ces nouveaux macrolides. En effet l'ère des antimétabolites touche à sa fin et fait place à des thérapies plus efficaces qui permettent de réduire la durée d'hospitalisation, le nombre de tests diagnostiques et donc, le fardeau financier du traitement.

1.4.1.3 Solutions du futur

D'après Paul Keown, l'immunosuppression des dix prochaines années doit atteindre cinq objectifs: 1) des taux de survie du patient de 95%, 2) des taux de survie du greffon de 90%, 3) des taux de rejet ne dépassant pas 10%, 4) des incidences d'infections de moins de 10%, et 5) des incidences de lymphomes de moins de 1% (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999). Evidemment, ceci excède les capacités des régimes cliniques courants. Ainsi donc, l'immunosuppression doit se tourner vers d'autres stratégies incluant le développement de nouveaux agents, et peut-être, de nouvelles découvertes sur la tolérance.

Il y a en ce moment un vague de nouveaux agents (Fig. 1.1) dont les données pré-cliniques et cliniques semblent prometteuses (Senel et Kahan; dans es Ginns *et al.*, 1999). Certain d'entre eux, comme les agents biologiques, ont déjà été mentionnés. Les autres font partie de nouvelles classes d'immunosuppresseurs non apparentés, par leur structure et leur mécanisme d'action, aux agents connus: des molécules comme le bréquinar, les malononatrilamides, le 15-déoxyspergualin (DSG) et le FTY720 (Fig. 1.1 et 1.2). Le bréquinar et les malononatrilamides (leflunomide) tirent leur effet immunosuppresseur de l'inhibition de la déhydroorotate déhydrogénase (DHODH), une enzyme impliquée dans la synthèse de pyrimidines des cellules en prolifération. L'inhibition du DHODH laisse les lymphocytes T activés sans le matériel nécessaire à leur prolifération (Senel et Kahan; Dans es Ginns *et al.*, 1999). Le 15-déoxyspergualin inhibe la différenciation des cellules T cytotoxiques et l'activité des macrophages. Son mode d'action n'est pas encore connu, mais il semble contrecarrer les effets des cytokines comme l'IL-1 et l'IFN- γ (Senel et Kahan; dans es Ginns *et al.*, 1999). Le FTY720 est un dérivé synthétique du myriocine. Le FTY720 induit l'apoptose des

lymphocytes T en bloquant la dégradation de la ceramide. L'accumulation de la céramide dans le cytosol induit le processus de mort cellulaire appelé apoptose. Augmentant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire dites $\alpha 4/\beta 7$ -intégrine, le FTY720 séquestrant dans les organes lymphoïdes et empêche la migration des lymphocytes T dans le greffon (Senel et Kahan; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Cette panoplie d'agents offrirait aux cliniciens la possibilité d'augmenter la spécificité du traitement et principalement, de personnaliser le régime; c'est-à-dire, le rendre flexible aux besoins et contraintes du receveur. De plus, le tacrolimus est en mesure de remplacer la CsA comme médicament de base des régimes immunosuppresseurs dans les transplantations de tous les organes (Wagner; dans es Ginns *et al.*, 1999)

L'immunosuppression a fait de la transplantation une réalité. Des découvertes remarquables aux essais cliniques rigoureux, elle continue de donner espoir aux individus ayant des organes défaillants: espoir d'une vie indépendante de moyens de prophylaxie lourds comme la dialyse ou la nutrition parentérale. Les obstacles n'ont pas tous été surmontés; en effet, il reste encore la toxicité et le rejet chronique à contrer. En vue de cette problématique, l'immunosuppression de demain aura deux aspects: diversifier le traitement à l'aide de nouveaux agents, et rediriger les stratégies vers le développement d'une tolérance définitive sans toxicité.

1.4.1 NÉORAL

1.4.2.1 Cyclosporine A

La découverte de la cyclosporine A (CsA) et son introduction en 1983, sous le nom commercial de Sandimmune par Novartis Pharma, permet une amélioration importante de la survie à court et moyen terme des transplantés. La CsA réduit les effets secondaires des thérapies ultérieures et améliore le style de vie des receveurs. Ces bénéfices sont extraordinaires, mais la CsA a des limites; en plus de sa toxicité, elle offre des taux d'absorption variables, dépendant de plusieurs facteurs liés à chaque patient. Ceci rend imprévisible la cinétique du médicament après son ingestion et définir la posologie optimale pour un patient devient difficile. Des améliorations à la CsA sont nécessaires pour que les régimes à base de la CsA posent moins de problèmes aux patients (Shah *et al.*, 1999).

Ce n'est qu'en 1995 que la FDA (*Food and Drug Administration*) approuve une nouvelle formulation de la CsA appelée Néoral. Avec cette micro émulsion, Novartis veut surmonter les problèmes de variabilité d'absorption de la CsA. Sandimmune est constituée de CsA émulsionnée dans de l'huile de maïs. Suivant son administration, Sandimmune forme une émulsion d'huile et d'eau qui nécessite l'action des sels biliaires et de la pancréatine pour permettre la dispersion des molécules de CsA sur la surface d'absorption. Avec Néoral, la CsA est diluée dans des tampons lipophiliques, hydrophiliques, et dans un surfactant. Ceci permet aux molécules de CsA de se disperser rapidement et uniformément dans le contenu aqueux de l'intestin pour être ensuite facilement absorbées avec ou sans sécrétions biliaires (Otto *et al.*, 1998).

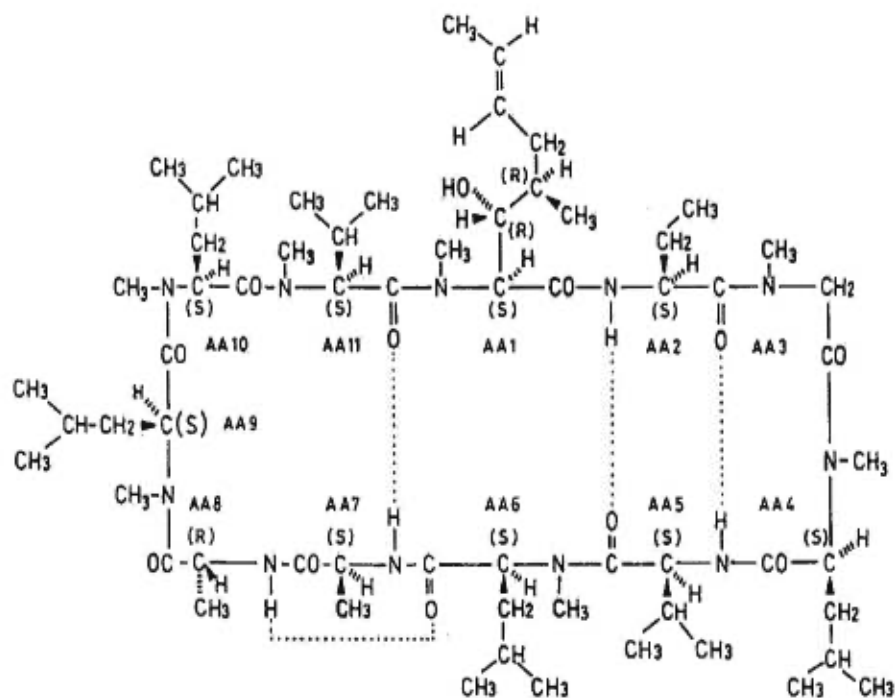


FIGURE 1.3: Structure chimique de cyclosporine A. (Pris de Keown PA. **Molecular and Clinical Therapeutics of Cyclosporine In Transplantation.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation.* Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p101).

1.4.1.2 Structure et mécanisme d'action

La cyclosporine A vient d'une famille comprenant plus de 25 undécapeptides cycliques et lipophiliques, dérivés du processus de fermentation du fungus *Tolpocladium inflatum Gams*. De ces métabolites, seulement la cyclosporine A (CsA) possède des caractéristiques immunosuppressives. Deux motifs structuraux caractérisent la CsA (Fig. 1.3): les résidus Met (AA1) et MeLeu (AA6) forment une feuille β -antiparallèle stabilisée par des liens hydrogènes avec Ala (AA7) et MeVal (AA11). Un autre lien lie le NH de Dela (AA8) aux carbonyles oxygénés de MeLeu (AA6). Le domaine de liaison se situe aux résidus 1, 2, 9, 10, 11 pendant que le domaine effecteur est aux résidus 4 et 8 (Wenger, 1990; Keown *et al.*, 1999).

Les cibles de la cyclosporine A sont principalement les cyclophilines dont la plus importante est cyclophiline A (CyA). D'autres cyclophilines, CyPB, CyPC, CyCD, et CyP-40 sont aussi des cibles de la CsA et pourraient être responsables de ses effets secondaires. Ces enzymes possèdent des domaines de liaison aux cyclosporines, aux glucocorticoïdes, et aux macrolides fongiques (Figure 1.4).

Mais la CsA peut aussi lier une protéine cytoplasmique dite P-glycoprotéine (produit du *Multiple Drug Resistance gene*) qui est responsable de la résistance aux médicaments dans les cellules malignes. La P-glycoprotéine extrait les médicaments du cytoplasme et ainsi diminue leur activité (Desmeules *et al.*, 1997). Mais c'est la liaison de la CsA à CyA qui aboutit à l'inhibition des signaux lymphocytaires, d'où ses propriétés d'immunosuppresseur (Fig. 1.4) (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999). Le complexe CsA-CyA interagit directement, via des domaines effecteurs de CsA, avec la Ser-Thr-phosphatase de la calcineurine.

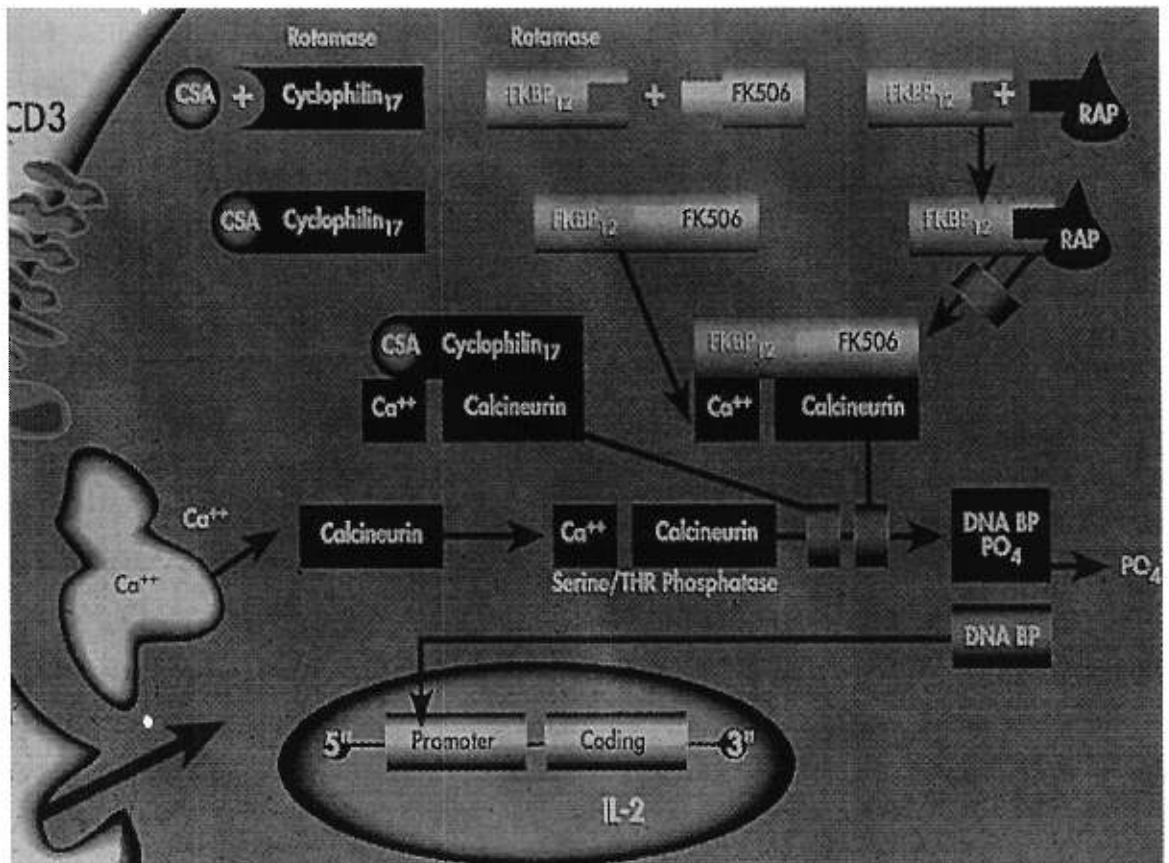


FIGURE 1.4: Schéma du mode d'action de Cyclosporine A (CSA): cascade d'inhibition de la transcription du gène de l'IL-2. Aussi, interaction de tacrolimus (FK506) et sirolimus (RAP) avec les FKBP. (Pris de Keown PA. **Molecular and Clinical Therapeutics of Cyclosporine In Transplantation.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). Transplantation. Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p101).

Cette liaison bloque les fonctions enzymatiques de la calcineurine et prévient la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT1, de elk-1, et de *cAMP-response element binding protein* (CREB), des facteurs induits par la reconnaissance d'un antigène (Sugimoto *et al.*, 1997). Cette déphosphorylation est l'étape limitante de l'activation des lymphocytes car ces facteurs ne peuvent se transposer dans le noyau, et activer la transcription de gènes de cytokines et des proto-oncogènes *c-mys*, *c-fos*, et *n-ras* (Batiuk *et al.*, 1997). Le complexe CsA-CyA abroge aussi l'expression des gènes contrôlant le changement de phase G0 à G1 des cellules T (Cristillo *et al.*, 1997).

Cette inhibition de l'expression génique empêche les lymphocytes d'entrer en phase proliférative; la synthèse d'ARN, d'ADN, de peptides, et la production de facteurs de croissance sont inhibées. Puisque la maturation est abrogée, la réponse des CTL contre les antigènes du donneur est atténuée. La CsA peut aussi, par influence négative sur IFN- γ et TNF- α , diminuer l'expression des CMH/HLA et des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire du greffon. Ceci entrave les événements immuns menant à l'inflammation (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Donc, l'administration de la CsA non seulement empêche la maturation des CTL, mais ralentie le trafic lymphocytaire dans le greffon et la production de facteurs menant à l'inflammation. C'est de cette manière que les crises de rejet aigu peuvent être contrôlées.

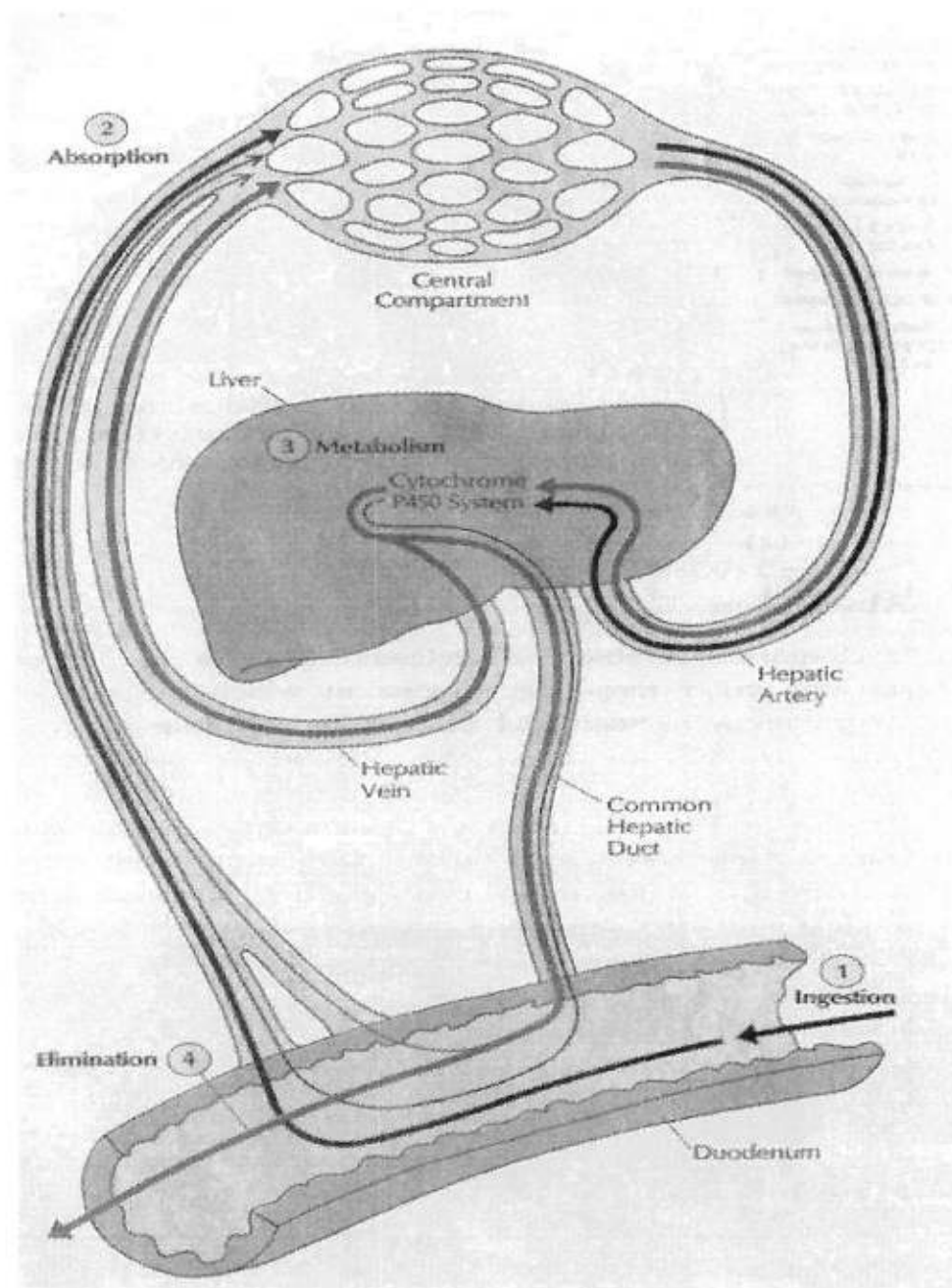


FIGURE 1.5: Voie d'absorption de cyclosporine A : La cyclosporine A est absorbée par les chylifères lymphatiques (1-2) jusqu'à son entrée dans le foie où la métabolisme se fait. Les métabolites sont soit recirculés par la lymphe ou éliminés par l'intestin. (pris de Keown PA. **Molecular and Clinical Therapeutics of Cyclosporine In Transplantation.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). Transplantation. Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p101)

1.4.2.3 Sandimmune vs Néoral

La cyclosporine A est administrée sous trois formes: voie intraveineuse ou voie orale par liquide ou capsule de gel. Sandimmune et Néoral sont toutes deux des formules orales de la CsA, la méthode d'administration de choix. Les deux formulations, bien qu'étant essentiellement les mêmes produits, se différencient par leur cinétique d'absorption (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999).

L'absorption de la CsA se fait au niveau du duodénum de manière constante et indépendante de la dose (Fig. 1.5), et comme pour tout composé lipophile, elle se fait via les chylifères lymphatiques. Mais avant, la CsA subit la déméthylation par le cytochrome P450-IIIa dans l'épithélium de l'intestin: ce qui entraîne déjà une diminution de la dose disponible (Kolars *et al.*, 1991). Une autre portion de la CsA se lie aux P-glycoprotéines de l'épithélium (Lowns *et al.*, 1997). Ce qui reste de la dose initiale est dirigée vers le foie via les lymphatiques intestinaux. La CsA est là transformée en 25 métabolites par le cytochrome P450-IIIa. Ces métabolites sont ensuite soit recirculés dans le sang par la veine hépatique ou excrétés dans l'intestin par le canal biliaire. La CsA se lie facilement aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques et s'accumule dans les tissus adipeux, le foie, le pancréas, le cœur, les poumons, la rate, et les nodules lymphatiques (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Les formulations Sandimmune et Néoral sont absorbées et métabolisées par ces mêmes voies. Mais, pour ce qui est de Sandimmune, son absorption est lente, incomplète, et imprévisible: il y a un délai d'absorption de 30 à 60 minutes et une demi-vie d'absorption de 60 minutes. La cime des concentrations sanguines (C_{max}) de

la CsA est atteinte 3 ou 4 heures après l'administration, et elle est souvent suivit de cimes secondaires se qui reflète une cinétique d'absorption irrégulière (Primmitt *et al.*, 1997). De la dose administrée seulement 30% parviendra à la circulation systémique: le reste sera soit éliminé ou se retrouve lié à diverses protéines. Pour aggraver la situation, l'absorption de Sandimmune est influencée par des facteurs gastro-intestinaux comme la présence de nourriture, le flot de la bile, la motilité intestinale, et la réduction de la surface d'absorption (Kahan *et al.*, 1986; Lindholm *et al.*, 1990). L'association de ces facteurs donne à la cinétique d'absorption un caractère unique pour chaque individu: un inconvénient majeur pour les cliniciens.

Néoral est formulé justement pour surmonter cet inconvénient. En effet, grâce à sa dispersion homogène sur la surface d'absorption de l'intestin, l'absorption de Néoral est plus rapide, complète et constante. Les délais d'absorption sont éliminés et le temps d'atteinte du C_{max} est réduit à 1.5 heures (Kovarik, 1994; Vanderscher *et al.*, 1996). Les cimes secondaires de concentration sanguine caractéristiques qui suivent l'administration de Sandimmune sont aussi éliminées. Avec Néoral, le C_{max} est augmenté à 60%, améliorant aussi la biodisponibilité de la CsA de 30% à 50%. Ceci amène une réduction des variations d'absorption et rend le comportement cinétique de la formulation Néoral plus prévisible (Taesch *et al.*, 1994; Keown, 1996). Néoral offre aussi l'avantage d'une thérapie clinique moins coûteuse que celle de Sandimmune. En effet, avec ses taux réduit de crises de rejet, Néoral permet d'écourter l'hospitalisation et de diminuer le nombre de procédures diagnostiques et la quantité de médicaments prescrit (Keown, 1996).

Ces avantages sont évidents selon les résultats de plusieurs études internationales en transplantation rénale. La nouvelle formulation Néoral permet la réduction des doses de la CsA de 8% et l'augmentation de taux d'absorption de 49%. Par contre, les taux de survie des transplantés traités avec Néoral restent similaires à ceux des patients traités avec Sandimmune. Mais Néoral entraîne quand même une baisse de la fréquence du rejet aigu (de 60% à 42%) sans toutefois augmenter la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité, l'hypertension, et les autres effets secondaires associés à la CsA (Keown et Niese, 1998). Des études préliminaires de transplantation de cœur, de pancréas, de poumon, et de foie semblent fournir des résultats similaires (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999). La formulation Néoral est particulièrement importante dans la transplantation du foie où le drainage externe de la bile réduit la biodisponibilité de Sandimmune à moins de 5% (Dunn *et al.*, 1995).

La formulation Néoral est donc une alternative intéressante à la formulation Sandimmune. L'absorption facilitée et prévisible permet de réduire les tests préopératoires visant à déterminer les taux d'absorption et le besoin de surveillance clinique durant le traitement; ceci allège le fardeau financier du régime immunosuppresseur. La formulation Néoral est le traitement idéal pour les enfants, les femmes enceintes et les personnes de race noire chez qui l'absorption et le drainage lymphatique sont plus lents. Avec des résultats cliniques favorables, Néoral prendra sans doute la place qu'occupe Sandimmune parmi les traitements concomitants. Par contre, la toxicité de la CsA n'est aucunement réduite avec la nouvelle formulation et le rejet chronique demeure l'obstacle principal à la survie du greffon (Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999).

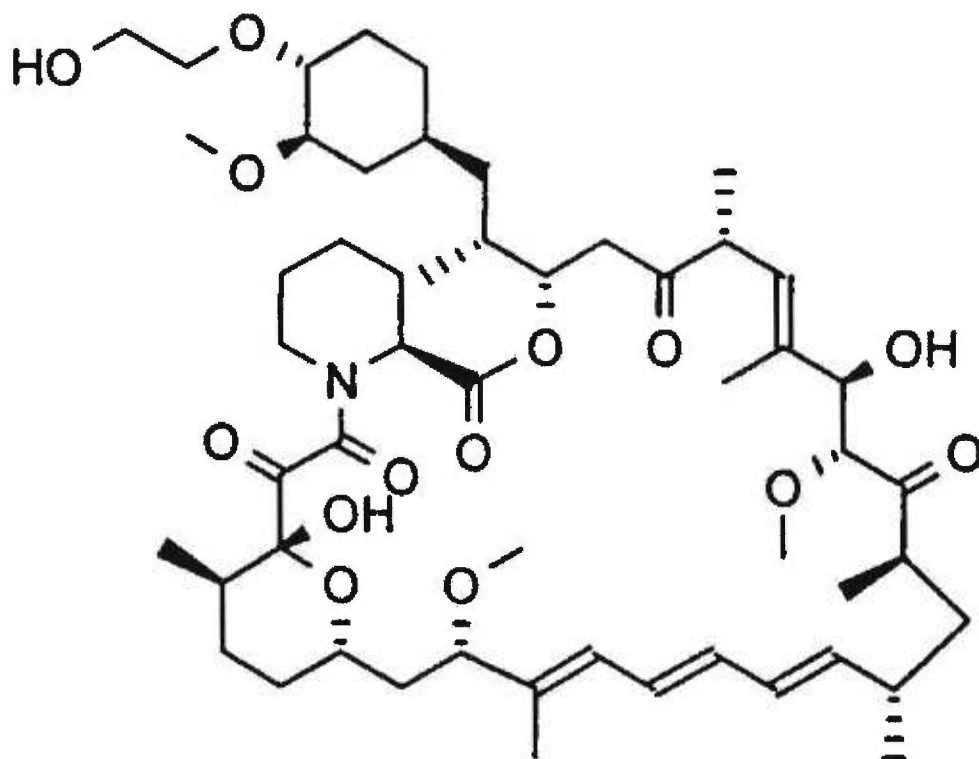
1.4.3 SDZ-RAD

1.4.3.1 Sirolimus

La découverte des propriétés immunosuppressives de certains antibiotiques fongiques a soulevé les efforts de recherche clinique sur la tolérance. En effet, des macrolides tels que le mycophenolate mofetil, le sirolimus, et le tacrolimus permettent aux cliniciens de diversifier et de les traitements. En effet, avec une puissance accrue et des effets secondaires réduits, il devient plus facile de gérer la thérapie et la période postopératoire. Malgré tout, chaque dérivé fongique est accompagné d'une cinétique distincte et d'une série d'effets secondaires. En réponse à ces limitations, les chercheurs s'affairent à trouver des modifications qui rendraient ces agents plus efficaces, sans toutefois diminuer leur caractère immunosuppresseur. SDZ-RAD, un produit analogue au sirolimus (rapamycine ou RAPA), est le résultat de telles modifications (Schuler *et al.*, 1997).

1.4.3.2 Structure et mécanisme d'action

Sirolimus est un antibiotique produit par *Streptomyces hygroscopicus*, un champignon endémique de l'Île de Pâques. Découvert en 1975, le sirolimus a été mis sur le marché des immunosuppresseurs par Wyeth-Ayerst, sous le nom de Rapamune, un lactone macrocyclique de 31 branches (Fig. 1.6). Le sirolimus possède, comme certains autres macrolides, un étalage tricarbonylique composé d'un amide, une cétone, un hémicétal, et d'un site rétroaldolique, mais il se différencie des autres agents par son segment triénique (Sehgal *et al.*, 1975; Kelly, 1997; Senel et Kahan; dans es Ginns *et al.*, 1999).



SDZ RAD

FIGURE 1.6: Structure chimique de SDZ RAD. (pris de Schuler, W, Sedrani R, Cottens S, Haberlin B, Schulz M, Schuurman, HJ, Zenke G, Zerwes HG, Schreier MH. SDZ RAD, A New Rapamycine Derivative: In Vivo and In Vitro. *Transplantation* 24; 1997: p32).

