

Université de Montréal

---

**L'effet du traitement immunosuppresseur sur la circulation coronaire**

Par

Ahmad Khalil

Faculté des études supérieures

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Pathologie

Juin 1997

©Ahmad Khalil, 1997



W  
4  
U58  
1998  
v.040

Université de Montréal

L'effet du traitement immunosuppresseur sur la circulation coronaire



Université de Montréal

Bibliothèque



1997

1997



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

L'effet du traitement immunosuppresseur sur la circulation coronaire

présentée par:

Ahmad Khalil

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Gaëtan Jasmijn  
Michel Carrier  
Jean-Pierre Latour  
Pierre Fagot  
John Kingma  
Teresa Kus

Thèse acceptée le: 28.01.1998

---

## Sommaire

*La Cyclosporine A (CSA) et le Tacrolimus (FK)* sont deux agents immunosuppresseurs largement utilisés en clinique pour leurs capacités à prévenir les phénomènes de rejet. Malgré l'amélioration considérable dans les résultats cliniques à court terme de la survie des greffés cardiaques, le pronostic à long terme reste lourdement grevé par l'apparition de la maladie coronaire de greffon. La cause de cette maladie est encore malconnue, et l'introduction de la CSA et du FK comme traitement immunosuppresseur n'a pas changé son incidence de survenue chez les greffés cardiaques. Le but de notre étude était d'examiner l'effet de la CSA et du FK sur la circulation coronarienne, spécifiquement sur l'endothélium vasculaire et sur le système de signalisation transmembranaire dépendant de *la protéine-G (PG)*.

Dans le premier volet, nous avons étudié l'effet de l'administration intracoronarienne directe de la CSA sur le débit coronaire et sur la réactivité vasculaire coronarienne. Nous avons utilisé un modèle canin développé dans notre laboratoire. Des chiens étaient anesthésiés et instrumentés pour la mesure du débit sanguin coronaire dans *l'artère interventriculaire antérieure (IVA)* et dans *l'artère circonflexe (Cx)*. Les niveaux sanguins intracardiaques de la CSA ont été mesurés. Les paramètres hémodynamique ont été enregistrés de façon continue durant l'expérience. Deux doses de CSA, une première de 5 mg et une deuxième de 10 mg ont été administrées directement dans l'IVA de chaque animal. Le débit de l'IVA a diminué significativement après l'injection de 5 et 10 mg de CSA. Cette diminution dans le débit de l'IVA a été associée à un niveau de cyclosporinémie élevé, et à une augmentation de la résistance vasculaire de l'IVA.

Dans le deuxième volet nous avons utilisé le même modèle canin pour clarifier le mécanisme responsable de l'effet vasoconstricteur coronarien de la CSA (20 mg administrée sur une période de 20 minutes). Nous avons testé

l'effet vasorelaxant de l'*acétylcholine* (Ach) (30 ng/kg), l'*adénosine* (Ade) (100 ng/kg), la *nitroglycérine* (NTG) (1.7 µg/kg), la *sérotonine* (5-HT) (1 µg/kg), la *bradykinine* (BK) (200 ng/kg), et la *substance P* (SP) (1 ng/kg) avant et après l'administration de la CSA et de la *L-arginine* (L-arg) (10 mg/kg/min). Nous avons démontré que la toxicité vasculaire de la CSA implique une dysfonction endothéliale et myogénique, et que cette dysfonction endothéliale peut être le résultat d'interférence avec les récepteurs cellulaires. Nous avons observé aussi que les niveaux d'endothéline plasmatique périphériques et intracardiaques n'étaient pas affectés par la CSA.

Dans le troisième volet, nous avons comparé l'effet coronarien de la CSA avec celui d'un autre agent immunosuppresseur le FK (0.05 mg/kg administré sur une période de 20 minutes). Nous avons démontré que comme la CSA, le FK a causé une toxicité vasculaire à travers un mécanisme endothélium-dépendant et myogénique. La dysfonction endothéliale induite par le FK, comme pour la CSA peut être la conséquence d'altération au niveau des récepteurs cellulaires. Contrairement à la CSA, le FK n'a pas induit une vasoconstriction coronarienne lors de son administration intracardiaque.

Dans le quatrième volet nous avons étudié l'effet de la CSA et du FK sur le système de signalisation transmembranaire dépendant de la PG en déterminant la formation d'*adénosine monophosphate cyclique* (AMPC) et l'activité GTPasique dans les cellules myocardiques. Nous avons démontré que la CSA, et non le FK, a augmenté significativement la formation d'AMPC stimulée par forskoline, et l'activité GTPasique.

Nous concluons que l'administration intracoronarienne de CSA, et non du FK, cause une réponse vasoconstrictive. La CSA et le FK ont induit une toxicité vasculaire à travers un mécanisme endothélium-dépendant et myogénique. Enfin, la CSA et non le FK a pu interférer avec le fonctionnement du système de signalisation transmembranaire en affectant les activités d'adénylyl cyclase et GTPasique.

## Table des matières

<b>Sommaire</b> .....	<b>iii</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Partie 1 : Revue de la littérature</b> .....	<b>3</b>
<b>Chapitre 1 : Le concept d'immunosuppression</b>	
1.1 Introduction .....	3
1.2 La modulation de la réponse immunitaire .....	3
1.2.1 L'activation et la prolifération des cellules T .....	4
1.2.1.1 Le premier signal .....	4
1.2.1.2 Le deuxième signal .....	6
1.2.1.3 Le troisième signal .....	7
1.3 L'importance de la phase "S" (la synthèse de l'ADN) .....	8
1.4 La réponse des cellules-B et leur interactions avec les cellules-T .....	8
1.5 Manipulation de la réponse immunitaire .....	9
1.6 L'immunosuppression et le contexte des trois signaux .....	11
1.6.1 Le blocage du premier signal .....	11
1.6.1.1 Les agents agissants sur les APCs .....	11
1.6.1.2 Les agents agissants sur les PTKs .....	12
1.6.1.3 Les inhibiteurs de la calcineurine .....	12
1.6.2 Blocage de deuxième signal .....	13
1.6.3 Blocage de troisième signal .....	13
1.6.3.1 L'interférence dans la transmission de signal .....	13
1.6.3.2 Les inhibiteurs de la synthèse de novo des nucléotides ...	14
<b>Chapitre 2 : Les agents immunosuppresseurs</b>	
2.1 La cyclosporine A .....	15

2.2 2.1.1	Introduction	15
2.1.2	Le mécanisme d'action de la CSA	15
2.1.3	Propriétés pharmacocinétiques de la CSA	18
2.1.4	La CSA dans la transplantation cardiaque	19
2.1.5	Maladie des coronaires du greffon cardiaque	20
2.1.6	La CSA et l'hypertension artérielle	23
2.1.7	La néphrotoxicité de la CSA	25
2.1.8	Les dyslipidémies chez les transplantés	26
2.1.9	La toxicité vasculaire de la CSA	27
2.2	Le Tacrolimus	30
2.2.1	Introduction	30
2.2.2	Mécanisme d'action du FK	30
2.2.3	La pharmacocinétique du FK	32
2.2.4	Le surveillance thérapeutique du FK	33
2.2.5	Les effets secondaires et la toxicité du FK	34

### **Chapitre 3 : La circulation coronaire**

3.1	Introduction	36
3.2	Artères de conductance et artères de résistance	36
3.3	La microcirculation capillaire	37
3.4	Le phénomène de dilatation débit-dépendante	38
3.5	La vasomotricité coronaire	40
3.6	Les produits de l'endothélium coronaire	41
3.7	Autorégulation du débit coronaire	46
3.7.1	Régulation métabolique	47
3.7.1.1	Étroite dépendance du débit coronaire vis-à-vis de la MVO <sub>2</sub>	47
3.7.1.2	Mécanismes régulateurs, rôle déterminant de l'adénosine	49
3.7.2	Forces de compression extrinsèque cardiaque	50
3.7.3	Régulation nerveuse de la circulation coronaire	51

3.7.3.1 Régulation adrénèrgique de la circulation coronaire	.....51
3.7..3.2 Régulation $\alpha$ -adrénèrgique de la circulation coronaire	..52
3.7.3.3 Régulation $\beta$ -adrénèrgique de la circulation coronaire	.....54
3.7.4 Régulation cholinèrgique de la circulation coronaire	.....55
3.8 Concept de rèsèrve coronaire	.....55

## **Chapitre 4 : L'endothélium coronaire**

4.1 Introduction	.....57
4.2 Les rèsèpteurs de l'EV	..... 57
4.3 Le monoxyde d'azote	.....60
4.3.2 Chimie et biochimie du NO	.....61
4.3.3 Biosynthèse de NO	.....62
4.3.3.1 Régulation des NO-synthases	.....63
4.3.4 Hémodynamie sanguine et NO	.....64

## **Chapitre 5 : L'endothélium et le rejet de greffon**

5.1 Introduction	.....66
5.2 Propriétés immunologiques de l'endothélium	.....66
5.2.1 L'endothélium et la présentation des allo-antigènes	.....68
5.3 L'endothélium et la réaction de rejet	.....70
5.3.1 L'endothélium et le rejet hyperaigu et aigu	.....70
5.3.2 L'endothélium et le rejet chronique	.....71

## **Chapitre 6 : Les endothélines**

6.1 Introduction	.....73
6.2 La biologie moléculaire des endothélines	.....73
6.3 Les rèsèpteurs des endothélines	.....75
6.3.1 La régulation et l'expression des rèsèpteurs des endothélines	...76
6.4 Les seconds messagers des endothélines	.....77

6.5 La physiologie des endothélines .....	79
6.6 La physiopathologie des endothélines .....	80

## **Chapitre 7 : La protéine G**

7.1 Introduction .....	83
7.2 Structure des protéines G .....	83
7.2.1 La sous-unité $\alpha$ .....	84
7.2.2 Les sous-unités $\beta$ et $\gamma$ .....	86
7.3 Interaction PG-récepteur .....	86
7.4 Interaction PG-effecteur .....	89
La question de la spécificité de la PG .....	90
7.5 Inhibition pharmacologique de la PG .....	91
7.6 La PG et la dysfonction endothéliale .....	92

## **Partie 2 : Contribution originale .....95**

### **Chapitre 8 : La cyclosporine A diminue le débit coronarien chez le chien**

8.1 Résumé (français) .....	96
8.2 Résumé (anglais) .....	96
8.3 Introduction .....	97
8.4 Matériel et méthodes .....	97
8.5 Résultats .....	98
8.6 Discussion .....	99
8.7 Bibliographie .....	100

### **Chapitre 9 : Cyclosporine A-induced coronary artery vasoconstriction through myogenic and**

## **endothelium-dependent mechanisms**

9.1 Résumé (français) .....	101
9.2 Résumé (anglais) .....	103
9.3 Introduction .....	103
9.4 Matériel et méthodes .....	103
9.5 Résultats .....	104
9.6 Discussion .....	105
9.7 Bibliographie .....	105

## **Chapitre 10 : Coronary vascular response and G-protein involvement after immunosuppressive treatment : a comparative study between cyclosporine A and tacrolimus**

10.1 Résumé (français) .....	108
10.2 Résumé (anglais) .....	110
10.3 Introduction .....	112
10.4 Matériel et méthodes .....	113
10.5 Résultats .....	118
10.6 Discussion .....	122
10.7 Bibliographie .....	127

## **Chapitre 11 : Discussion .....**

## **Conclusion .....**

## **Bibliographie .....**

## **Remerciements .....**

---

## Liste des figures

- Figure 9.1 : La séquence des injections et la réponse à l'acétylcholine à l'adénosine et à la nitroglycérine avant et après l'administration de la cyclosporineA et de la L-arginine .....102
- Figure 9.2 : L'effet et les changements maximaux après l'injection intracoronarienne d'acétylcholine,d'adénosine et de la nitroglycérine avant et après l'administrartion de la cyclosporine A et de la l-arginine .....102
- Figure 9.4 : Les effets des occlusions de courte durée de l'artère interventriculaire antérieure et de la circonflexe avant et après l'administration de la cyclosporine et de la L-arginine ....103
- Figure 10.1 : Les effets maximaux du débit coronaire dans l'artère interventriculaire antérieure dans le cinquième groupe ....136
- Figure 10.2 : Les effets maximaux du débit coronaire dans l'artère interventriculaire antérieure dans le sixième groupe .....137
- Figure 10.3 : L'activité GTPasique après la cyclosporine A et le tacrolimus .....138

---

## Liste des tableaux

Tableau 8.1 : Effets hémodynamiques après les injections intracoronariennes de la solution saline et celle de 5 mg et 10 mg de la cyclosporine A .....	96
Tableau 10.1 : Les effets maximaux du débit coronaire dans le premier groupe (n=13) .....	133
Tableau 10.2 : Les effets maximaux du débit coronaire dans le troisième groupe (n=9) .....	134
Tableau 10.3 : Les effets maximaux du débit coronaire dans le quatrième groupe (n=9) .....	135

## Liste des abréviations

µg	Microgramme
AC	Adénylyle cyclase
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPC	Adénosinemonophosphate cyclique
ANF	Facteur natriurétique atrial
APC	Cellules présentatrices d'antigènes
ATP	Adénosine triphosphate
BK	Bradykinine
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CGRP	Peptide de calcitonine gène-dépendant
CML	Cellules musculaires lisses
CMV	Cytomégalovirus
CSA	Cyclosporine A
DAG	1,2 diacylglycérol
ECE	Enzyme de conversion d'endothéline
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDRF	Facteur de relaxation dépendant de l'endothélium
ELIZA	Essai immuno-absorbant enzyme-dépendante
EMIT	Technique d'essai immunologique enzymatiquement multipliée
ET	Endothéline
ETA	Récepteur d'endothéline A
ETB	Récepteur d'endothéline B
EV	Endothélium vasculaire
FK	Tacrolimus
GC	Guanylyle cyclase

---

GMPC	Guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
h	Heure
H <sup>+</sup>	Hydrogène
HDL	Lipoprotéine à haute densité
HLA	Antigène leucocytaire humain
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
IDC	Cellules dendritiques interstitielles
IL	Interleukine
IMPDH	Inosine monophosphate déhydrogénase
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
K <sup>+</sup>	Potassium
kg	Kilogramme
L	Litre
L-arg	L-arginine
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LFA	Antigène de la fonction lymphocytaire
L-NAME	L-nitro-arginine-methyl ester
L-NMMA	N <sup>w</sup> -monométhyl-L-arginine
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MLV	Muscle lisse vasculaire
mRNA	Acide ribonucléique-messenger
MVO <sub>2</sub>	Consommation en oxygène du myocarde
Na <sup>2+</sup>	Sodium
NADPH	Nicotine adénine dinucléotide phosphate
NFAT	Facteur nucléaire des cellules T-activées
ng	Nano-gramme
nmol	Nanomol

---

NO	Monoxyde d'azote
O <sub>2</sub>	Oxygène
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PG	Protéine G
PGI <sup>2</sup>	Prostacycline
PKC	Protéine kinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
pmol	Picomol
PTK	Protéines tyrosines kinases
RIA	Essai radio-immunologique
s	Seconde
5-HT	Sérotonine
SP	Substance P
TGF	Facteur de croissance transformant
TNF	Facteur de nécrose tissulaire
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$
TOR	Cible de la rapamycine
VCAM	Molécule d'adhésion vasculaire
VIP	Peptide intestinal vasoactif
VLA	antigène de ligand vasculaire

## Introduction

---

La thérapie immunosuppressive réalisée par la Cyclosporine A et récemment par le Tacrolimus a amélioré d'une façon considérable la survie des patients qui ont eu une transplantation d'organe solide. Les traitements immunosuppresseurs actuels font que les rejets aigus sont mieux prévenus, traités plus efficacement et dépistés beaucoup plus précocement. Ils sont ainsi relégués à la deuxième place des causes de mortalité précoce, loin derrière les infections. Depuis la première greffe cardiaque, des milliers de transplantations cardiaques ont été recensées de par le monde. A un an, les courbes de survie actuarielle donnent des résultats presque identiques d'une équipe à l'autre avec au moins 80% de survivants. À 5 et 7 ans, les chiffres diffèrent et oscillent entre 60% et 70%. Cependant, malgré ce progrès, le pronostic à long terme reste lourdement grevé par l'apparition de la maladie coronaire du greffon cardiaque. C'est l'artériosclérose accélérée du greffon, synonyme de rejet chronique dont les lésions sont particulières car diffuses, concentriques, distales et d'évolution rapide, apparaissant surtout après un an suivant la transplantation. La fréquence de cette maladie est de 40 à 50% à 5 ans. C'est la première cause de mortalité à long terme chez les greffés cardiaques.

Le traitement immunosuppresseur possède aussi des effets vasculaires, qui sont démontré sur les artères rénales, fémorales et mésentériques, en provoquant la relâche des agents vasoconstricteurs comme l'endothéline et la thromboxane, et en stimulant les terminaisons nerveuses sympathiques. Peu d'intérêt a été accordé à un rôle potentiel de la thérapie immunosuppressive sur la circulation coronarienne et son implication potentielle dans la pathogénèse de la maladie coronaire du greffon cardiaque. L'introduction de la CSA et du FK nous a permis d'avoir une meilleure contrôle sur les épisodes de rejet myocardique, sans diminuer l'incidence de la maladie coronaire du greffon.

Ainsi le présent travail vise à démontrer l'effet de la thérapie immunosuppressive sur la circulation coronaire, spécifiquement sur

l'endothélium vasculaire et de clarifier le mécanisme responsable ainsi que les mesures préventives contre cet effet. Cette étude vise à préciser l'impact de l'immunosuppression et ses différents mécanismes sur l'endothélium vasculaire et à clarifier le rôle de l'endothéline, du monoxyde d'azote et de la protéine G dans l'interaction entre les agents immunosuppresseurs et les différentes structures vasculaires.

Dans un premier temps nous caractériserons l'effet de l'injection intracoronarienne de la CSA sur la réactivité vasculaire coronarienne et sur la fonction endothéliale et nous déterminerons les niveaux plasmatiques d'endothéline-1 dans le sinus coronaire. Dans un deuxième nous procéderons à caractériser l'effet du FK sur la circulation coronarienne et sur la fonction endothéliale. De plus, nous examinerons l'effet de la CSA et du FK sur le système de signalisation transmembranaire dépendant de la protéine-G en mesurant la formation d'AMP cyclique et l'activité GTPasique.

## Partie 1: Revue de la littérature

### Chapitre 1

#### Le concept d'immunosuppression

##### 1.1 Introduction

La meilleure façon d'améliorer le sort des patients transplantés, est d'améliorer l'immunosuppression. Même avec le nouveau concept de xénotransplantation, on aura besoin d'un protocole d'immunosuppression amélioré. L'amélioration de l'immunosuppression, ne passe pas par une augmentation d'intensité, en effet le degré important d'immunosuppression qu'on atteint a produit une incidence de survenue élevée des maladies néoplasiques (London et coll. 1995; Opelz et coll. 1993).

On assiste à une croissance considérable dans la science d'immunosuppression, ce qui génère l'utilisation de nouveaux agents et des nouvelles informations sur les mécanismes responsables.

Ordinairement, la réponse immunitaire cible les cellules et les tissus endommagés, qui sont des régions infectées et qui pourraient générer des signaux pathologiques. (Matzniger et coll. 1993). Les *antigen-presenting cells* (APCs) ou cellules présentatrices d'antigènes, se trouvent en grand nombre dans les tissus endommagés, ce qui témoigne du recrutement et de la progression du processus de régénération tissulaire. Un autre indice qui témoigne de l'endommagement tissulaire (par exemple dans les reins et dans l'endothélium vasculaire), est l'augmentation de l'expression du *major hiscompatibility complex* (MHC) ou complexe majeure d'histocompatibilité soit de classe I ou de classe II. (Goes et coll. 1995).

##### 1.2 La modulation de la réponse immunitaire

Les *interstitiel dendritic cells* (IDC) ou cellules dendritiques interstitielles classe II, représentent les APCs dans la réponse immunitaire primaire. (Ibrahim et coll. 1995). Les IDC reflètent et intègrent l'information à propos des facteurs locaux comme l'endommagement tissulaire et le stress. Ces facteurs locaux déterminent si les antigènes (Ags) vont déclencher l'activation des lymphocytes-T. En transplantation, les APCs peuvent être présentées soit par le donneur ou soit par le receveur, en utilisant deux voies différentes : directe et/ou indirecte. Dans la réponse immunitaire ordinaire contre un agent infectieux, la voie indirecte est la plus souvent utilisée pour la présentation d'Ag (revue dans Auchincloss 1995)

Le processus de reconnaissance de la greffe est presque totalement dépendant des lymphocytes-T. Fung-Leung et coll (1996) ont montré que les souris dépourvues des cellules T, ne seront pas capables de rejeter même les tissus xénogéniques. Cependant, les cellules T ne sont pas les seules actrices dans la réponse immunitaire, les cellules B et ses anticorps jouent eux aussi un rôle important, particulièrement chez les patients sensibilisés.

### **1.2.1 L'activation et la prolifération des cellules T**

Trois étapes ou signaux sont indispensables pour que les cellules-T puissent s'activer et produire des cytokines en passant de la phase inactive *Gap* (Go), aux phases actives G1 et *DNA synthesis* (S) ou synthèse de l'ADN.