La cible du sirolimus, FKBP 25, est similaire à celle de la CsA et du tacrolimus, et on aurait tendance à croire que ces agents empruntent la même voie d'action. Pourtant, sirolimus inhibe les signaux provenant des cytokines IL-2 et IL-6 non pas par liaison à la calcineurine, mais par liaison à *FK-Rapamycin Associated Protein* (FRAP). Cette enzyme est essentielle à la synthèse de la S6 Kinase (p79sck) qui active ensuite les ribosomes S6 (Kuo *et al.*, 1992; Kunz *et al.*, 1993; Kelly, 1997). Sirolimus bloque aussi la phosphorylation de facteurs en aval à FRAP tels que p34cdc2 kinase, p27kip, et *eukaryotic initiation factor-(eIF-4^E)-binding protein*. Ces protéines sont essentielles aux différentes étapes de la synthèse de protéines et de facteurs de maturation. Les inhibitions par le sirolimus se résument par une interférence générale avec la progression des lymphocytes T des phases G1 à S d'où son caractère immunosuppresseur (Morris, 1992; Sehgal, 1995). D'autres travaux démontrent que l'immunosuppression du sirolimus ne lui vient pas de son inhibition des cytokines, mais plutôt de la suppression de production d'immunoglobulines, c'est-à-dire l'inhibition de la réponse humorale (Luo *et al.*, 1992).

C'est précisément cette différence de mode d'action entre le sirolimus et les autres macrolides qui permet leur association en thérapie. En effet, l'administration simultanée du sirolimus et de la CsA agit de façon synergique en augmentant la puissance antiproliférative de la thérapie de 10 à 1000 fois par rapport à la monothérapie (Streptowski *et al.*, 1996; Senel et Kahan; dans es Ginns *et al.*, 1999). Le sirolimus associé avec le mycophénolate mofétil est aussi efficace pour prévenir le rejet de cœur, de rein, et de pancréas. Cette synergie entre les deux agents est bien documentée dans les modèles animaux (Vu *et al.*, 1998).

Les thérapies prophylactiques CsA-RAPA sont actuellement à l'étude en phase clinique I et II. Les effets secondaires majeurs du sirolimus semblent être l'hypertriglicéridémie et la thrombocytopénie. Ce profil d'effets est très favorable quand il est comparé à celui de la CsA ou des glucocorticostéroïdes. Par conséquent, les patients sous traitement de glucocorticostéroïdes peuvent être traités avec le sirolimus en toute sécurité (Senel et Kahan; dans es Ginns *et al.*, 1999). Le sirolimus n'est pas aussi néphrotoxique que la CsA dans les modèles de rat, mais il contribue quand même à une hypomagnésémie rénale et à des lésions tubulaires (Andoh *et al.*, 1996; DiJoseph *et al.*, 1992).

1.4.3.3 Sirolimus vs. SDZ RAD

En vertu de ses propriétés immunosuppressives, Rapamune, forme commerciale du sirolimus, est sujet à des variations pharmacocinétiques inter-individuelles. Ceci rend très difficile la formulation d'un composé adéquat aux thérapies: une formulation dont l'absorption est prévisible, uniforme, et constante. En effet, en plus d'être susceptibles aux dégradations métaboliques, la Rapamune oral a souvent une cinétique d'absorption imprévisible. Jusqu'à présent, dans la majorité des recherches précliniques, le sirolimus est administré par voie parentérale (Schuler *et al.*, 1997). Comme cela a été démontré avec Néoral, la nouvelle émulsion de la CsA, la conception d'un composé peut avoir des répercussions importantes sur l'issue clinique d'une transplantation.

Un produit analogue au sirolimus, le 40-O-(2-hydroxyéthyl)-rapamycine ou SDZ-RAD (Fig. 1.6) vient d'entrer en phase préclinique et clinique I. Le SDZ-RAD est une molécule dérivée du sirolimus, c'est-à-dire alkylée avec un groupe 2-hydroxyéthylique.

Bien que l'introduction de ce groupe réduise l'activité *in vitro* comparé à celle du sirolimus, le SDZ-RAD garde quand même les propriétés immunosuppressives du sirolimus: il bloque l'activation de la p70S6 Kinase. D'après les études de Schuler, le SDZ-RAD oral est aussi puissant que le sirolimus malgré leur différence d'activité *in vitro*, ceci parce que la réduction d'activité est compensée par une augmentation d'absorption et un profil cinétique plus favorable. Le groupe 2-hydroxyéthylique augmente la solubilité de la molécule dans les préparations orales. De plus, il est placée à une position qui, sur la molécule du sirolimus, est susceptible aux dégradations métaboliques de l'intestin et à l'hydrolyse, c'est-à-dire le clivage de liens chimiques par les molécules d'eau (H₂O) présentes dans le système digestif ou dans les formules orales. La présence du groupe 2-hydroxyéthylique protège la molécule de diverses dégradations augmentant ainsi la biodisponibilité de l'agent tout en maintenant l'immunosuppression: là sont les avantages du SDZ-RAD sur le sirolimus (Schuler *et al.*, 1997).

Les qualités antiprolifératives du SDZ-RAD s'étendent au-delà de la prophylaxie du rejet aigu. Il est bien connu que le rejet chronique n'est pas seulement un mécanisme d'ordre immunologique et que la prolifération de muscles lisses vasculaires en est une des causes principales (voir Rejet Chronique). Le SDZ-RAD inhibe le remodelage vasculaire induit par l'ischémie ce qui pourrait ralentir le développement du rejet chronique. Bien que le phénomène soit documenté, le mécanisme moléculaire n'est pas encore compris (Schuurman *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 1998).

Comme le sirolimus, SDZ RAD se montre synergique avec la CsA *in vitro* et *in vivo* (Hausen, 1999). Administré à des doses de 5.0 mg/kg/j, le SDZ RAD prolonge la survie du cœur ou des reins transplantés chez les rats. Quand associé avec 1.0 ou 2.0 mg/kg/j de

CsA, les doses de SDZ RAD peuvent être réduites à 0.5 ou 1.0 mg/kg/j. De plus, les "Index de Combinaison" (voir Synergie) suggéraient une synergie entre les deux agents (Schuurman *et al.*, 1997).

Le SDZ-RAD peut donc avoir un double effet antiprolifératif de facteurs immunologiques et non-immunologiques, ces derniers offrant une protection à long terme. Associé à la CsA, ces avantages peuvent être optimisés en faveur du receveur; en effet, une cinétique favorable permet de diminuer la posologie et de réduire le besoin de surveillance clinique postopératoire. Le développement du SDZ-RAD et son association avec la CsA est certainement un pas vers une thérapie plus souple et peut-être aussi vers le maintien indéfini de la vitalité du greffon. Son utilisation en association avec la CsA, est évaluée en phase clinique I en transplantation rénale (Kahan *et al.*, 1999).

1.5.0 ADDITION, SYNERGISME OU ANTAGONISME: MODÈLES D'INTERACTION DES IMMUNOSUPPRESSEURS

Comme nous l'avons mentionné, une thérapie idéale est celle dont la puissance est maximale, mais qui n'engendre pas de toxicité chez le receveur. Les thérapies d'association, dont deux ou trois agents agissent en synergie, sont présentement considérées comme étant plus efficaces. En effet ces thérapies permettent souvent d'observer des effets plus puissants que ceux obtenus avec un seul agent. La synergie se distingue de deux autres modes d'interaction entre médicaments : l'antagonisme et l'addition (sommation). Si un médicament n'a aucun effet seul mais parvient à augmenter celui d'un autre, il y a potentialisation. Avec ce projet, nous tentons de définir les avantages d'associer Néoral et SDZ RAD, deux immunosuppresseurs au mode d'action mutuellement non-exclusif. Puisque nous espérons préciser la nature de l'interaction entre ces deux médicaments, il est donc primordial que nous définissions chacune de ces interactions.

L'ambiguïté associée à la définition des interactions est reflétée dans le nombre de méthodes de calcul disponibles. Une méthode idéale tient compte de tous les paramètres cinétiques propres à chaque agent. En effet, un agent est distingué principalement par sa puissance, sa courbe dose-réponse, et son affinité (K_m et K_i) et efficacité (V_{max}) unique. Une multitude d'autres aspects peuvent s'ajouter à la caractérisation d'un agent, entre autres, la concentration, les constantes, et les facteurs physiologiques (pH, température, absorption, métabolisme, perméabilité, *etc.* ...).

Ces facteurs constituent un système complexe justifiant la prudence par rapport au choix de la méthode de quantification de la synergie (Chou et Rideout, 1991).

La synergie, l'addition, et l'antagonisme représentent l'association des effets que deux agents auraient séparément. Puisque chaque terme est relié l'un à l'autre, déterminer la synergie et l'antagonisme requiert une définition claire de l'addition. L'addition est souvent expliquée comme un phénomène arithmétique où deux agents d'une certaine puissance voient celle-ci s'additionner quand ils sont associés l'un à l'autre. Il s'ensuit que la synergie démontre une puissance excédant l'addition et l'antagonisme, un effet plus faible que l'agent seul. Mais définir ces interactions comme étant $0.5 + 0.5 <$, $=$, et > 1 est non seulement simpliste, mais erroné car cela signifie qu'un agoniste d'une puissance de 70% associé avec un de 40% donnerait un effet additif de 110% dépassant ainsi les capacités d'un système. Il va quand même de soit que la synergie est plus que l'effet additif prévu et l'antagonisme en est le contraire. Il faut donc trouver une méthode qui définit et quantifie clairement l'addition.

La méthode du produit fractionnel de Webb (Webb, 1963; dans Chou et Rideout, 1991) tente de résoudre ce problème en proposant que l'effet combiné de deux inhibiteurs peut être calculé en soustrayant la fraction inhibitrice de chaque agent à lui-même. Le résultat est que deux inhibiteurs à 50% lorsqu'ils sont associés, auront une puissance additive de 75%. C'est une méthode simple mais qui, d'après Chou et Talalay (Chou et Talalay, 1977; 1981; 1984), ne prend pas compte de la forme, sigmoïde ou hyperbolique, de la courbe dose-réponse des agents et, par conséquent, fausse la quantification de la synergie ou de l'antagonisme. De plus elle n'est adéquate que dans des systèmes de premier ordre et pour des agents mutuellement non-exclusifs (ex: agents au mode d'action différent ou indépendants).

La méthode d'isobogramme classique (Chou et Rideout, 1991) est l'une des plus utilisée. Cette formule souligne l'équipotence de plusieurs doses pour un certain effet : ED₅₀, la dose requise pour inhiber séparément 50% d'un système par deux agents. Les ED₅₀ pour chaque agent, 1 et 2, sont placés sur un axe x/y pour donner trois courbes de comparaison d'effets D₁ et D₂ (Fig.1.7). Celle du milieu est interprétée comme étant l'addition, celle du haut, l'antagonisme, et celle du bas, la synergie. Les équations qui décrivent ces courbes sont la somme de deux termes:

$$\frac{(D)_1 + (D)_2}{(D_x)_1 (D_x)_2} = 1 \text{ ou IC}$$

ici, D_{x1} et D_{x2} sont les doses des agents 1 et 2 requises pour inhiber x% du système, tandis que (D)₁ et (D)₂ sont les doses qui, combinées, inhibent aussi x% du système. Chou et Talalay (Chou et Talalay, 1981; 1984) interprètent la somme, la portion de droite de l'équation, comme l'index de combinaison (IC) qui désigne, si IC=1, IC<1, et IC>1, une interaction additive, synergique, et antagoniste respectivement. Mais encore une fois, cette formule ne s'applique qu'à des agents mutuellement exclusifs (même mécanisme d'action), de plusieurs ordres. Il n'y a pas dans la formule une fonction qui relierait l'effet basé sur deux modes d'action distincts.

Avec l'isobogramme conservateur, Chou et P. Talalay (Chou et Talalay, 1981; 1984) ajoute à l'équation un troisième terme: le produit des deux premiers,

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

L'IC reste invariablement basé sur l'effet des deux agents et prend aussi compte des bases distinctes donnant l'effet en question quand il y a association de deux agents mutuellement non-exclusifs et peut s'appliquer à des systèmes d'ordre plus élevé. Cette équation, de l'effet multiple des médicaments, s'applique aux cas d'agents immunosuppresseurs ayant des modes d'action distincts mais un effet commun, notamment la survie d'un allogreffe.

Dans ces travaux précédents, Chou (Chou, 1975) avait relié la dose et l'effet d'un agent par l'équation suivante:

$$fa/fu = (D/D_m)^m$$

Ici, fa et fu représentent la fraction affectée et celle non affectée (*unaffected*), D , la dose choisie, D_m est la dose de l'effet médian (ED_{50} ou IC_{50}), c'est-à-dire la puissance, et m , le coefficient de la forme de la courbe. Par définition, $fa+fu$ est égal à 1. Donc, quand m et D_m sont déterminés, la relation dose-réponse d'un agent peut être décrite. Et pour une dose D , il devient possible de calculer l'effet (fa) et vice-versa. Les graphiques d'effet médian sont les formes logarithmiques de l'équation en question:

$$\log (fa/1-fa) = m \log (D) - m \log (D_m)$$

La forme logarithmique donne un graphique en ligne droite dont la pente est m et l'intercepte y , $m \log (D_m)$. Le principe de l'effet médian est une description générale du comportement de plusieurs systèmes biologiques selon la loi d'action de masse. En effet, durant l'élucidation de ce principe, Chou (Chou, 1977) a pu démontrer que de l'effet médian peut être dérivé les quatre axiomes biochimiques descriptifs du comportement d'un système (Fig. 1.8): la relation cinétique enzymatique par l'équation de Michaelis-Menten (Michaelis et Menten, 1913; dans Chou et Talalay, 1991) et celle de Hill (Hill, 1913; dans Chou et Talalay,

1991); l'équation d'ionisation et pH de Henderson et Hasselbalch (Clark, 1933; dans Chou et Talalay, 1991); et celle de Scatchard (Scatchard, 1949; dans Chou et Talalay, 1991) qui décrit les modalités de la liaison ligand-récepteur.

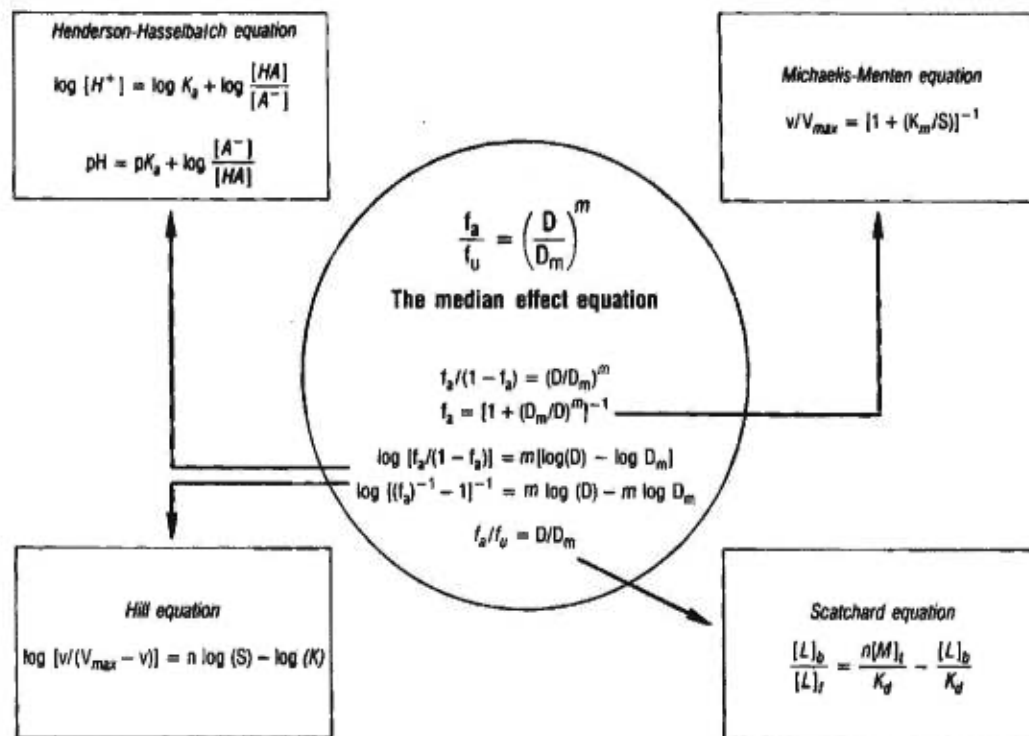


FIGURE 1.8: Quatre équations biochimiques majeures dérivées du principe de l'effet médian. (Pris de Chou T-C, Rideout DC, **Synergism, Antagonism, and potentiation in chemotherapy: An Overview**. Dans es Synergism, and Antagonism in Chemotherapy. Academic Press. NY. 1991; P6).

Avec l'effet médian, Chou et Talalay proposent une équation fondée sur des principes physiques et pharmacologiques. C'est ainsi que l'effet médian se démarque des autres méthodes de quantification de la courbe dose-réponse. En effet, les méthodes classiques d'analyses dose-réponse sont souvent une approche statistique ou empirique et basé sur des paramètres portant sur la linéarité d'une courbe (intercepte et la pente). Ces analyses s'éloignent de l'aspect biologique et souvent simple d'un système. Une des lacunes sérieuses de ces méthodes est de vouloir harmoniser des courbes statistiques avec les données expérimentales, mais sans guide théorique fondamental, les paramètres de probabilité, de signification et de variabilité, ainsi que les écarts-types, ne peuvent décrire que faiblement la relation dose-réponse (Chou et Rideout, 1991).

Avec la loi d'action de masse comme base, ceci permet d'élargir les champs d'application de l'effet médian en décrivant non seulement la relation dose-réponse des médicaments sur des systèmes de premier ordre, mais celle de médicaments combinés sur des systèmes d'ordres plus élevés, d'où l'équation de l'effet multiple des médicaments (Chou et Talalay, 1977, 1981, 1984) proposé pour la quantification des interactions de médicaments au mode d'action mutuellement non exclusif.

Pour déterminer la synergie, l'antagonisme, ou l'addition, Chou et Talalay (1984) proposent trois étapes: (1) générer un graphique de l'équation d'effet médian pour déterminer D et D_m pour chaque agent seul et leur association, (2) calculer la dose correspondante à un certain pourcentage d'effets à l'aide d'une des équations d'effet médian, et finalement, (3) calculer l'index de combinaison (IC) avec $D_{x_{1,2}}$ disséqués en D_1 et D_2 par rapport à leur ratio. Des valeurs IC plus petites, égales, ou plus grandes que 1 représentent la synergie, l'addition, ou l'antagonisme, respectivement (Chou et Rideout, 1991).

Un graphique représentant ces index de combinaisons comme fonction d'un ou plusieurs effets particuliers s'appelle un graphique Fa-CI (Fig. 1.9) (Chou et Talalay, 1984). Dans des travaux subséquents, Chou (Chou et Chou, 1989) développe un logiciel pour générer les Fa-CI et les isobogrammes. Pour cette étude, nous employons la version récente: Calcsyn de Biosoft (Ferguson, MO, USA).

En général, le principe de l'effet médian, au lieu d'adapter une courbe à un ensemble de données, permet d'adapter ces données à une théorie : la loi d'action de masse. Cette méthode d'évaluation a amplement fait ces preuves et peut être retrouvée dans des centaines de publications médicales, plus particulièrement celles traitant la chimiothérapie et l'immunosuppression. Dans nos études, nous utilisons l'effet médian pour évaluer l'association d'immunosuppresseurs mutuellement non-exclusifs. Puisque les m de D_m pour chaque agent seul sont disponibles, nous pouvons calculer les niveaux d'index de combinaison de chaque association (Fig. 1.10 et Table I).

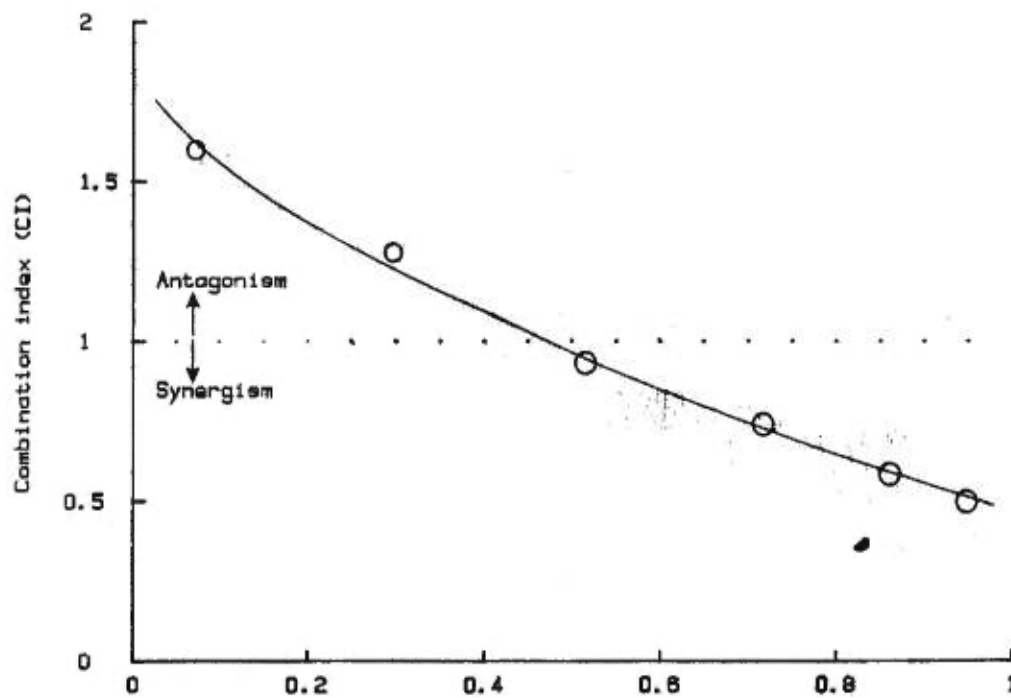


FIGURE 1.9 : Exemple de graphique Fa-IC. La courbe représente le IC pour l'effet de différentes doses. (Pris de Chou T-C, Rideout DC. **Synergism, Antagonism, and potentiation in chemotherapy: An Overview.** Dans es Synergism, and Antagonism in Chemotherapy. Academic Press. NY. 1991; P6).

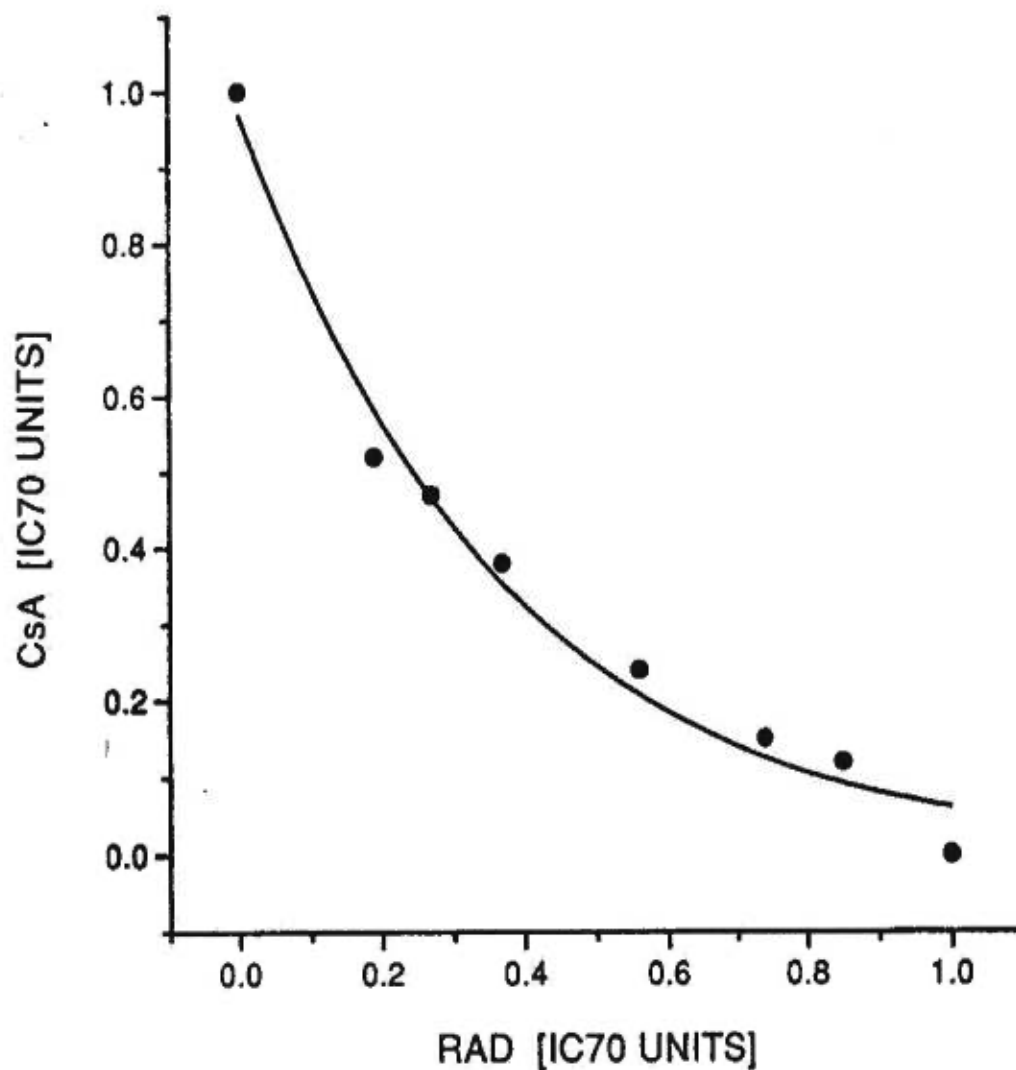


FIGURE 1.10: Graphique d'isobologramme de la combinaison de la CsA et SDZ RAD. La courbe représente l'effet équipotent pour chaque dose des axes x et y. Une interaction synergique entre les deux agents est indiquée. (Pris de Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, Joweegensen J, Meerloo T, Sedrani R, Tanner M, Zenke G, Schuler W. SDZ RAD, A New Rapamycin Derivative: Synergism with Cyclosporine. *Transplantation* 64(1);1997:p32).

Écart de CI	Symbole	Description
< 0.1	+++++	Synergisme Très Fort
0.1-0.3	++++	Synergisme Fort
0.3-0.7	+++	Synergisme
0.7-0.85	++	Synergisme Modéré
0.85-0.90	+	Synergisme Faible
0.9-1.10	±	Additivité
1.10-1.2	-	Antagonisme Faible
1.20-1.45	--	Antagonisme Modéré
1.45-3.3	---	Antagonisme
3.3-10	----	Antagonisme Fort
> 10	-----	Antagonisme Très Fort

TABLE I : Interprétation de la valeur de l'index de combinaison et des différents niveaux de synergie et d'antagonisme. Des valeurs plus petites que 1 indiquent la synergie, plus grandes que 1, l'antagonisme. Il y a addition quand CI est égale à 1(Adapté de Chou T-C, Rideout DC. **Synergism, Antagonism, and potentiation in chemotherapy: An Overview.** Dans es Synergism and Antagonism in Chemotherapy. Academic Press. NY. 1991: p226).

1.6.0 LA TRANSPLANTATION DE L'INTESTIN GRÊLE

La transplantation d'organes est améliorée par les nouveaux traitements immunosuppresseurs. En effet, il est maintenant possible de transplanter presque tous les organes et assurer au receveur au moins un an de santé. Ce succès n'est malheureusement pas observé dans la transplantation de l'intestin grêle. Bien que l'opération soit réussie, les receveurs meurent dans les mois qui suivent; il semble qu'aucune immunosuppression ne puisse surmonter le puissant stimulus antigénique provenant des mésentères (Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999). Pourtant, transplanter l'intestin grêle devient le traitement ultime pour les patients souffrant de déficience intestinale chronique, de la maladie de Crohn, de tumeurs intestinales et de thromboses. Bien que la nutrition parentérale totale (TPN) représente, avec un taux de morbidité bas, une alternative à la transplantation, elle coûte entre 145 000 et 290 000 CDN\$ par ans et impose des conditions de vie intenable, entraînant des complications sévères. La transplantation intestinale est nécessaire aussi chez les enfants souffrant d'anomalies congénitales tels que le volvulus gastroschisis, l'atrésie intestinale, et la nécrose entérocolitique. (Frezza *et al.*, 1996; Jan *et al.*, 1999; Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Ce n'est qu'en 1989 qu'a lieu la première réussite dans ce domaine par Grant: succès largement dû aux progrès faits en immunosuppression, notamment avec la CsA (Grant *et*

al., 1990). Un an plus tard, avec le tacrolimus comme thérapie de base, de nouveaux essais cliniques sont entrepris à Pittsburgh sur 94 patients entre 1990 et 1997. Et quoique le succès de ces essais soit mitigé (48%), la transplantation intestinale devient une procédure réalisable mais pas au même titre que celle des autres organes (Abu-Elmagd *et al.*, 1998).