#### **1.2.1.1 Le premier signal**

Le premier signal ou le signal d'Ag, représente la première étape dans le processus d'activation des cellules-T, et qui s'exprime par la liaison entre MHC et une peptide. (Feung-Leung et coll. 1996). Les produits du MHC sont les Ag et les structures présentatrices d'Ag aux cellules-T. Ces produits sont classés en MHC-classe I et MHC-classe II. (Feung-leung et coll. 1996). La base de reconnaissance allogénique entre deux individus se situe en partie dans la différence des peptides présentés par les classes de MHC aux cellules-T.

Ordinairement, un receveur possède une tolérance à ses propres peptides, et réagit contre les peptides étrangérés (Feung-Leung et coll. 1996).

Suite à la liaison entre le complexe MHC-peptide et les récepteurs, les cellules-T subissent différentes réactions soit une apoptose, une anergie et une activation partielle ou soit une activation complète avec une expansion clonale et modulation de l'effecteur (Feung-Leung et coll. 1996).

La liaison entre les récepteurs et le complexe MHC-peptide possède une haute spécificité et une basse affinité (Janeway et coll. 1995). Le mécanisme exacte de l'activation des récepteurs des cellules-T n'est pas encore bien connu. Toutefois, comme dans le cas d'autres récepteurs, ce processus peut impliquer des changements conformationnels. Il a été montré que le MHC-classe II est capable de déformer le récepteur pour induire des changements conformationnels, et que chaque molécule MHC peut déclencher successivement plusieurs récepteurs (Halloran et coll. 1993).

L'engagement d'Ag amène à l'altération conformationnelle des récepteurs et de corécepteurs lymphocytaires, spécifiquement le CD3 qui joue le rôle de transducteur des signaux. Cette altération des protéines transmembranaires, active une série de *protéines tyrosines-kinases* ( PTKs ) particulièrement la p56lck, la p59fyn et la p70ZAP (Janeway et coll. 1995). Les PTKs activent deux effecteurs différents: la calcineurine et la kinase "ras-map".

1) la calcineurine est un effecteur qui joue un rôle critique dans l'expression des cytokines. Lors de l'activation de la *phospholipase C* (PLC), une phospholipide membranaire est dissoute - la phosphatidylinositol biphosphate - et un médiateur soluble, l'*inositol triphosphate* (IP3), sera libéré dans la cytosol. Ce dernier se lie aux récepteurs correspondants sur le reticulum endoplasmique en causant la libération transitoire du calcium. À son tour, la libération du calcium du réticulum endoplasmique ouvre les canaux calciques, en maintenant un haut niveau de calcium cytosolique. Une fois libéré, le calcium cytosolique se lie avec la calcineurine et avec la sérine phosphatase dépendante de calcium et de calmoduline (Kissinger et coll. 1995; Griffith et coll. 1995). La calcineurine

est une protéine non-redondante ; une suppression génétique de l'activité de la calcineurine endommage irréversiblement la réponse immunitaire (Zhang et coll. 1996). Parmi les substrats qui sont déphosphorylés par la calcineurine, est le *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) ou facteur nucléaire des cellules-T activées (Rao et coll. 1994). Cette protéine contient des régions constituées de plusieurs sérines qui peuvent être phosphorylées dans son état inactivé et déphosphorylées dans son état activé. Lors de son activation, la calcineurine fait déphosphoryler ces sérines. Une fois déphosphorylée, la protéine NFAT se translocalise dans le nucléole et se lie aux différents promoteurs des cytokines, comme l'*interleukine* (IL2), l'interferon  $\gamma$ , l'IL4, le *tissue necrosis factor* (TNF) ou facteur de nécrose tissulaire et d'autres. Le promoteur d'IL2 est le mieux connu dans le fonctionnement des cellules-T (Rao et coll. 1994).

2) Le deuxième effecteur est la kinase "ras-map". Le déclenchement des récepteurs lymphocytaires fait activer la molécule "ras-p21" qui est une molécule de liaison avec la *guanosine triphosphate* (GTP) et laquelle représente un interrupteur majeur contrôlant plusieurs aspects de l'activation cellulaire (Burgering et coll. 1995; Cantrell et coll. 1996).

#### **1.2.1.2 Le deuxième signal.**

Le deuxième signal ou le signal de la costimulation de l'activation et de la prolifération lymphocytaire, se réalise par l'intermédiaire des récepteurs membranaires CD28. (June et coll. 1994). Les récepteurs CD28 sont engagés par les costimulateurs B7-1 et B7-2 qui sont fournis par les APCs (June et coll. 1994). Le costimulateur déterminera si l'engagement des récepteurs par les produits du MHC amènera à l'activation, à l'anergie, à l'apoptose et/ou à l'ignorance complète (June et coll. 1994).

Le signal de CD28 implique les PTKs, la lipide-kinase et la sphingomyelinase (Aggarwal et coll. 1994; Boucher et coll. 1995). Le récepteur CD28 augmente modérément la transcription et la demie-vie des cytokines, probablement via les facteurs de transcriptions appartenant à la famille NF- $\kappa$ B

(Lai et coll. 1994).

Suite à la présentation d'Ag, et à la costimulation par le CD28 (le premier et le deuxième signal) les cellules-T commencent à produire les cytokines et expriment des molécules membranaires similaires aux cytokines, comme la CD40. Cette étape de synthèse et de production des cytokines, amènera les cellules-T à passer de la phase inactive (Go) à la phase active (G1) sans subir l'expansion clonale (Gillis et Smith 1977; Morgan et coll. 1976).

### 1.2.1.3 Le troisième signal

Durant cette étape, les cytokines comme l'IL2, l'IL4 et l'IL7 engagent ses récepteurs et activent les PTKs et les voies de transduction du signal. Les cytokines possèdent une ou deux chaînes dans leurs récepteurs. L'IL2, 4, 7, 11 et 15 ont un besoin critique pour une chaîne commune, la chaîne Ryc comme composante dans leurs récepteurs. Les chaînes partagées dans les récepteurs, signifie que plusieurs cytokines sont capables de délivrer le même signal (Ihle et coll. 1994). Quelques-unes de ces chaînes sont non-redondantes pour le fonctionnement des récepteurs, comme par exemple la chaîne Ryc et la chaîne interleukine-2R $\alpha$ . (Suzuki et coll. 1995).

Pour comprendre comment les récepteurs des cytokines activent le processus de la croissance et de la prolifération lymphocytaire, plusieurs auteurs ont ciblé la voie sensible de la Rapamycine (Burgering et coll. 1995; Calvo et coll. 1992; Chung et col. 1992). Cette voie est dépendante des PTKs pour créer une site d'attachement avec l'initiateur principal, le PI3K (Burgering et coll. 1995). La PI3K fait phosphoryler une lipide membranaire pour créer le médiateur phosphatidyl inositol 3,4,5 triphosphate. La prochaine étape implique une protéine dénommée *target of rapamycine* (TOR) ou la cible de la Rapamycine. Quand elles sont activées, ces protéines font autophosphoryler une autre région de la molécule "TOR". La Rapamycine est un agent immunosuppresseur puissant, sa cible "TOR" est non-redondante, donc essentielle dans la transmission du signal controlant la division cellulaire.

(Zheng et coll.1995).

### **1.3 L'importance de la phase "S" (la synthèse de l'ADN)**

Pour qu'une lymphocyte-T puisse entrer dans la phase "S", elle aura besoin d'un offre adéquat de nucléotides, particulièrement la purine et la pyrimidine. Il existe deux sources de nucléotides: le recyclage et la synthèse de novo. Les lymphocytes-T ont particulièrement besoin de la synthèse de novo pour qu'ils puissent se diviser. De plus, les lymphocytes-T se diffèrent des autres cellules par leur incapacité relative à utiliser la première source - le recyclage -. Cette observation (que la synthèse de novo de nucléotides requise dans le cycle lymphocytaire) provient des études réalisées sur l'immunodéficiences héréditaires. Une forme particulière de cette immunodéficiences est celle due à la déficiences de l'adénosine déaminase (Giblet et coll. 1972; Allison et coll. 1975).

La synthèse de novo de la purine est contrôlée et limitée par l'enzyme *inosine monophosphate déhydrogénase* (IMPDH). Cette enzyme catalyse la conversion de l'inosine monophosphate en guanosine monophosphate. Cette enzyme existe sous deux isoformes l'IMPDH type 1 et 2, qui possèdent des structures similaires et elles sont largement distribuées dans les tissus, cependant ces deux isoformes sont modulées différemment. (Natsumeda et coll. 1990).

### **1.4 La réponse des cellules-B et leur interaction avec les cellules-T.**

Avec leur développement clonal, les cellules-T arrivent à leur maturation complète et commencent à réagir avec le greffon. Les cellules-T aident les cellules-B par l'intermédiaire de la reconnaissance conjuguée. Les cellules-B internalisent l'Ag à travers la liaison récepteur-MHC, ensuite elles fragmentent l'Ag en différents peptides, et enfin présentent ces peptides sur ses molécules MHC-classe II. À leur tour, les cellules-T reconnaissent l'Ag présenté par les cellules-B, et font communiquer avec les cellules-B par l'intermédiaire du ligand CD40. Ce signal est d'une grande importance pour les cellules-B, probablement parce qu'il permet à ces cellules d'éviter des changements comme l'apoptose, et

de commencer à produire l'immunoglobuline-G. (revu dans Flomenberg 1995).

En général, les cellules inflammatoires vont infiltrer le greffon à travers plusieurs étapes : 1) le roulement des leucocytes sur des molécules d'adhésion comme les sélectines; 2) l'activation des leucocytes par l'intermédiaire des chémokines; 3) l'attachement des leucocytes à travers les intégrines et les immunoglobulines; 4) et enfin la diapédèse à travers les jonctions entre les cellules endothéliales (revu dans Flomenberg 1995).

La première conséquence du processus de rejet est la dislocation des cellules endothéliales et des cellules parenchymales. Par exemple, la nécrose myocytaire et l'endothéliosite sont parmi les manifestations du processus de rejet du greffon cardiaque. Le processus de rejet comporte plusieurs médiateurs, comme le contenu granulaire des cellules-T, les perforines, les granzymes, les molécules similaires aux cytokines et le TNF (Kagi et coll. 1994; Ratner et coll. 1993). Par contre, des récentes études ont mis en doute le rôle de médiateurs dans le processus de rejet du greffon (Walsh et coll. 1996). Le mécanisme de rejet est donc encore mal connu, particulièrement au niveau effecteur, à l'exception du rôle des anticorps comme dans le cas des quelques syndromes cliniques. Ce mécanisme peut ne pas être cytotoxique, mais plutôt lié au phénomène d'hypersensibilité -type retardée- comme dans la réaction classique à la tuberculine. Un autre facteur comme la dislocation de la matrice extracellulaire peut aussi être impliqué dans ce mécanisme (revue dans Auchincloss 1995).

### **1.5 Manipulation de la réponse immunitaire**

L'intervention dans la réponse immunitaire est basée sur la compréhension complète des mécanismes et des étapes de cette réponse. Plusieurs approches sont décrites dans la littérature, parmi eux : 1) mettre en évidence la différence des Ags par l'intermédiaire de la méthode de l'assortissement du MHC (*MHC matching*). Cette procédure est largement utilisée en clinique et détermine le niveau de la reconnaissance immunitaire entre deux individus. Toutefois, cette méthode peut prédire la plupart des formes et des sous-formes d'interaction

immunitaire à l'exception de quelques maladies comme celle du greffon vs hôte, qui survient parfois chez les patients qui ont subi une transplantation rénale et de la moelle osseuse. Ainsi, la perspective de l'assortissement du *human leucocyte antigen* (HLA) ou antigène leucocytaire humain dans la transplantation cardiaque, reste limité par le temps de préservation du donneur (Opelz et coll. 1994; Jarcho et coll. 1994). 2) L'intervention clinique la plus importante dans la réponse immunitaire, est la prévention ou le renversement des lésions. Certaines études ont mentionné le rôle de certains facteurs de croissance - particulièrement le facteur de croissance similaire à l'insuline-1- pour pouvoir renverser la réponse immunitaire contre les lésions chez les transplantés (Goes et coll. 1996). 3) L'immunosuppression reste le premier choix dans la prévention du rejet chez les patients transplantés. L'immunosuppression est réalisée par des agents différents, destinés à agir sur les différentes étapes de la réponse immunitaire. L'étude de l'effet de la mutation génétique sur les différents composants de la réponse immunitaire a mis en évidence la non-redondance (vis-à-vis des cibles) et la sélectivité lymphocytaire de chaque agent immunosuppresseur (revue dans Morris 1995).

Généralement, il existe deux stratégies dans l'immunosuppression non-spécifique, la destruction des tissus immunitaires et l'interférence dans la réponse immunitaire. L'approche destructive se résume par différents procédures, comme l'irradiation lymphoïde totale, le drainage du conduit lymphatique thoracique, la thymectomie, la splénectomie et l'induction d'une lymphopénie profonde via l'administration des anticorps. L'approche destructive est délétère, parce qu'elle cause des changements irréversibles au niveau de la réponse immunitaire. La deuxième approche est l'immunosuppression qui représente la base thérapeutique de la transplantation contemporaine (Rosen et coll. 1995)

Pour qu'il soit efficace, un agent immunosuppresseur doit posséder les propriétés suivantes : la puissance (l'agent doit affecter une étape essentielle dans la réponse immunitaire), la sélectivité (cette étape essentielle doit être

secondaire pour les autres cellules), et la fiabilité. Les agents immunosuppresseurs peuvent agir en produisant une inhibition partielle de la réponse immunitaire, comme c'est le cas des agents immunosuppresseurs de maintien ou de longue durée, ou ils peuvent agir en produisant une inhibition complète ou saturation, comme c'est le cas des agents immunosuppresseurs de court terme ou d'attaque. Cette inhibition complète est utilisée en clinique pour traiter un épisode de rejet ou comme thérapie d'induction au début d'une transplantation ; cette procédure est obtenue par l'intermédiaire des anticorps monoclonaux (revue dans Morris 1995).

## **1.6 L'immunosuppression et le contexte des trois signaux**

### **1.6.1 Le blocage du premier signal**

#### **1.6.1.1 Les agents agissant sur les APCs**

Les corticostéroïdes et la 15-Déoxyspergualine sont deux agents qui possèdent des capacités immunosuppressives en affectant plusieurs phases de la réponse immunitaire.

Les corticostéroïdes réalisent un effet immunosuppresseur en inhibant l'activation des facteurs de transcription appartenant à la famille NF- $\kappa$ B. Les corticostéroïdes se lient à leurs récepteurs cytosoliques en formant le complexe corticostéroïde/récepteur, lequel sera ensuite translocalisé dans le nucléole. Les corticostéroïdes peuvent activer la transcription d'I $\kappa$ B, en causant une diminution de l'activité du NF- $\kappa$ B et la perturbation de la réponse inflammatoire. Les corticostéroïdes possèdent aussi un effet direct sur les promoteurs des cytokines (Scheiman et coll. 1995; Auphan et coll. 1995; Lee et coll. 1988).

La 15-Déoxyspergualine peut affecter plusieurs étapes de la réponse immunitaire. Cet agent a été développé dans le but de supprimer les épisodes de rejet aigu. En s'attachant à la protéine Hsc70 (*Heat shock protein*) la 15-Déoxyspergualine affecte la translocalisation des facteurs de transcription,

comme le NF- $\kappa$ , et diminue la disponibilité de ce facteur dans le nucléole. Le NK- $\kappa$ B est indispensable dans la production des monokines, comme l'IL1 et l'IL6, lesquels peuvent aider à costimuler les cellules-T, ou à organiser l'infiltrat inflammatoire. En plus, la protéine Hsc70 peut affecter la présentation d'Ag par les APCs en réduisant l'expression du MHC. La 15-Déoxyspergualine peut aussi bloquer la production d'immunoglobulines par les cellules-B (Suzuki et coll. 1990; Amemiya 1993; Tepper et coll. 1995).

#### **1.6.1.2 Les agents agissants sur les PTKs**

Les enzymes PTKs jouent un rôle très important dans la réalisation du premier signal, et dans le mécanisme d'action des agents immunosuppresseurs comme les corticostéroïdes et la 15-Déoxyspergualine. La mutation génétique de ces enzymes peut causer une immunodéficiência primaire via des défauts dans la réponse lymphocytaire et dans la transmission des signaux comme c'est le cas avec l'élimination des enzymes ZAP70, p59fyn et la p56lck (Chen et coll. 1994; Powis et coll. 1992; Stein et coll. 1992; Stuart et coll. 1992).

#### **1.6.1.3 Les inhibiteurs de la calcineurine**

La *cyclosporine A* (CSA) et le *Tacrolimus* (FK) sont les deux agents immunosuppresseurs qui inhibent la calcineurine. Les études cliniques et expérimentales sur la CSA et le FK ont donné le meilleur argument sur l'importance de la voie calcique et de la calcineurine dans la réponse immunitaire. Les défauts au niveau des récepteurs d'IP3 dans le reticulum endoplasmique et au niveau des canaux calciques, ont été associés avec les syndromes d'immunodéficiência. (O'keefe et coll. 1992; Liu et coll. 1991; 1992). Batiuk et coll. (1995) ont montré que la CSA inhibe la calcineurine chez 50 % des patients à des doses thérapeutiques, et que le niveau de la calcineurine a été corrélé avec l'inhibition des cytokines chez les souris (Batiuk et coll. 1996). L'inhibition de la calcineurine s'est avérée une stratégie puissante dans la production de l'immunosuppression. Les propriétés de la CSA et du FK seront

détaillées dans le chapitre 2.

### **1.6.2 Blocage de deuxième signal**

Les stratégies d'inhiber le ligand CD40 ont montré qu'elles possèdent un potentiel immunosuppresseur ; de plus, les mutations dans les gènes CD40L ont pu créer un défaut dans la maturation de la réponse immunitaire associé à la production des immunoglobulines-M (Korthauer et coll. 1993; DiSanto et coll. 1993). La CSA s'est montré capable de bloquer l'expression du gène CD40L ; ainsi, l'administration des anticorps monoclonaux contre le gène CD40L a eu un effet immunosuppresseur dans la maladie "greffon vs hôte" (Fuleihan et coll. 1994; Durie et coll. 1994).

### **1.6.3 Blocage de troisième signal**

#### **1.6.3.1 L'interférence dans la transmission de signal**

L'idée d'obtenir un effet immunosuppresseur en inhibant la transmission de signal d'IL2 s'est avérée fautive, suite à l'étude réalisée par Steiger et coll. (1995) qui montre que les souris dépourvues d'IL2 sont immunocompétentes et ont pu rejeter le greffon. Toutefois, la CSA et le FK, deux agents immunosuppresseurs qui inhibent l'expression d'IL2, ont montré une efficacité remarquable dans la prévention de rejet.

L'idée d'utiliser les anticorps monoclonaux contre les chaînes constituant des cytokines, particulièrement la chaîne 2R $\alpha$  de l'IL2, s'est montrée une stratégie prometteuse dans l'immunosuppression (Reed et coll. 1989). Deux sortes d'anticorps monoclonaux sont utilisées, qui se différencient entre eux par le degré de la lymphopénie obtenue (Tinubu et coll. 1994).

La Rapamycine est un autre agent qui affecte le troisième signal. Cet agent est un immunosuppresseur puissant qui inhibe la voie "TOR". Cet agent ne possède pas d'effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de la voie "TOR" ; toutefois, la Rapamycine prévient l'autophosphorylation. L'effet inhibiteur de la

Rapamycine est non-sélectif et s'étend à d'autres types de cellules, ce qui explique les effets secondaires observés avec cet agent, (comme l'hypertriglyceridemie) (Zheng et coll. 1995).

### **1.6.3.2 Les inhibiteurs de la synthèse de novo des nucléotides**

Le mofetil mycophenolate a été développé par Allison et coll. (1993). Ce groupe a recherché un agent immunosuppresseur puissant, sélectif vis-à-vis les lymphocytes et qui peut simuler la déficience congénitale de l'adénosine déaminase. L'acide mycophénolique, s'est montré efficace à inhiber l'IMPDH, l'enzyme responsable de la synthèse de novo de la purine nucléotide (Allison et coll. 1993). L'acide mycophénolique a été connu pour ses propriétés immunosuppressives depuis l'année 1969 (Mitsui et coll. 1969). Il a été utilisé avec un succès limité dans le traitement du psoriasis (Gomez et coll. 1979).

Le couplage entre le mofetil et l'acide mycophénolique a augmenté significativement la biodisponibilité de cet agent (Allison et coll.1993). Le mofetil mycophénolate est rapidement et complètement hydrolysé en acide mycophénolique, qui est la molécule active de cet agent. Cette molécule fait épuiser les réserves en guanine et augmente le rapport déoxyadénine nucléotides/guanine nucléotides en créant un état biochimique qui simule la déficience congénitale en adénosine déaminase. L'acide mycophénolique inhibe les cellules-T, les cellules-B, les monocytes et la prolifération des CML vasculaires in vitro (Nelson et coll. 1990; Allison et coll. 1993).

---

## Chapitre 2

### Les agents immunosuppresseurs

#### 2.1 La Cyclosporine A

##### 2.1.1 Introduction

La CSA est un polypeptide cyclique lipophile, composé de 11 acides aminés isolés de la micelle *tolypocladium inflatum*. La CSA possède des propriétés immunosuppressives uniques, qui ont largement été utilisées chez les patients transplantés. En effet, la CSA est bien établie comme la base de traitement et de prévention du rejet. Son efficacité thérapeutique a été évaluée et établie dans les maladies auto-immunes (Borel et coll. 1976).

La CSA est une molécule hydrophobe avec un acide aminé unique de 9 carbones en position 1. Tous les nitrogènes amides sont, soit liés à l'hydrogène soit méthylés, et l'activité biologique est très sensible aux altérations dans la configuration stéréochimique et aux modifications des résidus à la position 1, 2, 3, 10 et 11. La CSA contient un seul résidu du D-acide aminé dans la position 8, et le méthyle amide entre les résidus 9 et 10 est dans la configuration *cis*. Tout le reste est en configuration *trans*. (Wenger 1986).

##### 2.1.2 Le mécanisme d'action de la CSA

L'activation et la prolifération cellulaire sont les événements clés dans la réponse immunitaire. Les résultats initiaux évaluant les propriétés immunosuppressives de la CSA indiquent que cet agent est sélectif pour les lymphocytes, spécifiquement les *T-helper*. La CSA inhibe à la fois l'immunité cellulaire et humorale, et supprime la réaction inflammatoire chronique. La CSA inhibe la phase d'induction de la prolifération des cellules lymphoïdes, mais cet effet est réversible et n'est pas lymphotoxique ou myélotoxique à des doses thérapeutiques (Borel et coll. 1976).

Après sa libération de la moelle osseuse, les précurseurs des cellules T migrent vers le thymus où ils subissent sa maturation. La CSA réduit la production des lymphokines dans le thymus, prévient la maturation des cellules T-thymiques (Bader et coll. 1991; Jenkins et coll. 1988) et inhibe l'induction de la mort cellulaire (Shi et coll. 1989) en perturbant le développement de l'autotolérance.

Après la maturation dans le thymus, les cellules T se disséminent dans l'ensemble de l'organisme. L'activation des cellules T commence après la reconnaissance de l'Ag *via* les récepteurs CD3, ce qui provoque la production des lymphokines. La cascade d'activation dans les cellules *T-helper*, et particulièrement la synthèse d'*interleukine-2* (IL2), et d'*interféron- $\gamma$  -acide ribonucléique-messenger* (mRNA) sont inhibées par la CSA, à des concentrations < 100 *microgramme* ( $\mu\text{g}$ )/*litre* (L) *in vitro* (Di Padova 1989). La CSA est efficace seulement si les cellules sont exposées durant les phases G0 et G1 du cycle cellulaire immédiatement après la stimulation cellulaire. L'exposition tardive à la CSA n'a pas affecté la synthèse de *l'acide désoxyribonucléique* (ADN) (Borel et al. 1977; Gauchot et coll. 1986).

Plusieurs études ont évalué l'effet de la CSA sur l'expression et la synthèse de l'IL2. L'IL2 est produit durant l'activation des cellules T (Malek et Ahswell 1985). Elle stimule la production des autres lymphokines incluant l'*interféron- $\gamma$*  (Howard et coll. 1983; Inoba et coll. 1988), en facilitant l'expansion clonale des sous-types des cellules T avec CD4 et CD8, et en stimulant les cellules B et les monocytes (Erard et coll. 1985; Nakagawa et coll. 1985).

L'inhibition *in vitro* de l'activation des cellules T en réponse à la stimulation des récepteurs CD3 était proportionnelle de 50% d'inhibition avec 25  $\mu\text{g/L}$  de CSA, et à une inhibition complète à 100  $\mu\text{g/L}$  de CSA. La CSA a inhibé de 80% la réponse proliférative au phytohématagglutinine ou au phorbol ester en combinaison avec le ionophore de calcium (300 à 500  $\mu\text{g/L}$  de CSA) et

à 50% de la réponse des cellules T au phorbol ester seul (CSA 1 milligramme (mg/L) (Di Padova 1989).

La CSA n'a pas inhibé directement l'activation et l'amplification des cellules T-suppresseur (Hess et Tutshka 1980). En effet, la CSA a modérément augmenté la production des prostaglandines par les cellules mononucléaires, lesquelles stimulent le développement des cellules T-suppresseur (revue dans Kahan 1989).

Le mécanisme avec lequel la CSA inhibe sélectivement la synthèse de l'IL2, l'interféron- $\gamma$ , les proto-oncogènes c-myc et c-fos et les récepteurs des lymphokines est encore mal connu (Granelli-Piperno 1986,1990). Le site d'action de la CSA dans la cellule a été localisé dans le cytoplasme, sans avoir d'effet sur le système de signalisation membranaire ou sur les événements qui arrivent après l'activation génétique (revu dans Kahan 1989).

La cyclophyline, qui est une protéine cytosolique, a été identifiée comme le récepteur cellulaire de la CSA (Harding et coll. 1986; Ryffel et coll. 1992). La cyclophyline est une romatase catalysant l'isomérisation de la peptide imidoproline a été inhibée par la CSA (Fischer et coll. 1989; Takahashi et coll.1989). La cyclophyline a été trouvée en abondance dans tous les tissus (Ryffel et coll.1991).

Après sa liaison à la cyclophyline, la CSA subit des changements conformationnels résultant de la polarisation de la surface externe (Wüthrich et coll.1991). *In vitro*, le complexe CSA-cyclophyline inhibe de façon compétitive la calcineurine, qui est une sérine/thrombine phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline (Liu et coll.1991).

L'inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine par le complexe CSA-cyclophyline prévient l'activation des facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de la transcription génétique encodant l'IL2 et autres cytokines (Schumacher et Nordheim 1992). En effet, l'inhibition de l'activité de la calcineurine et de la production d'IL2 par la CSA dans les cellules T est proportionnellement associée (Fruman 1992).

### 2.1.3 Propriétés pharmacocinétiques de la CSA

Les propriétés pharmacocinétiques ont été évaluées de façon approfondie chez les patients transplantés. La *high performance liquid chromatography* (HPLC) ou chromatographie liquide à haute performance est considérée comme la procédure de référence pour la mesure de la CSA dans les liquides biologiques. Les concentrations plasmatiques mesurées par d'autres méthodes sont plus élevées que celles mesurées par HPLC. La raison peut en être la réactivité croisée des anticorps monoclonaux avec les métabolites de la CSA (Holt et Johnston 1992). Récemment, une nouvelle méthode a été suggérée: la *enzyme-multiplied immunoassay technique* (EMIT) ou technique d'essai immunologique enzymatiquement multipliée pour remplacer la HPLC. Cette méthode possède une limite de détection de 14 µg/L et un biais positif de 4% (McBride et coll. 1992).

Après son administration orale, la CSA atteint sa concentration sanguine maximale entre 1 et 8 h ( $t_{max}$ ). Un deuxième pic peut être observé chez quelques patients, entre 3 et 6 heures après le premier, et il est plus élevé dans la plupart du temps (Beukers et coll.1992; Brynskov et coll.1992). La présence de la bile augmente l'absorption de la CSA ; et l'ingestion de la nourriture durant la période d'absorption peut générer un deuxième pic. Alternativement, le deuxième pic peut être le résultat de l'excrétion de la CSA comme un sulfate conjugué dans la bile, dégradé par les bactéries intestinales et enfin réabsorbé (Henricsson et coll.1989).

L'absorption de la CSA se réalise dans les intestins grêles (Drewe et coll.1992) et elle est directement proportionnelle à leur longueur, d'où l'explication partielle d'une dose plus élevée à prescrire chez les enfants (Whittington et coll.1990).

La biodisponibilité de la CSA chez les volontaires non malades est approximativement de 30% (range de 5 à 70%); (revue dans Grevel et coll.1992).

Après son absorption, la CSA est initialement distribuée dans le sang et 60 à 70% de cette dose initiale est capturée par les cellules sanguines. Le reste se lie aux lipoprotéines plasmatiques. La liaison entre la CSA et les érythrocytes est inversement proportionnelle à la température et elle est saturée à des concentrations plus grandes que 3 mg/L, tandis que sa liaison avec les lipoprotéines plasmatiques est linéaire à des concentrations variant entre 0.025 mg/L et 38 mg/L et elle est directement proportionnelle à la température. (Revue dans Akagi et coll.1991). Le niveau tissulaire de la CSA est en corrélation avec le niveau de la cyclophylène et des lipides. La CSA ne pénètre pas la barrière sanguine cérébrale (Lensmeyer et coll.1991).

La CSA est métabolisée par le système enzymatique cytochrome P450III<sub>A</sub>, qui produit une hydroxylation, une diméthylation et la cyclisation, mais en préservant les structures cycliques (Lucey et coll.1990).

Trente produits métaboliques de la CSA ont été observés. Le produit le plus actif a montré une activité immunosuppressive équivalant à 10 - 20% de l'activité de la CSA (Radeke et coll.1992).

L'élimination de la CSA est sujette à une grande variation entre les patients, avec des valeurs qui varient entre 0.38 jusqu'à 3L/heure (h)/kilogramme (kg). L'élimination est plus importante chez les enfants et diminue chez les patients avec des altérations hépatiques (revu dans Kahan et coll.1989). Elle suit une cinétique linéaire avec une demi-vie sanguine autour de 19 h. A cause de sa distribution tissulaire importante, la demi-vie de l'élimination peut être considérablement plus grande que 24 h (revue dans Yee et coll.1991). Plus de 90% de la dose de la CSA est excrétée dans la bile et 6% de la dose orale est excrétée dans l'urine (Maurer et Lemaire 1986).

#### **2.1.4 La CSA dans la transplantation cardiaque**

Avant l'année 1980, la majorité des transplantés cardiaques ont été traités avec l'immunosuppression conventionnelle composée d'azathioprine et de corticostéroïdes (Jameson et coll.1979). Plus tard dans l'année 1980, l'Université de Stanford a introduit la CSA dans la transplantation cardiaque clinique, ce

qui a amené à une augmentation considérable du nombre des centres et de cas dans le monde entier (Heck et coll.1989). Ce développement était la conséquence de l'amélioration des résultats cliniques à court et à long terme obtenus avec ce type d'immunosuppression. Les résultats bénéfiques obtenus avec l'immunosuppression incluant la CSA, combinée à l'azathioprine et des doses minimales de corticostéroïdes, ont fait de ce type d'immunosuppression le protocole le plus utilisé chez les transplantés cardiaques (Kriett et coll.1991).

Avec l'introduction de la CSA, le taux de survie d'un an a augmenté jusqu'à 82%, comparée à 62% avec l'immunosuppression conventionnelle (Heck et coll.1989).

### **2.1.5 Maladie coronaire du greffon cardiaque**

Depuis la première greffe cardiaque, 12 891 transplantations cardiaques ont été recensées en 1990 à travers le monde. À un an, les courbes de survie actuarielle donnent des résultats presque identiques d'une équipe à l'autre avec au moins 80% de survivant. À 5 et 7 ans, les chiffres diffèrent et oscillent entre 60 et 70%.

Une meilleure connaissance de la physiopathologie des rejets, la réalisation d'échographie doppler et de biopsies endomyocardiques et les traitements immunosuppresseurs actuels font que les rejets aigus sont mieux prévenus, traités plus efficacement et dépistés beaucoup plus précocement. Cependant, malgré ces progrès, le pronostic à long terme reste lourdement grevé par l'apparition de coronaropathies, cause essentielle de la défaillance des greffons (O'Neill et coll.1989; Gao et coll.1988).

Il n'existe aucun traitement préventif, aucun traitement curatif de cette complication sévère et insidieuse. La CSA n'a pas diminué (ni augmenté) l'incidence de survenue de ces lésions coronaires, tandis que la survie plus prolongée des patients permet à cette coronaropathie de s'exprimer (Chomette et coll.1990; Billingham 1989).

Outre l'artériolite coronaire précoce, témoin d'un rejet artériolaire aigu, il faut individualiser l'artériosclérose et l'athérosclérose accélérée, entités bien particulières aux transplantés cardiaques et synonymes de rejet chronique. Ces dernières sont bien différentes de l'athérome « banal » (Chomette et coll.1990; Billingham 1989).

Les modifications histologiques de l'artériolite rejoignent celles des vascularites (Chomette 1990), l'intima est épaissie, des cellules inflammatoires mononucléées (macrophages, lymphocytes surtout *T4-Helper*) d'aspect activé, envahissent les parois vasculaires et une nécrose fibrinoïde pariétale est possible (Billingham 1989; Chomette et coll.1990).

L'artériosclérose accélérée ou endartérite fibreuse sclérosante atteint les artères intramyocardiques de petit calibre (branches secondaires et plus distales), mais aussi les artères épocardiques de moyen calibre. L'hyperplasie concentrique de l'intima la caractérise. Elle rétrécit peu à peu la lumière vasculaire puis l'occlut par prolifération interne ou par formation de thrombus *in situ*. Cette hyperplasie est circonférentielle, diffuse et constituée de fibrose, d'oedème de *cellules musculaires lisses* (CML) qui ont proliféré et migré de la média vers l'intima (Chomette et coll.1990; Borkon 1990; Billingham 1989).

L'athérosclérose accélérée diffère quelque peu de l'athérome «natif» (Chomette et coll.1990; Borkon 1990). La plaque est faite de fibrose de lipides intracellulaires (cellules spumeuses) et extracellulaires. Cependant, cet athérome est particulier car diffus. Le vaisseau est atteint sur toute sa longueur, même dans sa partie distale. La limitante élastique interne est souvent intacte et les dépôts calcaires sont rares. L'évolution en est plus rapide, les lésions pouvant progresser en quelques mois (Borkon 1990; Billingham 1989).

Les infarctus du myocarde sont ainsi le plus souvent de petite taille et sous-épocardiques. Multiples, ils peuvent altérer la quasi-totalité du muscle cardiaque.

La fréquence de survenue varie selon les équipes et les critères diagnostiques. À un an, la maladie coronaire du greffon serait présente dans 5 à 20%

des cas, et à 5 ans, dans 40 à 50% des cas (Gao et coll.1988; Billingham 1989; Eich et coll.1990). Les coronaropathies du greffon représentent la troisième cause de mortalité des transplantés cardiaques, la première cause de décès à un an (11-20%) et la cause principale de retransplantation, responsable de dysfonction du greffon dans un tiers des cas (Borkon 1990; Billingham 1989; Eich et coll.1990).

La date d'apparition dépend des individus et du type histologique considéré, expliquant ainsi les dates extrêmes citées dans la littérature de 3 mois à 17 ans (Billingham 1989).

L'artériolite serait la plus précoce, rencontrée surtout entre le 6ème et le 10ème mois (Chomette 1990); l'athérome n'apparaîtrait qu'après plusieurs années d'évolution.

Comme pour l'athérome natif, on ne connaît pas encore un facteur étiologique unique. Plusieurs facteurs interviendraient conjointement ou successivement. L'hypothèse la plus répandue est la survenue d'une lésion endothéliale relayée par une réaction immunitaire de l'hôte contre les cellules endothéliales des coronaires du greffon, premières cellules étrangères rencontrées. Cette réaction immunitaire serait de type cellulaire et/ou humorale. La vascularité artériolaire serait ainsi l'étape primaire d'un processus conduisant ultérieurement au rejet chronique (Libby et col.1989; Eich et coll.1990; Billingham 1990).

D'autres facteurs étiologiques peuvent être impliqués dans la pathogenèse de l'artériolite du greffon. Contrairement aux études sur l'athérome qui ont concerné des milliers de patients, le faible nombre de transplantés cardiaques dans chaque série ne permet pas d'établir des corrélations statistiques indéniables entre ces facteurs et le risque d'artériosclérose et d'athérosclérose accélérée.

L'augmentation du taux de cholestérol total et des *lipoprotéines de basse densité* (LDL) favoriserait pour certains l'apparition de l'artériosclérose et de l'athérosclérose accélérées (Borkon 1990; Taylor et coll.1989). L'hypertension

artérielle est fréquente (plus de 50% des cas), mais son rôle dans la survenue de l'artériosclérose et de l'athérosclérose accélérée n'est pas démontré, de même que pour l'obésité et le diabète (Dec et coll.1991; Eich et coll.1990; Butman et coll.1991).

L'artériosclérose et l'athérosclérose accélérées sont latentes et leur expression clinique est généralement pauvre.

Les douleurs typiques d'angine de poitrine sont absentes dans la majorité des cas, les coeurs transplantés étant dénervés. De rares cas d'angor ont été cependant rapportés, peut-être par réinnervation partielle suspectée dans quelques cas. Le plus souvent, aucun signal d'alarme ne permet d'évoquer cette complication. Des micro-infarctus se succèdent et aboutissent, parfois brutalement, à la défaillance du greffon. Apparaissent alors des symptômes bien tardifs, témoins de l'insuffisance cardiaque tels une fatigue anormale, une toux persistante, une dyspnée, une fiébrilité prolongée et inexplicée, une surinfection trop fréquente des voies aériennes supérieures, qui ont été cités comme révélateurs d'artériosclérose et d'athérosclérose accélérée. Chez ces coeurs défaillants, une mort subite peut survenir à tout moment, notamment par troubles du rythme ventriculaire (Eich et coll.1990; Dec et coll.1991).

Il n'existe aucun traitement curatif du rejet chronique. En cas de rejet artériolaire aigu, il convient de renforcer le traitement immunosuppresseur. Pontages et angioplasties sont en fait rarement possibles du fait de la diffusion et de la distalité des anomalies coronaires. Ils permettent de reculer la date d'une retransplantation et constituent le seul traitement possible en cas de contre-indication à une nouvelle greffe (Gao et coll.1988).

### **2.1.6 La CSA et l'hypertension artérielle**

Si l'utilisation de la CSA a permis d'améliorer très nettement la survie par diminution des phénomènes de rejet, son introduction a été associée à l'augmentation significative de l'hypertension artérielle: celle-ci touche 60 à 90% des patients transplantés, indépendamment de l'organe transplanté. Elle

touche très fréquemment les patients recevant ce médicament pour une autre raison qu'une transplantation (Kaye et coll.1993), alors qu'elle ne touche que 20% des patients recevant une bithérapie associant prednisone et azathioprine (Thompson et coll.1986). Plusieurs mécanismes ont été invoqués pour expliquer le rôle de la CSA dans la genèse de l'hypertension artérielle. Il peut s'agir d'effets vasoconstricteurs intrinsèques de la CSA (Bantle et coll.1987; Xue et coll.1987) ou induits par la libération de vasoconstricteurs sur des vaisseaux isolés (Tronc et coll.1992; Lamb et coll.1987). L'augmentation de l'activité sympathique (Morgan et coll.1991; Sherrer et coll.1990) des patients recevant la CSA reste un mécanisme controversé (Kaye et coll.1993).

Ainsi, même si les mécanismes exacts de l'hypertension artérielle liée à la CSA ne sont pas clairement définis, il est nécessaire de contrôler la tension artérielle de façon suivie puisqu'elle représente une cause de morbidité cardiovasculaire non négligeable. Plusieurs régimes de traitement anti-hypertenseurs ont été étudiés. Une étude randomisée comprenant la nifédipine, le captopril et le labétalol a démontré une efficacité comparable de ces trois médicaments; la nifédipine a cependant plus d'effets secondaires conduisant à son arrêt (Jessup et coll.1988). Une autre étude comparative mais rétrospective étudiant l'hydralazine, l'énalapril et l'aténolol n'a démontré qu'une efficacité modérée de ces trois médicaments sur les valeurs de pression artérielle, tout en induisant une progression comparable de l'insuffisance rénale dans les trois groupes (Schachter et coll.1992). Le traitement agressif de l'hypertension artérielle par l'association d'énalapril, de furosémide et de vérapamil a démontré un bon contrôle des valeurs de pression artérielle, ainsi qu'une régression de l'hypertrophie ventriculaire objectivée par des mesures échocardiographiques. Après un délai de 3 mois ce bénéfice ne s'accompagne pas d'augmentation des valeurs de créatinine sérique (Angermann et coll.1991). Plus récemment, Ventura et coll. (1993) ont démontré l'utilité chez les transplantés hypertendus des acides gras omega-3 par leurs propriétés vasodilatatrices en relation avec leur effet sur le profil des prostaglandines.

### 2.1.7 La néphrotoxicité de la CSA

L'insuffisance rénale apparaissant chez le transplanté cardiaque est en grande partie secondaire au traitement par la CSA sous la forme d'une néphrotoxicité aiguë (les premières semaines) et tardive (> 6 mois). Cette insuffisance rénale est attribuée à un effet toxique direct sur le parenchyme rénal, à des altérations du débit artériel intrarénal ou à des interactions pharmacologiques avec le métabolisme de la CSA (Thompson et coll.1986; Bantle et coll.1987). L'insuffisance rénale biologique avec ascension de la créatinine sérique touche 45% et 83% des patients à 6 et à 12 mois respectivement (Greenberg et coll.1987). Quinze à 20% des transplantés nécessitent une hémodialyse dans un délai de 10 ans après transplantation cardiaque. La protection de la fonction rénale est donc un des buts principaux du suivi à long terme chez les transplantés cardiaques.