Poursuivre les essais de nouvelles thérapies immunosuppressives spécifiques à la transplantation intestinale demeure un intérêt. Dans le cadre de cette recherche, il faut prendre en considération que les aspects chirurgicaux et immunologiques sont vastes et requièrent une compréhension intégrale de l'anatomie de l'intestin et des études antérieures faites avec chaque agent dans chaque modèle.

Aujourd'hui, nous devons la plupart des progrès faits en transplantation intestinale aux résultats d'opérations pratiquées sur des animaux. Depuis la première transplantation canine par Lillehei en 1959, les modèles canins, porcins, et rongeurs n'ont cessé de fournir aux cliniciens la possibilité d'étudier d'importants concepts: les nouveaux immunosuppresseurs, des techniques chirurgicales, les maladies GVH et HVG, la physiologie de la transplantation, et l'immunomodulation (Gruessner *et al.*, 1998; Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999). Toutes les études d'association d'immunosuppresseurs ou d'agents particuliers se font dans le modèle animal avant d'être réalisé en clinique. C'est lors de cette étape que la thérapie idéale pour la transplantation intestinale sera développée. C'est pourquoi, comprendre les résultats obtenus avec le modèle animal est essentiel au développement de stratégies cliniques adéquates.

1.6.2 Chirurgie de la transplantation intestinale

L'aspect chirurgical présente aussi des défis importants à la réussite des transplantations de l'intestins. En effet, l'intestin est un organe de grande taille dont l'anatomie comprend plusieurs segments ayant des différences de fonction et de constitution immunologique. La transplantation de l'intestin chez l'humain a débuté il y a à peine dix ans. Par conséquent, son aspect chirurgical demeure encore expérimental et très diversifié. En clinique, il y a trois types de transplantation intestinale: la transplantation de l'intestin isolé, la transplantation simultanée de l'intestin et du foie et la transplantation multiviscérale. La première option thérapeutique est la transplantation isolée, mais dans des rares cas où il y a cirrhose hépatique évolutive ou certaines tumeurs associées, le foie ou d'autres organes peuvent accompagner l'intestin (Goulet *et al.*, 1996).

Certains aspects des méthodes de prélèvement et de transplantation de l'intestin sont bien détaillés (avec quelques variations dépendant du cas) à la fois dans le milieu clinique (Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999) et pré-clinique (Chen *et al.*, 1998; Chen, Xu, *et al.*, 1998; 1991). L'abord de l'abdomen du donneur et du receveur se fait par une incision xypho-pubienne. L'intestin grêle est sectionné en aval du ligament de Treitz et de la valve iléo-cæcale (Le colon ne fait pas partie du greffon: bien que son inclusion ait été suggérée pour limiter les épisodes sévères de diarrhée, le colon d'un donneur ne fait qu'aggraver les crises de rejet et l'endotoxémie (Gruessner et Sharp, 1997)). L'artère et la veine mésentérique supérieure sont disséqués. La transplantation elle-même se fait par anastomose des extrémités intestinales du greffon à celles du receveur. Le greffon est revascularisé par anastomose des vaisseaux mésentériques, de l'artère à l'aorte, et de la veine porte à soit la veine porte ou directement à la veine cave dorsale du receveur.

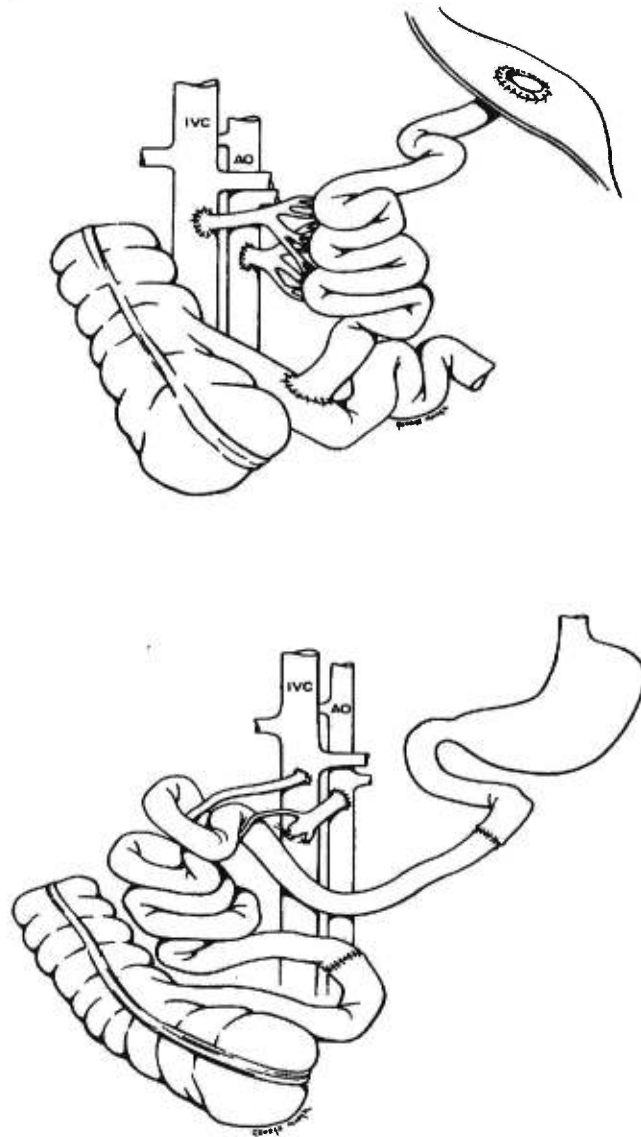


FIGURE 1.11: Modèles de transplantation de l'intestin grêle de rat. Haut: modèle hétérotopique avec extériorisation d'une extrémité. Bas: modèle orthotopique; continuité fonctionnelle avec l'intestin du receveur. (Pris de Zhong R, Grant D, Sutherland F, Wang PZ, Chen H, Lo S, Stiller C, et Duff J. **Refined Technique for Intestinal Transplantation in the Rat.** *Microsurgery* 12:1991: p268).

Ces variations de résection veineuse permettent un drainage mésentérique soit par voie portale allant au foie, soit par voie systémique entrant directement dans la circulation sanguine. Selon des études faites sur le cochon (Kaneko *et al.*, 1991) et chez l'humain (Gruessner et Sharp, 1997), une méthode ne semble pas être plus avantageuse que l'autre.

Il y a aussi plusieurs variations dans l'utilisation des techniques de transplantation intestinale utilisées, notamment chez les animaux. Celles-ci donnent de la flexibilité aux protocoles chirurgicaux, permettant aux cliniciens d'isoler certains paramètres propres à l'étude. Il existe généralement deux types de transplantation (Fig. 1.11): orthotopique, la continuité du greffon avec l'intestin du receveur et hétérotopique, aucune continuité; c'est-à-dire que le greffon est placé de manière à ne pas remplir sa fonction physiologique ou dans une position anatomique qui n'est pas la sienne. Dans les modèles animaux, le greffon peut aussi être segmenté, ou associé avec un autre organe et ensuite attaché aux vaisseaux jugulaires ou aortiques (Gruessner, 1998). Une transplantation hétérotopique servirait à isoler des aspects de la transplantation intestinale tel que la synergie, la survie du greffon, et le côté histologique du rejet. La méthode orthotopique, étant plus démonstrative de la physiologie, permettrait d'étudier la transplantation intestinale globalement, en incluant tous les paramètres: la survie, l'absorption, la synergie, le rejet, le métabolisme, et les concentrations sanguines d'un agent administré. Étant donné que la méthode orthotopique génère des crises de rejet plus fréquentes et intenses, certains groupes proposent une méthode où l'intestin est transplanté en deux étapes: hétérotopiquement, où les extrémités intestinales transplantées sont extériorisées jusqu'à la fin des crises de rejet, suivi du remplacement de l'intestin du receveur où les extrémités du greffon sont anastomosées à celles du receveur (Nakai *et al.*, 1999).

1.6.3 Le Rejet

L'abondance des plaques de Payers et des nodules lymphatiques autour des intestins font du rejet la cause principale des complications postopératoires. En effet, l'intestin grêle est un organe complexe qui requiert que ces nodules soient greffés au receveur, c'est-à-dire inclus dans le greffon. C'est ainsi que sont présentés les HLA-CMH de classes II natifs, responsables de l'abondance des stimuli antigéniques. Encore une fois, le rejet est causé par l'activation des CTL, des CD4+, et des CD8+. Dans les sept jours qui suivent l'opération, ces cellules migrent en grand nombre dans le greffon et procèdent à une destruction des cellules intestinales. Cette forme de rejet se nomme hôte-vs-greffe (HVG: *Host-vs-Graft Disease*). Cette réaction immunitaire est à double sens: en effet, les CTL, NK, et macrophages provenant des lymphatiques mésentériques du greffon réagissent aussi et infiltrent le corps du receveur pour engendrer la réaction greffe-vs-hôte (GVH). Ces réactions immunitaires se caractérisent par des inflammations cutanées, des diarrhées sévères, et la perte de poids et de cheveux (Nakai *et al.*, 1999). En général, les manifestations cliniques du rejet vont de la fièvre à la distension abdominale et au changement de taux d'excrétion fécale pour le rejet modéré. Durant une crise aiguë, il y a perte de mucosité, perte complète de motilité et des hémorragies intra-cavitaires. Dans certain cas, il peut y avoir un transfert de bactéries intestinales dans l'abdomen, de l'acidose métabolique, un choc septique, et même des insuffisances respiratoires. Dans les cas extrêmes, des ulcères peuvent se former et provoquer des hémorragies internes (Tzakis et Gruessner, 1998; Jan *et al.*, 1999). La mise en évidence de ces manifestations repose sur leur diagnostique histologique par biopsie. De ce point de vue, le rejet est identifié par l'apparition de destruction glandulaire, de nécrose cryptique, de lésions épithéliales, et d'atrophie villositaire totale (Goulet *et al.*, 1996).

1.6.4 L'immunosuppression actuelle et ses limites

Dans la plupart des centres de transplantation, la CsA reste la thérapie immunosuppressive de base pour la transplantation intestinale. Récemment, le tacrolimus (FK506) c'est révélé plus efficace pour les transplantations simultanées d'intestin et de foie (Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999). La thérapie est souvent administrée par voie intraveineuse quoiqu'un greffon fonctionnel soit en mesure d'absorber un traitement oral (Kahan et Ghobrial, 1994). Il arrive aussi que le méthylprednisolone, l'OKT-3, la cyclophosphamide et le mycophénolate mofétil soient administrés mais sans succès. Certaines équipes ont même recours à des infusions de la moelle osseuse du donneur au receveur pour induire un état chimérique: si les cellules hématopoïétiques infusées parviennent à détruire les lymphocytes T réactifs contre le donneur, alors un état de tolérance peut être induit (Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999).

Les protocoles de transplantation intestinale ne sont pas encore définis, et avec des taux de rejet de 80%, il est clair qu'il n'existe encore aucun régime offrant une protection adéquate. Les recherches courantes visent à trouver des agents qui pourraient minimiser la fréquence et sévérité des crises de rejet, tout en limitant les infections et les maladies prolifératives (Grant; dans es Ginns *et al.*, 1999). Évidemment, minimiser la toxicité des agents reste toujours un défi. C'est pourquoi les cliniciens s'attardent sur des tests de nouvelles associations.

1.6.5.1 Tacrolimus

On assiste actuellement à l'émergence du tacrolimus (FK506) comme thérapie de base donnant des résultats similaires à ceux de la thérapie avec la CsA pour tous les autres organes. En ce qui concerne la transplantation de l'intestin, les études précliniques chez le cochon semblent montrer que la thérapie intraveineuse à base du tacrolimus est plus efficace que celle à base de la CsA (Gruessner, 1998). Le tacrolimus commence donc à être considéré comme l'immunosuppresseur de choix dans ce type de transplantation et ce, même en clinique: en effet, le *Registre International de Transplantation Intestinale* montre que pour ce qui est de la transplantation d'intestin isolé, le tacrolimus donne de meilleurs résultats de survie (Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999). Il y a donc une tendance de vouloir remplacer la CsA par le tacrolimus pour la transplantation intestinale.

Mais, malgré ses propriétés intéressantes, le tacrolimus est aussi néphrotoxique que la CsA, et sa neurotoxicité et ses effets hyperglycémiques, plus fréquents (Rayhill et Sollinger; Dans es Ginns *et al.*, 1999). De plus, dans les transplantations intestinales, puisque la survie du greffon dépend de ses propres fonctions, les questions d'absorption deviennent primordiales. Une étude clinique faite après une transplantation intestinale démontre que l'absorption et la biodisponibilité du tacrolimus, 2%, sont aussi problématiques, sinon pires, que celles de la CsA, 6%). Par ailleurs, le tacrolimus est sujet au métabolisme par la cytochrome P450 IIIA intestinale et à la liaison aux P-Gp (Kaplan *et al.*, 1999). On tente actuellement, par certaines études de minimiser la toxicité du tacrolimus en l'associant avec un agent aussi puissant, comme le sirolimus. Mais, avec un modèle hétérotopique animal de transplantation intestinale, les moyennes de temps de survie n'indiquent que des interactions additives entre les deux médicaments (Chen, Qi *et al.*, 1998). D'autres études en transplantation intestinale démontrent que

l'association du sirolimus et du tacrolimus ne s'avère guère efficace, en fait, une augmentation des GVH en résulte (Cohen *et al.*, 1996). Jusqu'à présent, tacrolimus ne se montre effectif qu'en association avec des glucocorticostéroïdes (Trie-Thérapie) ou le mycophénolate mofétil (Alessiani *et al.*, 1996). Aucune interactions synergiques entre le tacrolimus et d'autres agents n'ont été rapportées dans les modèles de transplantation intestinale. Il est donc important de continuer à d'évaluer d'autres alternatives à celle du tacrolimus.

1.6.5.2 Cyclosporine A et Néoral

Bien qu'étant moins neurotoxique que le tacrolimus, la CsA reste néanmoins un des agents les plus néphrotoxiques. Les thérapies ayant pour base la formulation classique de la CsA, Sandimmune, restent toujours variables au point de vue de l'absorption et de la biodisponibilité, donc imprévisibles. L'absorption est un aspect capital de la transplantation, principalement dans les Transplantations intestinales. Un greffon intestinal subit des détériorations de ses fonctions tel que l'absorption de matières grasses et ses paramètres électrophysiologiques (Sigalet *et al.*, 1992). Ceci pousse plusieurs chercheurs à administrer la thérapie par voie parentérale ou intraveineuse (Gruessner *et al.*, 1998). La mise sur le marché de la nouvelle formulation de la CsA, Néoral, pourrait permettre une thérapie orale tout en surmontant les problèmes d'absorption de la CsA. Il est maintenant reconnu que grâce à sa dispersion sur la surface entière de l'intestin, Néoral permet des taux d'absorption et une pharmacocinétique plus constante et prévisible que Sandimmune (Voir section 1.6.5.2). Des études précliniques démontrent que ces améliorations sont maintenues même dans les modèles porcins de transplantation intestinale. En effet, les niveaux d'absorption de Sandimmune diminuaient tandis que ceux de Néoral restaient stables (Rossi *et al.*, 1998). De tels résultats présupposent des

applications cliniques pour l'administration de Néoral en transplantation intestinale. En transplantation rénale chez l'humain, des études faites par le *International Sandimmun Neoral Study Group* démontrent que Néoral est mieux absorbé que Sandimmune, mais sans toutefois augmenter la toxicité de la CsA pour le greffon ou pour le receveur (Frei *et al.*, 1998). Néoral étant déjà utilisé en clinique comme un agent idéal; il ne reste qu'à évaluer son efficacité en transplantation intestinale.

Il est bien connu que chaque agent, aussi puissant qu'il soit, n'est pas aussi efficace seul. En effet, la révolution apportée en transplantation par la CsA était en association avec d'autres agents allant des glucocorticostéroïdes aux antiprolifératifs. Même en transplantation intestinale, la monothérapie de la CsA ne s'avère effective qu'à doses élevées (15-25mg/kg/j) (Saat *et al.*, 1990). De plus, minimiser les effets toxiques d'un agent ne se fait qu'en diminuant sa posologie. Avec certaines associations, où les médicaments décuplent mutuellement leurs puissances, il devient alors possible de diminuer leur posologie tout en la augmentant la potentiel de la thérapie: d'ou la nécessité d'associer Néoral avec un autre agent immunosuppresseur.

1.6.5.3 Sirolimus et SDZ RAD

Un dérivé du macrolide fongique, sirolimus (rapamycine), fait son entrée dans l'arène des immunosuppresseurs. Les propriétés immunosuppressives du sirolimus sont déjà bien établies en clinique, dans la transplantation rénale et cardiaque. En effet, le sirolimus est reconnu comme étant un antiprolifératif 10 à 100 fois plus puissant que la CsA. Il se trouve aussi que les effets immunosuppresseurs du sirolimus et de son dérivé, le SDZ RAD, sont, dans certains modèles de transplantation, synergiques ou additifs à ceux de plusieurs agents, entre autres la CsA, le tacrolimus, et le mycophénolate mofétil.

Cette synergie est due à l'inhibition d'une voie de signalisation différente de celles des autres agents. Le SDZ-RAD est conçu pour améliorer l'absorption du sirolimus tout en maintenant sa capacité antiproliférative (voir SDZ RAD pour un revue complète de sirolimus et SDZ RAD).

Dans la transplantation intestinale, les recherches sur les effets du sirolimus demeurent en phase préclinique dans les modèles rongeurs et porcins. Chez le rat, le sirolimus prolonge la survie des allogreffes intestinales de façon significative, et ce, même à des doses de 0.08 mg/kg/j à 0.8 mg/kg/j (Stepkowski *et al.*, 1991; Marquet *et al.*, 1993). La synergie entre le sirolimus et la CsA est bien documentée. Les rares études faites en transplantation intestinale démontrent une augmentation significative du temps de survie des receveurs quand le sirolimus et la CsA sont associés (Chen *et al.*, 1996). Les études faites en transplantation intestinale, impliquant le sirolimus et la CsA, visent souvent à évaluer des paramètres autres que la synergie des deux agents; ceci atteste de la confiance acquise par rapport à l'efficacité des effets sirolimus\CsA (Wang *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1996). Quand au SDZ RAD, aucune étude n'a encore été publiée sur ses effets en transplantation intestinale. Mais ses interactions synergiques avec la CsA sont aussi bien documentées, au même titre que le sirolimus, c'est-à-dire dans tous les modèles sauf celui de la transplantation intestinale. En fait, des essais cliniques de phase I sont déjà entamés afin de tester la cinétique de SDZ RAD (de 0.75 à 7.5 mg/j) ajouté à un régime Néoral/prednisone en transplantation rénale (Kahan *et al.*, 1999).

La formulation Néoral et le SDZ-RAD sont deux agents à cinétique d'absorption améliorée, ce qui permet une réduction de leurs doses; ils agissent de façon synergique sur la survie d'un allogreffe et sont très bien tolérés en clinique. Les deux

immunosuppresseurs dont ils sont dérivés ont déjà fait leur preuve en transplantation d'organe, mais en transplantation d'intestin, des lacunes sur l'efficacité des thérapies persistent. Ces aspects, notamment la cinétique d'absorption, rendent Néoral et le SDZ-RAD particulièrement intéressants comme thérapie immunosuppressive en transplantation intestinale. En effet, l'association de ces deux agents pourrait offrir une alternative à la trié-thérapie courante en transplantation intestinale, notamment du fait que cette dernière impose toujours des effets secondaires. L'efficacité de sirolimus/CsA, quoique établie, demeure incertaine, par manque de résultats en transplantation intestinale. En effet, à cause des difficultés techniques et immunologiques associées avec les modèles de transplantation intestinale, rares sont les groupes qui s'attardent sur l'aspect expérimental sur ce modèle. L'association de SDZ-RAD/Néoral émerge en clinique comme une thérapie plus efficace que l'immunosuppression classique en transplantation rénale, cardiaque, et pulmonaire, mais cette association reste encore à être évalué dans un modèle de transplantation intestinale.

1.7.0 BUT DU PROJET

Il y a donc, en transplantation de l'intestin grêle, un besoin de nouvelles stratégies immunosuppressives. Nous avons pris pour but d'évaluer les formulations améliorées de la CsA et du sirolimus et de vérifier les effets de leur association sur la survie du receveur dans un modèle de transplantation intestinale. Nous désirions de plus nous assurer de la nature et de l'efficacité de cette association dans un modèle de transplantation parmi les plus difficiles. Nous voulions aussi renforcer le modèle préclinique de transplantation intestinale en espérant que nos résultats diversifieraient des données disponibles nécessaires à l'utilisation d'un régime prophylactique en phase clinique. Notre hypothèse est que les effets synergiques de la CsA et du sirolimus, démontrés en transplantation de cœur, de rein, et de foie, seront reproduits dans un modèle orthotopique de transplantation d'intestin grêle avec cette fois-ci, en guise de traitement, l'association d'un analogue du sirolimus, le SDZ RAD, et d'une formulation de la CsA, le Néoral, administré à un ratio de 1:2.

1.7.1 Protocole

Huit groupes (n=6) recevaient une transplantation de l'intestin grêle selon trois combinaisons pour évaluer le rejet unidirectionnel (HVG), (LBN-F1→LEW), le rejet GVH unidirectionnel (LEW→LBN-F1), et la présence des deux réactions immunitaires (BN→LEW). En guise de contrôle, le groupe 1, les allogreffes, ne recevait aucun traitement. Les groupes 2 et 3 recevaient la monothérapie de SDZ RAD par voie orale à 1.0 et 2.5 mg/kg/j respectivement. Les groupes 4 et 5 recevaient Néoral par voie orale à 2.0 et 5.0 mg/kg/j respectivement. Le groupe 6 recevait la thérapie mixte, 1.0 mg/kg/j de SDZ RAD et 2.0 mg/kg/j de Néoral. Le groupe 7 recevait le SDZ RAD à 2.5 mg/kg/j et le Néoral à 5.0

mg/kg/j. Le traitement durait toute l'étude. Le groupe 8, récipient d'isogreffes (Lew→Lew), constituait le deuxième contrôle .

1.7.2 Modèle animal

Nous avons choisi d'évaluer notre hypothèse dans un modèle de transplantation intestinale de rat. Les rongeurs sont utiles par leur expression des mêmes événements immunitaires observés chez d'autres animaux et aussi chez l'homme. Ils constituent des modèles bien étudiés, relativement peu coûteux, donc idéaux aux évaluations préliminaires de nouvelles associations thérapeutiques (Saat *et al.*, 1990). La disponibilité de types consanguins nous permet d'isoler des paramètres immunologiques spécifiques: les maladies hôtes-versus-greffe (HGV) et greffe-vs-hôte (GVH) (Chen, et Corman, 1998). Nous avons choisi d'utiliser les rats Lewis (LEW) et Brown Norway (BN) et leur progéniture, L-BN-F1 de Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). Les allogreffes parentaux transplantés aux progénitures (LEW ou BN→LBN-F1) produisent les GVH unilatéralement, tandis que transplanter les allogreffes des progénitures aux parents (LBN-F1→LEW ou BN) produit le rejet de greffe, HVG. Les deux réactions immunitaires sont présentés dans la transplantation entre parents des deux types (BN→LEW). Pour isoler les paramètres non-immunologiques, tel que les traumas ischémiques ou opératoires, la transplantation se fait entre rats de la même souche: l'isogreffe (LEW→LEW).

1.7.3 Doses de médicaments

Nous avons choisi les doses par rapport au ratio idéal à la synergie du SDZ RAD et de Néoral. Les recherches faites chez Novartis (Schuurman *et al.*, 1997) ont établi que des associations de 1.0 et 2.0 mg de CsA avec 0.5 et 2mg de SDZ RAD donnaient des IC de 0.3 et 0.7 en transplantation cardiaque et rénale chez le rat. Basé aussi sur nos résultats précédents

avec le sirolimus, à 2.0 et 4.0 mg, et la CsA, à 4.0 mg, en Transplantation d'intestin grêle (Chen *et al.*, 1996), nous avons choisi d'administrer les agent à un ratio de 1:2, soit 2.0 et 5.0mg de Néoral et 1.0 et 2.5mg de SDZ RAD. Des doses plus élevées de SDZ RAD induisent des pertes de poids sévères chez les rongeurs (Schuurman *et al.*, 1997). Nous voulions une thérapie à petite dose, permettant un effet minimum sur la survie pour des fins de comparaison, et une thérapie à dose élevée permettant des effets maximaux sans toutefois induire une toxicité désavantageuse à sa survie.

Les formulation et microémulsion du SDZ RAD et du Néoral étaient un don de Novartis Pharmaceuticals, Inc., Basel, en Suisse. Une solution de SDZ RAD orale (20mg/ml) était entreposée à 4°C et diluée dans une solution de 5% de glucose avant d'être administrée en volume final de 10 ml/kg. La micro-émulsion de Néoral (100 mg/ml) était maintenue à température ambiante et administrée sans dilution. Les traitements ont débuté immédiatement après la transplantation et ont été maintenus durant toute l'étude. Les traitements étaient administrée par voie orale, et leurs doses étaient déterminée par rapport au poids journalier de l'animal (mg/kg/j).

1.7.4 Modèle Chirurgical

Nous avons choisi la méthode orthotopique de transplantation, bien qu'elle soit plus immunogénique, c'est-à-dire qu'elle provoque des crises de rejet plus intenses qu'avec la méthode hétérotopique (Grant *et al.*, 1991). La méthode orthotopique reflète mieux les phénomènes reliés à la transplantation par sa continuité anatomique avec l'intestin du receveur. De plus, notre projet puise son importance de l'absorption par l'intestin, d'une thérapie orale, justifiant notre choix d'une méthode qui permet l'étude de l'organe dans son contexte anatomique.

Le modèle chirurgical a été adapté de Zhong (Figure 1.12) (Zhong *et al.*, 1991). Il est bien établi dans notre laboratoire (Chen *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996). Le donneur et le receveur sont préparés un jour à l'avance en recevant seulement une solution de 5% de dextrose et de 0.9% de chlorure de sodium. L'anesthésie est faite par injection intrapéritonéale de 40mg/kg de pentobarbital (Somnotol) dilué dans de la chlorure de sodium 0.9% (Baxter, Ontario CA). L'intestin grêle est isolé à 1 cm en aval du ligament de Treitz et à 4 cm en amont du caecum. L'organe est ensuite perfusé *in situ* avec 2 ml d'Euro-Collins hépariné à 4 C. Le jéjunum, l'iléum, les nodules mésentériques adjacents, la veine porte, et l'artère mésentérique sont prélevés en bloc et préservés dans de l'Euro-Collins à 4 C. Le greffon est revascularisé selon la méthode cavale: anastomoses termino-latérales entre l'aorte du receveur et l'artère mésentérique du donneur et entre la veine cave inférieure du receveur et la veine porte du donneur. Des sutures 10-0 en nylon sont utilisées.

Les extrémités de l'intestin transplanté sont mises en continuité avec l'intestin du receveur par anastomose termino-terminales. Nous avons maintenu le temps d'ischémie froide en deçà de 45 minutes minimisant ainsi les dommages ischémiques au greffon. Après l'opération, les animaux recevaient 5 à 8 ml de fluide par voie intraveineuse pour contrer la déshydratation ou perte de sang. Les animaux morts durant les trois jours postopératoires étaient considérés comme des échecs techniques et étaient exclus de l'analyse du protocole.