La préservation de la fonction rénale et les mécanismes de son atteinte par la CSA ont surtout été étudiés chez le transplanté rénal et les conclusions peuvent, en partie au moins, être appliquées au transplanté cardiaque. La néphrotoxicité chronique est due à une vasoconstriction de l'artériole afférente du glomérule avec une diminution du coefficient de filtration (Wagner et coll.1988) et à une atteinte toxique directe des cellules tubulaires, non spécifique, caractérisée par l'apparition de mitochondries géantes, de vacuolisations intra-cytoplasmiques et de microcalcifications (Meyers et coll.1984). Les mécanismes de protection de cette atteinte portent principalement sur l'effet vasodilatateur de l'artériole afférente s'opposant à la vasoconstriction induite par la CSA. Les anticalciques, en particulier le diltiazem, possèdent cette propriété et il est concevable qu'ils réduisent la néphrotoxicité de la CSA (Carrier et coll. 1993). Ceci a été démontré cliniquement par Neumayer et coll. chez le transplanté rénal chez lequel l'administration du diltiazem influence favorablement la fonction rénale à court terme après la greffe rénale (Neumayer et coll.1991; 1992). Ces études ont

également démontré les interactions entre le diltiazem et le métabolisme de la CSA par l'inhibition *in vivo* et *in vitro* du cytochrome P450. Ceci est traduit cliniquement par une augmentation significative du taux sérique de la CSA pour les mêmes doses quotidiennes (Neumayer et coll.1989). Ces constatations doivent être interprétées en tenant compte de la limitation des méthodes de dosage de la CSA dans le sang. En effet, le dosage par le *radio-immunologic assay* (RIA) ou *l'essai radio-immunologique* utilise des anticorps polyclonaux réagissant avec différents métabolites de la CSA. Or, l'augmentation du taux de la CSA circulante apparaissant après l'introduction de diltiazem ne s'associe pas, comme on aurait pu s'y attendre, à une aggravation de la fonction rénale.

### **2.1.8 Les dyslipidémies chez les transplantés**

L'hyperlipidémie fréquemment rencontrée après transplantation est en relation avec le traitement par corticoïdes et CSA (Becker et coll.1988; Vathsala et coll.1989). La CSA est certainement un facteur indépendant responsable du développement d'une hyperlipidémie. Ceci est démontré par la persistance de cette atteinte même dans les séries dans lesquelles la corticothérapie ne faisait pas partie du traitement immunosuppresseur (Esmore et coll.1989; Gao et coll.1989). L'hyperlipidémie a été évoquée comme facteur favorisant la maladie coronaire du greffon et diverses études ont démontré qu'un régime pauvre en graisse, associée à un traitement par un inhibiteur de l'HMG-CoA-réductase, pouvait contrôler les taux lipidiques chez des patients transplantés cardiaques (Kuo et coll.1989). Une seule étude récente comparant deux groupes historiques de transplantés cardiaques (de 1983 à 1988 et de 1988 à 1991) (Carrier et coll.1994) a démontré que la survenue d'une maladie coronaire du greffon semblait réduite par le contrôle drastique des taux de cholestérol, de triglycérides et de LDL-cholestérol, mais uniquement à condition que la valeur absolue de LDL-cholestérol soit abaissée à moins de 3.0 mmol/L. La mortalité globale n'est cependant pas diminuée. Des études prospectives sur un grand nombre de patients sont nécessaires afin de déterminer le bénéfice clinique réel

sur la survie d'un contrôle stricte de l'hyperlipidémie par un traitement médicamenteuse.

### **2.1.9 La toxicité vasculaire de la CSA**

La toxicité vasculaire de la CSA est bien identifiée dans les études cliniques et expérimentales, soit au niveau de la circulation rénale ou cardiaque. Le mécanisme responsable de toxicité vasculaire induite par la CSA est inconnu. Trois mécanismes peuvent être responsables: (1) la dysfonction endothéliale, (2) l'activation du système nerveux sympathique, (3) la stimulation de la réponse vasoconstrictrice dépendante de calcium.

La dysfonction endothéliale causée par la CSA peut être le resultat de plusieurs mécanismes comme la diminution de la production de *nitric oxide* (NO) ou monoxyde d'azote, l'élimination de l'effet du NO, et/ou l'augmentation de la production des agents vasoconstricteurs opposants à l'effet de NO (Gallego et coll.1993).

Plusieurs études, in vivo et in vitro ont démontré les effets nocifs de la CSA sur les différentes structures vasculaires, parmi eux celle de Diederich et coll. (1994) qui a conclu que la CSA est capable d'éliminer l'effet du NO dans les artères mésentériques des rats, à travers la production des radicaux libres. Ces auteurs ont suggéré que cette production des radicaux libres est le résultat de la cascade d'activation de l'acide arachidonique. L'administration de la CSA chez les cochons a causé une dysfonction endothéliale au niveau des artères coronaires, et elle a amené aussi à des altérations dans les CML vasculaires (Berkenboom et coll. 1994). Ainsi, Gallego et coll. (1993) ont observé sur les aortes isolées des rats que l'administration chronique de la CSA a affecté la fonction endothéliale en altérant la relaxation médiée par l'*acétylcholine* (Ach), et en interférant dans le contrôle des concentrations calciques endothéliales. Cette altération de la vasorelaxation à l'Ach a été renversée par la régénération de la *guanosine monophosphate-cyclique* (GMPc). Une autre étude a suggéré que le site principal de l'effet toxique de la CSA est la cellule endothéliale

(Lusher et coll. 1989).

La production et la libération des agents vasoconstricteurs comme l'*endothéline* (ET) a été suggéré d'être influencée par la CSA. Un effet stimulateur de la CSA sur la libération d'ET-1 a été rapporté (Carrier et coll. 1993), et l'administration des anticorps monoclonaux contre l'ET-1 a pu renversé l'effet vasoconstricteur de la CSA sur la circulation rénale (Bunchmann et coll. 1991; Brooks et coll. 1991). Par contre, Sudhir et coll. (1994) ont montré sur les artères isolées de chien que la CSA a causé une altération dans la libération de NO, et que cette dysfonction endothéliale n'a pas été associée à une augmentation dans les concentrations plasmatiques de l'ET-1.

Chez les patients traités par la CSA, l'apparition du syndrome hémolyse-urémie est un argument indirect de l'endommagement endothéliale par cet agent immunosuppresseur (McNally et coll. 1992). Des données récentes ont suggéré que la *L-arginine* (l-arg) qui est le substrat de NO, peut contribuer au renversement de la toxicité vasculaire causée par la CSA (Gallego et coll. 1993).

La CSA possède aussi un effet sur les CML vasculaires. Cartier et coll. (1994) ont démontré que le traitement chronique par la CSA affecte la réactivité vasculaire des aortes isolées du rat en diminuant la libération de NO reliée aux récepteurs muscariniques, en augmentant la sensibilité de muscles vasculaires lisses aux catécholamines (norépinéphrines) circulantes, et en libérant un agent vasoconstricteur dépendant de l'endothélium. Auch-Schwelk et coll. (1993) ont caractérisé l'effet de la CSA sur les muscles vasculaires lisses et les cellules endothéliales. Ils ont conclu que le traitement chronique par la CSA affecte la vasodilatation dépendante de l'endothélium et la contraction des muscles vasculaires lisses dans les aortes isolées du rat. Ils ont montré une augmentation de la réponse vasculaire à l'angiotensine II, et une diminution de la libération de NO. Verbeke et coll. (1994) ont conclu aussi que la CSA affecte la réactivité des muscles vasculaires lisses, en diminuant la vasorelaxation induite par la nitroglycérine.

Tanaka et coll. (1995) ont évalué la cinétique de la prolifération des

CML vasculaires des artères coronaires après transplantation cardiaque hétérotopique des coeurs de lapins traités avec la CSA et ils ont trouvé une prolifération précoce de la média coronarienne produite par la CSA. En effet, le même auteur a récemment trouvé que le rejet aigu active non seulement les cellules endothéliales des artères coronaires, mais aussi les muscles vasculaires lisses, en augmentant l'expression des *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) ou molécules d'adhésion vasculaire-1, les *intercellular adhesion molecule* (ICAM) ou molécules d'adhésion intercellulaire-1 et le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) ou le facteur de nécrose tumoral-alpha (Tanaka et coll.1994). Le rejet du greffon cardiaque est associé à une expression intensive de VCAM-1 dans les artères coronaires épocardiques (Briscoe et coll.1991; Taylor et coll.1992). La CSA a réduit considérablement l'expression de VCAM-1 dans le cœur natif et transplanté. Cet effet peut être expliqué par la diminution de la libération des cytokines (Ferns et coll.1990). De Caterina et coll. (1995) ont démontré que la CSA et son véhicule, le crémophor, ont réduit l'expression de VCAM-1 induite par l'IL4.

La toxicité vasculaire de la CSA s'exprime aussi par l'inhibition de la production de *prostacycline* (PGI<sub>2</sub>) par les cellules endothéliales (Bossaller et coll.1989; Brown et coll.1987). Neild et coll. (1983) ont démontré que le sérum des lapins traités par la CSA, quand il est perfusé dans l'aorte de lapins isolés, résulte par une diminution de la production de PGI<sub>2</sub>. Voss et coll. (1988) ont rapporté dans leur étude *in vitro* sur des cellules endothéliales que la CSA peut affecter directement et de façon réversible la capacité de l'endothélium à produire la PGI<sub>2</sub>. Cette suppression de la PGI<sub>2</sub> peut permettre l'agrégation plaquettaire, ce qui peut expliquer la thrombose vasculaire observée dans les organes transplantés avec l'administration de la CSA.

## 2.2 Le Tacrolimus

### 2.2.1 Introduction

La thérapie immunosuppressive suivie jusqu'à maintenant, incluant la CSA, l'azathioprine et les corticostéroïdes, a été associée à des effets secondaires comme la néphrotoxicité, l'hypertension et l'hypercholestérolémie. Le *Tacrolimus* (FK) est le nouvel agent immunosuppresseur à qui on a accordé l'espoir de diminuer les effets secondaires de la CSA.

Le FK est un antibiotique macrolide de 822-KDa, extrait de la micelle *streptomyces tsukubaensis* (Kino et coll.1987). Le FK, malgré sa structure différente de la CSA possède des propriétés antilymphocytaires similaires. Il a une activité immunosuppressive puissante *in vivo* et *in vitro* en prévenant le rejet et le développement des maladies autoimmunes (Ochiai et coll.1987; Todo et coll.1988).

### 2.2.2 Mécanisme d'action du FK

Le FK supprime la réponse immunitaire humorale et cellulaire, incluant la production des allo-anticorps secondaire à la transfusion sanguine chez les animaux (Propper et coll.1990).

L'activation lymphocytaire est un processus à étapes multiples. Initialement, les lymphocytes sont stimulés par un Ag lié à un récepteur membranaire spécifique. Ce premier signal d'activation résulte par la sécrétion des lymphokines (IL2) et par l'expression des récepteurs des facteurs de croissance. L'attachement secondaire des lymphokines à ces récepteurs génère un autre signal d'activation - le deuxième - qui induit la prolifération. L'attachement antigène-lymphocyte fait activer la *phospholipase C* (PLC). Celle-ci hydrolyse la phosphatidylinositol-4.5-biphosphate, ce qui résulte par la génération de l'IP3 et *1,2-diacylglycérol* (DAG). L'IP3 amène à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et le DAG fait activer la *protéine kinase C* (PKC). La combinaison de ces deux effets cause la prolifération, la

différentiation et l'induction du messenger de (mRNA) lymphokine (Isakov et coll.1987; King 1988). L'hydrolyse du phosphatidylinositol-4.5-biphosphate en IP3 est l'événement clef dans la prolifération lymphocytaire (Isakov et coll.1987; King 1988).

Les premières études ont suggéré que l'action du FK peut ressembler à celle de la CSA (Kay et coll.1989a; Sawada et coll.1987). La CSA bloque les événements dépendant du calcium dans l'activation lymphocytaire, mais elle n'affecte pas la voie d'activation médiée par la PKC. Les données montrent aussi que les événements d'activation qui sont insensibles à la CSA sont aussi insensibles au FK (Sawada et coll.1987; Kay et coll.1989b).

Warty et coll. (1988) ont suggéré que le FK peut se lier à une protéine cellulaire qui possède un poids moléculaire similaire à celui de la cyclophiline. Des études subséquentes ont rapporté que la protéine de liaison du FK est un cis-trans peptidyl-propyl isomérase, qui peut être un régulateur important dans la transduction du signal d'activation lymphocytaire (Harding et coll.1989; Maki et coll.1990; Rosen et coll.1990).

Les investigations initiales réalisées par Kino et coll. (1987) ont démontré que le FK inhibe les réactions lymphocytaires mixtes chez l'humain, la production d'IL2 et l'expression des récepteurs de l'IL2. Dans des investigations ultérieures, Pani et coll. (1989) ont démontré que le FK inhibe sélectivement l'expression des gènes de la phase d'activation primaire dans les lymphocytes, cette inhibition incluant les gènes pour l'IL2, l'interleukine-3 (IL3), l'IL4, l'interféron- $\gamma$  et le TNF. Quand il est comparé à la CSA, le FK paraît être 10 à 100 fois plus puissant à inhiber la synthèse d'IL2. Yoshimura et coll. (1989) ont démontré que le FK n'affecte pas la phase proliférative qui suit la liaison d'IL2 à son récepteur. Ce déficit d'inhibition sur les cellules activées est appuyé par l'étude de Thomas et coll. (1990) dans laquelle le FK n'a pas inhibé la liaison des lymphocytes T-cytotoxiques aux allo-antigènes.

### 2.2.3 La pharmacocinétique du FK

Le FK est un agent lipophile, avec une bonne solubilité dans le méthanol, le chloroforme, l'acétone et le propylène glycole (Honbo et coll.1987). La solubilité aqueuse du FK est  $< 100$  nano-gramme (ng)/ml.

Après une courte infusion intraveineuse, le FK atteint sa concentration plasmatique maximale entre 2 et 4 heures et commence rapidement à diminuer, ce qui indique une phase de distribution rapide. Après son administration orale, le FK atteint son pic plasmatique après 1 à 4 heures (Venkataramanan et coll.1990). Le FK possède une biodisponibilité pauvre, laquelle peut être causée par sa faible dissolution dans le liquide gastrique. À cause de cette faible biodisponibilité, les doses du FK sont plus élevées quand il est administré par voie orale (Venkataramanan et coll.1991). L'absorption du FK ne dépend pas de la présence des sels biliaires, ce qui le différencie de l'absorption de la CSA.

Le volume de distribution du FK est approximativement 1.5 ml/kg (Mekki et coll.1993). Dans le sang, le FK est considérablement distribué dans les hématies et possède un ratio hématies/plasma de 4:1. La partition du FK entre les hématies et le plasma dépend de la température. Dans la fraction plasmatique, le FK s'est trouvé dans le plasma pauvre en lipoprotéine, ce qui est à l'inverse de la CSA, laquelle est liée à différentes fractions de lipoprotéines (Warty et coll.1991).

Moins de 1% de la dose orale ou intraveineuse du FK s'élimine d'une façon inchangée dans l'urine, ce qui indique que le FK est métabolisé presque complètement dans le foie avant son élimination. Le FK est éliminé par le métabolisme hépatique *via* la monodéméthylation, la didéméthylation et la hydroxylation; la plupart des métabolites sont excrétés dans la bile (Venkataramanan et coll.1991). La clairance corporelle totale du FK est approximativement de 4.1 L/h chez les transplantés hépatiques, et de 6.8 L/h chez les transplantés rénaux. La demi-vie de l'élimination du FK chez les patients avec une fonction hépatique normale est approximativement de 8.7 h, et elle est prolongée chez les patients avec une dysfonction hépatique

(Venkataramanan et coll.1991).

#### 2.2.4 La surveillance thérapeutique

Plusieurs investigateurs ont utilisé l'*enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) ou l'essai immuno-absorbant enzyme dépendante pour déterminer les concentrations plasmatiques dans les essais cliniques sur FK (Tamura et coll.1987; Cadoff et coll.1990). Cette procédure ELISA utilise les anticorps de souris contre le FK. Comme avec la CSA, le FK peut être analysé soit dans le plasma, soit dans du sang complet. Le dosage qui utilise le plasma exige la séparation du plasma à 37°C à cause de la distribution dépendant de la température du FK entre les hématies et le plasma. L'analyse du FK dans le sang complet est la procédure de choix, à cause de la distribution du FK dans les hématies (Beysens et coll.1991; Jusko et D'Ambrasio 1991).

Le FK était efficace comme immunosuppresseur primaire en association avec les corticostéroïdes à partir du temps de la transplantation. Fung et coll. (1990) sont parmi les auteurs qui ont démontré l'efficacité du FK comme immunosuppresseur primaire. Parmi les 125 patients qui ont eu une transplantation hépatique et qui ont reçu le FK comme immunosuppresseur primaire, 50% n'ont pas reçu les corticostéroïdes. Soixante-six (53%) de ces patients sur FK seulement n'ont pas montré des épisodes de rejet durant cette étude. Ils ont conclu que le FK a diminué l'incidence des épisodes de rejet et qu'il a contribué à la réduction de la dose des corticostéroïdes et à la diminution du besoin d'utiliser le muromonab-CD3 (un agent utilisé pour traiter les épisodes de rejet).

Dans un autre essai prospectif, non randomisé, Shapiro et coll. (1991) ont présenté les résultats d'utilisation du FK chez 425 patients qui ont eu une transplantation rénale. Les taux de survie et l'incidence de survenue des épisodes de rejet étaient similaires à ceux observés avec la CSA. Les corticostéroïdes ont été arrêtée chez 44% des patients et la thérapie antihypertensive a été arrêtée chez 43% des patients.

Dans des études préliminaires, le FK a démontré son efficacité soit comme thérapie immunosuppressive primaire, soit comme thérapie d'urgence lors des épisodes de rejet chez les transplantés cardiaques (Armitage et coll.1991a; 1991b).

### **2.2.5 Les effets secondaires et la toxicité du FK**

Le FK a montré une toxicité différente selon les animaux. Chez le babouin, le FK a provoqué l'anorexie, la léthargie, l'hypoglycémie et l'amaigrissement léthal (Thiru et coll. 1987). Chez le rat, le FK a provoqué l'atrophie médullaire thymique et l'hyperglycémie (Nalesnik et coll. 1987; Thomson et coll. 1989). Chez le chien, le FK a causé la vasculite fibroïde aiguë, le vomissement, l'anorexie, des changements vasculaires dans le coeur ainsi que des changements dans l'apparence nucléaire des cellules des tubules proximales rénales (Thiru et coll. 1987; Ochiai et coll. 1987).

Les résultats des essais cliniques suggèrent que le FK est modérément bien toléré. Dans l'étude clinique de Shapiro et coll. (1990) et Fung et coll. (1991), tous les patients qui ont absorbé du FK après arrêt de la CSA ont montré des symptômes toxiques, soit cardiovasculaires, pulmonaires, neurologiques, gastro-intestinaux et cutanés. Le FK peut causer une augmentation de la concentration de la créatinine sanguine, similaire à celles causées par la CSA (McCauley 1990). Comme la CSA, le FK peut causer une dysfonction rénale importante quand les concentrations sanguines sont très élevées. L'altération de la fonction rénale se manifeste par des anomalies dans le métabolisme des électrolytes et par des changements dans les taux de filtration glomérulaire.

Le FK, comme la CSA, est responsable d'une hypertension artérielle chez les patients transplantés. Le traitement antihypertensif a été requis chez 25% des transplantés hépatiques (Fung et coll.1991), chez 15% des transplantés cardiaques (Armitage et coll.1991a; 1991b), et chez 60% des transplantés rénaux.

L'altération dans le métabolisme des glucides a été aussi observé lors de traitement de longue durée avec le FK (Fung et coll.1991c). Les études *in vitro* ont démontré que le FK a un effet sur les cellules des îlots pancréatiques en causant une inhibition de l'exocytose médiée par la synexine de ces cellules, ce qui peut être une explication de l'effet hyperglycémique du FK (Carrol et coll.1991).

Les maladies lymphoprolifératives bénignes et malignes ont été rapportées chez les patients transplantés qui ont reçu le FK (Reyes et coll.1991; Kitahara et coll.1991). La lympho-adénopathie craniale et cervicale, et la présence d'une tumeur ulcérate dans le tube gastro-intestinal ont été observées chez 53% des patients avec une maladie lymphoproliférative. Enfin, des complications infectieuses ont été rapportées avec le FK (Kitahara et coll.1991; Alessiani et coll.1991). L'infection à *cytomégalovirus* (CMV) est considérée comme l'infection opportuniste la plus fréquente chez les patients transplantés. Alessiani et coll. (1991) ont rapporté une incidence d'infection à CMV de 20.9% chez des transplantés hépatiques, ce qui est similaire aux taux rapportés par Fung et coll. (1993c).

## Chapitre 3

### La circulation coronaire

#### 3.1 Introduction

La circulation coronaire est une circulation essentielle car elle doit assurer l'apport en oxygène du coeur qui génère le débit de l'organisme entier. En conséquence, il s'agit d'une circulation capable d'une régulation très rapide afin d'assurer un débit adapté dans toutes les circonstances physiologiques. De plus, le myocarde étant un muscle dont le métabolisme est avant tout aérobique, toute inadéquation entre les apports et les besoins en oxygène du coeur se traduira par une ischémie myocardique, notamment lors de l'effort physique. Il en résulte donc que toute augmentation de la demande en oxygène du myocarde doit être assurée presque exclusivement par une augmentation dite «autorégulée» du débit coronaire et cela, dans des conditions hémodynamiques très particulières puisque du fait de la contraction cardiaque, la circulation coronaire n'est assurée efficacement que pendant la diastole.

Si la dynamique du débit coronarien est pour une large part de nature mécanique et métabolique, elle peut également être modulée par d'autres systèmes physiologiques comme le système nerveux autonome adrénergique et cholinergique. Plus récemment, la place de l'endothélium dans la régulation physiologique de la circulation coronaire s'est également révélée fondamentale et sa dysfonction peut être responsable d'une vasoconstriction coronaire paradoxale, ce qui peut, à terme, être le révélateur précoce du développement d'un processus athérosclérotique.