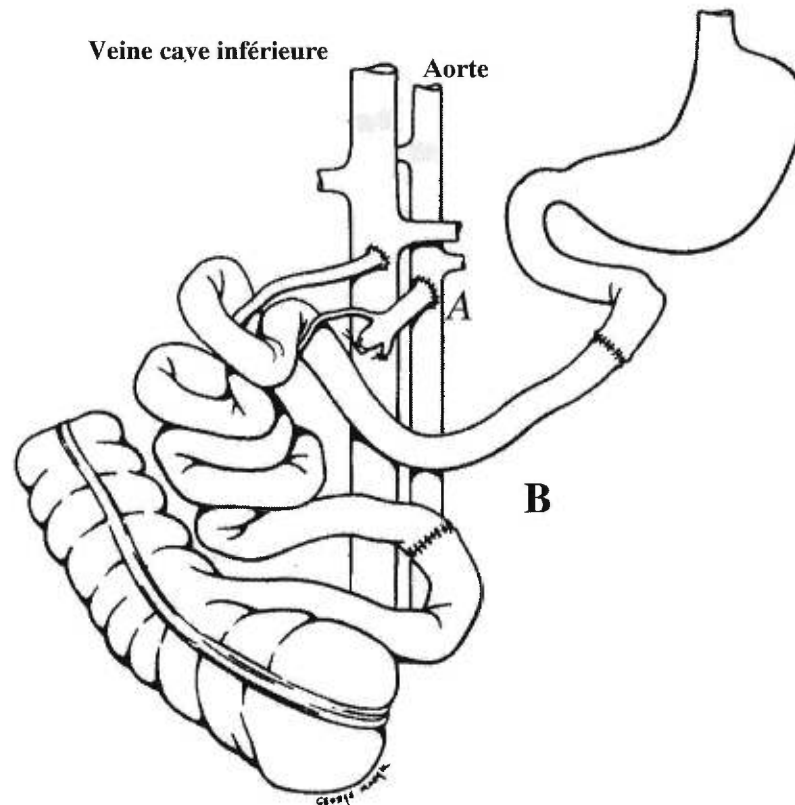


Figure 1.12 Transplantation orthotopique de l'intestin grêle du rat. La mise en place de du greffon est réalisée par anastomose termino-latérale entre l'artère mésentérique du donneur et l'aorte du receveur et entre la veine porte du donneur et la veine cave receveur (A). Les extrémités intestinales sont jointes par anastomoses termino-terminales. Le greffon est placé en continuité anatomique et physiologique chez le receveur (pris de Grant D, Zhong R, Hurlbut D, Garcia B, Chen H, Lamont D, Wang P, Stiller C, Duff J. **A comparison of Heterotopic and Orthotopic Intestinal Transplantation in Rats.** *Transplantation* 51; 1991: p949).

1.7.5 Évaluation du greffon

Survie du receveur

Un examen visuel des rats était fait en guise de contrôle de la survie du greffon. Les deux paramètres du rejet de greffe, les maladies GVH et les HVG, peuvent être diagnostiqués visuellement. Les critères visuels des GVH se manifestent n'importe quand après la première semaine de survie. Ils incluent la perte graduelle de poids, l'inflammation cutanée et la cachexie. Durant les dernières semaines de survie, les douleurs abdominales induites par les crises de rejet entraînent un changement de posture, tel que le voûtement du dos, chez l'animal. Les critères cellulaires des GVH sont des changements histologiques tels que la dermatite, l'infiltration d'immunoblastes et des dommages généraux aux organes du receveur (Grant, 1989). Les maladies HVG de l'intestin se caractérisent par le développement d'une masse abdominale palpable, de faiblesse, de perte de poids. Ces symptômes se manifestent n'importe quand suivant la première semaine de survie. L'infiltration de lymphocytes dans les parois de l'intestin, la perte de cellules Goblet, la cryptite et l'amincissement des villi sont des critères histologiques des HVG (Garcia *et al.*, 1990). Nous avons utilisé les critères visuels pour évaluer l'état du greffon durant la survie, et les critères histologiques durant la nécropsie.

Tests de fonction

Nous avons choisi d'évaluer la santé du greffon à l'aide de deux tests de fonction: l'absorption de maltose, et la perméabilité au $^{51}\text{Cr-EDTA}$. L'intestin non seulement absorber les aliments, mais il offre aussi une barrière physique entre la lumière intestinale et la circulation sanguine. Il est bien établi que l'intestin transplanté voit ces fonctions diminuées

soit par le choc ischémique, par le trauma opératoire et même par les crises de rejet (Sigalet *et al.*, 1992). Les différents paramètres de la fonction intestinale peuvent donc être évalués en suivant leurs fluctuations.

Absorption de Maltose: Il y a plusieurs tests de fonction utilisés en recherche préclinique qui détectent la présence d'enzymes et de marqueurs moléculaires nécessaires à l'absorption: la monoamine oxydase, la maltase, la diamine oxydase, la sucrase, et l'aminopeptidase. Ces enzymes contribuent au métabolisme de certains aliments, dont la présence dans le flot sanguin est indicative de l'intégrité de la fonction intestinale (Gruessner, 1998). Le test d'absorption de maltose est reconnu comme étant sensible au rejet de greffe intestinal. En effet, les taux de maltose sanguin varient selon la présence de crises de rejet puisque l'enzyme maltase ne fonctionne que dans les membranes à bordures en brosse intactes (Billiar, 1984).

Le test était réalisé une fois par semaine pendant quatre semaines. les rats étaient gavés avec une solution de maltose de 500 mg/kg. Les niveaux de glucose plasmatique étaient mesurés à 30 minutes d'intervalle, d'abord avant l'ingestion (0), puis à 30 minutes, 50 minutes, et 90 minutes suivant l'ingestion. Seules les groupes 3, 5, 6 et 7 étaient évalués pendant quatre semaines suivant la transplantation.

Les différences de taux de glucose entre les groupes expérimentaux et les prélèvements hebdomadaires étaient évaluées avec le test 3-way Anova suivit du Test de Comparaison Multiple de Tukey (Sigmastat 2.0, Jandel Scientific, USA).

Perméabilité au ⁵¹Cr-EDTA: Les tests de barrière intestinale sont aussi indicateurs de l'état de l'intestin. Plusieurs marqueurs sont disponibles: le Cr-EDTA, le DTPA, le PEG-400

et le mannitol (Gruessner, 1998). Le principe justifiant ces méthodes est que la présence d'une de ces quatre molécules, qui en temps normal seraient trop grosses pour traverser l'intestin, dans l'urine est indicative d'une augmentation de perméabilité due à l'installation du rejet. Les tests au ^{51}Cr -EDTA sont considérés comme étant les plus sensibles. Le chromium ethylène-diamine-tetra-acétate est une molécule inerte de 358 Daltons qui durant la présence d'épisodes de rejet, se faufile à travers les jonctions serrées des villi endommagés par les traumas immunitaires pour se retrouver dans la circulation sanguine et être ensuite excrétée par la voie urinaire (Grant *et al.*, 1989; 1991).

La solution mère était préparée en ajoutant 150 μCi de ^{51}Cr -EDTA (*1mCi/10ml) (Amersham International Inc.) à 50 ml d'eau distillée. Trois millilitres de solution (10 μCi) étaient administrés aux rats par gavage. Des échantillons de 1 ml d'urine provenant de chaque animal était analysé en pair avec 100 μl de la solution de ^{51}Cr -EDTA dans un compteur à puits Wallac 1280 Ultrogamma pendant 30 secondes. La dose urinaire excrétée était calculée de cette façon:

$$\% \text{ d'excrétion} = \frac{\text{Moyenne du nombre de comptes/ml d'urine} \times \text{volume d'urine}}{\text{Moyenne du nombre de comptes/100}\mu\text{l standard} \times 30} \times 100$$

Les tests étaient faits une fois par semaine. Durant les tests, les animaux étaient gardés dans des cages métaboliques.

Examen post mortem

Après leur mort ou sacrifice, les animaux étaient soumis à une nécropsie, faite par un pathologiste, pour déterminer la cause de la mort et vérifier l'état des greffons. Bien que les études en transplantation soient toujours accompagnées d'histologie, nous n'avons fait aucun

examen régulier. Gruessner affirme que l'histologie régulière est sans équivoque pour évaluer l'état des greffons et l'installation du rejet (Gruessner, 1998). L'idéal serait de faire des biopsies hebdomadaires, malheureusement, les greffon transplantés de façon orthotopique sont relativement inaccessibles aux biopsies (Grant *et al.*, 1991). De plus, le rejet est diffus et peut donc être absent de la biopsie (Billiar *et al.*, 1984). Une ouverture routinière de l'abdomen pour prélèvement d'échantillons pourrait remplacer la biopsie, mais ceci aurait des répercussions négatives sur la survie. Notre étude porte principalement sur le temps de survie de l'animal et non les effets de la thérapie sur l'aspect histologique. Nous avons donc opté pour une nécropsie et utilisés des tests de fonction comme outils d'évaluation.

1.7.6 Statistiques

La survie des allogreffes était exprimée selon la moyenne de temps de survie (MTS \pm ÉT); la comparaison entre chaque groupe est faite avec l'analyse de variance ANOVA suivit du test de comparaison Dunnett (Sigma Stat, Jandel Scientific, USA). Le principe de l'effet médian (Chou, 1991; dans es Chou et Rideout, 1991), basé sur l'effet de chaque agent par rapport à sa dose, est calculé ainsi:

$$fa/fu=(D/D_m)^m$$

$$D=D_m[fa/(1-fa)]^{1/m}$$

Les symboles *fa* et *fu* représentent la fraction du système qui est affectée (% d'inhibition ou le temps de survie par rapport au témoin) et la fraction non affectée (*1-fa*), respectivement, par le médicament administré à dose D. Une protection complète (*fa*=1) est définie comme étant une survie atteignant 60 jours. Le *D_m* est la dose requise pour induire 50% d'inhibition (IC₅₀), l'effet médian en question ; le *m* est le coefficient qui décrit la fonction sigmoïdale de

la courbe dose-réponse. L'interaction entre les deux agents, soit la synergie, l'antagonisme, ou l'additivité, est mesurée avec l'index de combinaison (IC):

$$\frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} + \frac{(D)_1(D)_2}{(Dx)_1(Dx)_2} = IC$$

ou D_1 et D_2 représentent les doses de l'agent 1 et 2 en association, respectivement. Les agents D_1 et D_2 induisent $x\%$ d'inhibition dans le cas des médicaments mutuellement non-exclusifs (aux modes d'action qui diffèrent). D'après l'interprétation de Chou, un IC d'une valeur de moins de 1.0 (<1) suggère la synergie, tandis qu'un IC égale à 1.0 ($=1$) réfère à l'additivité, et un IC de plus que 1.0 (>1), l'antagonisme. Le logiciel de calcul, Calcsyn de Biosoft (Ferguson, MO, USA) était utilisé pour évaluer les paramètres dose-réponse (D_m , m , et r) et les index de combinaison.

Les analyses statistiques pour le test de maltose étaient effectuées avec le test 3-way ANOVA suivi du test de Comparaison Multiple de Tukey (Sigmastat 2.0, Jandel Scientific, USA). Le 3-way ANOVA est une analyse de variance qui permet d'évaluer les différences entre les séries de données de chaque groupe expérimental par rapport à trois facteurs. Les trois facteurs incluent dans l'analyse des taux d'absorption de maltose étaient le modèle de rejet (GVH, HVG, ...), l'immunosuppresseur et sa dose, et la semaine de la prise de sang. Une valeur p inférieure à 0.05 représentait une différence statistiquement significative.

CHAPITRE DEUX

SYNERGISTIC EFFECT OF SDZ RAD AND NEORAL IN THE INHIBITION OF GRAFT-VS-HOST AND HOST-VS-GRAFT IMMUNE RESPONSES IN RAT SMALL BOWEL TRANSPLANTATION

**SYNERGISTIC EFFECTS OF SDZ SDZ RAD AND NEORAL IN
INHIBITION OF HOST-VERSUS-GRAFT AND GRAFT-VERSUS-HOST
IMMUNE RESPONSES
IN RAT SMALL BOWEL TRANSPLANTATION¹**

Stéphane Johnson,² Shiji Qi,² Dasheng Xu,² Marc Jolicoeur,² Dingyi Liu,² Stéphane
Busque,² Christian Smeesters,² Pierre Daloze,² Huifang Chen^{2,3}

Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital,
University of Montreal, Quebec, Canada

Mailing address: Huifang Chen, MD. PhD., Laboratory of Experimental Surgery, Research
Center of CHUM, Room Y1611, Notre-Dame Hospital, University of Montreal, 1560 Sherbrooke
Street East, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada
Tel: (514) 281-6000 ext-7081; Fax: (514) 896-4679

FOOTNOTES

1. This work was supported by Novartis Pharmaceuticals Canada Inc., and in part by the Research Center of CHUM, University of Montreal.
2. Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital, University of Montreal.
3. Address and correspondence to Huifang Chen, MD. PhD., Laboratory of Experimental Surgery, Research Center of CHUM, Room Y1611, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke St. East, Montreal, Quebec. H2L 4M1, Canada. E-mail: chenhu@ere.umontreal.ca

ABBREVIATIONS

CsA, cyclosporine; SDZ SDZ RAD, rapamycin derivative; LEW, Lewis; BN, Brown Norway; LBN-F1, Lewis x Brown Norway first generation, MST, mean survival time; HVG, host-versus-graft disease; GVH, graft-versus-host disease.

ABSTRACT

The combined effects of SDZ RAD and Neoral were tested in a rat orthotopic small bowel transplantation model.

Methods: Eight groups (n=6) were involved in this study, and each one was included in three combinations for the evaluation of host-versus-graft disease (HVG) (LBN-F1 to LEW), graft-versus-host disease (GVH) (LEW to LBN-F1), and combined HVG and GVH immune responses (BN to LEW). Both drugs were administered orally throughout the study. ⁵¹Cr-EDTA gut permeability test and maltose absorption test were performed to evaluate the small bowel graft function during the study.

Results: Low doses of SDZ RAD 1.0 – 2.5 mg/kg/day combined with Neoral 2.0 – 5.0 mg/kg/day produced strong synergistic effects in prolongation of small bowel graft survival in HVG (combination index, CI=0.095, 0.1212), GVH (CI=0.027, 0.020), and combined HVG and GVH immune responses (CI= 0.070, 0.301).

Conclusion: The combination therapy of SDZ RAD and Neoral produces a strong synergistic effect toward the inhibition of HVG, GVH and combined HVG and GVH immune responses in a rat small bowel transplantation model.

Clinical small bowel transplantation offers a solution for short gut syndrome and an alternative to Total Parenteral Nutrition (TPN). However, rejection and infection remain the major obstacles to the success of this procedure. The small bowel is a complex organ surrounded by a variety of associated tissue including the mesenteric lymph nodes, Payer's patches, and lymphocytes of the lamina propria and intestinal epithelium. The massive lymphocyte engraftment from the transplant and native class II antigen expression by the intestinal epithelium provide the strong the immunological stimuli responsible for triggering rejection. To date, due to the high failure rate of current cyclosporine (CsA)-based regimens to adequately control both host-versus-graft (HVG) and graft-versus-host (GVH) diseases, only a small number of successful clinical cases have been reported (1-4).

The classic CsA treatment, Sandimmune, is quite problematic regarding absorption, bioavailability, and other pharmacokinetic issues. Its bioavailability is particularly poor in small bowel transplant (5-7). Neoral, the microemulsion formulation of CsA, has been shown in clinical studies to have superior bioavailability and improved predictability of pharmacokinetic properties when compared to Sandimmune (8-10); likewise, Neoral showed improved drug exposure in a porcine small bowel transplantation model (11).

The molecule SDZ RAD [40-)-(2-hydroxyethyl)-rapamycin, SDZ SDZ RAD, Novartis Pharma AG] is a new orally active macrocyclic immunosuppressant with antiproliferative properties which is currently being evaluated in clinical trials for prevention of solid organ allotransplantation rejection. Compared to the calcineurin inhibitor cyclosporine A, SDZ RAD acts at a later stage in the chain of events that lead to a T cell immune response, by blocking transduction of mitogenic signals generated by growth factors such as IL-2 (12). The different mode of actions of SDZ RAD and cyclosporine A provide a rational for the synergistic

interaction which has been demonstrated in vitro, and also in vivo in rat heart, kidney, and lung allo-transplantation models (13,14). The molecule SDZ RAD, being resistant to intestinal degradation, allows for a stable oral therapy with improved absorption kinetics and predictability. Furthermore, with an oral administration, the risks associated with parenteral injections are eliminated, conceding a safer and more cost effective therapy (15). In this study we describe a synergistic effect of combined oral SDZ RAD and Neoral administration in preventing HVG and GVH immune responses after small bowel transplantation in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Inbred male Brown Norway (BN, RT1ⁿ), Lewis (LEW, RT1^l), and Lewis x Brown Norway-F1 (LBN-F1) rats were purchased from Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN), housed in controlled light/dark cycles, and allowed free access to water and rat chow.

Drugs and treatments. Microemulsion formulations of SDZ RAD and Neoral for oral administration were donated by Novartis Pharma, (Basel, Switzerland). A solution of SDZ RAD (20 mg/ml) for oral administration was stored at 4°C and diluted in a 5% glucose solution before administration in a final volume of 10 ml/kg. The Neoral microemulsion (100 mg/ml) was kept at room temperature and administered by gavage without dilution. All treatments were started immediately after surgery and continued once daily for the duration of the study. The drug dose was based on the individual daily weight of each rat.

Design of Experiment. Eight groups (n=6) received a small bowel transplant; of these, seven groups were included in three different combinations for the evaluation of unidirectional rejection (LBN-F1 → LEW), unidirectional graft-vs-host disease (GVH) (LEW → LBN-F1), and combined rejection and GVH (BN → LEW). In groups 1, the control group, recipient rats did not receive any treatment. In groups 2 and 3, recipient rats were administered SDZ RAD 1.0 and 2.5 mg/kg/day respectively, throughout their survival. In groups 4 and 5, recipient rats received Neoral 2.0 and 5.0 mg/kg/day respectively, throughout their survival. Recipients of group 6 were treated with SDZ RAD, 1.0 mg/kg/day, and with Neoral, 2.0 mg/kg/day, orally for the duration of

the study. Recipient rats of group 7 were administered SDZ RAD 2.5 mg/kg/day with Neoral 5.0 mg/kg/day throughout their survival. Recipient rats of the eighth group received isografts (LEW → LEW).

Surgical technique. The method of orthotopic small bowel transplantation was described in our previous studies (16, 17). Briefly, small bowel graft including jejunum, ileum, and accompanying mesenteric lymph nodes, portal vein, and superior mesenteric artery attached to a segment of aorta was revascularized with end-to-side anastomoses between the donor aorta and recipient aorta and between the donor portal vein and recipient inferior vena cava using 10-0 nylon sutures. The small bowel graft was placed into functional continuity by completing two end-to-end anastomoses on the remaining native gut and the graft. Animals dead within three postoperative days (less than 10%) were considered technical failures and excluded from experimental data.

Host survival. Small bowel recipient rats were examined daily until death or sacrifice. A full necropsy was performed to determine the cause of death for each animal. Criteria for small bowel rejection included clinical findings (development of a palpable abdominal mass, weakness, weight loss), and/or typical histological changes (lymphocytic infiltration, loss of goblet cells, cryptitis, and changes of villi) (18). Criteria for GVH included both clinical (weight loss, skin rash, cachexia, altered gait, hunched posture), and/or histological changes (dermatitis, intestinal infiltration by immunoblasts, and damage to the host's immune organs) (19).

⁵¹Cr-EDTA permeability test. A stock solution of ⁵¹Cr-EDTA was prepared by adding 150 μ Ci of ⁵¹Cr-EDTA (1 mCi/10 ml); (Amersham International Inc.) to 50 ml distilled water.

Permeability tests were performed once every postoperative weeks throughout survival (20). Three milliliters of $^{51}\text{Cr-EDTA}$ solution (10 μCi $^{51}\text{Cr-EDTA}$) were administered orally throughout the study. The animals were housed in a metabolic cage to obtain 24-hr urine collections. Paired 1-ml samples of the urine were analyzed with paired 100- μl samples of the administered $^{51}\text{Cr-EDTA}$ solution in a well counter (Wallac 1280 Ultrogamma) for 30 sec. The renal excretion of the oral dose of $^{51}\text{Cr-EDTA}$ was calculated as follow,

$$\% \text{ excretion} = \frac{\text{average No. of counts/ml urine} \times \text{urine vol}}{\text{average No. of counts/100-}\mu \text{ standard} \times 30} \times 100$$

Maltose Test: A maltose absorption test, was adapted from Billiar et al. (21). A solution of 500 mg/kg of maltose was administered by gavage and plasma glucose levels were measured with the One Touch method (LifeScan, USA) on samples drawn from each animal at 0, 30, 60, and 90 minutes following ingestion. The test was done on groups 3, 5, 6, 7, and isograft recipients and was carried out weekly, for four weeks.

Data analysis. Small bowel allograft survivals are presented as a mean survival time (MST \pm SD) with comparison among groups performed with an Anova test followed by Tukey's Multiple Comparison among groups (Sigmastat 2.0, Jandel Scientific, USA). The median-effect principle (22) is based on the premise that the effect of each agent is related to its dose and can be calculated using the following equation,

$$(fa/fu) = (D/D_m)^m$$

where fa and fu represent the fraction of the system that is 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 as at least a 60-day survival of allograft. The symbol D_m 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),

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

where D_1 combined and D_2 combined represent the amount of drug 1 and drug 2, respectively. D_1 and D_2 each displays the $x\%$ 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), antagonism. A computer software program was used to assess the dose-effect parameters (D_m , m and r) and CI values (Calculusyn, Biosoft, Ferguson, MO, USA). Maltose statistics were performed with a 3-way ANOVA test followed by a Tukey Multiple Comparison test among groups by computer software (Sigmastat 2.0, Jandel Scientific, USA). The rejection model, the agent's doses and the week of the test were the three factors evaluated in the 3-way Anova.

RESULTS

Synergistic effects on small bowel allograft survival. Three histoincompatible donor-recipients were used to assess the synergistic effects of SDZ RAD and Neoral in the inhibition of HVG and GVH immune responses in rat small bowel transplantation. In the HVG model (Fig. 2.1 and Table II), the naïve control group showed a mean survival time (MST) of 9.5 ± 1.0 days. There was a dose response in groups treated with SDZ RAD; at 1.0 mg/kg/day, MST was 17.3 ± 5.4 days ($p=0.006$); at 2.5 mg/kg/day, MST was 19.2 ± 4.8 days ($p=0.001$); and in Neoral treated groups: 2.0 mg/kg/day, MST was 15.0 ± 1.7 days ($p=0.0001$); at 5.0 mg/kg/day, MST was 28.8 ± 5.7 days ($p=0.0001$) respectively. Furthermore, results with the combined use of drugs indicated that a synergistic or very strong synergistic interaction was produced when compared with monotherapy of each drug: for groups given SDZ RAD 1.0 mg/kg/day + Neoral 2.0 mg/kg/day, MST was 57.8 ± 6.7 days ($p=0.0001$, CI=0.095); for groups given high doses of SDZ-RAD 2.5 mg/kg/day + Neoral 5.0 mg/kg/day, MST was 70.5 ± 12.8 days ($p=0.0001$, CI = 0.112). These results were repeated in the GVH model (Fig. 2.2 and Table II): groups given SDZ RAD 1.0 mg/kg/day + Neoral 2.0 mg/kg/day, MST was 48.5 ± 6.4 days ($p=0.0001$, CI = 0.027); groups given high doses of SDZ RAD 2.5 mg/kg/day + Neoral 5.0 mg/kg/day, MST was 63.0 ± 13.6 days ($p=0.0001$, CI = 0.020). These survival results indicate a very strong synergistic effects when compared with those of the monotherapy of SDZ RAD 1.0 mg/kg/day, where MST was 15.3 ± 1.7 days ($p=0.0001$); the high dose of SDZ RAD 2.5 mg/kg/day, where MST was 21.7 ± 3.0 days ($p=0.0001$); Neoral 2.0 mg/kg/day, where MST was 17.7 ± 1.4 days ($p=0.0001$); the high dose of Neoral 5.0 mg/kg/day, where MST was 27.8 ± 4.4 day ($p=0.0001$); naïve

control, MST 8.3 ± 1.2 days. In the combined HVG and GVH models (Fig. 2.3 and Table II), the naïve control survival time was 9.2 ± 1.2 days in group 1. The treatment of SDZ RAD at 1.0 and 2.5 mg/kg/day in group 2 and group 3 produced significant prolongation of graft survival with an MST of 12.0 ± 1.1 ($p=0.001$), and 20.8 ± 9.8 days ($p=0.016$) respectively. The high dose treatment of Neoral 2.0 and 5.0 mg/kg/day administered to group 4 and group 5 also produced significant prolongation of small bowel graft survival with an MST of 16.2 ± 3.9 days ($p=0.002$), and 30.5 ± 6.9 days ($p=0.0001$) respectively. The combined treatment of SDZ RAD 1.0 mg/kg/day with Neoral 2.0 mg/kg/day in group 6, yielded an MST of 52.3 ± 5.4 days ($p=0.0001$, CI= 0.070) while in the high dose treatment of SDZ RAD 2.5 mg/kg/day with Neoral 5.0 mg/kg/day in group 7, MST was 69.0 ± 5.3 days ($p=0.0001$, CI=0.301). These survival times represented strong synergistic interactions between the SDZ RAD and Neoral when compared with the monotherapy of each drug.

⁵¹Cr-EDTA permeability test in small bowel recipient rats. All groups began their postoperative survival with an elevated renal excretion which reached a plateau during the third and fourth weeks of their survival (Fig. 2.5, 2.5 and 2.6). Prior to death, excretion had steadily been increasing. The elevated excretion during weeks one and two was not likely to be caused by surgical or ischemic trauma since isografted groups failed to show these increases. Many groups experienced excretion peaks between weeks 1 and 2 followed by a decrease on week 3. In groups 3, 5, and 7 of the HGV-GVH combination model, excretion increases were delayed until week 3 and 4. According to the results of Grant et al., these peaks are suggestive of acute rejection episodes (20).

Maltose absorption test. The maltose test revealed significant absorption differences ($P=0.001$) in all experimental groups versus the isografted groups, indicating graft deterioration most likely caused by immunologic rejection (Fig. 2.7, 2.8 and 2.9). We also found significant differences

between week 1 and 2 in groups 3 ($P=0.008$), 5 ($P=0.0029$), and 6 ($P=0.001$) of each rejection model indicative of the same rejection episodes observed in permeability studies. However, absorption increased in groups 3 and 5 while decreasing in group 6 making it difficult to correlate these fluctuations with rejection. We also noted no significant differences in absorption across the rejection models ($P=0.99$) nor were there any difference in absorption between groups administered different drug doses and drug combinations ($P=0.321$).

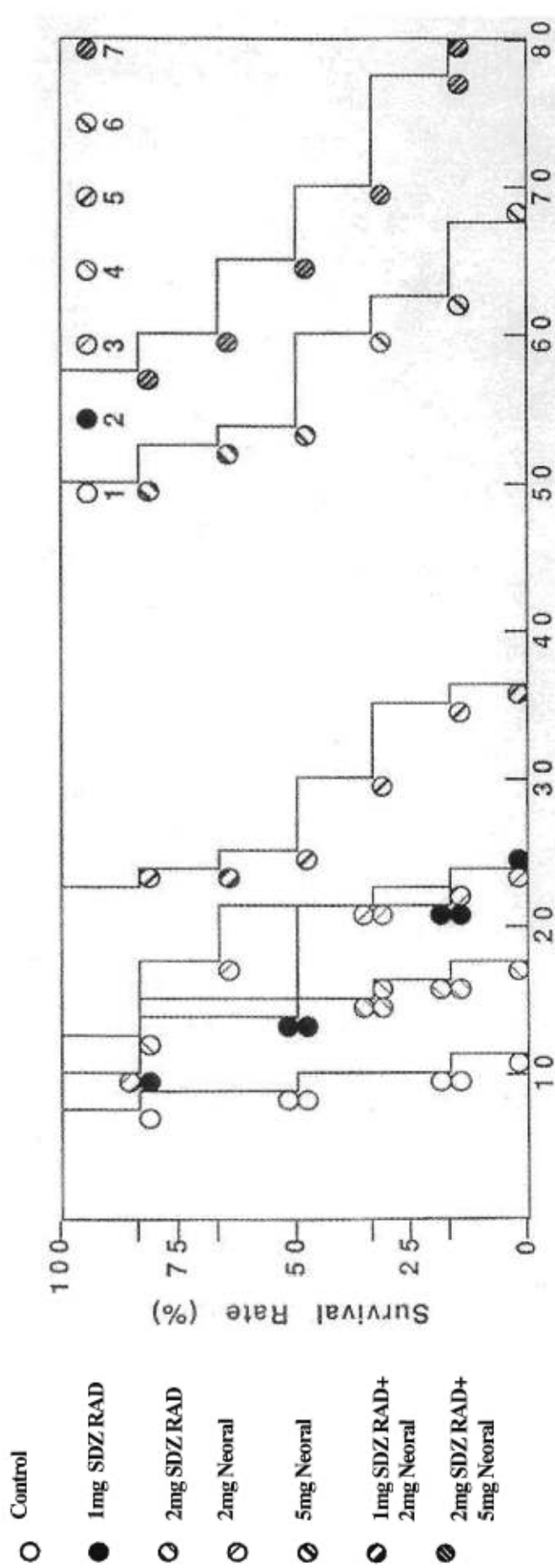


FIGURE 2.1: Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in HVG rejection model (FI→LEW). Survival rate versus survival days of each animal in each group are presented. Control group 1 (allografts) was not administered any drugs. Groups 2-7 were administered different doses of SDZ RAD and Neoral alone or in combination. Treatment was administered by gavage and lasted the duration of the study.

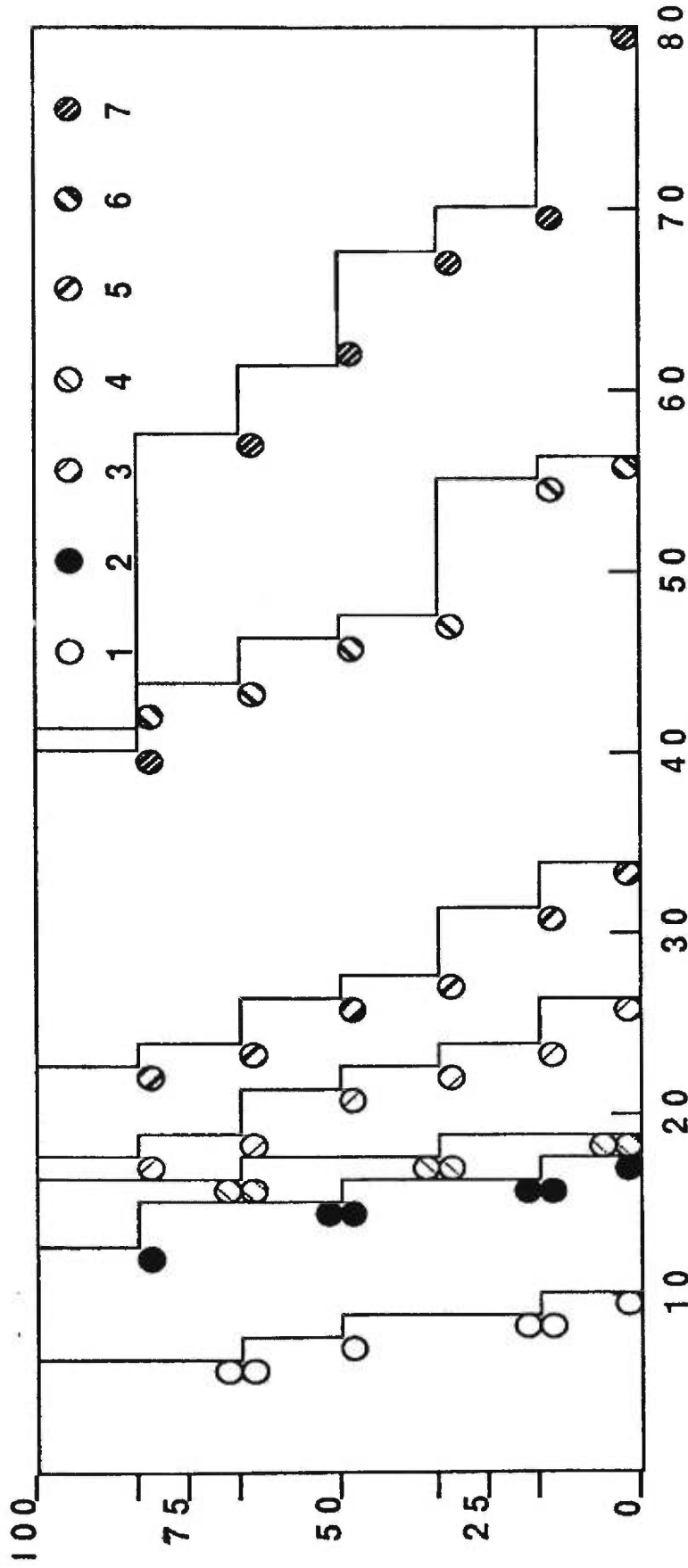


FIGURE 2.2: Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in GVH rejection model (LEW→F1). Survival rate versus survival days of each animal in each group are presented. Control group 1 (allografts) was not administered any drugs. Groups 2-7 were administered different doses of SDZ RAD and Neoral alone or in combination. Treatment was administered by gavage and lasted the duration of the study.

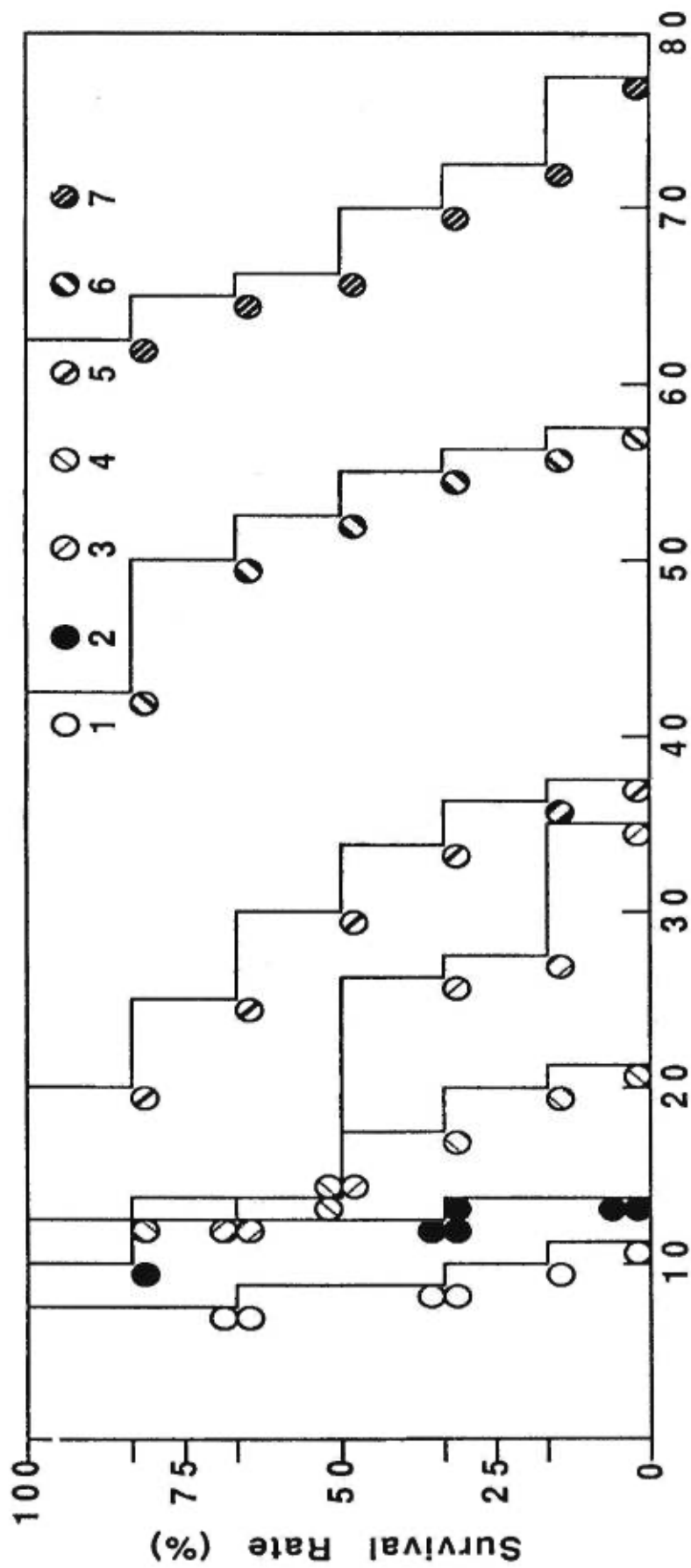


FIGURE 2.3: Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in HVG-GVH rejection model (BN→LEW). Survival rate versus survival days of each animal in each group are presented. Control group 1 (allografts) was not administered any drugs. Groups 2-7 were administered different doses of SDZ RAD and Neoral alone or in combination. Treatment was administered by gavage and lasted the duration of the study.

HVG (F1→LEW)	Survival days	MST ± SD	P value	CI
1. Allograft Control	8,9,9,10,10,11	9.5 ± 1.0		
2. SDZ RAD 1.0mg	10,14,14,21,21,24	17.3 ± 5.4	0.001	
3. SDZ RAD 2.5mg	10,18,21,21,22,23	19.2 ± 4.8	0.001	
4. Neoral 2.0mg	12,15,15,15,16,17	15.0 ± 1.7	0.001	
5. Neoral 5.0mg	23,24,25,30,35,36	28.8 ± 5.7	0.001	
6. Rad 1.0mg+Neo 2.0mg	50,53,54,60,62,68	57.8 ± 6.7	0.001	0.095*
7. RAD 2.5mg+Neo 5.0mg	58,60,65,70,78,92	70.5 ± 12.8	0.001	0.112*

*Combination index: group 6=very strong synergism; group 7=strong synergism.

GVH (LEW→F1)	Survival days	MST ± SD	P value	CI
1. Allograft Control	7,7,8,9,9,10	8.3 ± 1.2		
2. SDZ RAD 1.0mg	12,15,15,16,16,17	15.3 ± 1.7	0.001	
3. SDZ RAD 2.5mg	18,19,21,22,24,26	21.7 ± 3.0	0.001	
4. Neoral 2.0mg	16,16,18,18,19,19	17.7 ± 1.4	0.001	
5. Neoral 5.0mg	23,24,26,28,32,34	27.8 ± 4.4	0.001	
6. Rad 1.0mg+Neo 2.0mg	41,43,47,48,55,57	48.5 ± 6.4	0.001	0.027*
7. Rad 2.5mg+Neo 5.0mg	40,58,62,68,70,80	63.0 ± 13.6	0.001	0.020*

*Combination index: group 6= very strong synergism; group 7=very strong synergism.

GVH-HVG (BN→LEW)	Survival days	MST ± SD	P value	CI
1. Allograft Control	8,8,9,9,10,11	9.2 ± 1.2		
2. SDZ RAD 1.0mg	10,12,12,12,13,13	12.0 ± 1.1	0.001	
3. SDZ RAD 2.5mg	12,12,13,26,27,35	20.8 ± 9.8	0.016	
4. Neoral 2.0mg	12,13,13,18,20,21	16.2 ± 3.9	0.002	
5. Neoral 5.0mg	20,25,30,34,36,38	30.5 ± 6.9	0.001	
6. Rad 1.0mg+Neo 2.0mg	43,50,52,55,56,58	52.3 ± 5.4	0.001	0.070*
7. RAD 2.5mg+Neo 5.0mg	63,65,66,70,73,77	69.0 ± 5.3	0.001	0.301*

*Combination index: group 6=very strong synergism; group 7=strong synergism.

TABLE II: Survival days of orthotopic small bowel allograft recipient in HVG, GVH, and HVG-GVH rejection models. Control group 1 (allografts) was not administered any drugs. Groups 2-7 were administered different doses of SDZ RAD and Neoral alone or in combination as mentioned. Treatment was administered by gavage and lasted the duration of the study. Survival days are represented as Mean Survival Times (MST ± SD). Statistics were analysed with the ANOVA variance test followed by a Tukey multiple comparison indicating highly significant differences with the control group ($P < 0.05$). Combination Indexes were computed as mentioned in the Methods.

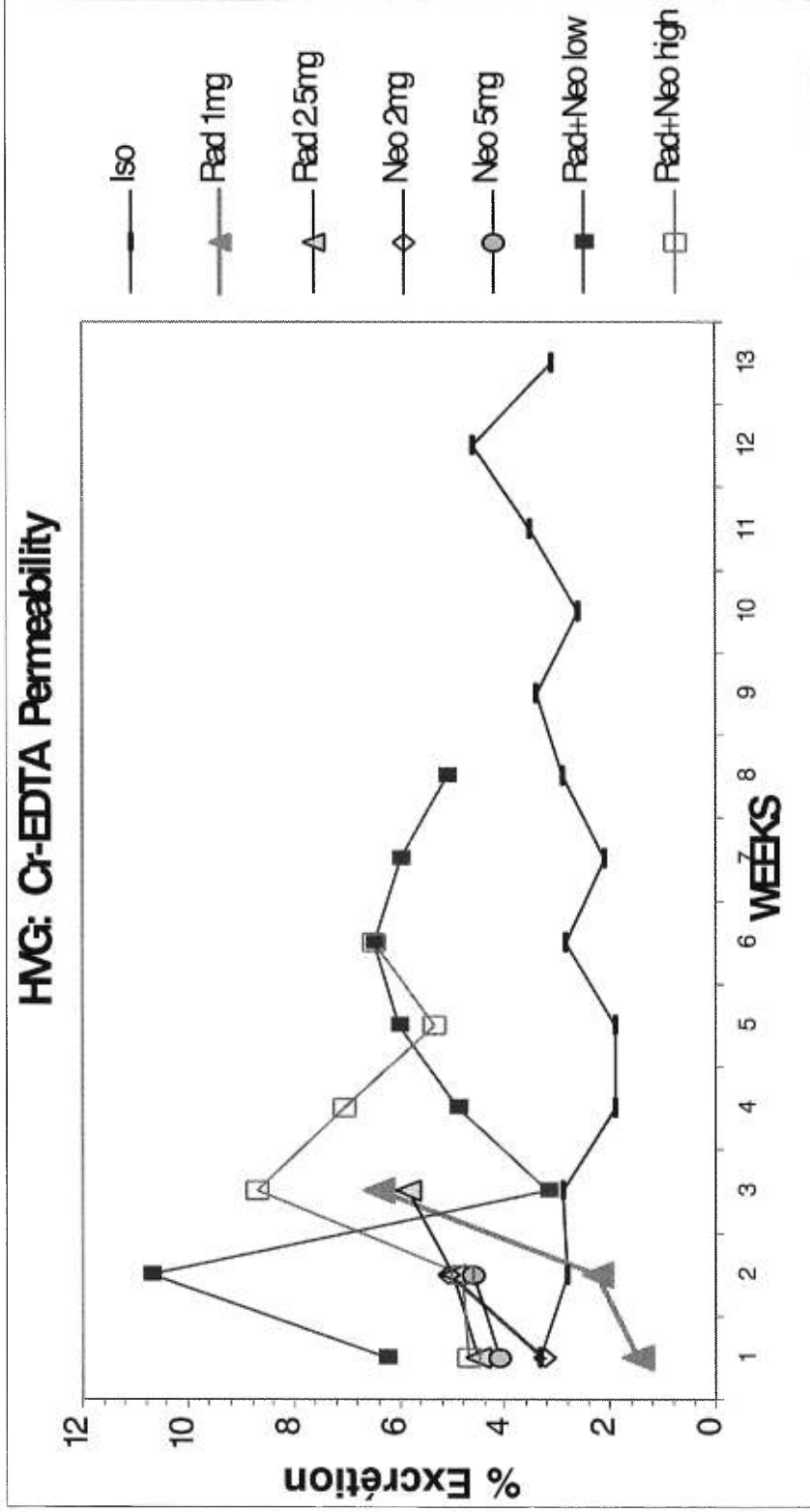


FIGURE 2.4: Tests of permeability to ⁵¹Cr-EDTA for HVG (F1→LEW) models. Tests were performed during each postoperative weeks throughout survival. Urinary excretion of ⁵¹Cr-EDTA was measured after ingestion as mentioned in Methods. Each graph reports the average percent urinary excretion of each treated group and isografted controls according to rejection model. Results indicated a net permeability increase during postoperative weeks when compared to controls.

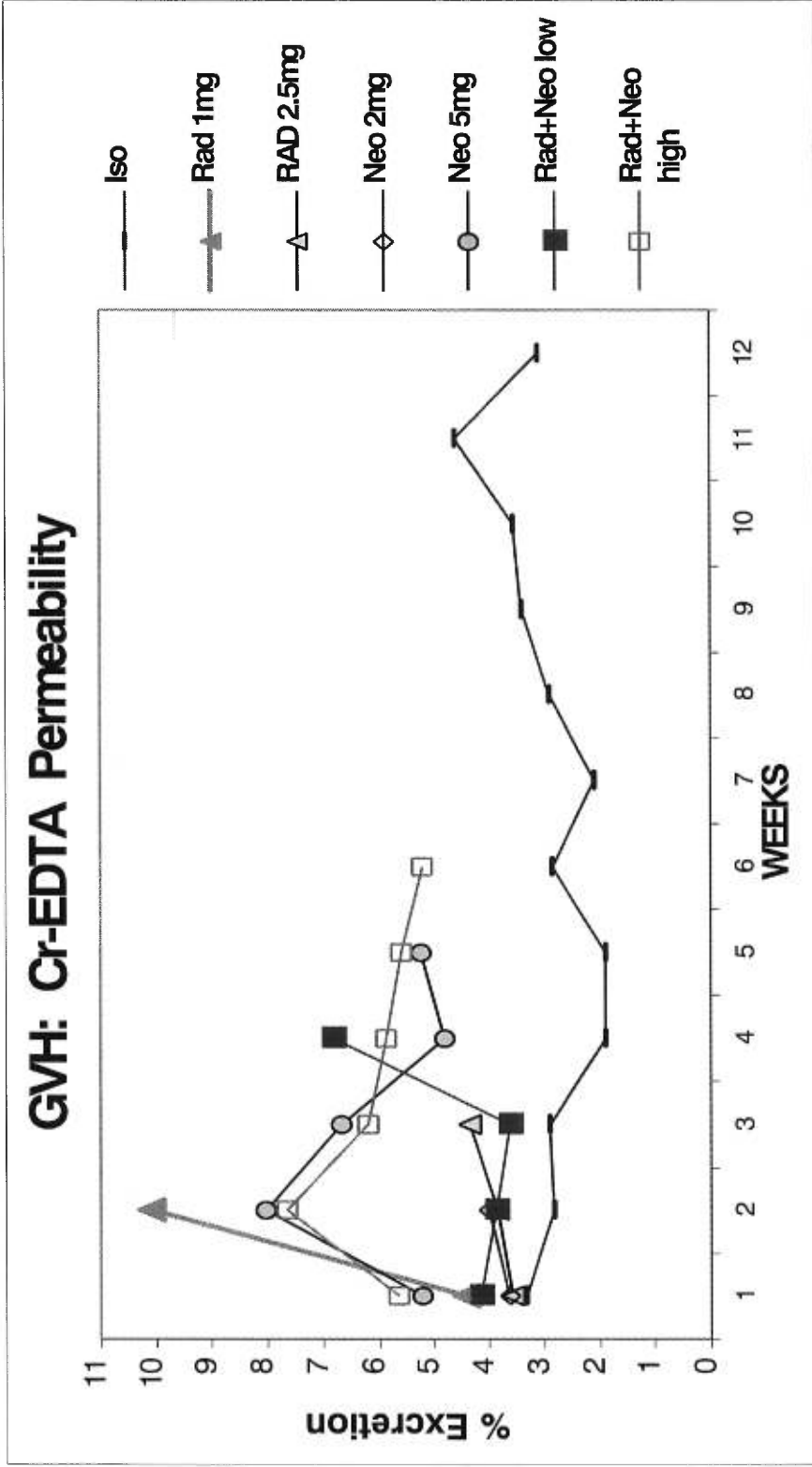


FIGURE 2.5: Tests of permeability to ⁵¹Cr-EDTA for GVH (LEW→F1) models. Tests were performed during each postoperative weeks throughout survival. Urinary excretion of ⁵¹Cr-EDTA was measured after ingestion as mentioned in Methods. Each graph reports the average percent urinary excretion of each treated group and isografted controls according to rejection model. Results indicated a net permeability increase during postoperative weeks when compared to controls.

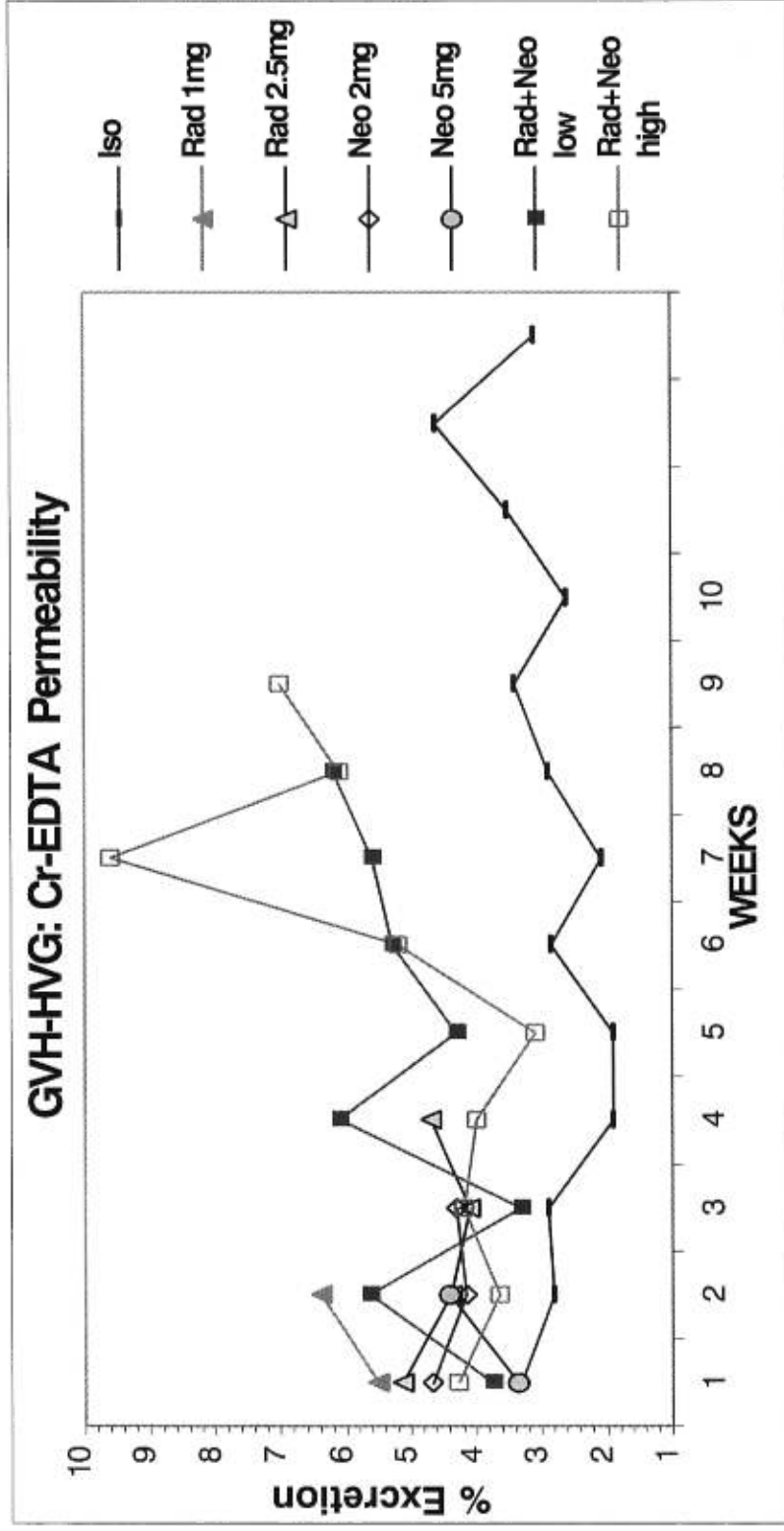


FIGURE 2.6: Tests of permeability to ⁵¹Cr-EDTA for the combined HVG-GVH (BN→LEW) rejection models. Tests were performed during each postoperative weeks throughout survival. Urinary excretion of ⁵¹Cr-EDTA was measured after ingestion as mentioned in Methods. Each graph reports the average percent urinary excretion of each treated group and isografted controls according to rejection model. Results indicated a net permeability increase during postoperative weeks when compared to controls.

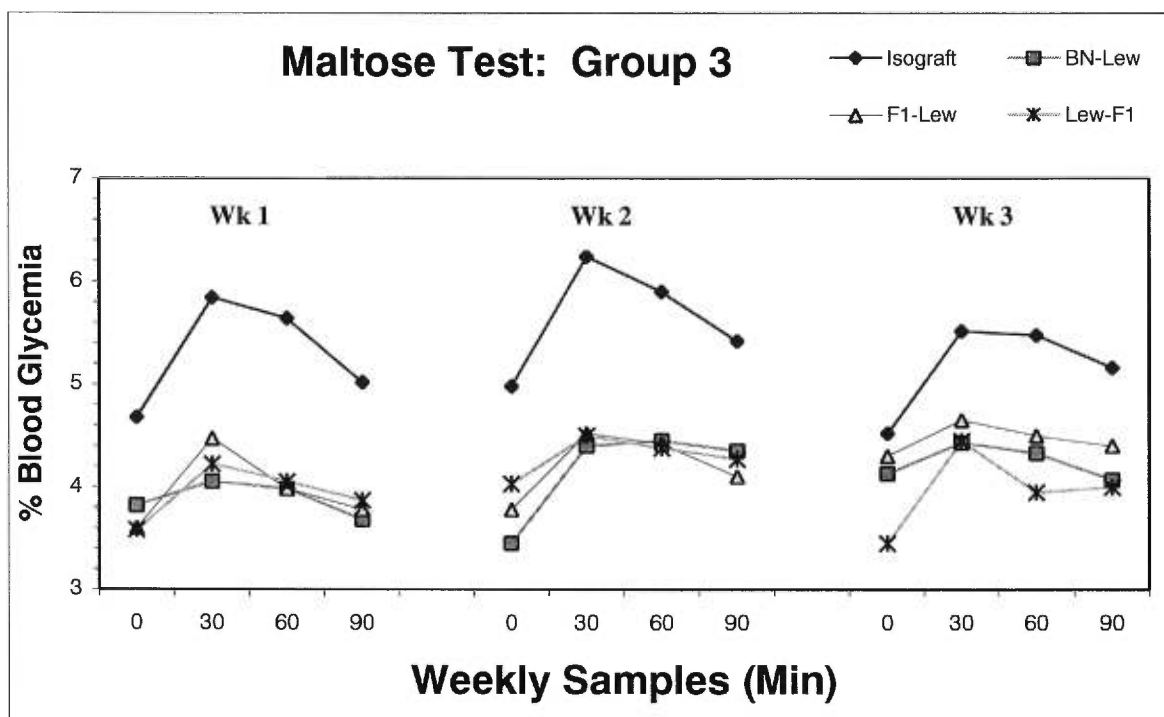


FIGURE 2.7: Maltose absorption test results of groups 3 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses. Maltose tests were performed weekly on group 3 (2.5 mg/kg/d of SDZ RAD) of each rejection model. Results are presented as percent glycemia levels at 0, 30, 60, and 90 minutes following Maltose ingestion over 3 postoperative weeks. Each curve represents a weekly test presented from as week 1 to 3 from left to right. Results indicate a clear lowering of absorption in treated groups compared to isografted controls ($P < 0.05$).

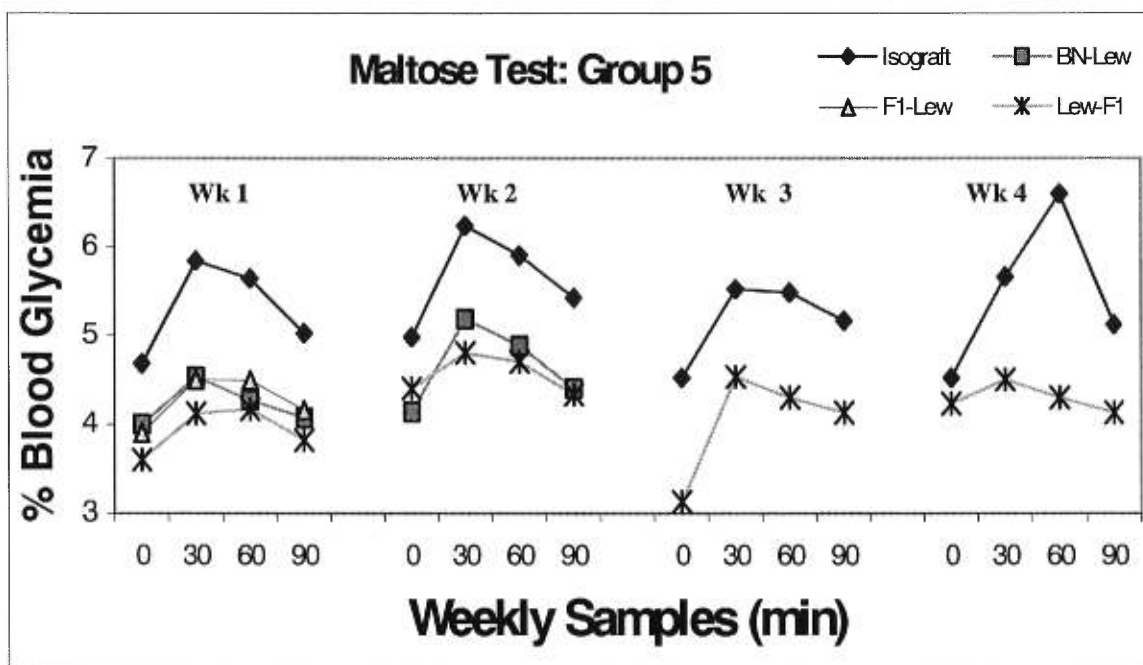


FIGURE 2.8: Maltose absorption test results of group 5 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses. Maltose tests were performed weekly on group 5 (5 mg/kg/d of Neoral) of each rejection model. Results are presented as percent glycemia levels at 0, 30, 60, and 90 minutes following Maltose ingestion over 4 postoperative weeks. Each curve represents a weekly test presented from as week 1 to 4 from left to right. Results indicate a clear lowering of absorption in treated groups compared to isografted controls ($P < 0.05$).