#### 3.2 Artères de conductance et artères de résistance

La distinction entre les gros troncs (ou artères de conductance) et les artères coronaires de résistance repose sur des considérations à la fois anatomiques, structurales et fonctionnelles. Les gros troncs coronaires

correspondent aux artères coronaires localisées à la surface de l'épicaarde et représentent moins de 5% de la résistance coronaire totale dont l'essentiel est donc lié à la nature résistive du réseau artériolaire (Feigl 1983). De ce fait, ce sont les petites artères, les artérioles et les capillaires qui contrôlent la perfusion du myocarde et où siège l'essentiel de l'autorégulation métabolique. Ainsi, la pression de perfusion coronaire ne chute que de 10% depuis l'aorte jusqu'aux artères de 300  $\mu\text{m}$  de diamètre, alors qu'elle chute brutalement depuis les petites artères de 300  $\mu\text{m}$  jusqu'aux artérioles de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre. Une modification du diamètre coronaire, même faible, aura donc des conséquences hémodynamiques importantes puisque le débit est lié par une puissance de 4 au diamètre du vaisseau. Dans des conditions physiologiques normales, 40 à 50% de la résistance totale réside dans des artères de diamètre inférieur à 100  $\mu\text{m}$ . Il est licite, sur un plan fonctionnel, de regrouper sous le terme de vaisseaux de résistance les petites artères et les artérioles coronaires dont le diamètre est inférieur à 300  $\mu\text{m}$  et dont on sait qu'elles représentent plus de 95% de la résistance coronaire totale (Feigl 1983).

Dans cette définition du caractère physiologique de la circulation coronaire, les veines paraissent jouer un rôle secondaire. Il semble pourtant que la distribution de la résistance coronaire totale puisse être hétérogène et que dans certaines conditions physiologiques, le compartiment veineux joue un rôle non négligeable (Marcus et coll.1990).

### **3.3 La microcirculation capillaire**

Des artérioles terminales ( $< 30 \mu\text{m}$ ) naît un réseau dense de capillaires d'une densité d'environ 3500 à 4000 capillaires par  $\text{mm}^2$  de myocarde. Cette densité permet de prévoir que la distance de diffusion moyenne intercapillaire est de l'ordre de 5 à 6  $\mu\text{m}$ . Chaque capillaire est très fin, si bien qu'avec un diamètre moyen de 3 à 7  $\mu\text{m}$ , ils occupent moins de 5% du volume tissulaire (Anversa et coll.1986). Les capillaires comportent une couche de cellules

endothéliales connectées entre elles, qu'on appelle des *tight junctions* ou des jonctions étroites. Sur le plan fonctionnel, les sphincters précapillaires participent à la fonction de régulation du tonus vasculaire dépendant des besoins en oxygène du myocarde (Anversa et coll.1986).

### **3.4 Le phénomène de dilatation débit-dépendante**

L'écoulement du sang dans les vaisseaux constitue le principal stimulus endogène de l'endothélium vasculaire. Ce dernier joue un rôle capital dans l'ajustement du tonus vasculaire au débit sanguin dans les vaisseaux. Ce phénomène est décrit sous le nom de dilatation débit-dépendante et a été également mis en évidence au niveau des artères coronaires épicaudiques (Gould et coll.1982; Hintze et coll.1984). L'augmentation brutale et importante du débit sanguin coronaire survenant lors du relâchement rapide d'une occlusion coronaire totale de courte durée (ou réaction d'hyperémie) s'accompagne d'un accroissement retardé du diamètre de cette artère coronaire. Cette dilatation de l'artère coronaire est bien médiée par l'augmentation brutale du débit sanguin, dans la mesure où elle n'est pas observée lorsque l'occlusion coronaire est relâchée très progressivement de façon à ce que le débit coronaire ne dépasse pas sa valeur initiale, autrement dit, lorsque l'on s'oppose au phénomène d'hyperémie réactionnelle (Hintze et coll.1984; Holtz et coll.1983). Chez l'humain, une telle dilatation dite réactive (Hintze et coll.1984) des artères de gros calibres est également observée en réponse à une augmentation du débit sanguin au niveau des artères coronaires (Drexler et coll.1989). L'implication de l'endothélium vasculaire dans ce phénomène est confirmée chez l'animal après destruction mécanique locale de l'endothélium vasculaire par angiographie (Inoue et coll. 1988; Drieu La Rochelle et coll. 1993). De même, chez l'humain, la dilatation débit-dépendante des artères coronaires est compromise lorsque la fonction endothéliale est altérée du fait de lésions athérosclérotiques (Cox et coll. 1989).

Les cellules endothéliales sont des cellules fusiformes et juxtaposées, tapissant la paroi interne des vaisseaux et elles sont toutes orientées parallèlement au sens de l'écoulement du sang. L'accroissement du débit sanguin dans un vaisseau entraîne une augmentation des forces de cisaillement s'exerçant à la surface interne de la paroi vasculaire et conduit à une déformation des cellules endothéliales qui jouent le rôle de mécanorécepteurs (Hayashi et coll. 1988). L'étirement des cellules endothéliales stimulerait ainsi la biosynthèse et la libération d'un ou de plusieurs facteurs endothéliaux diffusant vers le muscle lisse vasculaire qu'ils relaxent. L'augmentation du diamètre vasculaire qui en résulte est suffisante pour ramener les forces de cisaillement à leurs valeurs basales, et ce phénomène de dilatation débit-dépendante constituerait une boucle d'autorégulation ayant pour but de maintenir constantes les forces de cisaillement s'exerçant à la surface des cellules endothéliales (Hayashi et coll. 1988; Cook et coll. 1990). Ces mêmes auteurs ont montré à partir des cellules endothéliales en culture que le facteur endothélial relaxant libéré est assimilable au NO. Le caractère pulsatile du débit sanguin joue un rôle important dans la dilatation débit-dépendante. Le seul fait de passer d'un débit régulier et stationnaire à un débit pulsatile, sans qu'il y ait de modification de la valeur du débit sanguin moyen, entraîne une relaxation vasculaire (Rubanyi 1986). Cela montre bien que ce n'est pas le débit sanguin par lui-même qui est l'événement initiateur du phénomène de débit-dépendance, mais que ce sont, avant tout, les forces de cisaillement au niveau des cellules endothéliales qui sont à l'origine de ce phénomène.

Au niveau de la microcirculation, l'endothélium vasculaire serait responsable d'un tonus vasodilatateur de base (Koller et coll. 1991) et le phénomène de débit-dépendance existerait également à ce niveau (Tefamarian et coll. 1988).

### 3.5 Vasomotricité coronaire

La vasomotricité coronaire est modulée par l'interaction de très nombreux facteurs qui agissent, soit directement, soit indirectement, sur la CML vasculaire. L'état de contraction ou de relaxation n'est que le résultat de la sommation d'effets opposés ou synergiques. De façon schématique, la vasomotricité coronaire résulte de l'intégration des effets produits par le système nerveux autonome, d'une part, et les interactions substances vasomotrices - cellules endothéliales - CML vasculaire, d'autre part.

Le système nerveux autonome représente la première grande composante du contrôle de la vasomotricité coronaire. Le système orthosympathique et les catécholamines sont prépondérants. L'action du système orthosympathique sur la vasomotricité coronaire peut s'exercer: (1) par les terminaisons nerveuses (voie abluminale), (2) par les catécholamines circulantes (voie luminale) (Feigl 1983). Les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques des CML vasculaires induisent une contraction. Le rapport  $\alpha_1/\alpha_2$  diminue progressivement le long des vaisseaux et les récepteurs  $\beta_2$  se trouvent majoritaires dans les vaisseaux distaux (Jones et coll. 1993; Chilian et coll. 1991).

L'action du système sympathique et des catécholamines circulantes sur la vasomotricité coronaire dépend de la densité et du rapport relatif entre les récepteurs de la CML vasculaire. Le rapport  $\alpha/\beta$  est faible et décroît des artères épicaudiques aux artérioles coronaires, ce qui explique la faible contraction induite par la stimulation sympathique et les catécholamines. D'un autre côté, la réponse vasodilatatrice à la stimulation  $\beta$ -adrénergique est, elle aussi, relativement faible dans les vaisseaux proximaux et augmente en distalité. Enfin, des récepteurs  $\alpha_2$  des cellules endothéliales sont impliqués dans la libération du NO. L'action du système parasympathique s'exerce au niveau des terminaisons du système orthosympathique (inhibition de la libération de noradrénaline) et par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques au niveau de la CML vasculaire (contraction) et des cellules endothéliales (libération du NO)

(Jones et coll. 1993).

Le neuropeptide Y est un vasoconstricteur direct de la CML vasculaire. La *substance P* (SP) est un neuropeptide circulant qui induit la production du NO par les cellules endothéliales. Le *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) ou la peptide de calcitonine gène-dépendant est un relaxant de la CML vasculaire. La neurotensine et le *vasoactive intestinal peptide* (VIP) ou peptide intestinal vasoactif sont des neuropeptides vasodilatateurs agissant directement sur la CML vasculaire. La dopamine libérée par les terminaisons nerveuses orthosympathiques peut médier un effet vasodilatateur: (1) par la stimulation des récepteurs DA<sub>1</sub> de la CML vasculaire; (2) par rétrocontrôle négatif de la libération de la noradrénaline par les terminaisons nerveuses orthosympathiques (Feigl 1983).

### 3.6 Les produits de l'endothélium coronaire

Le NO, labile, est produit dans les cellules endothéliales. Sa libération est stimulée par de très nombreuses substances circulantes: les catécholamines (récepteurs  $\alpha_2$ ), la sérotonine (récepteurs 5-HT<sub>1</sub>), l'histamine (récepteurs H<sub>1</sub>), l'Ach (récepteurs muscariniques M<sub>2</sub>), l'angiotensine (récepteurs AT<sub>2</sub>), l'adénosine (récepteurs purinergiques P<sub>1</sub>), l'*adénosine diphosphate* (ADP) et l'*adénosine triphosphate* (ATP) (récepteurs purinergiques P<sub>2</sub>), la thrombine, la SP, l'arginine-vasopressine (récepteurs V<sub>2</sub>), la *bradykinine* (BK) et la vitesse d'écoulement. Ce produit est un relaxant fondamental dans la vasomotricité coronaire par son action au niveau de la circulation de résistance et des artères coronaires épicaudiques. La libération du NO par les cellules endothéliales induit la relaxation de la CML vasculaire en stimulant la *guanylyle cyclase* (GC) (revue dans Lusher et Vanhoutte 1990). Par ailleurs, le NO possède également un effet inhibiteur sur la production d'endothéline et a un effet anti-agrégant plaquettaire (Palmer 1987).

Les endothélines sont des polypeptides synthétisés par les cellules endothéliales. Les récepteurs vasculaires sont de deux types: les récepteurs

d'endothéline-A (ETA) (CML), et les récepteurs d'endothéline-B (ETB) (cellules endothéliales). L'endothéline ne peut être synthétisée sans l'action de nombreuses substances: *platelet-derived growth factor* (PDGF) ou facteur de croissance dérivé des plaquettes, *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) ou facteur de croissance transformant de type  $\beta$ , thrombine, adrénaline, hypoxie, contrainte de cisaillement, angiotensine II, arginine-vasopressine (Masaki et coll.1991).

Toutes les endothélines induisent une vasodilatation initiale de durée brève due à la libération du NO et de PGI<sub>2</sub> par les cellules endothéliales, suivie d'une vasoconstriction prolongée par action directe sur les CML vasculaire qui est due à une augmentation du calcium libre intracytoplasmique. Par ailleurs, elle a un effet stimulant sur l'agrégation plaquettaire, elle stimule la prolifération des CML vasculaires et des fibroblastes, ainsi que la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II dans les cellules endothéliales (Masaki et coll.1991).

Les dérivés de l'acide arachidonique agissent à la fois sur les CML vasculaires et les plaquettes. La PGI<sub>2</sub>, produite par les cellules endothéliales à partir de l'acide arachidonique, possède à la fois un effet anti-agrégant plaquettaire et une action relaxante sur la CML vasculaire. De plus, la PGI<sub>2</sub> stimule la production du NO (action intracrine). La production de PGI<sub>2</sub> est stimulée par l'augmentation de la contrainte pariétale (vitesse d'écoulement), l'hypoxie, la BK, l'angiotensine II, l'histamine, la *high-density lipoprotein* (HDL) ou lipoprotéine à haute densité-cholestérol et le leucotriène C4 produit par les leucocytes (Drexler 1991; Lüscher 1990).

La thromboxane A2 (source principale constituée par les plaquettes) est un agent puissant de l'agrégation plaquettaire et un stimulant de la contraction de la CML vasculaire dont la demi-vie plasmatique est courte [(30 secondes (s))] (Drexler et coll.1991; Lüscher et coll.1990).

La production de l'*endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) ou facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium est stimulée par l'augmenta-

tion de la contrainte de cisaillement longitudinale des cellules endothéliales, par l'Ach (récepteurs  $M_1$ ) et par la BK. L'EDHF stimule l'ouverture des canaux potassiques de la CML vasculaire, ce qui entraîne une hyperpolarisation cellulaire et une relaxation (Lüscher et coll.1990).

L'angiotensine II peut être produite par les cellules endothéliales. Elle exerce une action trophique et constrictrice sur les CML vasculaire (récepteurs  $A_1$ , système autocrine) (Dzau et coll.1986).

L'histamine est une amine libérée par les mastocytes. Son action sur les vaisseaux coronaires résulte de la sommation de trois effets: (1) une vasodilatation indirecte *via* la libération du NO (récepteurs  $H_1$ ); (2) une vasodilatation directe *via* la stimulation de récepteurs  $H_2$  de la CML vasculaire; (3) une vasoconstriction *via* la stimulation des récepteurs  $H_1$  de la CML. Chez le sujet normal, l'histamine induit une dilatation des artères coronaires épiscopiques et de la microcirculation (Toda et coll.1987).

La BK est une substance circulante qui peut être également produite par les cellules endothéliales et qui exerce des effets antagonistes sur la vasomotricité coronaire. Elle stimule directement la contraction de la CML vasculaire (récepteurs  $BK_1$ ) par son action sur les cellules endothéliales (récepteurs  $BK_2$ ) et elle a une action vasodilatatrice qui résulte de la libération du NO et d'EDHF (Shini et coll.1989). La production de BK par les vaisseaux est une hypothèse nouvelle et attrayante. En effet, la BK n'est pas une hormone circulante. Le foie synthétise et sécrète dans le plasma la prékallicréine qui est inactive du fait de sa structure de proenzyme et du complexe qu'elle forme avec le kininogène de haut poids moléculaire. L'activation de la prékallicréine en kallicréine se fait par protéolyse partielle lors de l'activation des systèmes de coagulation (facteur XII) et de fibrinolyse (plasmine). Les kinines alors produites augmentent localement la perméabilité capillaire. Les kallicréines tissulaires, synthétisées dans le rein, le pancréas, la sous-maxillaire, peuvent hydrolyser la BK à partir de son substrat mais, lorsqu'elles sont sécrétées dans le plasma, elles sont rapidement inactivées du fait de leur interaction avec les

inhibiteurs circulants des sérines protéases (Shini et coll.1989).

Une question importante est donc de savoir si la BK peut être synthétisée localement dans la paroi artérielle, notamment par les cellules endothéliales. La BK provoque une vasorelaxation à travers deux grands médiateurs, la prostacycline et le NO: l'interaction de la BK avec son récepteur endothélial, à sept domaines transmembranaires, couplé aux protéines G entraîne une augmentation de calcium intracellulaire qui a pour double effet, d'une part, d'activer la phospholipase A2 et de produire la prostacycline et d'autre part, de stimuler la NO-synthase constitutive et d'engendrer du NO. La prostacycline et le NO agissent synergiquement sur la CML vasculaire sous-jacente pour produire une vasorelaxation. Plusieurs arguments encore préliminaires, plaident en faveur d'une production locale de BK dans la paroi vasculaire. Les cultures de cellules endothéliales ombilicales humaines synthétisent et sécrètent du kininogène de haut poids moléculaire (Schmaier et coll. 1988). Elles sont capables de fixer et d'internaliser les kinines exogènes. Par ailleurs, les CML vasculaires d'aorte de rat en culture produisent de la kallibréine et du kininogène (Oza et coll. 1992; Saed et coll. 1990). La BK engendrée aurait un effet paracrine sur les récepteurs B2 des cellules endothéliales (Keravis et coll. 1991). Un autre argument indirect, provient des expériences pharmacologiques *in vitro*. L'administration d'inhibiteur de l'enzyme de conversion sur des anneaux aortiques ayant subi une constriction préalable entraîne une vasorelaxation, en présence d'endothélium. Celle-ci peut être bloquée par un antagoniste spécifique de la BK, impliquant l'action de ce peptide dans la vasorelaxation (Mombouli et coll. 1991). La suppression de l'endothélium dans cette préparation entraîne la perte de la relaxation induite par l'inhibiteur de l'enzyme de conversion. De même, le traitement des cellules endothéliales en culture par un inhibiteur de l'enzyme de conversion provoque des modifications du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et une production de prostaglandines qui peuvent être inhibées par un antagoniste compétitif des kinines (Wiemer et coll. 1991). À long terme, la BK pourrait avoir une action antiproliférative sur la paroi vasculaire à travers les médiateurs

endothéliaux, comme le NO, qui diminuent la mitogenèse des CML vasculaires.

La sérotonine (5-HT) possède une double action vasculaire: contraction de CML vasculaire par stimulation de récepteurs sérotoninergiques  $ser1$  et surtout  $ser2$  d'une part, et vasorelaxation due à la libération du NO et de  $PGI_2$  par les cellules endothéliales par stimulation des récepteurs sérotoninergiques  $ser1$ , d'autre part (Cohen et coll. 1983).

Les leucotriènes sont libérés par les leucocytes et les macrophages en réponse à une réponse inflammatoire après lésion tissulaire. Les leucotriènes C3 et C4 induisent une constriction de la microcirculation coronaire, mais ils ne semblent avoir aucun effet sur les artères épocardiques (Flavahan et coll. 1989; Sakuma et coll. 1987).

Les facteurs mécaniques jouent également un rôle important. La vitesse de l'écoulement sanguin dans les vaisseaux coronaires est à elle seule un élément déterminant de la vasomotricité coronaire. En effet, une dilatation débit-dépendante apparaît en moyenne 30 s après l'augmentation de la vitesse d'écoulement au niveau des gros troncs coronaires. Cette dilatation débit-dépendante est abolie dans de nombreuses conditions pathologiques (athérosclérose, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, diabète, tabagisme, etc.) même en l'absence de lésions coronaires angiographiquement visibles (Gould et coll. 1982; Hintze et coll. 1984).

La contrainte de cisaillement longitudinale stimule la libération par les cellules endothéliales des produits vasodilatateurs NO,  $PGI_2$  et EDHF, et inhibe la production d'endothéline. L'EDHF pourrait être l'élément déterminant de la vasodilatation coronaire lorsque la stimulation sympathique est responsable à la fois de l'augmentation de la demande métabolique du myocarde et de la stimulation  $\alpha$ -adrénergique de la paroi vasculaire (Inoue et col. 1988; Olesen et coll. 1988).

L'adénosine est une substance dont la durée de vie plasmatique est très courte (0.6 s), produite par le métabolisme normal des myocytes et par les cellules endothéliales. Elle exerce une action vasodilatatrice à deux niveaux par

l'intermédiaire des récepteurs purinergiques  $P_1$ , (1) en stimulant la conduction du NO par les cellules endothéliales, (2) en activant *l'adénylyle cyclase* (AC) et la production *d'adénosine monophosphate cyclique* (AMPC) par la CML vasculaire. L'adénosine exerce également un rétrocontrôle négatif sur les terminaisons nerveuses orthosympathiques par l'intermédiaire de récepteurs  $P_1$ . Depuis longtemps, l'adénosine est considérée comme le messager physiologique entre les myocytes cardiaques et les CML vasculaires, permettant l'adéquation entre la demande métabolique et le débit coronaire par un rétrocontrôle. Cependant, l'inhibition de l'adénosine par l'adénosine déaminase n'empêche pas l'augmentation du débit coronaire (Berne 1980).

En conclusion, le tonus vasculaire est le résultat d'interactions très nombreuses au niveau de la CML vasculaire. La liste des substances susceptibles d'induire une vasoconstriction ou une relaxation n'est probablement pas close. De plus, une même substance peut avoir des effets opposés qui dépendent de l'intégrité de l'endothélium vasculaire.

### **3.7 Autorégulation du débit coronaire**

Comme dans tout lit vasculaire, la pression de perfusion coronaire est un déterminant fondamental du débit sanguin local. Mais la circulation coronaire, comme celle du cerveau ou du rein, possède la propriété fondamentale d'être «autorégulée». En effet, dans les modèles expérimentaux où la demande en oxygène du myocarde est maintenue constante, toute augmentation ou diminution de la pression de perfusion coronaire engendre rapidement un ajustement du tonus des petits vaisseaux de résistance, conduisant au retour rapide du débit coronaire à une valeur très proche de sa valeur initiale (Hoffman et coll. 1990). Ce phénomène est appelé autorégulation et est défini par Feigl comme la propriété intrinsèque d'un organe à maintenir constant son débit sanguin en dépit des variations de la pression de perfusion artérielle (Feigl 1983). Par définition, l'autorégulation intrinsèque d'un organe exclut les régulations extrinsèques nerveuses et humorales qui peuvent la conditionner.