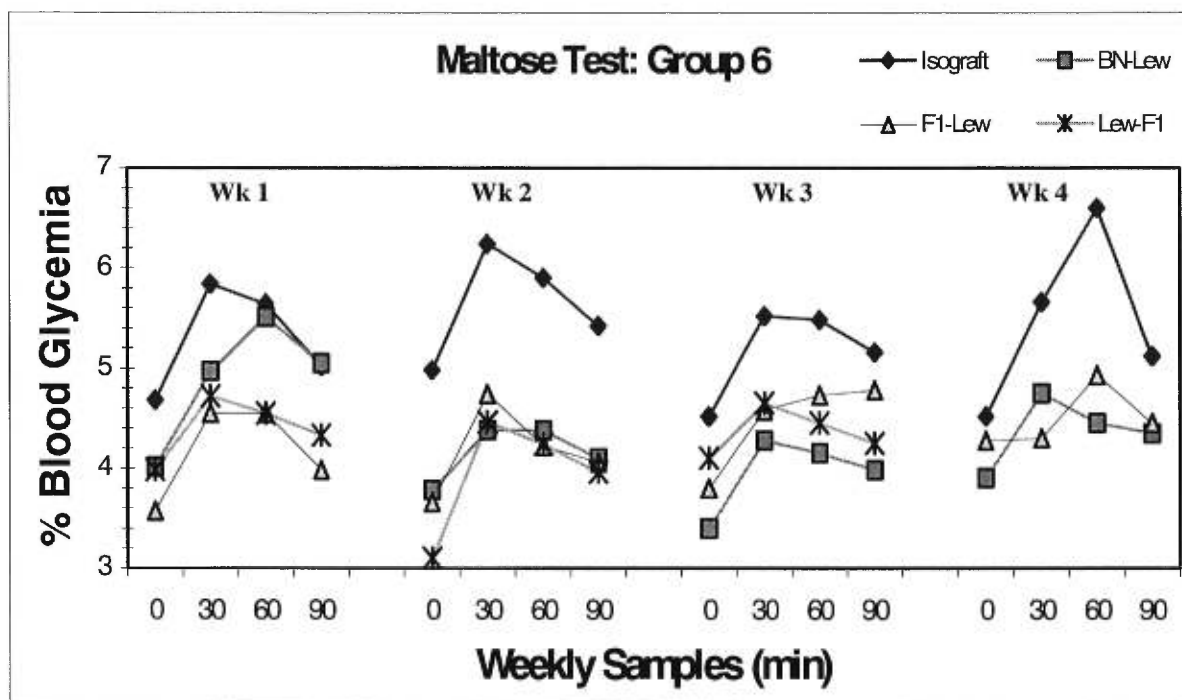


FIGURE 2.9: Maltose absorption test results of group 6 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses. Maltose tests were performed weekly on groups 6 (1 mg/kg/d of SDZ RAD + 2 mg/kg/d of Neoral) of each rejection model. Results are presented as percent glycemia levels at 0, 30, 60, and 90 minutes following Maltose ingestion over 4 postoperative weeks. Each curve represents a weekly test presented from as week 1 to 4 from left to right. Results indicate a clear lowering of absorption in treated groups compared to isografted controls ($P < 0.05$).

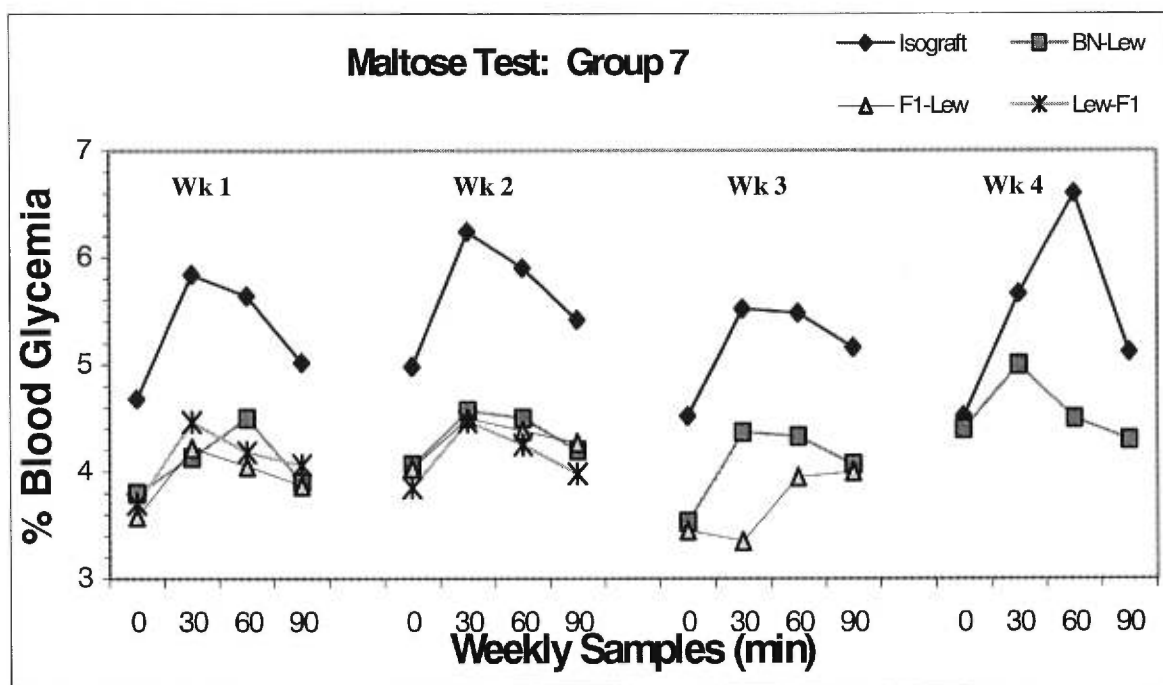


FIGURE 2.10: Maltose absorption test results of group 7 according to each rejection model: HVG (F1→LEW), GVH (LEW→F1), and HVG-GVH (BN→LEW) immune responses. Maltose tests were performed weekly on groups 7 (2.5 mg/kg/d of SDZ RAD + 5 mg/kg/d of Neoral) of each rejection model. Results are presented as percent glycemia levels at 0, 30, 60, and 90 minutes following Maltose ingestion over 4 postoperative weeks. Each curve represents a weekly test presented from as week 1 to 4 from left to right. Results indicate a clear lowering of absorption in treated groups compared to isografted controls ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Unsatisfactory clinical experience and poor experimental results seen in animal models has limited the clinical use of small bowel transplantation. Better immunosuppressive regimens are needed for this procedure to succeed. All attempts at both experimental and clinical small bowel transplantation ceased in the late 1970's and early 1980's until the introduction of CsA, and more recently FK506 and rapamycin. These powerful immunosuppressive agents have renewed optimism toward small bowel transplantation as a viable clinical option. As a result, novel immunosuppressive treatments with new therapeutic agents are currently being tested to improve the outcome of small bowel transplantation (1).

We report here a synergistic interaction between SDZ RAD and Neoral, administered at a 1:2 ratio, toward the inhibition of the HVG and GVH immune responses in rat small bowel transplantation. Subtherapeutic doses of a combination of SDZ RAD, 1.0-2.5 mg/kg, and Neoral, 2.0-5.0 mg/kg, displayed strong synergism in all three models of rejection: HVG, GVH, and combined HVG-GVH. Our results thus confirm earlier results obtained in rat kidney, heart and lung allo-transplantation models (13, 14); these results suggest a beneficial effect of combining the microemulsion formulation of cyclosporine A with SDZ RAD. When combined, these agents work together to abrogate clonal expansion through two different pathways situated one after the other in the activation steps of the immune response: CsA inhibits the activation of T cell growth factors, while SDZ RAD inhibits the signals these factors transmit (13, 14).

⁵¹Cr-EDTA, a biochemically inert substance of 342 Da, is currently the most sensitive and convenient permeability probe available to clinical practice (20, 23). In the first three weeks following small bowel grafting, renal excretion of oral doses of ⁵¹Cr-EDTA was elevated and fell

thereafter. The detection of small bowel rejection episode was obscured by the difference in permeability profiles among groups. But the permeability increases and subsequent decreases in groups 6 and 7, treated with SDZ RAD and Neoral in three different models, suggested therapeutic protection of intestinal permeability. The ^{51}Cr -EDTA excretion differences seen between isografted and allografted groups pointed to graft deterioration caused by immunologic rejection.

Among the absorption evaluation probes available, such as d-xylose and glucose tests, the maltose test is considered the most reliable in animal models. The absorption of maltose is indicative of the function of the enzyme maltase whose presence in the brush border membrane of the intestine indicates of a healthy graft. Fluctuations in blood glucose levels should reflect rejection episodes or deterioration (21, 24). We were not able to detect rejection with our test nor did we find any relevant differences in absorption levels throughout survival weeks. This suggests that transplant deterioration does not modify maltose absorption. Furthermore, we found the absorption differences between groups administered various therapeutic doses or combinations to be statistically insignificant. The test was sensitive only to the differences among isografted and allografted groups: which we ascribed to graft function deterioration caused by the immunologic rejection present allografts. Overall, we found the test to reflect global events only rather than specific rejection episodes within a group. We were therefore unable to assess the effect of our regimes on graft function.

The validity of the maltose test has been questioned before. The results of an absorption test by Bakonyi et al. showed no differences in absorption levels between rats given the test 2 days before and 5 and 15 days after small bowel transplantation, suggesting the insensitivity of the maltose probe to single rejection episodes (15). It has been suggested that CsA's potential interference on insulin production might invalidate the test by raising glycemia levels (25, 26).

Our results failed to show any blood glucose increase in treated groups. A recent study suggests that combined low doses of immunosuppressants do not alter energy absorption from the gut (27). Our results suggest that high doses of drugs, whether used singly or in combination, do not affect absorption. We also conclude that the maltose test may not be useful in evaluating small bowel graft function.

Results reported here show that low doses of SDZ RAD and Neoral produce a synergistic effect in the inhibition of host-versus-graft and graft-versus-host immune responses in rat small bowel transplantation and results in an increase survival time when compared to the monotherapy. These results should help renew interest and support the rationale for the use of this combination in small bowel transplantation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Novartis Pharmaceuticals, Inc., and Novartis Pharma Canada Inc. for providing a grant to support the study, and for the supply of oral SDZ RAD and Neoral, and for helpful discussion.

REFERENCES

1. Frezza E, Tsakis A, Fung J, and Van Thiel D. Small bowel transplantation: current progress and clinical application. *Hepato-gastroenter* 1996; 43: 363.
2. Grant D, Wall W, Mimeault R, et al. Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet* 1990; 335: 181.
3. Todo S, Tsakis A, Abu-Elmagd K, et al. Cadaveric small bowel and small bowel-liver transplantation in humans. *Transplantation* 1992; 53: 369.
4. Jan D, Michel J, Goulet O, et al. Up-to-date evaluation of small bowel transplantation in children with intestinal failure. *J Pediatr Sur* 1999; 34: 841.
5. Lampen A, Christians V, Bader A, et al. Drug interactions and interindividual variability of cyclosporin metabolism in the small bowel intestine. *Pharmacology* 1996; 53: 159.
6. Christians V, Sewing KF. Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther* 1993; 57: 291.
7. Kaplan B, Lown K, Craig R, et al. Low bioavailability of cyclosporine microemulsion and tacrolimus in a small bowel transplant recipient. *Transplantation*, 1999; 67: 333.
8. Vänderscher J, Meinzer A. Rational for the development of Sandimmun and Neoral. *Transplant Proc* 1994; 26: 2925.
9. Taesch S, Niese D, Mueller EA. Sandimmun Neoral a new formulation of cyclosporine A with improved pharmacokinetic characteristics: safety and tolerability in renal transplant patients. *Transplant Proc* 1994; 26: 3147.

10. Kovaric JM, Mueller EA, Van Bree JB, et al. Cyclosporine pharmacokinetics and variability from a microemulsion formulation: a multicenter investigation in kidney transplant patients. *Transplantation* 1994; 58: 658.
11. Rossi G, Reggiani P, Regazzi MB, et al. Neoral increases in bioavailability versus oral Sandimmune after porcine small bowel transplantation. *Transplant Proc*, 1998; 30: 2654.
12. Schuler W, Sedrani R, Cottens S, et al. SDZ SDZ RAD, a new rapamycin derivative, pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 1997; 64: 36.
13. Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, et al. SDZ SDZ RAD, a new rapamycin derivative, synergism with cyclosporine. *Transplantation* 1997; 64: 32.
14. Hausen B, Boeke K, Berry GJ, et al. Coadministration of Neoral and the novel rapamycin analog, SDZ SDZ RAD, to rat lung allograft recipients. *Transplantation* 1999; 67: 956.
15. Bakonyi AN, Koh IHJ, Gaarcez-Silva MH, and Goldenberg S. The validity of the maltose absorption test in the heterotopic small bowel transplant model. *Transplant Proc*, 1994; 26: 1670.
16. Chen H, Xu D, Qi S, Wu J, Luo H, Daloz P. Rapamycin graft pretreatment in small bowel and kidney transplantation in the rat. *Transplantation* 1995; 59: 1084.
17. Chen H, Qi S, Xu D, et al. Immunosuppressive effects of the cyclosporine derivative SDZ IMM125 on kidney allograft in the dog and small bowel and pancreas allografts in the rat. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996; 80: 76.
18. Garcia B, Zhong R, Wijsman J, et al. Pathological changes following intestinal transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1990; 22: 2469.
19. Grant D, Zhong R, Gunn H, et al. Graft-versus-host diseases associated with intestinal transplantation in the rat, host immune function and general histology. *Transplantation* 1989; 48: 545.

20. Grant D, Lamont D, Zhong R, et al. ^{51}Cr -EDTA: a mark of early intestinal rejection in the rat. *J Surg Res* 1989; 46: 507.
21. Billiar, RT, Barberoglio C, and Schraut WH. Maltose absorption as an indicator of small-intestinal allograft rejection. *J Surg Res* 1984; 37: 75.
22. Chou TC. The median-effect principle and combination index for quantification of synergism and antagonism. In: Chou TC, Ride-out D, eds. *Synergism and antagonism in chemotherapy*. San Diego: Academic Press. 1991:61.
23. Gruessner RWG. Large animal models in intestinal transplantation. *Transplant proc* 1998; 30: 2629.
24. Peter TJ and Bjarnason I. Use and abuses of intestinal permeability measurements. *Canadian J Gastroenterol* 1988; 2: 127.
25. Nielsen JH, Mandrup-Poulsen A, and Nerup S. Direct effect of cyclosporin A on human pancreatic beta cells. *Diabetes*, 1986; 35: 1545.
26. Robertson RP. Cyclosporin-induced inhibition of insulin secretion in isolated rat islets and HIT cells. *Diabetes* 1986; 35: 1016.
27. Sigalet DL, Thorne PC, Williams DC, Marin GR, and Yatscoff RW. Effect of combined immunosuppressive drug therapy on small intestinal nutrient transport in the rat. *Clin Biochem* 1999; 32: 51.

CHAPITRE TROIS

DISCUSSION

4.1.0 Aspects généraux

Les résultats inadéquats obtenus en clinique et en pré-clinique après une transplantation d'intestin grêle reflètent clairement les lacunes des régimes immunosuppresseurs actuels. En effet, la puissance de la réaction immunitaire du rejet de l'allogreffe engendré par les stimuli provenant des abondantes plaques de Payers et nodules lymphatiques rend inefficaces toutes immunosuppressions jusqu'à présent évaluées. Les difficultés techniques associées à la chirurgie de la transplantation d'intestin grêle ne font qu'aggraver la situation. Durant les années 70, devant de telles difficultés, les cliniciens avaient cessé les expériences de transplantation intestinale jusqu'au début des années 80 après la découverte de la cyclosporine A et récemment celle du tacrolimus et du sirolimus. Grâce à la puissance de ces agents, l'intérêt de la communauté clinique internationale pour la transplantation intestinale est ravivé. Le besoin pressant de régimes prophylactiques engendre l'introduction, constante, en pré-clinique, de thérapies comprenant de nouveaux agents associés à d'autres. Des associations entre la CsA, le tacrolimus et le sirolimus ont récemment été étudiées en phase clinique. En effet, associer des agents procure de multiples avantages, entre autres, grâce aux interactions synergiques, la réduction de la dose, donc de la toxicité et du besoin de supervision des patients. Ces agents sont sélectifs pour les cellules T et donc réduisent les risques de myélosuppression et les effets secondaires associés aux glucocorticostéroïdes (Vu *et al.*, 1998). Les thérapies d'avenir excluront les glucocorticostéroïdes et seront constituées d'associations entre deux et même trois agents dépendant des besoins du receveur. Avec de tels outils, il est concevable que la transplantation d'intestin grêle devienne routinière au même titre que celle des autres organes.

Dans le domaine de la transplantation expérimentale, les rongeurs, les chiens, et les cochons sont les animaux les plus étudiés (Chen *et al.*, 1996). Nous avons choisi d'utiliser des rats pour nos transplantations à cause de la disponibilité de types consanguins, permettant l'étude des trois types de rejet et pour leur coût inférieur. Le modèle de rongeur représente aussi la première étape d'une longue série d'évaluation du régime, qui implique le modèle porcine et le modèle primate non-humain, précédant son admission en phase clinique.

Dans cette étude, nous évaluons Néoral et SDZ RAD, de nouvelles formulations de la CsA et du sirolimus, dont l'efficacité est déjà établie pour les transplantations de la plupart des organes, tel que le coeur, les reins, et le foie. Nous vérifions aussi l'efficacité de ces formulations sur un modèle expérimental de transplantation d'intestin grêle dont la difficulté d'obtenir de résultats satisfaisants est connue.

Plusieurs aspects distinguent les nouvelles formulations des thérapies classiques. Premièrement, SDZ RAD et Néoral sont toutes deux conçues pour surmonter les problèmes d'absorption et de biodisponibilité liés à la CsA et le sirolimus. Deuxièmement, quand elles sont associées l'une à l'autre, ces formulations constituent un régime par voie orale, le sirolimus étant d'habitude administré par voie intraveineuse, qui est capable de résister aux dégradations métaboliques rapprochant ainsi la dose absorbée à celle qui a été administrée.

Les analyses de variances des temps de survie entre groupes ont été faite avec le test Anova suivit d'une comparaison multiple de Tukey (Table III). D'habitude, les analyses de variances Student *t* et Anova sont utilisé pour traiter les statistiques de survie. Mais, ces tests ne permettent que la comparaison entre deux groupes plutôt qu'entre plusieurs, et notre protocole contient un groupe témoin contre lequel six groupes expérimentaux sont comparés. Nous avons donc opté pour un test de comparaison multiple qui suivrait le test Anova. Les comparaison

multiple de Tukey, de Dunnett et de Bonferroni étaient des choix adéquats pour nos données. Nous avons choisi le test de Tukey, le plus rigoureux des trois (SigmaStat, 1992-1995).

Mais, dans notre expérience, il est seulement question de démontrer que les doses faibles et élevées améliorent les temps de survie de manière significative par rapport au groupe témoin et non aux autres groupes: nous n'essayons pas de comparer les traitements l'un à l'autre puisque cela n'étant pas nécessaire pour démontrer la synergie. Les temps de survie obtenus avec les monothérapie doivent être significatifs quand comparés au groupe témoin pour justifier le choix des agents. Or, contrairement à la comparaison simple, le test de comparaison multiple indique que la plupart des temps de survie obtenus avec les monothérapie ne sont pas différents de ceux du groupe témoin (Table III). Mais puisque la comparaison multiple interprète la variance entre les groupes administrés les bi-thérapies et le témoins comme très significatives, les variances des groupes recevant les monothérapie auront des valeurs P plus élevées, et par conséquent, elles ne seront pas jugées significatives. En d'autres mots, plus il y a de synergie entre deux agents et plus la différence des temps de survie entre la mono et la bithérapie est large, moins significatives seront les différences de survie entre les groupes traités avec la monothérapie des deux agents et le contrôle. Si nos résultats indiquaient des moyennes de temps de survie moins élevées pour les bithérapie, c'est-à-dire une synergie faible ou une additivité, le test de Tukey aurait déterminé les différences monothérapie/témoin comme étant significatives.

Quoique conscient de la nécessité de la comparaison multiple, nous avons opté d'analyser nos données avec le test Anova suivi d'une comparaison simple. Par rapport à notre but, celui d'évaluer la synergie entre deux agents, nous jugeons qu'il est acceptable d'utiliser une comparaison simple entre deux groupes plutôt qu'entre tous les groupes. Ceci nous permet de présenter individuellement l'effet de chaque agent sur les groupes traités par rapport à leur

groupe témoin. Les résultats des comparaisons multiples sont présentés dans la Table III et discutés dans cette section.

4.2.0 Monothérapies

Le traitement classique avec la CsA est assez problématique par rapport à l'absorption, la biodisponibilité, et d'autres aspects pharmacocinétiques. Ceci est reflété par la difficulté d'obtention de concentrations sanguines correspondantes aux doses de CsA administrées. Avec une transplantation intestinale, l'absorption est déjà réduite par les traumatismes opératoires (Sigalet *et al.*, 1992), et les concentrations sanguines adéquates d'immunosuppresseur deviennent plus difficiles à obtenir (Kaplan *et al.*, 1999). Mais des études comparatives démontrent que la formulation Néoral améliore les paramètres pharmacocinétiques obtenus avec Sandimmune (Rossi *et al.*, 1998).

Les patients traités avec le SDZ RAD bénéficient d'une réduction des variations pharmacocinétiques observées avec le sirolimus. Le SDZ RAD, 40-O-(2-hydroxyéthyl)-rapamycine, un analogue du sirolimus, ne subit pas les dégradations intestinales et peut donc, contrairement au sirolimus, être administré par voie orale tout en maintenant le même niveau d'activité immunosuppressive que le sirolimus. Les thérapies orales sont moins coûteuses à la fois pour le patient et pour l'hôpital. De plus, elles permettent d'éliminer les risques associés aux injections parentérales d'immunosuppresseurs (Schuler *et al.*, 1997).

La monothérapie avec le SDZ RAD prolonge la survie des allogreffes de façon significative. Mais une analyse de variance Anova *one-way* (comparaison simple) entre les temps de survie des groupes administrés 1mg et 2.5 mg de SDZ RAD n'indique aucune différence significative dans les modèles HVG (P=0.549) et GVH-HVG (P=0.053). Seul le modèle GVH démontre un effet relatif à une courbe dose-dépendente entre les deux groupes (P=0.001). En monothérapie,

augmenter la dose de SDZ RAD ne semble donc pas procurer les mêmes bénéfices que l'augmentation de la dose de Néoral. En effet, la même analyse statistique indique une amélioration de temps de survie suivant l'administration de la haute dose de Néoral dans les trois modèles de rejet ($P=0.001$).

Il y a quelques années, Stepkowski *et al.*, (1992), avaient suggéré que le sirolimus (0.8mg), administré par voie intraveineuse, quoique prolongeant la survie des allogreffes intestinaux hétérotopiques de façon significative, n'était pas aussi efficace vis-à-vis l'inhibition des maladies GVH ($21\pm 5.2j$) que vers celle des HVG ($40\pm 5.6j$). Nos résultats ne démontrent aucune différence significative de survie entre les trois modèles de rejet (Table III). Le SDZ RAD s'avérait aussi efficace contre les maladies HVG que les maladies GVH. Le fait que nos thérapies étaient administrées par voie orale dans un modèle orthotopique aurait pu engendrer ces différences de résultats: en effet, le rejet d'un greffon intestinal hétérotopique est moins aigu que celui d'un greffon orthotopique (Grant *et al.*, 1991). Mais une étude publiée dans notre laboratoire par Chen *et al.*, (1992), sur des greffons intestinaux orthotopiques, n'indiquait aucune différence entre les temps de survie des modèles GVH ($38\pm 13.8j$) et HVG ($36\pm 10.8j$) chez des rats administrés 0.8mg/kg/j de sirolimus par intraveineuse ce qui suggère que la différence entre nos résultats et ceux de Stepkowski *et al.*, est attribuable au fait que notre modèle soit orthotopique et le leur, hétérotopique. Mais puisqu'une autre étude en transplantation d'intestin grêle hétérotopique chez la souris, ne rapporte aucune différence de temps de survie entre les modèles GVH et HVG (Chen, Qi *et al.*, 1996), nous concluons que les thérapies sont aussi efficaces contre les GVH que les HVG. En fait, en clinique, comme les transplantations sont orthotopiques, la réaction GVH, bien qu'elle soit présente, n'est pas considérée comme un problème nécessitant une attention thérapeutique particulière par rapport aux HVG (Khan et Tzakis; dans es Ginns *et al.*, 1999). Nous pensons donc que les rats du

modèle GVH de Stepkowski *et al.*, (1992) auraient pu succomber prématurément à des infections bactériennes.

La monothérapie avec la formulation Néoral s'avérait efficace dans les trois modèles de rejet. D'après nos comparaisons multiples, la puissance des doses de 5mg de Néoral par rapport aux autres monothérapies variait d'un modèle de rejet à l'autre. Les doses de 1mg et 2.5mg de SDZ RAD et de 2mg de Néoral étaient équipotentes dans les trois modèles de rejet (Table III). Les résultats des comparaisons simples et multiples contredisent la multitude de rapports indiquant le sirolimus comme étant de 10 à 100 fois plus efficace que la CsA et ce même à des doses plus faibles (Chen *et al.*, 1992; Chen et Qi, *et al.*, 1996; Stepkowski *et al.*, 1992; Keown; dans es Ginns *et al.*, 1999). Il y a là un phénomène attribuable peut-être au fait d'administrer le SDZ RAD et Néoral par voie orale plutôt qu'intraveineuse. Il est déjà bien établi que ces deux formules sont aussi efficaces que le sirolimus et la CsA (voir Néoral et SDZ RAD). Il se pourrait que le SDZ RAD soit absorbé avec moins de facilité que Néoral, diminuant la dose sanguine du SDZ RAD par rapport à celle de Néoral. Mais cette hypothèse reste à être vérifiée. Globalement, les trois modèles de rejets indiquent les mêmes résultats, réduisant la possibilité qu'une infection bactérienne aurait pu jouer réduire les temps de survie chez les groupes recevant le Néoral.

COMPARAISON MULTIPLE DES TEMPS DE SURVIE						
Différence Significative (P < 0.05) Oui ou Non						
HVG	RAD 1	RAD 2	Néo 1	Néo 2	Rad+Néo 1	Rad+Néo 2
Contrôle Allo	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
RAD 1		Non	Non	Non	Oui	Oui
RAD 2	Non		Non	Non	Oui	Oui
Néo 1	Non	Non		Oui	Oui	Oui
Néo 2	Non	Non	Oui		Oui	Oui
RAD + Néo 1	Oui	Oui	Oui	Oui		Oui
RAD + Néo 2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
Différence Significative (P < 0.05) Oui ou Non						
GVH	RAD 1	RAD 2	Néo 1	Néo 2	Rad+Néo 1	Rad+Néo 2
Contrôle Allo	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
RAD 1		Non	Non	Oui	Oui	Oui
RAD 2	Non		Non	Non	Oui	Oui
Néo 1	Non	Non		Non	Oui	Oui
Néo 2	Oui	Non	Non		Oui	Oui
RAD + Néo 1	Oui	Oui	Oui	Oui		Oui
RAD + Néo 2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
Différence Significative (P < 0.05) Oui ou Non						
HVG-GVH	RAD 1	RAD 2	Néo 1	Néo 2	Rad+Néo 1	Rad+Néo 2
Contrôle Allo	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
RAD 1		Non	Non	Oui	Oui	Oui
RAD 2	Non		Non	Non	Oui	Oui
Néo 1	Non	Non		Oui	Oui	Oui
Néo 2	Oui	Non	Oui		Oui	Oui
RAD + Néo 1	Oui	Oui	Oui	Oui		Oui
RAD + Néo 2	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	

TABLE IV: Différence entre traitements immunosuppresseurs. Les temps de survie étaient analysés avec un *Two-Way Anova* suivit de la comparaison multiple de Tukey entre chaque groupe pour déterminer les différences. Les résultats indiquaient que seul les groupes recevant le SDZ RAD à 1mg et 2mg, et de Néoral à 2mg et 5mg, avaient des temps de survie similaires. L'analyse ne détectait aucune différence significative entre les temps de survie par modèle de rejet. ($p=0.231$).