L'étude de cette autorégulation requiert des conditions expérimentales particulières dans lesquelles le métabolisme de l'organe considéré est constant et où les variations de la pression de perfusion ne modifient pas le métabolisme de cet organe. Ce point est particulièrement important et complexe pour le coeur, car la pression artérielle ne représente pas uniquement la pression de perfusion pour la circulation coronaire mais, également, le post-charge pour le ventricule gauche. Comme la pression systolique développée par le ventricule gauche est un déterminant important de la consommation en oxygène du myocarde, les variations du débit coronaire consécutives aux variations de la pression artérielle engloberont donc également les effets liés à la modification du métabolisme myocardique et ne pourront pas être seulement imputables au seul phénomène d'autorégulation (Hoffman et coll. 1990).

### **3.7.1 Régulation métabolique**

À part le phénomène d'autorégulation, il existe une régulation métabolique qui consiste en l'augmentation, ou en la diminution parallèle du débit coronaire et de la consommation en oxygène du coeur pour un niveau de pression constant. C'est la base même de l'adéquation des besoins aux apports en oxygène du myocarde.

#### **3.7.1.1 Étroite dépendance du débit coronaire vis-à-vis de la *consommation en oxygène du myocarde (MVO<sub>2</sub>)***

Le métabolisme cardiaque et la circulation coronaire sont en effet intimement liés. Toute augmentation du métabolisme myocardique s'accompagne d'une dilatation coronaire fonctionnelle (Feigl 1983) car elle a pour conséquence d'augmenter les besoins en oxygène du coeur. La situation inverse se vérifie également.

C'est principalement au niveau des artérioles coronaires que se situe l'essentiel de la régulation métabolique du coeur. Le tonus des artérioles coronaires s'adapte en effet en permanence aux besoins métaboliques du

myocarde, et cela de façon à assurer en permanence un débit coronaire adapté au métabolisme du myocarde (Feigl 1983). La  $MVO_2$  est exprimée par l'équation suivante:

$$MVO_2 = QCo \times (CaO_2 - CvO_2)$$

où  $QCo$  = débit coronaire;

$CaO_2$  = contenu en oxygène du sang artériel coronaire;

$CvO_2$  = contenu en oxygène du sang veineux coronaire;

$(CaO_2 - CvO_2)$  = différence artério-veineuse du contenu en oxygène.

La relative constante de la différence artério-veineuse du contenu en oxygène observée au niveau de la circulation coronaire malgré d'importantes modifications de la  $MVO_2$  traduit bien l'étroite dépendance du débit coronaire vis-à-vis de la demande en oxygène du coeur. En effet, dans les conditions physiologiques normales, le coeur ne peut fonctionner qu'en aérobiose. Or, au repos, cet organe extrait déjà approximativement 75 à 80% de l'oxygène du sang artériel et la circulation coronaire se différencie de toutes les autres circulations locales par l'importance de sa différence artério-veineuse en oxygène; le contenu en oxygène du sang issu du sinus coronaire n'étant que de 5 à 6 volumes d'oxygène ( $O_2$ ) pour 100 ml de sang. Ainsi, à la différence de ce qui se passe au niveau des autres circulations locorégionales, toute augmentation des besoins en oxygène du myocarde ne pourra être satisfaite que par l'accroissement de l'apport de sang artériel par vasodilatation coronaire puisque l'extraction de l'oxygène par le myocarde est déjà pratiquement maximale au repos (Feigl 1983; Marcus et coll. 1990).

Les facteurs qui déterminent la  $MVO_2$  ont été étudiés en détail. Les déterminants les plus importants sont: (1) la tension pariétale du ventricule gauche en systole; (2) la force contractile du myocarde; (3) la fréquence cardiaque (Feigl 1983; Marcus et coll. 1990).

### 3.7.1.2 Mécanismes régulateurs, rôle déterminant de l'adénosine

Le mécanisme fondamental contrôlant en permanence le tonus des artérioles coronaires de façon à ce que les apports en oxygène soient toujours en équilibre avec les besoins métaboliques du myocarde n'est pas encore définitivement élucidé. Plusieurs facteurs métaboliques comme l'adénosine, le dioxyde de carbone, l'oxygène et les protons (pH) ont été étudiés comme des candidats potentiels à cette médiation. À l'état de base, le débit coronaire est probablement contrôlé par un métabolite libéré par les cellules myocardiques proportionnellement à leur activité métabolique, et possédant de puissantes propriétés vasoactives. Berne (1963) a émis l'hypothèse que l'adénosine était le facteur métabolique contrôlant le tonus vasculaire coronaire. Selon cette hypothèse, l'augmentation des besoins énergétiques cardiaques, comme l'hypoxie tissulaire, conduirait à une diminution des stocks de composés riches en énergie comme l'ATP ou la créatinine phosphate, et à une production accrue d'ADP, d'AMP et d'adénosine. L'adénosine diffusant dans l'espace interstitiel atteint alors les artérioles coronaires qu'elle dilate et l'augmentation du débit coronaire qui en résulte accroît les apports d'oxygène au tissu cardiaque. Différentes expériences ont en effet montré que l'adénosine, tout comme l'hypoxie myocardique, dilate préférentiellement les petites artères et les artérioles coronaires.

Un second facteur souvent évoqué pour expliquer l'autorégulation métabolique est le dioxyde de carbone car l'hypercapnie serait un agent constricteur de ce lit vasculaire (Ledingham et coll. 1970; Case et coll. 1978). Ces effets du dioxyde de carbone sont moins puissants et inverses de ceux de l'oxygène et ils sont indépendants du pH extracellulaire. L'hypoxie entraîne une intense dilatation des artérioles coronaires sans modification du métabolisme cardiaque (Berne 1975), tandis que l'hyperoxie est responsable d'une faible diminution du débit coronaire (Lammerant et coll. 1969). Le rôle physiologique du pH dans la régulation du débit coronaire est, quant à lui, plus discuté, car il faut une acidose importante (pH = 6.90) pour observer une dilatation coronaire (Tarnow et coll. 1975). Enfin, l'endothélium et ses métabolites (NO, ET, PGI<sub>2</sub>,

etc.), tout comme l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants, semblent également jouer un rôle de tout premier plan.

### **3.7.2 Forces de compression extrinsèques cardiaque**

Au cours d'un cycle cardiaque, le débit sanguin coronaire présente un aspect intermittent tout à fait particulier. La contraction systolique du myocarde se traduit en effet par une chute brutale du débit coronaire contemporaine de la contraction isovolumétrique. Comme l'ont démontré Downey et Kirk (1974), et Hess et Bache (1976), c'est au cours de la diastole que le ventricule gauche reçoit l'essentiel de son irrigation. Ainsi, si le débit coronaire dépend de la pression de perfusion, il dépend également de la pression régnant à l'intérieur du myocarde. La pression intramyocardique paraît résulter d'une part d'un phénomène actif, car elle diminue sans modification notable de la pression intraventriculaire au cours de l'ischémie (Herzberg e coll. 1966), mais aussi de la distension passive secondaire aux variations de la pression intraventriculaire, et notamment de la précharge (Ellis et coll. 1979).

Au sein du myocarde, la distribution de la pression intramyocardique n'apparaît également pas homogène. En systole, les pressions intramyocardiques sont en effet plus élevées dans les couches sous-endocardiques du myocarde où elles sont probablement équivalentes à la pression régnant dans la cavité ventriculaire. Progressivement, à mesure que l'on s'éloigne de l'endocarde, ces pressions diminuent pour se rapprocher de la pression atmosphérique au niveau de l'épicarde. En diastole, un gradient similaire pourrait exister mais cela a été moins étudié (Hoffman et coll. 1990).

### **3.7.3 Régulation nerveuse de la circulation coronaire**

La circulation coronaire possède une double innervation parasymphatique et sympathique provenant du système nerveux autonome (Wollard 1926). Cette double innervation concerne à la fois les gros troncs et les artérioles (Lever et coll. 1965; Denn et Stone 1976). L'innervation cholinergique de gros

troncs et des artérioles coronaires provient très probablement d'un ganglion intracardiaque (Berne 1985) alors que l'innervation sympathique de la circulation coronaire provient essentiellement du ganglion stellaire gauche. Ces fibres adrénergiques se terminent par un plexus périvasculaire très dense localisé au niveau de la couche adventitielle de la paroi vasculaire (Wollard 1926).

### 3.7.3.1 Régulation adrénergiques de la circulation coronaire

L'effet de la stimulation sympathique sur la circulation coronaire résulte d'une balance complexe entre la vasoconstriction induite par l'activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques et la vasodilatation induite par l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Cependant, l'augmentation du métabolisme myocardique due à l'effet inotrope positif de la stimulation sympathique (activation des récepteurs alpha-1-adrénergiques) accroît le débit coronaire par le jeu de l'autorégulation métabolique et met en jeu une vasodilatation coronaire débit-dépendante et endothélium-dépendante. Les effets de l'autorégulation métabolique sont minimisés dans le modèle de coeur fibrillant chez le chien. Dans ces conditions, les effets inotropes et chronotropes positifs des catécholamines sont évités, et l'injection intracoronaire d'adrénaline ou de noradrénaline diminue le débit sanguin coronaire et la pression partielle d'oxygène dans le sinus coronaire, traduisant ainsi une vasoconstriction (Berne 1985). Chez le chien éveillé, l'administration intraveineuse ou intracoronaire de noradrénaline s'accompagne d'une vasodilatation coronaire, et l'effet vasoconstricteur de la noradrénaline est démasqué après blocage des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques par le propranolol (Pitt et coll. 1967). La vasoconstriction  $\alpha$ -adrénergique limiterait approximativement de 30% la vasodilatation liée à la régulation métabolique (Mohrman et Feigl 1978) et pourrait donc ainsi, en permanence, exercer un effet modulateur sur les apports en oxygène au myocarde lors d'une stimulation sympathique.

Chez l'humain, les effets de la stimulation sympathique sur la circulation

coronaire ont été étudiés par le test au froid et pendant l'exercice. L'action du test au froid sur les artères épicaudiques est endothélium-dépendante (Zeiber et coll. 1991). En présence d'un endothélium fonctionnel, le test au froid induit une vasodilatation. Celle-ci n'est plus observée chez un patient ayant une athérosclérose coronaire. Des données analogues ont été démontrées lors de l'exercice avec une vasoconstriction des segments d'artères athéroscléreux et des sténoses coronaires (Gage et coll. 1986).

### 3.7.3.2 Régulation $\alpha$ -adrénergique de la circulation coronaire

La distinction de l'action des deux sous-types de récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  adrénériques au niveau de la circulation coronaire est aujourd'hui reconnue sur la base de données fonctionnelles (Langer et coll. 1977).

Des données expérimentales ont bien établi le rôle vasoconstricteur important des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénériques dont la localisation est essentiellement postsynaptique. En particulier, Gwartz et coll. (1986) ont montré que l'activation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénériques limitait la dilatation des gros troncs épicaudiques et des artères résistives lors de l'exercice musculaire.

Au niveau des gros troncs coronaires, les deux sous-types de récepteurs  $\alpha_1$ - et  $\alpha_2$ -adrénériques sont impliqués dans la réponse constrictrice à la noradrénaline (Cocks et Angus 1983). Berdeaux et coll. (1994) ont récemment montré dans un modèle de désendothélialisation expérimentale de l'artère circonflexe chez le chien qu'en l'absence d'endothélium, la vasodilatation n'existait plus et pouvait même être remplacée par une vasoconstriction. Ainsi, l'administration d'un  $\alpha_1$ -bloquant sélectif comme la prazosine diminue la vasoconstriction induite par les catécholamines à l'effort en l'absence d'endothélium. L'implication clinique de ces résultats reste encore hypothétique mais le développement de la recherche clinique sur ce thème devrait permettre sans doute de discuter une thérapeutique passant par des antagonistes des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénériques dans les pathologies coronaires accompagnées de dysfonctions

endothéliales.

Il a été montré que l'effet de l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques coronaires ne résulte pas de leur seule action présynaptique. En effet, une vasoconstriction médiée par l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques postsynaptiques a été également mise en évidence dans différents lits vasculaires (Timmerman et coll. 1981) et en particulier dans la circulation coronaire (Chen et coll. 1988). De plus, des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques sont présents au niveau de l'endothélium vasculaire et leur activation induit la libération de NO qui vient ainsi moduler les effets vasoconstricteurs directs résultant de l'activation des récepteurs  $\alpha_2$  sur le muscle lisse. Les effets physiologiques de l'activation des récepteurs  $\alpha_2$  impliqueraient essentiellement le lit résistif. En effet, au niveau de la microcirculation, les deux types de récepteurs  $\alpha_1$ - et  $\alpha_2$ -adrénergiques sont présents. Cependant, des données expérimentales suggèrent que les récepteurs  $\alpha_2$  seraient plus volontiers distribués au niveau des artérioles et même si leur importance physiologique reste encore discutée, il semble bien que les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques y soient prépondérants sur le plan fonctionnel, surtout en cas de sténose coronaire ou d'ischémie myocardique. Plus récemment, il a été montré qu'il existait une interaction au niveau de la microcirculation entre la stimulation  $\alpha$ -adrénergique et l'endothélium vasculaire, ce qui pourrait avoir des conséquences physiopathologiques importantes (Jones et coll. 1993).

### **3.7.3.3 Régulation $\beta$ -adrénergique de la circulation coronaire**

La stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques entraîne une dilatation des artères coronaires de résistance selon deux mécanismes distincts: l'un résultant de la stimulation directe des récepteurs vasculaires, l'autre résultant de l'augmentation indirecte des besoins métaboliques du myocarde du fait de la stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques cardiaques (Feigl 1983; Brodde et coll. 1991). Ce double mécanisme rend difficile l'appréciation des effets

vasodilatateurs directs résultant de la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Cependant, le principal mécanisme responsable de la vasodilatation des artères coronaires de résistance repose sur l'activation des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques.

En définitive, la vasodilatation directe des artérioles coronaires en réponse à des agents pharmacologiques semble donc essentiellement médiée par les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques, mais ces récepteurs vasculaires ne semblent pas fonctionnellement innervés par le système nerveux sympathique extrinsèque et sont surtout activés par les catécholamines circulantes. Au niveau transmural, la stimulation des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques coronaires entraîne une vasodilatation régionale qui est plus importante au niveau des couches myocardiques sous-épicaudiques que sous-endocardiques, d'où la diminution du rapport perfusion endocardique/épicaudique. Ces effets peuvent s'expliquer soit par une plus grande réserve de dilatation au niveau sous-épicaudique, soit par une distribution transmurale hétérogène des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques coronaires (Berdeaux et coll. 1979).

Au niveau des gros troncs coronaires, la presque totalité des études consacrées à la caractérisation de la nature des sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques au niveau des artères épicaudiques a été réalisée sur des vaisseaux isolés où prédominent les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques.

#### **3.7.4 Régulation cholinergique de la circulation coronaire**

La stimulation nerveuse ou humorale du système nerveux parasympathique entraîne une diminution importante de la fréquence cardiaque, de la contractilité du ventricule gauche et de la pression artérielle. Tous ces effets réduisent la consommation d'oxygène du myocarde et tendent à augmenter indirectement la résistance vasculaire coronaire, d'une part en faisant intervenir l'autorégulation métabolique, d'autre part en diminuant la pression de perfusion, masquant ainsi les effets directs de la stimulation parasympathique sur la

circulation coronaire. Chez le chien, il est maintenant bien établi qu'une vasodilatation coronaire mettant en jeu des récepteurs muscariniques est observée lors de l'administration d'Ach (Gross et coll. 1981; Cox et coll. 1983), lors de la stimulation électrique directe des nerfs vagues (Feigl 1969; Reid et coll. 1985) et lors de la mise en jeu de mécanismes réflexes comme la stimulation du réflexe de Bezold-Jarish (Feigl 1975).

Au niveau des gros troncs coronaires, la relaxation des CML vasculaires induite par l'Ach et dépendante de l'intégrité de l'endothélium vasculaire est également observée au niveau des gros troncs coronaires chez le chien éveillé (Young et coll. 1987). Ces résultats sont confirmés par des données angiographiques chez l'humain, où l'injection intrac coronaire d'Ach contracte les artères coronaires de patients ayant une pathologie coronarienne et peut même conduire à l'occlusion totale d'un segment sténosé, alors que des patients ayant des artères coronaires saines répondent uniquement par une dilatation des artères coronaires épicaudiques dans des conditions similaires (Ludmer et coll. 1986).

### **3.8 Concept de réserve coronaire**

La réserve coronaire se définit comme la capacité maximale du débit coronaire à s'élever au-dessus de sa valeur basale alors que le travail cardiaque, la consommation en oxygène du myocarde et la pression de perfusion sont maintenues constantes (Hoffman et coll. 1984). La réserve coronaire est ainsi définie par le rapport du débit coronaire maximal obtenu après l'action d'un vasodilatateur artériolaire sur le débit coronaire de base.

Son concept repose sur le phénomène d'autorégulation. Si le travail ventriculaire est maintenu constant pendant que l'on fait varier la pression de perfusion des coronaires, le débit sanguin coronaire aura tendance à se maintenir constant, cela pour une pression moyenne de perfusion coronaire entre 70 et 130 mmHg. Mais si les vaisseaux coronaires (microcirculation essentiellement) sont dilatés au maximum par des agents vasodilatateurs tels que l'adénosine, la régulation sera perdue et le débit coronaire sera directement proportionnel aux

variations de pression de perfusion. La différence entre le débit lorsque les vaisseaux sont dilatés au maximum et le débit lorsque l'autorégulation s'exerce, représente la réserve coronaire; elle indique donc l'accroissement de débit que l'on peut obtenir pour une pression donnée en provoquant une vasodilatation maximale (Hoffman et coll. 1987).

---

## Chapitre 4

### L'endothélium coronaire

#### 4.1 Introduction

*L'endothélium vasculaire* (EV) est une monocouche de cellules qui occupe une position anatomique stratégique dans la circulation, à l'interface entre le sang circulant et le *muscle lisse vasculaire* (MLV). De par sa position, l'EV constitue un site privilégié d'échange d'informations avec le sang circulant et le MLV sous-jacent. A l'état physiologique, l'EV possède la propriété antithrombogénique. Les plaquettes et les leucocytes, les systèmes de la coagulation, de la fibrinolyse et du complément ne sont pas activés à son contact. Dans des conditions normales, l'état anticoagulant et non thrombogène de l'EV prédomine. En cas de stimulation ou d'agression de la cellule endothéliale, l'équilibre bascule vers les activités procoagulantes ou prothrombotiques. Le maintien de la fluidité sanguine normale au contact de l'EV provient d'interactions complexes entre le sang, le vaisseau et les forces hémodynamiques. La perturbation de l'un de ces éléments provoque un déséquilibre dont les conséquences peuvent conduire à la thrombose et à l'athérosclérose (Munro et coll. 1988; Dejana et coll. 1987).

#### 4.2 Les récepteurs de l'EV

L'échange d'informations entre l'EV et le sang d'une part, et les MLV d'autre part, n'est possible que par la présence à la face luminale de la cellule endothéliale de récepteurs spécifiques à de nombreuses substances circulantes. D'un point de vue pharmacologique, on considère généralement qu'il est possible de classifier les récepteurs membranaires cellulaires en quatre types, en fonction de leurs mécanismes de couplage:

- les récepteurs couplés à *l'adénylyle cyclase* (AC), soit de façon positive, conduisant à l'augmentation de l'AMPc, soit de façon négative,

provoquant une diminution de l'AMPC;

- les récepteurs couplés à un canal ionique, comme les récepteurs nicotinique de l'Ach;
- les enzymes transmembranaires pour lesquels les sites récepteurs et enzymatiques sont présents sur la même protéine, comme le récepteur de type tyrosine kinase (récepteur de l'insuline ou des facteurs de croissance);
- les récepteurs couplés à la PLC (Flavahan et coll. 1988).

En pratique, au niveau de la circulation coronaire, on peut considérer que la plupart des réponses physiologiques dépendant de l'EV sont médiées par des récepteurs couplés à la voie de la PLC (Lüscher et coll.1990). Du point de vue biochimique, la stimulation d'un de ces récepteurs conduit, par l'intermédiaire d'une protéine G (PG), à l'activation de la PLC qui hydrolyse des phospho-inositides membranaires ( $PIP_2$ ) conduisant ainsi à la production d' $IP_3$  et de DAG. Le DAG stimule la PKC qui peut phosphoryler différents effecteurs cellulaires impliqués dans la régulation des expressions géniques et des synthèses protéiques et dans la prolifération cellulaire. En parallèle, l' $IP_3$  stimule la libération de  $Ca^{++}$  à partir de ses sites de stockage intracellulaire (réticulum sarcoplasmique). L'augmentation de  $Ca^{++}$  qui en résulte peut activer différents systèmes enzymatiques  $Ca^{++}$ -dépendants, en particulier les enzymes NO-synthase et phospholypase  $A_2$  (Casey et coll. 1989; Dohlman et coll. 1991).

En effet, la preuve de l'existence d'un récepteur endothélial au niveau des artères coronaires humaines est basée sur des études fonctionnelles réalisées *in vitro* sur des artères prélevées chez des patients présentant une pathologie coronarienne ou une cardiopathie non ischémique, et *in vivo* chez des sujets pour lesquels un cathétérisme coronaire avait été réalisé (Luscher et coll. 1990; Egaschira et coll. 1992). Dans ces conditions, l'absence d'un récepteur fonctionnel sur les cellules endothéliales pourrait être due à des modifications précoces liées à la pathologie, et ne constitue pas une preuve formelle de l'absence de ce récepteur chez l'humain, en particulier chez le sujet sain où

l'étude de la fonction endothéliale coronaire n'est pas possible. Il est important de noter que le système de transduction comme étant responsable au niveau endothélial de la production de facteurs vasodilatateurs, en l'occurrence la voie des PLC, est également présent au niveau de la CML vasculaire, où l'activation de la PLC et l'augmentation de  $Ca^{++}$  intracellulaire qui en résulte provoquent le développement d'une contraction musculaire et est donc à l'origine d'une vasoconstriction (Lüscher 1990). Ainsi, on peut considérer qu'une substance peut, par l'intermédiaire du même récepteur et de la même voie de transduction du signal, exercer soit des effets vasoconstricteurs par la stimulation des récepteurs musculaires lisses, soit des effets vasodilatateurs par la stimulation des récepteurs endothéliaux, conduisant à la libération de facteurs relaxants tels que la  $PGI_2$  et le NO. Ainsi, l'administration intracoronaire d'Ach chez des patients ayant des artères coronaires épicaardiques normales provoque une vasodilatation des segments distaux de l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA) et cet effet est aboli par un inhibiteur de la NO-synthase la *L-nitro-arginine-methyl ester* (L-NAME) (Lefroy et coll. 1993; Quyyumi et coll. 1995). Cependant, l'existence de relaxations endothélium-dépendantes à l'Ach n'a pas été démontrée de façon claire sur des segments d'artères coronaires humaines évaluées *in vitro* (Lüscher 1990). Par ailleurs, l'administration locale de SP (Egashira et coll. 1991) ou de BK (Kuga et coll. 1995) provoque également chez l'humain une vasodilatation coronaire probablement par un mécanisme dépendant de l'endothélium. Enfin, si l'existence de relaxations endothélium-dépendantes induites par l'histamine et l'ADP a été démontrée au niveau d'artères coronaires humaines isolées (Lüscher et coll.1990), le rôle éventuel de ces réponses reste à être démontré *in vivo*.

De nombreuses études expérimentales et cliniques ont clairement démontré que les facteurs de risques et les pathologies cardio-vasculaires pouvaient, dans de nombreux cas, être à l'origine d'une dysfonction endothéliale caractérisée par une diminution de la production de facteurs relaxants en réponse à un stimulus tel que l'Ach (Lüscher et coll.1990). Il faut cependant noter

qu'une telle dysfonction pourrait être liée à une incapacité des cellules endothéliales à produire des facteurs vasodilatateurs ou, au contraire, à une altération spécifique de certains types de récepteurs ou de systèmes de transduction couplés à ces récepteurs. Dans cette optique, des études expérimentales ont clairement montré que les altérations fonctionnelles subies par l'EV dans l'hypercholestérolémie ou l'athérosclérose étaient liées à un dysfonctionnement spécifique des systèmes de transduction, en particulier au niveau des PG (Flavahan et coll. 1992). De la même façon chez l'humain, l'hypertension, l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose provoquent une altération spécifique des réponses coronaires à l'Ach, alors que dans de nombreux cas, les réponses vasodilatatrices à la BK et à la SP sont normales, montrant que ces pathologies ne s'accompagnent pas d'une diminution de la production de facteurs vasodilatateurs par l'EV (Egashira et coll. 1992; Kuga et coll. 1995).

Ces données expérimentales et cliniques suggèrent donc que les récepteurs endothéliaux et les voies de transduction du signal associés à ces récepteurs constituent une cible privilégiée des maladies cardio-vasculaires à l'origine des phénomènes de dysfonction endothéliale observés dans ces pathologies.

### **4.3 Le monoxyde d'azote (NO)**

Dès 1980, Furchgott et Zawadzki avaient observé que la relaxation des artères isolées soumises à l'action de l'Ach dépendait de l'endothélium (Furchgott et coll. 1980). Ils en ont conclu qu'un facteur appelé *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) ou facteur de relaxation dépendant de l'endothélium, sécrété par les cellules endothéliales traitées à l'Ach ou à la BK provoquait l'élongation des CML vasculaires adjacentes. Il fallut sept années pour faire la preuve que l'EDRF n'était autre que le NO (Ignarro et coll. 1987; Moncada et coll. 1991).

### 4.3.2 Chimie et biochimie du NO

Le NO, sous forme gazeuse ou bien dissous dans l'eau, est un radical stable dans des conditions normales: il réagit avec d'autres radicaux, mais non sur lui-même. Il est relativement peu soluble dans l'eau. Il intervient dans le cycle de l'azote en tant qu'intermédiaire entre le nitrite ( $\text{NO}_2$ ) et le protoxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Étant donné sa capacité à capter un électron, ou à donner un électron, la réactivité du NO dépend du potentiel d'oxydo-réduction du milieu environnant. Les estimations des quantités de NO, très faibles dans les systèmes biologiques, sont souvent délicates et non spécifiques. Le NO est détecté en chimiluminescence des gaz ou chromatographie en phase gazeuse suivie d'une détection par spectrométrie de masse ou par spectrométrie en présence d'oxyhémoglobine, ou enfin par électrochimie grâce à une électrode à porphyrine de nickel (Archer et coll. 1993). La résonance paramagnétique électronique constitue une autre méthode peu sensible, mais spécifique, pour détecter des complexes paramagnétiques nitrosylés (Henry et coll. 1993; revu dans Luscher et Vanhoutte 1990).

Le NO a été mesuré dans divers organes, comme le coeur sain [160 *picomol* (pmol)/min] et le poumon humain normal (12 pmol/min) (Gustafsson et coll. 1991). Dans le système vasculaire, la concentration de NO a été mesurée à proximité immédiate de la paroi endothéliale grâce à l'électrode à porphyrine de nickel (Malinski et coll. 1993). Une injection de BK provoque une augmentation de concentration jusqu'à 1  $\mu\text{mol/L}$  avec une vitesse de 0.4  $\mu\text{mol/L/s}$ . Dans les CML vasculaires adjacentes situées à 100  $\mu\text{m}$  du lieu de production de NO, une concentration de 0.8  $\mu\text{mol/L}$  est mesurée 20 s après l'injection de BK. Ces données permettent d'estimer une perte de 40% de NO au cours de sa diffusion jusqu'à la *guanylate cyclase* (GC) cible, perte attribuée aux autres réactions chimiques et à une activation maximale de la GC (Malinski et coll. 1993).

### 4.3.3 Biosynthèse de NO

Les NO-synthases catalysent chez les mammifères l'oxydation du groupe guanidino de la l-arg par un mécanisme impliquant cinq électrons. La l-arg, l'oxygène moléculaire et le *nicotine adénine dinucléotide phosphate* (NADPH) sont les cosubstrats, l'H<sub>2</sub>O, le NADP, la l-citrulline et le NO sont les coproduits (Marletta et coll. 1993).

Il existe différentes isoformes de la NO-synthase: constitutives et inducibles, solubles et particulières. Les flavines (FMV), la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) et la calmoduline sont des cofacteurs des différentes isoformes qui contiennent également une molécule d'hème. Les NO-synthases peuvent être considérées comme des «cytochromes P-450 autosuffisants» qui contiennent à la fois le domaine héminique et le domaine réductasique sur la même chaîne polypeptidique (Marletta et coll. 1993).

Une différence fondamentale entre les isoformes concerne l'activité NO-synthase *in situ*. Les NO-synthases constitutives sont responsables de la synthèse de petites quantités de NO. Cette faible production de NO est limitée dans le temps. Ainsi, le NO participe au contrôle du tonus vasculaire lorsqu'il est produit par la NO-synthase constitutive endothéliale, ou joue un rôle de neurotransmetteur quand il est synthétisé par l'isoforme neuronale. Dans ces situations, le NO se comporte comme un messager intercellulaire. En revanche, les NO-synthases inductibles dont le prototype est l'enzyme de macrophage de souris sont impliquées dans la production de grandes quantités de NO pendant de longues durées. Le NO exerce alors des activités cytotoxiques et antiprolifératives. Des anticorps polyclonaux préparés contre la NO-synthase constitutive de cervelet reconnaissent la NO-synthase constitutive endothéliale, mais non la NO-synthase inductible (Stuehr et coll. 1992).

De nombreuses arginines N-substituées ont été synthétisées dans l'espoir de trouver des inhibiteurs spécifiques de ces isoformes. La *N<sup>ω</sup>-monométhyl-L-arginine* (L-NMMA) est un bon inhibiteur des deux isoformes, mais la L-NAME est un meilleur inhibiteur de la NO-synthase constitutive (Stuehr et coll. 1992) et l'amino-guadine, un meilleur inhibiteur de la forme inductible (Misko

et coll. 1993). Les NO-synthases sont aussi inhibées par certains inhibiteurs de flavo-protéines. Les NO-synthases constitutives sont inhibées par des antagonistes de la calmoduline (trifluoropérazine) mais les NO-synthases inductibles ne le sont pas (Stuehr et coll. 1992).

Les NO-synthases ont été trouvées dans de nombreuses espèces: rat, souris, chien, boeuf, lapin, porc ainsi que chez l'humain et dans un grand nombre de cellules : neurones, endothélium, plaquettes (constitutives), macrophages, hépatocytes, cellules tumorales (inductibles) (Stuehr et coll. 1992).

On a longtemps cherché à caractériser une NO-synthase inductible chez l'humain. Le groupe de Biliar a mis en évidence une NO-synthase inductible dans les hépatocytes et les muscles lisses aortiques (Geller et coll. 1993).

#### 4.3.3.1 Régulation des NO-synthases

Les NO-synthases constitutives sont régulées par le complexe  $\text{Ca}^{++}$ /calmoduline. L'enzyme est pratiquement inactive au-dessous de 80 *nano-molle* (nmol)/L, concentration du  $\text{Ca}^{++}$  libre des synaptosomes. Les agonistes, comme les acides aminés excitateurs (glutamate glycine), peuvent se fixer sur des récepteurs-canaux de type NMDA. Il en résulte une augmentation transitoire de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  libre et donc, une augmentation très rapide de l'activité des NO-synthases. Le même schéma peut s'appliquer à l'isoforme constitutive endothéliale, l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  étant déclenché par des composés vasodilatateurs (BK, Ach) (Stuehr et coll. 1992).

La phosphorylation des NO-synthases constitutives sur des résidus sérine ou thréonine (Marletta et coll. 1993) a été proposé comme mode de régulation négatif de l'activité NO-synthase. De plus, le produit de la réaction lui-même, NO, a été décrit comme un inhibiteur réversible des NO-synthases constitutives (Rogers et Ignarro 1992; Rengasamy et Jones 1993) et inductible (Assreny et coll. 1993).

La plupart des signaux inducteurs sont des cytokines (interféron- $\gamma$ , TNF-

$\alpha$ , IL-1) et des molécules d'origine bactérienne, lipopolysaccharide muramyl-dipeptide, etc. L'induction est inhibée par d'autres cytokines comme les TGF, l'IL-4, l'IL-10 et aussi par les glucocorticoïdes et les facteurs de croissance (Stuehr et coll. 1992; Nathan et coll. 1992; Goureau et coll. 1993).

#### 4.3.4 Hémodynamie sanguine et NO

Le NO produit par les cellules endothéliales diffuse et active la GC soluble des CML vasculaires sous-jacentes. Le produit GMPc, second messenger du NO, entraîne une cascade de phosphorylation des protéines impliquées dans le recaptage et l'extrusion du  $\text{Ca}^{++}$ , induisant la relaxation de la CML vasculaire et, *in vivo*, la vasodilatation (Rapoport et coll. 1983).

La synthèse d'antagonistes compétitifs de la l-arg par le groupe de Moncada a permis d'étudier l'effet du blocage de la NO-synthase. L'application de ces antagonistes sur des préparations d'anneaux artériels provoque une augmentation du tonus développé par le vaisseau. Moncada et coll. ont démontré qu'il existe en permanence une sécrétion de NO responsable d'un tonus vasodilatateur dépendant de l'endothélium, puisque l'effet de ces antagonistes disparaît après l'ablation de l'EV. *In vivo*, l'administration aiguë de ces antagonistes s'accompagne d'une élévation de la pression artérielle (Rees et coll. 1989; Moncada et coll. 1991).

Ces travaux ont donc montré que le tonus vasodilatateur est permanent, non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo*. La régulation de la pression artérielle et du débit sanguin apparaît donc comme le résultat de deux tonus, l'un vasodilatateur et l'autre vasoconstricteur, alors que seul ce dernier avait été décrit en physiologie cardio-vasculaire jusqu'à maintenant.

Une des particularités du système cardio-vasculaire réside dans la capacité qu'ont les contraintes hémodynamiques de transmettre des signaux à la paroi artérielle (Davies et coll. 1993).

En ce qui concerne le NO, il est apparu rapidement que sa sécrétion de base par l'EV était sous le contrôle du débit sanguin. L'accélération du débit

entraîne une augmentation des forces de cisaillement sur la couche d'interface (endothélium) avec la phase solide (paroi artérielle). Ces forces de cisaillement sont proportionnelles à la vitesse sanguine et à la viscosité, et inversement proportionnelles au cube du rayon du vaisseau. Physiologiquement, l'augmentation des contraintes de cisaillement accroît la mobilisation du  $\text{Ca}^{++}$  libre dans la cellule endothéliale, activant la NO-synthase endothéliale dépendante du  $\text{Ca}^{++}$ . La production accrue de NO entraîne une relaxation des CML vasculaires sous-jacentes et donc une vasodilatation. Cette régulation des calibres vasculaires par la vitesse du débit sanguin joue un rôle fondamental dans l'adaptation du réseau artériel à l'augmentation des besoins métaboliques tissulaires (Pohl et coll. 1986; Griffith et coll. 1987). Lors de l'accélération de la fréquence cardiaque, l'augmentation du métabolisme tissulaire induit une dilatation des artérioles très distales. Cet effondrement des résistances vasculaires s'accompagne localement d'une élévation des vitesses circulatoires dans le réseau vasculaire d'amont. L'accélération du débit sanguin augmente les contraintes de cisaillement sur l'EV à l'origine d'un signal de vasodilatation. L'augmentation du calibre artériel normalise ces mêmes contraintes de cisaillement. Si le stimulus devient permanent, cette adaptation fonctionnelle transitoire se complète d'une adaptation structurale (Languille et coll. 1986; 1989).

## Chapitre 5

### L'endothélium et le rejet de greffon

#### 5.1 Introduction

Après une transplantation d'organes, les déterminants antigéniques associés aux antigènes du MHC du donneur stimulent les lymphocytes T du receveur et provoquent l'induction d'une réaction immunitaire qui peut aboutir au rejet du greffon et à la destruction spécifique des cellules du donneur (Dousset 1981). Au cours de la réaction de rejet, les cellules endothéliales du greffon jouent un rôle de premier plan, à la fois comme actrices et comme cibles. Actrices, car elles entretiennent des rapports fonctionnels privilégiés avec les leucocytes circulants et donc, en situation de greffe, avec les cellules immunocompétentes du receveur. Cibles, car elles sont particulièrement exposées aux agressions des effecteurs humoraux et cellulaires de la réaction de rejet, non seulement en raison de leur position stratégique à l'interface entre le tissu greffé et le sang, mais aussi en raison de certaines de leurs propriétés intrinsèques (Shimizu et coll. 1992).

#### 5.2 Propriétés immunologiques de l'endothélium

La destruction spécifique des cellules du donneur, qui caractérise la réaction de rejet du greffon, nécessite le recrutement dans le greffon des cellules immunocompétentes du receveur. Ce recrutement comporte plusieurs étapes successives: (1) l'accumulation des cellules effectrices du receveur dans la microcirculation de l'organe greffé; (2) l'adhérence de ces cellules à l'EV; et (3) leur migration à travers la paroi vasculaire vers le tissu sous-jacent (Springer 1990; Shimizu et coll. 1992).

L'accumulation des cellules effectrices du receveur dans le greffon est facilitée par l'effet chimiotactique de certaines cytokines comme l'IL8 et par les modifications des conditions rhéologiques locales (Mantovani et Dejana 1989).

Ainsi, les cytokines, IL1, TNF- $\alpha$ , et peut-être IL2, modulent la production de médiateurs endothéliaux réglant le tonus vasculaire et exercent ainsi un effet vasodilatateur (Mantovani et Dejana 1989; Casey 1993). De plus, un effet rapide de l'IL1, du TNF- $\alpha$  et de l'interféron- $\gamma$  sur l'EV conduit à une augmentation prolongée de la perméabilité du revêtement endothélial capillaire (Martin et coll. 1988; Casey 1993). Ces modifications locales sont au préalable indispensables à l'établissement d'interactions stables entre les cellules endothéliales et les différentes populations de leucocytes circulants. La formation de ces interactions stables nécessite la présence de protéines d'adhérence spécialisées (Springer 1990; 1991; Shimizu et coll. 1992; Pober 1988). Parmi elles, la P-sélectine et la E-sélectine appartiennent à la famille des sélectines, les ICAM 1 et 2, les VCAM 1 et 2 et le *lymphocyte function antigen* (LFA-3) ou antigène de la fonction lymphocytaire appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Kilbridge et coll. 1994; Burns et coll. 1995). Une seule de ces protéines d'adhérence est exprimée à l'état normal sur l'ensemble des cellules endothéliales capillaires. C'est l'ICAM-2, dont le ligand est une intégrine LFA-1 exprimée sur l'ensemble des leucocytes circulants. Les autres protéines sont inductibles, elles ne sont normalement pas exprimées à la surface des cellules endothéliales capillaires et ne sont présentes que sur des cellules endothéliales stimulées par certains médiateurs de l'inflammation comme l'IL1, l'interféron- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (Casey 1993; Springer 1990; 1991; Shimizu et coll. 1992; Kilbridge et coll. 1994). Chacune de ces protéines a un rôle précis au cours du processus d'adhérence leucocytaire qui comprend deux phases principales. La première phase consiste dans le ralentissement du déplacement des leucocytes dans le débit circulatoire afin d'augmenter la fréquence et la durée de leurs contacts avec l'EV et la seconde phase correspond à la stabilisation de l'adhérence entre les leucocytes et les cellules endothéliales. La première phase est assurée par les sélectines. La P-sélectine dont l'induction très rapide est provoquée, contrairement à celle des autres protéines d'adhérence, par des agents non spécifiques comme l'histamine, la thrombine et

les prostaglandines, interagit préférentiellement avec les neutrophiles et les monocytes. La E-sélectine, dont l'induction est plus tardive et dépend des médiateurs de l'inflammation, assure plus spécifiquement le recrutement des lymphocytes lors du déclenchement de la phase immune de la réaction inflammatoire (Springer 1990; 1991; Shimizu et coll. 1992; Kilbridge et coll. 1994; Burns et coll. 1995). La seconde phase du processus, celle de l'adhérence stable, fait intervenir les protéines ICAM-1 et VCAM-1 dont les ligands leucocytaires appartiennent à la famille des intégrines. Les ligands de l'ICAM-1 sont les protéines LFA-1 et Mac-1 présentes à la surface de l'ensemble des leucocytes circulants. Le ligand de VCAM-1 est le *vascular ligand antigen* (VLA4) ou antigène de ligand vasculaire, une intégrine caractéristique des lymphocytes T-activés. En plus de ces deux couples principaux, d'autres protéines d'adhérence peuvent intervenir. Ainsi la protéine LFA-3, dont l'un des facteurs inducteurs semble être l'IL4, est souvent débutée sur les endothéliums au voisinage des foyers inflammatoires: son ligand est CD2, une protéine membranaire présente sur l'ensemble des lymphocytes T-circulants (Mantovani 1989; Springer 1990; 1991; Shimizu 1992; Kilbridge 1994).

### **5.2.1 L'endothélium et la présentation des allo-antigènes**

L'immunogénicité d'un greffon a été longtemps expliquée par l'hypothèse dite du «leucocyte voyageur», selon laquelle un greffon n'est immunogène que s'il contient encore des cellules spécialisées capables de présenter aux lymphocytes T du receveur les allo-antigènes du donneur associés au MHC (Lafferty et coll. 1983).

Il n'est pas exclu que des cellules non spécialisées puissent acquérir des propriétés immunogènes dans le tissu greffé. Les cellules endothéliales sont parmi les meilleures candidates (Rose et coll. 1990), en raison de leur situation privilégiée, à l'interface entre le tissu greffé et le sang, mais aussi en raison de résultats expérimentaux montrant qu'elles peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigènes (Hirschberg et coll. 1982). Les cellules

endothéliales en culture, stimulées par les cytokines inflammatoires, sont en effet capables de présenter efficacement des antigènes non seulement à des lymphocytes T allogéniques préalablement sensibilisés *in vitro*, mais aussi à des lymphocytes T naïfs, non sensibilisés préalablement (Pober 1986). *In vivo*, pour qu'une cellule présente efficacement des antigènes, elle doit remplir au moins trois conditions (Janeway 1989): (1) elle doit exprimer à sa surface les molécules de classe II du CMH, puisque les lymphocytes auxiliaires ne reconnaissent l'antigène que si celui-ci, préalablement modifié et dégradé sous forme de petits peptides, est exposé à la surface de la cellule en association avec ces molécules; (2) elle doit exprimer des protéines d'adhérence spécialisées capables d'interagir avec les protéines correspondantes exprimées par les lymphocytes T-auxiliaires; ces couples de protéines d'adhérence, dont les plus importants sont ICAM-1/LFA-1 et LFA-3/CD2, assurent des interactions cellulaires non spécifiques stabilisant et renforçant la liaison spécifique entre l'antigène et son récepteur lymphocytaire; (3) enfin, elle doit être capable de sécréter des médiateurs solubles stimulant la prolifération des lymphocytes T; les principaux de ces médiateurs sont l'IL1 et l'IL6 (Janeway 1989).