Légende: **Contrôle Allo:** Groupe 1 allogreffé non-traité

RAD 1: SDZ RAD 1mg/kg/J **RAD 2:** SDZ RAD 2.5mg/kg/J

Néo 1: Néoral 2mg/kg/J **Néo 2:** Néoral 5mg/kg/J

RAD+Néo 1: SDZ RAD 1mg/kg/J + Néoral 2mg/kg/J

RAD+Néo 2: SDZ RAD 2.5mg/kg/J + Néoral 5mg/kg/J

4.3.0 Thérapies associées

Notre étude évalue non seulement l'effet du SDZ RAD et du Néoral sur la survie d'allogreffe, mais aussi sur la nature de cet effet, c'est-à-dire le type d'interaction entre ces deux agents. La différence du mode d'action de la CsA et du sirolimus pour la suppression immunitaire, suggère que ces deux agents, et donc leur nouvelle formulation, agiraient de façon synergique. En effet, dans les trois modèles de rejet étudiés, nous avons obtenu des résultats démontrant une interaction très fortement synergique entre le SDZ RAD et le Néoral administrés dans un ratio 1:2, respectivement (Fig. 2.1, 2.2 et 2.3; Table I et II).

Les différences de temps de survie entre les monothérapies et les bithérapies sont prononcées. Certains croiraient à une réaction dose-réponse classique où associer deux agents ne fait qu'augmenter la dose totale de la thérapie et donc l'effet global. Mais ceci n'est pas le cas: doubler la dose du SDZ RAD, de 1mg à 2.5mg/kg/j, ou Néoral, de 2mg à 5mg/kg/j, augmente les temps de survie (Fig 2.1, 2.2, 2.3 et Table II). Par contre, associer les agents à doses faibles, 1mg du SDZ RAD et 2mg de Néoral pour une dose totale de 3mg, donnait des temps de survie excédant celles obtenues avec, par exemple, 5mg de Néoral. Bien qu'ils ne définissent le concept de synergie, ces types de résultats, où les effets de l'association dépassent ceux d'un agent seul, sont caractéristiques des thérapies d'association avec effet synergique (Chou et Talalay, 1991). De plus, nos valeurs de IC indiquent des effets synergiques très évidents.

Notre laboratoire a déjà publié une étude en transplantation d'intestin grêle orthotopique, dans laquelle le sirolimus et la CsA étaient administrés en ratio 1:10 par voie intraveineuse chez des rats (Chen *et al.*, 1992). La comparaison de ces résultats à ceux obtenus avec le SDZ RAD et le Néoral permettent quelques interprétations intéressantes (Fig. 3.1). Premièrement, du point

de vue de la survie, la thérapie orale de SDZ RAD est nettement moins efficace que la thérapie intraveineuse avec le sirolimus. La cyclosporine A, par contre, est aussi efficace quand elle est administrée par voie intraveineuse ou orale (Néoral). En effet, 2mg de Néoral et 2mg de la CsA (intraveineuse) procurait aux animaux les mêmes temps de survie (16 jours). Ceci suggère que le Néoral soit absorbé de manière à ce que sa concentration sanguine soit équivalente à celle obtenue quand la CsA est administrée par voie intraveineuse. Ceci expliquerait l'équipotence de Néoral et de la CsA par voie intraveineuse, mais aucun dosage sanguin a été fait pour supporter cette affirmation.

La comparaison entre mono et bithérapie montre que l'association des agents oraux est nécessaire pour supplanter les résultats de la monothérapie intraveineuse. Ceci remet en question soit l'équipotence du SDZ RAD et du sirolimus ou la capacité de SDZ RAD à résister à la dégradation intestinale et à être adéquatement absorbé. En effet, si le SDZ RAD et le sirolimus sont d'une puissance égale, les différences de survie observées peuvent être expliquées par une absorption incomplète de la dose de SDZ RAD administré par voie orale. Deuxièmement, la synergie est démontrée pour SDZ RAD et Néoral administrés au ratio de 1:2 et non 1:10 comme c'est le cas dans l'administration intraveineuse de Chen *et al.* (1992). La proportion des doses de deux agents joue un rôle significatif sur l'interaction, soit synergique ou additive, observée entre deux agents (Vu *et al.*, 1998). Comme mentionné, le SDZ RAD inhibe une voie de signalisation en aval de celle sur laquelle joue la CsA. Donc, la proportion du SDZ RAD administré doit être assez élevée pour agir de manière efficace sur les cellules immunitaires qui n'ont pas été sujettes à l'action de la CsA.

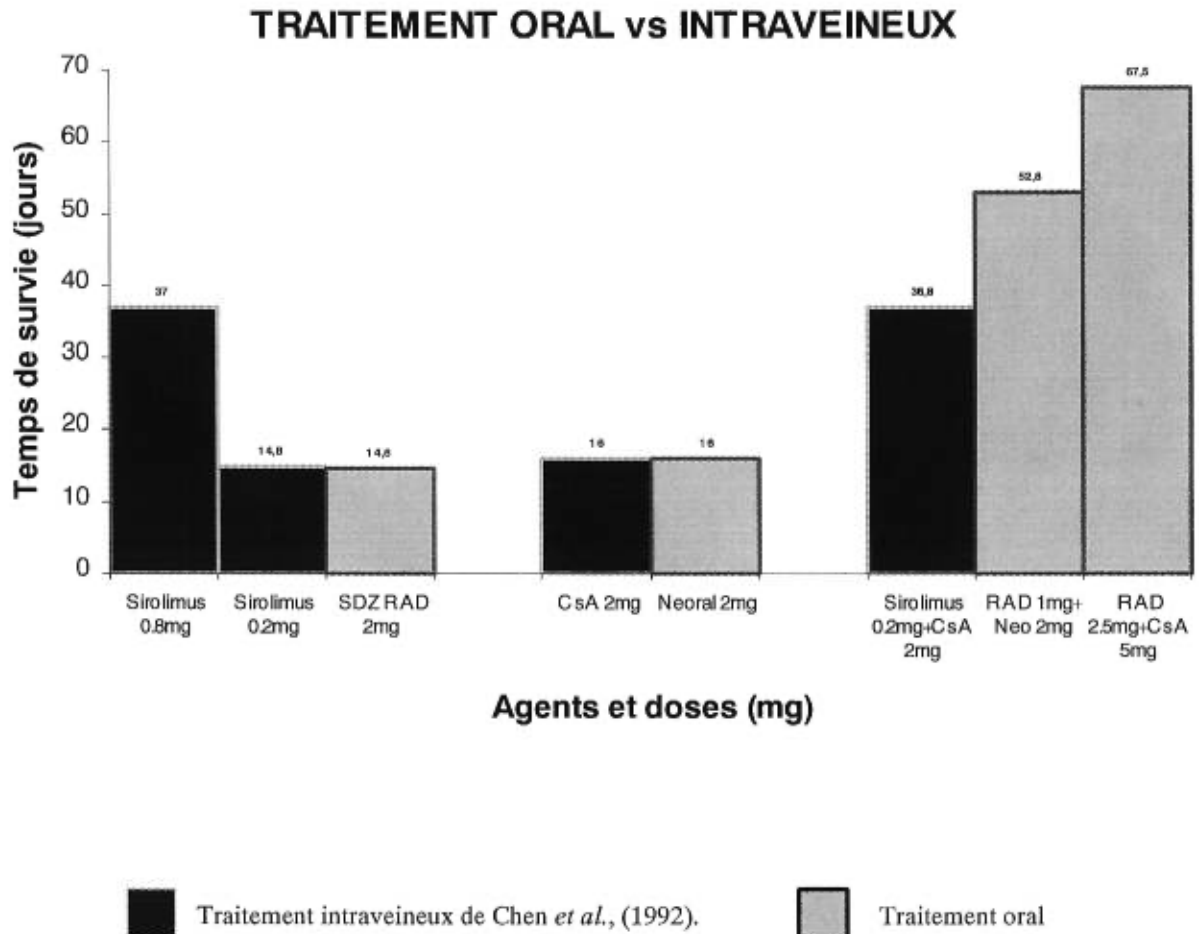


FIGURE 3.1: Comparaison de l'effet d'un traitement oral (SDZ RAD et Néoral) et intraveineux (Sirolimus et CsA) en Transplantation d'intestin grêle orthotopique chez le rat. Comparaison de la survie obtenus dans notre études et celle de Chen *et al.*, (1992). Les résultats des deux études proviennent de transplantés de l'intestin grêle de façon orthotopique d'après le modèle de Zhong *et al.*, (1991). Les transplantés (Chen *et al.*, 1992), recevaient le sirolimus et la CsA aux doses indiquées (mg/kg/j) par pompe osmotique, un système de livraison incorporé dans la paroi intrapéritonéale et relié à la veine lombaire. Pour le traitement associé, un ratio 1:10 de sirolimus et de la CsA était administré et révélait des taux de survie semblables à ceux des groupes recevant la mono thérapie de sirolimus à 0.8mg reflétant une interaction additive entre les deux agents à ces doses. Le SDZ RAD et le Néoral, administrés à un ratio de 1:2, révèle une interaction synergique. Le sirolimus administré par voie intraveineuse était plus efficace que le traitement oral, sauf quand ces derniers sont administrés en association. Les 2mg du SDZ RAD et les 2mg du Néoral s'avèrent aussi efficaces comme traitement que 2mg de CsA et 2mg de sirolimus, les deux administrés par intraveineuse.

4.4.0 Tests de Fonctions

La méthode de transplantation que nous avons choisie, la méthode orthotopique, est plus immunogénique que la méthode hétérotopique (Grant *et al.*, 1991), mais reflète mieux les phénomènes reliés à la transplantation grâce à sa continuité anatomique avec l'intestin du receveur. Puisque notre projet puisait son importance de l'absorption d'une thérapie orale, une méthode qui permettait l'étude de l'organe dans son contexte anatomique, donc la transplantation orthotopique semblait plus indiquée. Malgré ces avantages cette méthode comporte d'importantes limites. Premièrement, les études faites en transplantation intestinale orthotopique chez le rat sont peu nombreuses, ce qui rend difficile la comparaison de nos résultats. Deuxièmement, le protocole de biopsie constitue un outil limité pour l'évaluation d'un organe transplanté, notamment parce que les greffons orthotopiques sont inaccessibles aux biopsies et parce que les signes crises de rejet, de par leur nature dispersée, sont susceptibles de ne pas être détectés par les biopsies (Grant *et al.*, 1991). Nous avons donc opté pour des tests de fonction plutôt que des biopsies. Par conséquent, nous n'avons aucune donnée histologique pour étudier directement l'effet des thérapies sur le profil immunologique de chaque type de rejet et sur leur toxicité au greffon. Les nécropsies ne révélaient rien de plus que la cause de la mort et un amas de tissus intestinaux nécrosés. Donc, bien que nos résultats démontrent des interactions fortement synergiques et une augmentation de la survie de l'allogreffe, nous ne pouvons vérifier si ces interactions augmentent aussi la toxicité des agents au receveur de façon synergique. Malgré que l'association des agents entraîne la baisse des doses administrées et théoriquement la diminution de la néphro- et hépatotoxicité, causées particulièrement par la CsA (Keown et Niese, 1998), sans une analyse histologique hebdomadaire, tel que la toxicité d'une thérapie, ne peuvent être résolues. Nous avons donc opté pour la réalisation des tests de fonction espérant récolter quelques indications de l'effet des immunosuppresseurs sur la viabilité du greffon.

4.4.1 Perméabilité

Notre test de fonction au $^{51}\text{Cr-EDTA}$ s'est avéré être sensible aux différences de perméabilité entre les groupes allogreffés et les témoins isogreffés: en effet, les allogreffes laissaient filtrer deux à trois fois plus de $^{51}\text{Cr-EDTA}$ que les témoins (Fig. 2.4, 2.5, et 2.6). En temps normal, une molécule de $^{51}\text{Cr-EDTA}$ serait trop grosse pour transiter de l'intestin vers la circulation sanguine, et sa présence dans l'urine est indicative d'une augmentation de perméabilité est explicable par la présence du rejet. Les tests au $^{51}\text{Cr-EDTA}$ sont considérés très sensibles (Frezza, 1996). Le 51 chromium éthylènediaminetétraacétate est une molécule inerte de 358 Daltons qui, en présence du rejet, se faufile au travers les jonctions serrées des villi endommagées soit par le trauma opératoire ou l'atteinte immunologique, pour se retrouver dans la circulation sanguine et être ensuite excrétée par voie urinaire. D'après Grant et ses collègues, une augmentation d'excrétion suivie d'une baisse est indicative d'un épisode de rejet (Grant *et al.*, 1989; 1990; 1991). Nos résultats semblent montrer chez la plupart des groupes, une augmentation d'excrétion qui pourrait indiquer une crise de rejet aiguë durant la deuxième ou troisième semaine. Par contre, cette augmentation n'est pas répétée chez tous les groupes, notamment ceux appartenant au modèle GVH-HVG, administrés 2.5mg de SDZ RAD, 2mg de Néoral, et l'association de 2.5mg de SDZ RAD et 2mg de Néoral (Fig. 2.6). Nous n'avons pas de données histologiques pour exposer la nature exacte des événements immunologiques de la deuxième semaine. Mais il est possible que l'absence d'augmentation d'excrétion chez ces groupes soit explicable par la suppression des crises de rejet par la thérapie.

Il a été noté, en transplantation d'intestin grêle pré-clinique, que suivant des traitements intraveineux à cours terme, les crises de rejet, notamment dans le cas des GVH, survenaient dans les 4^{ème} et 6^{ème} semaines postopératoires (Sigalet *et al.*, 1992). Nos résultats indiquent des crises de rejet dès la 2^{ème} et 3^{ème} semaines. Ceci pourrait être explicable par le fait qu'au

moment où les animaux se remettaient du trauma opératoire, l'absorption des médicaments, probablement du SDZ RAD, était réduite permettant apparition du rejet.

Le test de ^{51}Cr -EDTA démontre globalement l'effet des crises de rejet sur la perméabilité. En fait, ce test est conçu en clinique pour détecter les crises de rejet, permettant d'ajuster la thérapie sans avoir recours aux biopsies (Grant *et al.*, 1989; 1990; 1991). Les augmentations et baisses subséquentes d'excrétion du ^{51}Cr -EDTA chez les groupes qui survivent plus que quatre semaines, notamment ceux administrés SDZ RAD et Néoral, indiquent que l'association du SDZ RAD et Néoral protège le greffon de dommages immédiats à la perméabilité causés par le rejet. Mais cette protection n'est pas observable à long terme. En fait, l'excrétion chez les groupes traités augmente et diminue sans jamais retourner aux niveaux précédant la crise.

4.4.2 Absorption

Il y a plusieurs autres tests de fonction utilisés en recherche pré-clinique qui détectent la présence d'enzymes et de marqueurs moléculaires nécessaires à l'absorption: monoamine oxydase, maltase, diamine oxydase, sucrase et aminopeptidase. Ces enzymes contribuent au métabolisme de certains aliments, dont la présence dans le compartiment sanguin est indicative de la viabilité du greffon (Gruessner, 1998). Le test d'absorption de maltose est reconnu comme étant sensible au rejet de la greffe intestinale; en effet, les taux de maltose sanguins varient selon les crises de rejet puisque l'enzyme maltase ne fonctionne efficacement que dans les membranes à bordures en brosse qui sont intactes (Billiar, 1984).

Nos résultats des tests d'absorption de maltose sont difficiles à interpréter. Les évaluations statistiques révèlent des différences d'absorption significatives qui suggèrent une crise de rejet durant la deuxième semaine de survie du groupe administré les doses faibles de SDZ RAD et Néoral (Table IV) et une amélioration de fonction pour le groupe administré 5mg de Néoral. Pour ce qui est des autres groupes, aucun changement d'absorption n'est détecté de semaine en semaine, ce qui laisse entendre que la condition du greffon, pour ce qui est de l'absorption de maltose, ne s'améliore pas. Globalement, le test de maltose démontre clairement une différence d'absorption entre les groupes isogreffes et allogreffes traités, attribuable aux réactions immunologiques ou à diverses lésions liées à la thérapie. Nos résultats n'indiquent aucune différence entre les modèles de rejet ou entre les groupes selon les différents traitements. Avec les doses plus élevées, la toxicité pour le greffon serait plus présente et affecterait de la sorte l'absorption du maltose; notre test n'indique rien de tel. Les taux de glycémie ne sont donc pas influencés par l'augmentation des doses. Une autre analyse statistique (Anova 3-way) indique que les pourcentages de changement de glycémie observés entre les premiers (0min) et deuxièmes (30min) prélèvements ne sont pas différents d'un modèle de rejet à l'autre ($P=0.546$), d'un groupe expérimental à l'autre ($P=0.278$), d'une semaine à l'autre ($P=0.848$) ou entre les isogreffes et les allogreffes. Cette similarité entre les isogreffes et allogreffes indique que les immunosuppresseurs ne modifient pas la cinétique d'absorption de maltose.

La validité du test de maltose a déjà été questionnée. Une étude rapporte qu'il n'y a pas de différences entre l'absorption préopératoire et postopératoire de rats après une transplantation hétérotopique de l'intestin. Il n'y aurait donc aucune corrélation entre les crises de rejet et les changements d'absorption (Bakonyi *et al.*, 1994). Nous avons pensé que ces résultats ne reflétaient pas les événements présents dans un greffon orthotopique. Les crises de rejet contre

une greffe intestinale hétérotopique sont beaucoup moins intenses que celles présentes dans une greffe orthotopique (Grant *et al.*, 1991), et peut-être que le test de maltose n'est sensible qu'à des crises de rejet plus fortes. Mais même dans notre modèle nous ne détectons rien concernant les crises de rejet d'un groupe à l'autre. Peut être que la présence de Néoral fausse nos résultats puisque la CsA interfère avec la sécrétion d'insuline (Robertson, 1986; Nielsen *et al.*, 1986). Mais dans ce cas, les taux de glycémie seraient plus élevés chez les groupes traités, et nos résultats montrent le contraire. Il n'existe aucune indication que le sirolimus influence les niveaux de glucose sanguin.

Nous sommes en mesure de détecter une baisse d'absorption chez les allogreffes sans pouvoir être certain que celle-ci n'est pas le résultat de lésions induites par les immunosuppresseurs utilisés. Une étude récente démontre que la monothérapie avec de faibles doses du tacrolimus, du MMF ou du sirolimus, ne modifie pas l'absorption de glucides chez les rats transplantés de l'intestin grêle (Sigalet *et al.*, 1999). Nos résultats suggèrent que des doses élevées de SDZ RAD ou de Néoral en monothérapie ne modifient pas l'absorption non plus. C'est pourquoi nous pensons que les effets des immunosuppresseurs, quoique néfastes au greffon, ne modifient pas l'absorption de maltose et donc seul le rejet immunologique serait responsable de la différence d'absorption entre les groupes isogreffes et allogreffes.

Sommaire des comparaisons de variance entre groupes expérimentaux et entre semaines suivant la transplantation				
Comparaison Entre Groupes	P<0.05			
	Rad 2.5mg	Néo 5mg	Rad+Néo Faible Dose	Rad+Néo Haute dose
Iso vs HVG	Oui	Oui	Oui	Oui
Iso vs GVH	Oui	Oui	Oui	Oui
Iso vs Combinaison	Oui	Oui	Oui	Oui
GVH vs HGV	Non	Non	Non	Non
GVH vs Combinaison	Non	Non	Non	Oui
HGV vs Combinaison	Non	Non	Non	Non
Comparaison Entre Semaines				
1 vs 2	Oui	Oui	Oui	Non
2 vs 3	Non	Oui	Oui	Non
3 vs 1	Non	Non	Non	Non
3 vs 4		Non	Non	Non
4 vs 2		Non	Non	Non
4 vs 1		Non	Non	Non
4 vs 3		Non	Non	Non

TABLE III: Significations statistiques du Test de Maltose. Comparaison de variance des résultats du test d'absorption de maltose entre chaque modèle de rejet et entre chaque semaine suivant la transplantation (4 semaines de test). La comparaison statistique est déterminée avec un Anova 3-way suivi du test de Comparaisons Multiples de Tukey: différence significative, P<0.05.

4.5.0 Conclusions

Nos données nous permettent de conclure que la thérapie concomitante du SDZ RAD et du Néoral est efficace vis-à-vis l'inhibition des HVG et des GVH. L'index de combinaison indique une interaction synergique allant de forte à très forte. La monothérapie du SDZ RAD et de Néoral s'avère quand même efficace, prolongeant la survie d'allogreffe de façon significative. Par contre, les moyennes de temps de survie des groupes traités avec la bithérapie étaient du double et même du triple de celles des groupes recevant la monothérapie, ce qui reflète l'interaction synergique entre les deux agents. Ceci s'accorde avec les multiples études faites dans notre laboratoire et ailleurs indiquant que c'est l'association des macrolides fongiques qui offre une protection nettement supérieure pour les allogreffes. De tels résultats ne servent qu'à raffermir la place de l'association des immunosuppresseurs dans la prophylaxie de rejet de greffe tout en établissant la transplantation orthotopique de l'intestin grêle du rongeur comme modèle adéquat d'évaluations préliminaires. Le régime étudié ici était constitué d'agents administrés par voix orale. Aucune donnée impliquant une thérapie orale et un modèle orthotopique de transplantation de l'intestin grêle n'est présentement disponible. Nos comparaisons préliminaires indiquent que la monothérapie orale n'est pas aussi efficace que la monothérapie intraveineuse, mais que la bithérapie est très efficace. D'autres études sont nécessaires avant de confirmer les avantages d'un mode d'administration l'un par rapport à l'autre.

Nous concluons donc que le SDZ RAD et le Néoral agissent de façon synergique dans l'inhibition des maladies hôte-vs-greffe et greffe-vs-hôte dans un modèle de transplantation orthotopique de l'intestin grêle chez le rat. Nous suggérons que les thérapies orales ne sont efficaces que si administré en association à un ratio permettant la synergie. Ces résultats préliminaires, offrent une base de référence importante pour d'autres études pré-cliniques et cliniques en transplantation intestinale.

4.6.0 Perspectives

D'autres études seront nécessaires car la présente étude ne fournit pas toutes les réponses essentielles à la progression vers la phase clinique. Comme nous l'avons mentionné, notre protocole est limité par rapport à sa capacité d'évaluation d'une thérapie immunosuppressive: nous ne pouvions mener d'études histologiques avec un modèle orthotopique. Par conséquent, nous n'avons pas les moyens d'évaluer la toxicité des agents pour le greffon, soit la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité. Il s'agit évidemment de lacunes que nous ne pouvons combler. Nous avons établi l'association du SDZ RAD et du Néoral comme thérapie adéquate à la survie d'allogreffe de l'intestin grêle. Les études qui suivront devront être axées sur la toxicité et les effets secondaires de ce régime. Elles impliqueront des biopsies du greffon hétérotopique et le sacrifice hebdomadaire d'animaux pour permettre d'analyses histologiques de tous les organes afin de comparer le développement d'une toxicité pour le greffon. Ces études pourraient être faites chez les rongeurs et les cochons. Dépendant des résultats dans ces modèles, des essais chez les primates non-humains seront nécessaires avant le développement de la phase clinique. Bien que le SDZ RAD et le Néoral aient déjà fait leur entrée en phase clinique dans la transplantation de rein, de coeur et de poumon, nous parlons ici d'une transplantation de l'intestin grêle. D'autres associations devront aussi être évaluées, particulièrement celle du tacrolimus avec le SDZ RAD ou le Néoral.

En plus de varier les thérapies, il faudra aussi étudier l'absorption des traitements administrés par voie orale, particulièrement celle du SDZ RAD. Comme nous l'avons déjà mentionné, il est possible que durant la période de guérison des traumas opératoires et ischémiques, le greffon ne soit pas en mesure d'absorber complètement les doses administrées. Ceci se traduirait, en clinique, par un besoin d'initier la thérapie par voie intraveineuse. C'est pourquoi d'autres essais sont nécessaires afin de clarifier cet aspect de la greffe intestinale.

Voilà en résumé, ce qui sera nécessaire dans le but d'améliorer l'immunosuppression en transplantation intestinale. Comme les pionniers de la transplantation l'ont démontré, grâce à la méthode expérimentale que nous parvenons à des progrès médicaux. C'est ainsi que nous continuerons à développer les outils qui permettront d'alléger les souffrances des patients en attente d'une greffe

CHAPITRE QUATRE
BIBLIOGRAPHIE

Abu-Elmagd K, Reyes J, Todo S, Rao A, Lee R, Irish W, Furukawa H, Bueno J, McMichael J, Fawzy AT, Murase M, Demetris J, Rakela J, Fung JJ, Starzl TE. **Clinical Intestinal Transplantation: New Perspectives and Immunologic Considerations.** *J Am Coll Surg* 186; 1998: p512.

Alessiani M, Spada M, Dionigi P, Arbustini E, Regazzi M, Fossati GS, Zonta A. **Combined Immunosuppressive Therapy with Tacrolimus and Micophenolate Mofetil Small Bowel Transplantation in Pigs.** *Transplantation* 62; 1996; p563.

Allen PM. **Peptides in Positive and Negative Selection: A Delicate Balance.** *Cell* 1994; 76: 593.

Andoh TF, Burdmann EZ, Gransecini N, Houghton DC, et Bennett WM. **Comparison of Acute Rapamycin Nephrotoxicity with Cyclosporine and FK506.** *Kidney Int* 50; 1996; p1110.

Batiuk TD, Kung L, Halloran PF. **Evidence That Calcineurin is Rate-Limiting for Primary Human Lymphocyte Activation.** *J Clin Invest*, 100; 1997: p1894.

Billiar, RT, Barberoglio C, et Schraut WH. **Maltose Absorption as an Indicator of Small-Intestinal Allograft Rejection.** *J Surg Res* 37; 1984; p75.

Bakonyi NA, Kho IHJ, Garces-Silva MH, et Goldenberg S. **Validity of the Maltose Absorption Test in the Heterotopic Small Bowel Transplant Model.** *Transplantation Proc.* 26; 1994: p1670.

Calne Dans es Ginns, LC, Cosimi BA, et Morris PJ. **Immunobiology of Graft Rejection.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation.* Blackwell Science Inc. Malden, Massachusett: 1999.

Cantrell DT. **Cell Antigen Receptor Signal Transduction Pathways.** *Annu Rev Immunol* 14; 1996: p259.

Carrier M, Cartier R, Pelletier LC. **Assessment of the Need for Organ Transplantation in Quebec.** *CMAJ* 150; 1994: p1443.

Chatenoud, L. **Principles of Action of Biologic Immunosuppressants.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation*. Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p185.

Chen H, Corman J, Smeesters C. **Methods and Effects of Immunosuppression After small Bowel Transplantation in the Rat.** Dans es *Organ Transplantation in Rats*. Timmermann W, Gassel HJ, Ulrichs K, Shong R, Thiede A (eds). Springer Publisher, NY; 1998: p407.

Chen H, Qi S, Xu D, Bergeron E, Wu J, Beauregard-Zollinger L, Tan A, Dalozé P. **Immunosuppressive Effects of the Cyclosporine Derivative SDZ IMM125 on Kidney Allograft in Dog and Small Bowel and Pancreas Allografts in the Rat.** *Clinical Immunology and Immunopathology* 80; 1996: p76.

Chen H, Qi S, Xu D, Wu J, Dalozé P. **The Immunosuppressive Effect of Rapamycin on Mouse Small Bowel Transplantation.** *Transplantation* 61; 1996: p523.

Chen H, Qi S, Xu D, Fitzsimmons WE, Berkersky I, Sehgal SN, et Dalozé P. **Combined Effect of Rapamycin and FK506 in Prolongation of Small Bowel Graft Survival in the Mouse.** *Transplant Proc* 30; 1998; p2579.

Chen H, Wu J, Xu D, Aboujaoude M, Stepkowski S, Kahan B, Dalozé P. **The Effects of Rapamycin on Orthotopic Small Bowel Transplantation in the Rat.** *Transplant Proc* 24; 1992: p1157.

Chen H, Xu D, Qi S, Wu J, Luo H, Dalozé P. **Rapamycin graft pretreatment in small bowel and kidney transplantation in the rat.** *Transplantation* 59; 1995: p1084.

Chou, J, et Chou TC. **Dose-Effect Analysis with Microcomputers: Dose, Effect, Binding and Kinetics, Computer Software for the IBM PC Series (2.1 Dos, 5.25 floppy disk).** Elsevier-Biosoft, Cambridge England, 1989. Dans es Chou TC, et Rideout DC (Eds). Academic Press, NY: 1991: p72.

Chou T.C. **Derivation of Michaelis-Menten Type and Hill Type Equations for Reference Ligands.** *Proc Int Congr Pharmacol* 6th. 1975: p619.

Chou T.C. **On the Determination of Availability of Ligand Binding Sites in Steady-State Systems.** *J Theor Biol* 65; 1977; p345.

Chou T-C, Rideout DC. **Synergism, Antagonism, and potentiation in chemotherapy: An Overview.** Dans es Synergism and Antagonism in Chemotherapy. Academic Press. NY. 1991; p6.

Chou, TC et Talalay, P. **A Simple Generalized Equation for the Analysis of Multiple Inhibitions of Michaelis-Menten Kinetic System.** *J. Biol. Chem* 252; 1977: p6438.

Chou TC et 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.** *Wur j Biochem* 115: 1981; p207. Dans es Chou TC et Rideout DC (eds). Synergism and Antagonism in Chemotherapy. Academic Press. NY. 1991.

Chou, T.C. et Talalay, P. **Quantitative Analysis of Dose-Effect Relationships; The Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors.** *Adv Enzyme Regul* 22; 1984: p27.

Christians V et Sewing KF. **Cyclosporin Metabolism in Transplant Patients.** *Pharmacol Ther* 57; 1993: p291.

Clark A.J. **The Mode Of Action of Drugs on Cells.** Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland: 1933. Dans es Chou TC, et Rideout DC (Eds). Synergism and Antagonism in Chemotherapy. Academic Press, NY: 1991; p67.

Cohen DS, Fisher RA, Shapiro JH, Goggins WC, Tawes JW, Mills S, Contos M, Ham JM, Schoreder TJ. **Porcine Small Bowel Transplantation with Rapamycin-Based Induction Immunosuppression and Short-Course Cyclosporine or FK 506 Therapy.** *Transplant Proc.* 28; 1996: p2501.

Cole OJ, Shehata M, Rigg KM. **Effect of SDZ-RAD on Transplant Arteriosclerosis in the Rat Aortic Model.** *Transplant Proc* 30; 1998: p2200.

Commelin P. **Mythologie Grecque et Romaine.** Club France Loisir (Éditions Garnier), Paris: 1960.

Corman J, Clermont MJ, Dandavino R, Daloz P, Lachance JG, Mangel R, Corcos J, Chartrand C, Poirier N, Marleau D. **Development of Organ Transplantation in Quebec from 1985 to January 1990.** *Ann Chir* 45; 1991: p791.

Cristillo AD, Heximer SP, Russel L, Forsdyke DR. **Cyclosporin A inhibits Early mRNA Expression of G0-G1 Switch Gene 2 (G0S2) in Cultured Human Blood Mononuclear Cells.** *DNA Cell Biol* 16; 1997: p1449.

Dallman, MJ. **Cytokines and Transplantation.** *Curr Opin Immunol* 7; 1995: p632.

Dallman MJ, Shiho O, Page T. **Peripheral Tolerance to Alloantigen Results from Altered Regulation of the Interleukin 2 Pathway.** *J Exp med* 173; 1991: p79.

Desmeule M, Beliveau R, Wenger RM. **Molecular Interactions of Cyclosporine A with P-Glycoprotein. Photolabeling with Cyclosporin Derivatives.** *J Biol Chem* 272; 1997: p6647.

DiJoseph JF, Sharma RN, et Chang JY. **The Effect of rapamycin on Kidney Function in the Sparque-Dawley Rat.** *Transplantation* 53; 1992: p507.

Dupont E, Schandene L, Denys C, Wybran J. **Differential In Vitro Actions of Cyclosporine, Methyl-Prednisolone, and 6-Mercaptopurine: Implications for Drug Influence on Lymphocyte Activation Mechanisms.** *Clin Immunol Immunopathol* 40; 1986: p422.

Dunn SP, Cooney JF, Kulinsky A, Falkenstein K, Pierson A, Elder CA, Meligeni J. **Absorption Characteristics of a Microemulsion Formulation of Cyclosporine in de Novo Pediatric Liver Transplant Recipients.** *Transplantation* 60; 1995: p1438.

Elion GB, Bieber S, Hitching GH. **The Fate of 6-Mercaptopurine in Mice.** *Ann NY Acad Sci* 60; 1955: p297.

Frezza EE, Tsakis A, Fung JJ, Van TDH. **Small Bowel Transplantation: Current Progress and Clinical Application.** *Hepato-Gastroenterology* 43; 1996: p363.

Frei UA, Neumayer HH, Buchholz B, Niese D, Mueller EA. **Randomized, Double-Blind, One-Year Study of the Safety and Tolerability of Cyclosporine Microemulsion Compared with Conventional Cyclosporine in Renal Transplant Patients.** International Sandimmun Neoral Study Group. *Transplantation* 65(11); 1998: p1455.

Garcia B, Zhong R, Wijsman J, Wang P, Chen H, Sutherland F, Duff D, et Grant D. **Pathological Changes Following Intestinal Transplantation in the Rat.** *Transplant Proc* 22; 1990: p2469.

Gibson I et Medawar PB. **The Fate of Skin Homografts in Man.** *J Anat* 77; 1942: p299. Dans es Ginns, LC, Cosimi BA, et Morris PJ. Immunobiology of Graft Rejection. Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). Transplantation. Blackwell Science Inc. Malden, Massachusett: 1999: p9.

Ginns LC, Cosimi BA, et Morris PJ. **Immunobiology of Graft Rejection.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). Transplantation. Blackwell Science Inc. Malden, Massachusett: 1999.

Goodnow CC. **Transgenic Mice and Analysis of B-Cell Tolerance.** *Ann Rev Immunol* 10; 1992: p489.

Goulet O, Jan D, Ricour C, Révillon Y. **La Transplantation De l'Intestin Grêle, Faut-Il Continuer?** *La Revue Du Praticien* 46; 1996: p1445.

Grant D. **Commentaries.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). Transplantation. Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p434.

Grant D, Lamont D, Zhong R, Garcia B, Wang P, Stiller C, Duff, J. **Cr-EDTA: A Marker of Early Intestinal Rejection in the Rat.** *J Sug Res.* 46; 1989: p507.

Grant D, Wall W, Mimeault R, Zhong R, Garcia B, Stiller C, Duff J. **Successful Small-Bowel-Liver Transplantation.** *Lancet* 335; 1990: p181.

Grant D, Zhong R, Hurlbut D, Garcia B, Chen H, Lamont D, Wang P, Stiller C, Duff J. **A comparison of Heterotopic and Orthotopic Intestinal Transplantation in Rats.** *Transplantation* 51; 1991: p948.

Grant D, Zhong R, Gunn H, Duff J, Garcia B, Keown B, Wisjman J, Stiller J. **Graft-vs-Host Disease Associated with Intestinal transplantation in the Rat, Host Immune Function and General Histology.** *Transplantation* 48; 1989: p545.

Groth CG et Brattsrom C. **Commentaries.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds) *Transplantation*. Blackwell Sciences. Malden, Mass; 1999: p162.

Gruessner RWG. **Large Animal Models in Intestinal Transplantation.** *Transplant Proc* 30; 1998: p2629.

Gruessner RWB, Sharp HL. **Living Related Intestinal: First Report of a Standardized Surgical Technique.** *Transplantation* 64; 1997: p1605.

Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S. **Mycophenolate Mofetil in renal Allograft recipient: A Pooled Analysis of Three Randomized Double-Blind Clinical Studies in Prevention of Rejection.** *Transplantation* 63; 1997: p39.

Halloran PF. **Rethinking Immunosuppression in Terms of the Redundant and Nonredundant Steps in the Immune Response.** *Transplant Proc* 28; 1996: p11.

Hamilton D. **Reaching for the Impossible : the Quest for Tissue Replacement.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, et Morris PJ. *Immunobiology of Graft Rejection.* Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation*. Blackwell Science Inc. Malden, Massachusetts: 1999: p1.

Hausen B, Boeke K, Berry GJ, Segarra I, Benet LZ, Christians U, Morris RE. **Coadministration of Neoral and the Novel Rapamycin Analog, SDZ RAD, to Rat Lung Allograft Recipients.** *Transplantation* 67: 1999: p956.

Hayry, P. **Pathophysiology of Chronic Rejection.** *Transplantation Proc* 28; 1996: p7.

Hayry P, Defendi V. **Mixed Lymphocyte Cultures Produce Effector Cells: Model In Vitro for Allograft rejection.** *Science* 168; 1970: p133.

- Hiesse C, Charpentier B, Gries D. **Safety of Triple Immunosuppressive Treatment (Cyclosporine, Azathioprine, and prednisolone).** *Lancet* 2; 1985: p1355.
- Hill A. V. **The Combination of Hemoglobin With Oxygen and Carbon Monoxide.** *Biochem J* 7; 1913: p471.
- Dans es Chou TC, et Rideout DC (Eds) **Synergism, Antagonism, and potentiation in chemotherapy: An Overview .** Academic Press, NY: 1991: p67.
- Jan D, Michel JL, Goulet O, Sarnacki S, Lacaille F, Damotte D, Cezard JP, Aingrain Y, Brousse N, Peuchmaur M, Rengeval A, Colomb V, Jouvet P, Ricour C, Revillon Y. **Up-to-date evaluation of small bowel transplantation in children with intestinal failure.** *J Pediatr Sur* 34; 1999: p841.
- Jiang H, Suguo H, Takahara S. **Combined Immunosuppressive Effect of FK506 and Other Immunosuppressive Agents on Pha- and CD3-Stimulated Human Lymphocyte Proliferation in Vitro.** *Transplant Proc* 23; 1991: p2933.
- Kaneko H, Fischman MA, Buckley TM, Schweizer RT. **A Comparison of Portal Versus Systemique Drainage in the Pig Small Bowel Allograft Recipient.** *Surgery* 109; 1991: p663.
- Kahan BD. **Concentration-Controlled Immunosuppressive Regimesn Using Cyclosporine With Sirolimus or Brequinar in Human Renal transplantation.** *Transplant Proc* 27; 1995: p33.
- Kahan BD, Ghobrial R. **Immunosuppressive Agents.** *Surg Clin North Am* 74; 1994: p1029.
- Kahan BD, Gibbons S, et Tejpal N. **Synergistic Interaction of Cyclosporine and Rapamycin to Inhibit Immune Performances of Normal Human Peripheral Blood Lymphocytes In Vitro.** *Transplantation* 51; 1991: p232.
- Kahan BD, Jeppal N, and Gibbons-Stubbers S. **The Synergistic Interactions In Vitro and In Vivo of Brequinar Sodium with Cyclosporine or Rapamycin Alone and in Triple Combination.** *Transplantation* 55; 1993: p894.
- Kahan BD, Kramer WG, Wideman C, Fleshner SM, Lober ML, et Van Buren CT. **Demographic Factors Affecting the Pharmacokinetics of Cyclosporine Estimated by Radioimmunoassay.** *Transplantation* 41; 1986: p459.

Kahan BD, Wong RL, Carter C, Katz SH, Von Fellenberg J, Van Buren CT, Appel-Dingman S. **A Phase I Study of a 4-Week Course of SDZ-RAD (RAD) Quiescent Cyclosporine-Prednisone-Treated Renal Transplant Recipients.** *Transplantation* 68; 1999: p1100.

Kang JS, Kim DS, Lee CH, Shin IC, Shun YC, Choi HS, Ha JH, Kim JH. **Effects of Cyclosporine on Glucose Tolerance in Streptozotocin-Diabetic Rats: Cyclosporin May Deteriorate Insulin sensitivity.** *Transplant Proc* 21; 1999: p2150.

Khan FA, Tzakis AG. **Intestinal and Multivisceral Transplantation.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds) *Transplantation.* Blackwell Sciences. Malden, Mass: 1999: p422.

Kaplan B, Lown K, Craig R, Abecassis M, Kaufman D, Leventhal J, Stuart F, Meier-Kriesche, et Fryer J. **Low Bioavailability of Cyclosporine Microemulsion and Tacrolimus in a Small Bowel Transplant Recipient.** *Transplantation* 67; 1999: p333.

Kelly PA, Gruber SA, Behbod F, Kahan B. **Sirolimus, A New, Potent Immunosuppressive Agent.** *Pharmacotherapy* 17; 1997: p1148.

Keown PA. **Molecular and Clinical Therapeutics of Cyclosporine In Transplantation.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation.* Blackwell Sciences, Malden, Massachusetts; 1999: p101.

Keown PA for the National and International Neoral Study Groups. **Use of Cyclosporine Microemulsion (Neoral) in de Novo and Stable Renal Transplantation: clinical impact, Pharmacokinetic, Consequence, and Economic.** *Transplant Proc* 28; 1996: p2147.

Keown PA, Niese D. **Cyclosporine Microemulsion Increases Drug Exposure and Reduces Acute Rejection Without Incremental Toxicity in de Novo Renal Transplantation.** *Kidney Int* 54; 1998: p938.

Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Peterson VP, Fjeldborg, P. **Hyperacute Rejections of Kidney Allografts Associated with Pre-Existing Humoral Antibodies Against Donor Cells.** *Lancet* 2; 1966: p662.

Kolars JC, Merion RM, Awni WWM, Witkins PB. **First-Pass Metabolism of Cyclosporin by the Gut.** *Lancet* 338; 1991: p1488.

Kovarik JM, Mueller EA, Van Bree JB, Fluckiger SS, Lange H, Schmidt B, Boesken WH, Lison AE, et Kutz K. **Cyclosporine Pharmacokinetics and Variability from a Microemulsion Formulation: Multicenter Investigation in Kidney Transplant Patients.** *Transplantation* 58; 1994: p1.

Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Rheinhard M, Movva NR, et Hall MN. **Target of Rapamycin in Yeast, TOR2, is Essential Phosphatidylinositol Kinase homolog Required for G1 Progression.** *Cell* 73; 1993: p585.

Kuo CJ, Chumb J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, et Crabtree JR. **Rapamycin Selectively Inhibits Interleukin-2 Activation of p70S6 Kinase.** *Nature* 358; 1992: p70.

Lampen A, Christians V, Bader A, Hackbarth I, et Sewing KF. **Drug Interactions and Interindividual Variability of Cyclosporin Metabolism in the Small Bowel Intestine.** *Pharmacology* 53; 1996: p159.

Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. **Migration of Dendritic Leukocytes from Cardiac Allografts Into Host Spleens: A Novel Pathway for Initiation of Rejection.** *J Exp Med* 171; 1990: p307.

Lindholm A, Henricsson S, Dahlquist R. **The Effect of Food and Bile Acid Administration on the Relative Bioavailability of Cyclosporine.** *Br J Pharmacol* 29; 1990: p541. Dans es Ginns, LC, Cosimi BA, et Morris PJ. Immunobiology of Graft Rejection. Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). Transplantation. Blackwell Science Inc. Malden, Massachusett: 1999: p101.

Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, Brown MB, Buo W, Rossi SJ, Watkins PB, et Benet LZ. **Role of Intestinal P-glycoprotein (mdr1) in Interpatient Variation in the Oral Bioavailability of Cyclosporine.** *Clin Pharmacol Ther* 62; 1997: p48.

Luo H, Chen H, Daloz P, Chang JY, St-Louis B, et Wu J. **Inhibition of In Vitro Immunoglobulin Production By Rapamycin.** *Transplantation* 53; 1992: p1071.

Matzinger P, Graft Tolerance: A Duel of Two Signals. *Nature Med.* Vol5 (6), 1999 : 616-7.

Marquet RL, de Bruin RW, Heineman E, Jeekel J. **Efficacy of Rapamycin in Orthotopic Small Bowel Transplantation in the Rat.** *Transplant Proc* 25; 1993; p2695.

Michaelis, L, et Menten M.L. **Die Kinetik der Invertinwirkung.** *Biochem Z* 4;1913: p333-369. Dans es Chou TC, et Rideout DC (Eds) *Synergism, Antagonism, and potentiation in chemotherapy: An Overview.* Academic Press, NY: 1991: p67.

Morris RE. **Rapamycin, Antigungal, Antitumor, Antiproliferative, and Immunosuppressive Macrolides.** *Transplantation Rev* 6; 1992; p39.

Mottram PL, Han W-R, Purcell LJ. **Increased Expression of IL-4 and IL-10 and Decreased Expression of IL-2 and Interferon-Gamma in Long-Surviving Mouse Heart Allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy.** *Transplantation* 59; 1995: p559.

Nakai T, Kawabe T, Jurooka K, et Okuno K. **Immunologic Changes in Heterotopic and Orthotopic Small Bowel Transplantation in Rats.** *Transplant Proc* 31; 1999: p2661.

Nashan B, Moore R, Amlot P. **Randomized Trial of Basiliximab versus Placebo for Control of Acute Cellular Rejection in Renal Allograft Recipients.** *Lancet* 350; 1997: p1193.

Nielsen JH, Mandrup-Poulsen A, Nerup S. **Direct Effect of Cyclosporin A on Human Pancreatic Beta Cells.** *Diabetes* 35; 1986: p1545.

Oppenheim JJ, Wand JM, Chertov O. **The Role of Chemokines in Transplantation.** Dans es Tilney NL, Strom TB, Paul LC, eds, *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects.* Philadelphia: Lippincott-Raven 1996: p187.

Orosz, C.G., VanBuskirk, A.M. **Immune Mechanisms of Acute Rejection.** *Transplantation Proc* 30; 1998: p859.

Otto MG, Mayer AD, Clarien PA. **Randomized Trial of Cyclosporine Microemulsion (Neoral) versus Conventional Cyclosporine in Liver Transplantation: MILTON Study.** *Transplantation* 66; 1998; p1632.

Palestine AG, Austin HA III, Balow JE, Antonovych TT, Sabnis SG, Preuss HG, Nussenblatt RB. **Renal Histopathologic Alterations in Patients Treated with Cyclosporine for Uveitis.** *NEngJ Med* 314; 1986; p1293.

Paul LC, Benediktsson H. **Chronic Transplant Rejection: Magnitude of the Problem and Pathogenetic Mechanism.** *Tranplant Rev* 7; 1993; p96.

Peter TJ et Bjarnason I. **Use and Abuses of Intestinal Permeability Measurements.** *Canadian J Gastroenterol* 2; 1988; p127.

Primmett D, Levine M, Wlshko R, Keown PA. **Pharmacokinetic Study of Cyclosporine A: Factors Affecting the Usefulness of Trough Levels in Predicting Drug Exposure in Renal Transplant Patients.** *Clin Drug Invest* 13; 1997; p23.

Qi S, Xu D, Peng J, Vu MD, Wu J, Bekersky I, Fitzsimmons WE, Peets J, Sehgal S, Daloz P, et Chen H. **Effect of Tacrolimus (FK506) and Sirolimus (Rapamycin) Mono- and Combination-Therapy in Prolongation of Renal Allograft Survival in the Monkey.** *Transplantation* (in Press).

Rayhill ST, Sollinger HW. **Mycophenolate Mofetil: Experimental and Clinical Experience.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation*. Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999; p 185.

Revillard J-P. **Immunologie.** DeBoeck-Wesmael S.A., Bruxelles. 1994; p309.

Robertson RP. **Cyclosporin-Induced Inhibition of Insulin Secretion in Isolated Rat Islets and HIT Cells.** *Diabetes* 35; 1986; p1016.

Rocha B, Tancho C Von Boehmer H. **Clonal Anergy Blocks in vivo Growth of Mature T Cells and can be Reversed in the Absence of Antigen.** *J Exp Med* 177; 1993; p1517.

Rocken M, Urban JF, Shevach EM. **Infection Breaks T Cell Tolerance.** *Nature* 359; 1992: p79.

Roitt, I. **Transplantation.** Dans es, *Essential Immunology.* Blackwell Science, 9th Edition. 1997: p353.

Rossi G, Reggiani P, Regazzi MB, Gatti S, Ceccherelli F, Prato P, Galmarini D, et Fassati LR. **Neoral Increases Bioavailability Versus Oral Sandimmune After Porcine Small Bowel Transplantation.** *Transplant Proc* 30; 1998: p2654.

Saat, RE, de Bruin RW, Heineman E, Jeckel J, Marquest RL. **The Limited Efficacy of Cyclosporine in Preventing Rejection and Graft-vs-Host Disease in Orthotopic Small Bowel Transplantation in Rats.** *Transplantation* 50; 1990: p374.

Scatchard G. **The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ion.** *Ann NY Acad Sci.* 51; 1949: p660-672. Dans es Chou TC, et Rideout DC (Eds) *Synergism, Antagonism, and potentiation in chemotherapy: An Overview.* Academic Press, NY: 1991: p67.

Stepkowski SM, Chen H, Wang M-E, Daloz P, Kahan BD. **Inhibition of Host-Versus-Graft and Graft-Versus-Host Responses After Small Bowel Transplantation in Rats by Rapamycin.** *Transplantation.* 53; 1992: p258.

Schuler, W, Sedrani R, Cottens S, Haberlin B, Schulz M, Schuurman, HJ, Zenke G, Zerwes HG, Schreier MH. **SDZ RAD, A New Rapamycin Derivative: In Vivo and In Vitro.** *Transplantation* 24; 1997: p32.

Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, Joweegensen J, Meerloo T, Sedrani R, Tanner M, Zenke G, Schuler W. **SDZ RAD, A New Rapamycin Derivative: Synergism with Cyclosporine.** *Transplantation* 64; 1997: p32.

Schuurman HJ, Pally C, Weckbercker G, Schuler W, et Bruns C. **SDZ RAD Inhibits Cold Ischemia-Induced Vascular Remodeling.** *Transplant Proc* 31; 1999: p1024.

Schwartz RH. **Costimulation of T Lymphocytes; The Role fo CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in Interleukin 2 Production and Immunotherapy.** *Cell* 71; 1992: p1065.

Schwartz RH. **T Cell Clonal Anergy.** *Curr Opin Immunol* 9; 1997: p351.

Sehgal SN. **Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action.** *Ther Drug Monit* 17; 1995: p660.

Sehgal SN, et Dumont FJ. **Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: Pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction.** *Annu Rev Immunol* 10; 1992: p519.

Sehgal SN, Gaker H, et Vezina C. **Rapamycin (WAY-22, 989), a New Antifungal Antibiotic: Fermentation, Isolation, and Characterization.** *J Antibiot* 28; 1975: p727.

Senel F, et Kahan BD. **New Small Molecule Immunosuppressive Agents.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation*. Blackwell Sciences. Malden, Mass: 1999; p174.

Shah MB, Martin JE, Schroeder TJ, et First MR. **The Evaluation of the Safety and tolerability of Two Formulations of Cyclosporine: Neoral and Sandimmun.** *Transplantation* 67; 1999: p1411.

Sigalet, DL, Knetemen NM, Fedorak RM, Kizilisik TA, et Thomson ABR. **Intestinal Function Following Allogeneic Small Intestinal Transplantation in the Rat.** *Transplantation* 53; 1992; p264.

Sigalet DL, Thome PC, Williams DC, Martin GR, et Yatscoff RW. **Effect of Combined Immunosuppressive Drug Therapy on Small Intestinal Nutrient Transport in the Rat.** *Clin Biochem* 32; 1999: p51.

SigmaStat for Windows Version 2.0 . **Help Topics: Multiple Comparison Options for an ANOVA Test.** Copyright© Jandel Corporation 1992-1995.

Steinman, RM. **The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity.** *Annu Rev Immunol* 9; 1991: p271.

Stepkowski SSM, Chen H, Daloz P, et Kahan BD. **Rapamycin, a Potent Immunosuppressive Drug for Vascularized Heart, Kidney, and Small Bowel Transplantation in the Rat.** *Transplantation* 51; 1991: p22.

- Stepkowski SSM, Chen HF, Wang ME, Daloz P, et Kahan BD. **Inhibition of Host-Versus-Graft and Graft-Versus-Host Responses After Small Bowel Transplantation in Rats by Rapamycin.** *Transplantation* 53; 1992: p258.
- Stepkowski SH, Napoli KL, Wang ME, Qu X, Chou TC, et Kahan BD. **Effects of the Pharmacokinetic Interaction Between Orally Administered Sirolimus and Cyclosporin on the Synergistic Prolongation of Heart Allograft Survival in the Rat.** *Transplantation* 62; 1996: p986.
- Strom TP, Roy-Chadhury P, Manfro R, Zheng XX, Nikerson PW, Wood K, et Bushell A. **The Th1/Th2 Paradigm and the Allograft Response.** *Curr Opin Immunol* 8; 1996: p688.
- Sugimoto T, Stewart S, et Guan KL. **The Calcium-Calmodulin –Dependent Protein Phosphatase Calcineurin is the Major Elk-1 Phosphatase.** *J Biol Chem* 47; 1997: p29415.
- Sykes M, et Sachs DH. **Tolérance.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation*. Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p81.
- Taesch S, Niese D, et Mueller EA. **Sandimmun Neoral A new Formulation of Cyclosporine A With Improved Pharmacokinetic Characteristics: Safety and Tolerability in Renal Transplant Patients.** *Transplant Proc* 26; 1994: p3147.
- Todo S, Tzakis A, Abu-Elmagd K, Reyes J, Nakamura K, Casavilla A, Selby R, Nour BM, Wright H, et Fung JJ. **Cadaveric small bowel and small bowel-liver transplantation in humans.** *Transplantation* 53; 1992: p369.
- Tzakis AG, et Gruessner RWG. **Future of Living Related Small Bowel Transplantation in Children.** *Pediatr Transplantation* 2; 1998: p1.
- Vanderscher J, et Meinzer A. **Rationale for the Development of Sandimmun and Neoral.** *Transplant Proc* 26; 1994: p2925.

Vincenti F, Kirkman R, et Light S. For The Daclizumab Triple Therapy Study Group, **Interleukin-2 Blockade with Daclizumab to Prevent Acute Rejection in Renal Transplantation.** *N Engl J Med* 338: 1998: p161.

Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, Dumont L, Busque S, Daloze P, et Chen H. **Tacrolimus and Sirolimus In combination are not Antagonistic but Produce Extended Graft Survival in Cardiac Transplantation in the Rat.** *Transplantation* 64; 1997: p1853.

Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Peng J, Daloze P, Sehgal S, Leduc B, et Chen H. **Synergistic Effects of Rof Mycophenolate Mofetil and Sirolimus in Prevention of Acute Heart, Pancreas, and Kidney Allograft Rejection in the Rat.** *Transplantation* 66; 1998: p1575.

Wagner Karl. **New Small Molecule Immunosuppressive Agents.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation.* Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p 179.

Walker RG. **Steroids and Transplantation.** Dans es Ginns LC, Cosimi BA, Morris PJ (eds). *Transplantation.* Blackwell Sciences, Malden, Massachusett; 1999: p115.

Walsh, CM, Hayashi, F, et Saffron DC. **Cell-Mediated Cytotoxicity Results from , but May Not Be Critical for Primary Allograft Rejection.** *J Immunol* 156; 1996: p566.

Wang M, Qu X, Stepkowski SM, Chou TC, et Kahan BD. **Beneficial Effect of Graft Perfusion with Anti-T Cell Receptor Monoclonal Antibodies on Survival of Small Bowel Allografts in Rat Recipient Treated with Brequinar Alone or in Combination with Cyclosporine and Sirolimus.** *Transplantation* 61; 1996: p458.

Webb JL. **Enzyme and Metabolic Inhibitors.** Academic Press. NY: vol 1, 1963; p488-512. Dans es Chou TC et Rideout D (Eds). *Synergism and Antagonism in Chemotherapy.* Academic Press, NY. 1991: p14.

Wenger RM. **Structures of Cyclosporine and Its Metabolites.** *Tranplant Proc* 22; 1990: p1104.

Zerwes H-G, et Schreier MH. **SDZ-RAD a New Rapamycin Derivative.** *Transplantation* 64; 1997: p36.

Zhong R, Grant D, Sutherland F, Wang PZ, Chen H, Lo S, Stiller C, et Duff J. **Refined Technique for Intestinal Transplantation in the Rat.** *Microsurgery* 12:1991:p268.