Les cellules endothéliales des tissus greffés remplissent au moins une partie de ces conditions. En effet, il a été vérifié par immunohistochimie que les cellules endothéliales expriment de façon quasi constante les molécules de classe II du MHC, quel que soit le niveau d'expression de ces antigènes dans le tissu normal (Bouwman et coll. 1987; Milton et coll. 1986). De plus, les cellules endothéliales capillaires des tissus greffés expriment les protéines d'adhérence spécialisées, notamment ICAM-1 et LFA-3, nécessaires aux interactions avec les lymphocytes T auxiliaires.

Donc, les cellules endothéliales des tissus greffés sont susceptibles de jouer un rôle dans la présentation des allo-antigènes. Des arguments directs en ce sens ont été obtenus dans des modèles expérimentaux de transplantation cardiaque chez le rat (Ferry et coll. 1987).

### 5.3 L'endothélium et la réaction de rejet

#### 5.3.1 L'endothélium et le rejet hyperaigu et aigu

Les réactions de rejet hyperaigu sont essentiellement observées en cas de xéno greffe, greffe entre espèces différentes, ou allogreffes entre sujets ABO incompatibles. La cible du rejet hyperaigu est la cellule endothéliale vasculaire qui est détruite, en présence du complément, par des anticorps anti-cellules endothéliales. Ces anticorps sont le plus souvent naturels et souvent polyréactifs (Platt et coll. 1991; Turmann et coll. 1991). Les lésions sont précoces, sévères et étendues; elles se traduisent en particulier par des thromboses massives du greffon (Van der Bogaerde et coll. 1991). Les lésions du rejet hyperaigu ne sont pas contrôlées par les thérapeutiques anti-rejet habituelles qui sont essentiellement actives sur l'immunité cellulaire. Seule la déplétion du sang circulant en anticorps ou en complément s'est montrée capable d'augmenter la survie des xéno greffes dans des modèles animaux expérimentaux (Van der Bogaerde et coll. 1991). Deux stratégies thérapeutiques expérimentales ont été explorées. La première consiste à bloquer les interactions entre les lymphocytes T cytotoxiques du receveur et les cellules greffées. Ce blocage peut être obtenu en interférant avec les molécules d'adhérence exprimées par les lymphocytes T eux-mêmes, telles que le récepteur de l'antigène, la molécule CD4 ou les molécules de classe II du CMH (Kowolski et coll. 1991, Adorini et coll. 1988). La deuxième stratégie consiste à bloquer les sites d'adhérence exprimés par les cellules greffées, telles que les molécules de classe I du CMH, avant leur transplantation (Faustman et Coc 1991). Une autre stratégie thérapeutique explorée est la protection des cellules endothéliales contre l'action du complément. Ainsi, l'expression dans les cellules endothéliales d'une protéine inhibitrice du complément, le *decay accelerating factor* ou facteur inhibiteur de l'accélération d'origine érythrocytaire, a permis de protéger ces cellules de l'action cytotoxique dépendante du complément d'un sérum hétérologue

(Dolmasso et coll. 1991).

Au cours du rejet aigu, ce sont les capillaires qui constituent l'une des cibles de la réaction immunitaire (Bishop et coll. 1989). Les lésions endothéliales du rejet aigu sont provoquées par des mécanismes humoraux et cellulaires. Des anticorps spécifiques dirigés contre la membrane plasmique des cellules endothéliales ont été mis en évidence chez des receveurs d'allogreffes rénales (Paul et coll. 1979) et cardiaques (Dunn et coll. 1991). Les cibles de ces anticorps sont souvent les antigènes de classe II du MHC. Les antigènes reconnus sont des antigènes indépendants du CMH, notamment des Ag communs aux cellules endothéliales et aux monocytes (Paul et coll. 1985) et qui peuvent être détectés par la technique du *cross-match* monocytaire afin de permettre une meilleure sélection des receveurs (Rose et coll. 1989).

Les cellules immunitaires sont aussi impliquées dans cette réaction. Les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (*natural killer*) ou tueuses, stimulées par les lymphokines, sont capables de provoquer la lyse de cellules endothéliales. Le processus a été bien étudié expérimentalement (Bender et coll. 1989) et dépend de la présence des Ag de classe I du MHC. Dans un organe greffé, toutes les conditions sont réunies pour que les cellules endothéliales soient la cible des lymphocytes cytotoxiques (Kirby et coll. 1987). L'expression des Ag de classe I du MHC, présents à l'état normal sur les cellules endothéliales capillaires, est stimulée par les cytokines inflammatoires. Certaines études ont suggéré que l'intensité des lésions de rejet soit mieux corrélée au niveau d'expression des Ag de classe I du MHC qu'à celle des Ag de classe II (Suitters et coll. 1987) (revue dans Carrier et Pelletier 1988).

### **5.3.2 L'endothélium et le rejet chronique**

Le rejet chronique est défini par la persistance d'une réaction immunitaire chez le receveur, plusieurs mois ou années après la greffe, malgré la poursuite du traitement immunosuppresseur. Les lésions vasculaires sont au premier plan des lésions de rejet chronique (Tilney et coll. 1991). Il s'agit

essentiellement de lésions artérielles, contrairement aux lésions du rejet aigu, qui touchent surtout les capillaires. Dans les greffes cardiaques en rejet chronique, les lésions caractéristiques sont des lésions d'artériosclérose coronaire. Le développement des lésions vasculaires du rejet chronique est probablement expliqué par la survenue d'épisodes répétés d'agression endothéliale, entraînant une prolifération intimale secondaire et une oblitération progressive de la lumière vasculaire. La lésion endothéliale initiale est sans doute due à des anticorps cytotoxiques circulants agissant en présence du complément (Suciu-Foca et coll. 1991; Tilney et coll. 1991). Les lésions initiales sont ensuite entretenues et progressivement aggravées par l'accumulation locale de macrophages, de lymphocytes T cytotoxiques et de cellules NK (Tilney et coll. 1991).

En conclusion, les cellules endothéliales occupent une position clé au cours de la réaction de rejet de greffe, non seulement en raison de leur situation à l'interface entre le sang et les leucocytes, mais aussi en raison de leurs propriétés fonctionnelles, qui leur permettent de participer directement au recrutement et sans doute à la stimulation des cellules immuno-compétentes du receveur. Les propriétés des cellules endothéliales sont cependant à double tranchant, leur situation les expose aux effets des anticorps spécifiques, naturels ou acquis, présents chez le receveur et leurs caractéristiques fonctionnelles en font des cibles privilégiées pour les cellules cytotoxiques.

## Chapitre 6

### Les endothélines

#### 6.1 Introduction.

Neuf ans à peine se sont écoulés depuis la découverte de l'ET-1, le plus puissant peptide vasoconstricteur connu à ce jour. L'histoire commence en 1985, quand Hickey et coll. (1985) ont décrit que l'addition d'un milieu de culture de cellules endothéliales d'aorte bovin à des sections d'artères coronaires, provoque une vasoconstriction de longue durée. En 1988 Yanagisawa et coll. (1988) ont isolé et cloné ce facteur vasoconstricteur, un peptide de 21 acides aminés, qu'ils ont nommé ET-1. Deux autres formes de ce peptide, l'ET-2 et l'ET-3 ont ensuite été isolées par ce même groupe. Elles sont également constituées de 21 acides aminés, mais leur structure diffère de celle de l'ET-1 par deux et six acides aminés respectivement (Sakurai et coll. 1992).

En parallèle, une autre équipe a isolé des toxines de venin d'aspic, les sarafotoxines, qui possèdent une structure similaire à celles des endothélines, suggérant une origine évolutive commune de ces deux familles de peptides (Sokolovsky et coll. 1992). Les sarafotoxines et les endothélines ont en commun une structure comportant deux ponts disulfures situés entre les cystéines en position 1 et 15 d'une part et 3 et 11 d'autre part, et une extrémité C-terminale identique.

#### 6.2 La biologie moléculaire des endothélines.

Les trois formes d'endothélines sont libérées à partir de trois précurseurs différents, les préproendothélines (Sakurai et coll. 1992). Les préproendothélines, sont ensuite clivées par coupure protéolytiques en proendothélines (ou "big" endothélines). Les "big" endothélines sont mûries en endothélines ET-1, ET-2 et ET-3, par clivage par des enzymes spécifiques à chaque forme, les *endothélines converting enzyme* ou ECE. Ces enzymes sont

des glycoprotéines et correspondent à une nouvelle forme de métalloprotéase sensible au phosphoramidon mais insensible à certains autres inhibiteurs classiques de métalloprotéases. ( captocril et kélatorphan ). Le "big" ET-1 et l'ET-1 sont retrouvées dans le plasma, mais in vitro, "big" ET-1 possède un effet vasoconstricteur 100 fois plus faible que celui de l'ET-1, suggérant que l'étape de conversion de la "big" ET-1 soit importante pour l'activité biologique de l'ET-1 (Xu et coll. 1994).

La dégradation des endothélines est assurée en deux étapes par une endopeptidase sensible au phosphoramidon (Sokolovsky et coll. 1992).

La demie-vie de l'ET-1 dans le plasma est très courte (moins qu'une minute) et sa concentration circulante est bien inférieure aux concentrations généralement nécessaires à l'obtention de ses effets biologiques. La concentration plasmatique de l'ET-1 diminue d'une façon significative (entre 50 et 90 %) après son premier passage dans les poumons. (de Nucci et coll. 1988). L'ARN-messager codant pour les prépro ET-1 et prépro ET-2 et ET-3 est exprimé non seulement dans les tissus vasculaires mais également dans le poumon, le cerveau, le rein, le coeur, l'estomac, le pancréas etc... (Sakurai et coll. 1992; Sokolovsky et coll. 1992). Toutefois, seul l'ARN-messager codant la prépro ET-1 est exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires. (Sakurai et coll. 1992 ).

La sécrétion d'endothéline est contrôlée par les agents vasodilatateurs, le NO, ou *l'atrial natriuretic factor* (ANF) ou facteur natriurétique atrial. Le NO formé à partir de la l-arg, active la GC soluble et augmente la concentration intracellulaire de GMPc. Boulanger et Lûsher (1990) ont montré que la production aortique d'ET-1 était potentialisée par des inhibiteurs de la GC soluble, alors que l'addition de GMPc bloquait cette production.

L'ANF inhibe la sécrétion d'ET-1 par l'intermédiaire de deux récepteurs différents dans les cellules d'aorte et de la veine ombilicale, le récepteur B contenant la GC membranaire, et le récepteur C dont l'activation aboutit respectivement à une augmentation de GMPc (Kohno et coll. 1991) et à

une inhibition de la production d'AMPc (Ming et coll 1992).

### 6.3 Les récepteurs des endothélines.

Les trois types d'endothélines s'attachent à deux types de récepteurs (A et B). Les récepteurs sont les membres de la superfamille des récepteurs couplés à la PG. (Sakurai et coll. 1992). Cette classification a été proposée sur la base des plusieurs données sur les effets vasculaires des endothélines. L'injection intraveineuse d'ET-1, d'ET-2 ou d'ET-3 chez le rat conduit tout d'abord à une diminution de la pression artérielle moyenne, puis à une hypertension prolongée. Deux mécanismes différents sont responsables, l'ET-1 étant un vasoconstricteur plus puissant que l'ET-3 alors que les deux (ET-1 et ET-3) possèdent des activités équivalentes. Lors de sa perfusion dans l'artère mésentérique, l'ET-1 a provoqué un effet vasoconstricteur plus puissant que celui observé au cours de la perfusion d'ET-3, alors qu'à faibles doses, les deux endothélines induisent un effet vasodilatateur comparable. (Sakurai et coll. 1992; Sokolovsky et coll.1992).

Les effets vasoconstricteurs sont effectués par l'intermédiaire d'ET-A, alors que l'ET-B conduirait à la production de facteurs relaxants (NO, PGI<sub>2</sub>) et à la vasodilatation. Ces observations ont été confirmées sur la base de données biochimiques qui ont permis d'établir que le récepteur présent dans le muscle lisse vasculaire lie l'ET-1 avec une affinité supérieure à l'ET-3, alors que le récepteur présent dans les cellules endothéliales vasculaires lie les deux peptides avec la même affinité (Sakurai et coll. 1992; Sokolovsky et coll. 1992).

Comme c'est déjà mentionné, les récepteurs ET-A et ET-B sont couplés aux PG, et possèdent une structure comprenant sept domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Ils présentent entre eux une homologie de séquences en acides aminés de 60 % et divergent essentiellement dans la partie N-terminale de la molécule (Sakurai et coll. 1992; Sokolovsky et coll. 1992). L'utilisation de récepteurs chimériques, construits en substituant progressivement la structure du

récepteur ET-A humain avec celle de son homologue ET-B, a permis récemment de déterminer que des portions différentes des récepteurs sont impliquées dans la sélectivité pour les agonistes et les antagonistes. (Sakamoto et coll. 1993).

Il existe probablement d'autres classes de récepteurs des endothélines. Classiquement, les récepteurs ET-B sont responsables uniquement des effets vasodilatateurs des endothélines. Actuellement, ces récepteurs apparaissent également impliqués dans certains effets vasoconstricteurs. Ainsi, l'IRL 1620, un agoniste spécifique des récepteurs ET-B, est capable de provoquer des contractions de l'artère coronaire, même en présence de BQ 123, un antagoniste des récepteurs ET-A. (Shetty et coll. 1993). Les contractions de la veine saphène provoquées par la sarafotoxine 56c, l'agoniste spécifique des récepteurs ET-B, sont insensibles au BQ 123. (Clozel et coll. 1992). Ces données suggèrent l'existence de deux sous-classes de récepteurs ET-B, l'une responsable de la vasodilatation, l'autre responsable de la vasoconstriction de certaines artères et veines. Sokolovsky et coll. (1992) ont caractérisé deux sous-types de récepteurs ET-B, l'un de forte affinité qui pourrait être responsable des effets vasodilatateurs, l'autre de faible affinité qui pourrait être responsable des effets vasoconstricteurs.

### **6.3.1 La régulation et l'expression des récepteurs des endothélines.**

La régulation et l'expression des récepteurs des endothélines sont souvent parallèles à celles des endothélines. L'hypoxie et la CSA stimulent rapidement la production d'ET-1 et des récepteurs ET-A dans les cellules endothéliales et dans les CML respectivement. (Simonson et coll. 1993). Suite à l'hypoxie, la réponse est bénéfique, et s'exprime par une augmentation de la perfusion tissulaire locale, mais la réponse à la CSA, contribuait probablement à sa néphrotoxicité (Kon et coll. 1990).

Plusieurs facteurs et agents augmentent l'expression des récepteurs ET-B; parmi eux, le facteur de croissance épidermique, le facteur de croissance fibroblastique basale, l'AMPc, l'estrogène, l'angiotensine II et le type C-

hormone natriurétique. Par contre, les endothélines, l'angiotensine II, le facteur de croissance dérivant des plaquettes et le facteur de croissance de la transformation  $\beta$  ont diminué l'expression des récepteurs ET-A, tandis que l'AMPc et les cathécholamines ont diminué l'expression des récepteurs ET-B (revue par Levin 1995).

La distribution des récepteurs ET-A et ET-B varie selon les tissus. Dans les reins, les récepteurs ET-A se trouvent dans le vasa recta et dans les artères arcuées, tandis que les récepteurs ET-B se trouvent d'une façon prédominante dans les ductes collectifs, ce qui suggère des rôles différents dans la modulation de la réabsorption rénale. Les deux types de récepteurs sont trouvés dans les glomérules (Simonson et coll. 1993). L'ET-1 a réduit le débit sanguin rénal en augmentant la résistance vasculaire rénale. (Ferrario et coll. 1989). L'administration systémique de l'ET-1 a réduit la fréquence de la filtration glomérulaire et a pu causer une anti-natriurèse, un mécanisme probablement effectué par l'intermédiaire des récepteurs ET-A. (Goetz et coll. 1988).

#### **6.4 Les seconds messagers des endothélines.**

Dans tous les tissus, la liaison de l'ET1 aux récepteurs ET-A et ET-B provoque une augmentation du taux de calcium cytosolique. (Sakurai et coll. 1992; Sokolovsky et coll,1992). Comme pour les autres hormones mobilisant le calcium, cette augmentation est la conséquence de l'activation conjointe d'au moins deux systèmes membranaires, la PLC et l'influx de calcium à travers des canaux calciques. La stimulation de la PLC par les endothélines, conduit à l'apparition de deux seconds messagers, l'IP3 et la DAG, une molécule qui reste dans la membrane et active la PKC. L'IP3 se lie à des récepteurs canaux calciques dans le réticulum endoplasmique/sarcoplasmique, et la sortie de calcium qui en résulte est extrêmement rapide. (Simonson et coll. 1993, 1990).

Dans le cas des récepteurs ET-A, la concentration calcique intracellulaire augmente et cause une vasoconstriction. (Simonson et coll 1990).

Celle-ci persiste après l'enlèvement d'ET1 du récepteur. (Clarke et coll. 1989), probablement à cause de la persistance d'une concentration élevée du calcium intracellulaire. Le NO a raccourci la durée de la vasoconstriction en accélérant le retour au normal de la concentration calcique intracellulaire. (Goligorsky et coll. 1994).

La DAG et le calcium stimulent la PKC, qui fait médier l'action mitogénique de l'ET1. (Simonson et coll. 1993). Les premières observations publiées par l'équipe de Masaki (Goto et coll. 1989) laissaient supposer que dans les muscles lisses vasculaires, l'ET1 était un agoniste des canaux calciques dépendants du voltage de type-L. Cependant, des nombreuses données démontrent que l'influx de calcium provoqué par l'ET1 est observé en présence d'inhibiteurs de ces canaux calciques de type-L, et que d'autres canaux seraient également cibles des endothélines (Sakurai et coll. 1992). Journeaux et coll. (1993) ont observé que l'ET1 inhibe la pompe à calcium des membranes plasmiques de foie, par l'intermédiaire d'une PGs, bloquant ainsi l'extrusion de calcium hors de la cellule. L'incubation de cellules mésangiales ou de fibroblastes avec des esters de phorbol, activateurs de PKC, atténue l'augmentation de calcium intracellulaire provoquée par ET1. (Takuwa et coll. 1989).

Les endothélines influencent aussi la production de l'AMPc. Aramori et coll. (1992) ont montré que l'ET1 stimule la production d'AMPc dans des cellules exprimant le récepteur ET-A, alors qu'elle inhibe l'AMPc dans des cellules exprimant le récepteur ET-B. Ces résultats ont été confirmés par Eguchi et coll. (1993) qui ont observé que dans des CML d'origine vasculaire n'exprimant que le récepteur ET-A, l'ET1 stimule la production d'AMPc, alors que dans les cellules endothéliales vasculaires qui ne présentent que le récepteur ET-B, l'ET1 inhibe la production d'AMPc.

L'ET1 stimule également la PLA2 (Sokolovsky et coll. 1992) et donc la production d'acide arachidonique, de thromboxane  $A_2$ , et de PGI<sub>2</sub>.

L'ET1 stimule l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , conduisant à l'alcalinisation du pH cytosolique, une étape nécessaire à l'initiation de la prolifération cellulaire (Sokolovsky et coll. 1992). L'ET1 stimule l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dans le rein, secondairement à une augmentation des prostaglandines  $\text{PGE}_2$  et inhibe ce système dans l'aorte, par un mécanisme dépendant de la PKC. (Sokolovsky et coll. 1992). Enfin, l'ET1 module l'activité de différents canaux ioniques comme les canaux potassiques et les canaux chlore (Masaki et coll. 1993).

### **6.5 la physiologie des endothélines.**

Les endothélines pouvaient agir localement de façon autocrine ou paracrine au niveau des tissus cibles. L'une des propriétés essentielles de l'ET1 est son effet mitogène. Ainsi, les endothélines stimulent la prolifération des fibroblastes des CML vasculaires des cellules mésangiales, des mélanocytes etc. (Battistini et coll. 1993a) . L'activité proliférative des endothélines est effectuée par l'intermédiaire des récepteurs ET-A. Comparée à celle d'autres facteurs de croissance, l'activité mitogène des endothélines est faible et souvent augmentée en présence d'autres agents mitogènes (Battistini et coll. 1993b).

Dans le coeur, les endothélines provoquent un effet inotrope positif de longue durée, qui est sensible à la toxine de pertussis et associé à une augmentation de calcium intracellulaire (Krâmer et coll. 1992). Les mêmes auteurs ont observé que le blocage par le Nicardipine (agent anticalcique) de l'effet contractile provoqué par les endothélines suggère que l'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type-L pourrait être impliquée (Krâmer et coll.1992 ).

Les endothélines exercent également un effet hypertrophique dans des myocytes isolés de rats ( Suzuki et coll 1990). Cet effet se caractérise par une augmentation du volume des myocytes, une accumulation de protéines contractiles et l'induction des proto-oncogènes c-fos et c-myc (Suzuki et coll. 1990).

L'ET1 exerce un effet biphasique sur la synthèse et la sécrétion du ANF, (Shirakami et coll.1993). À faibles doses, l'ET1 inhibe la sécrétion du ANF et à fortes doses l'ET1 stimule la sécrétion de ce facteur par un mécanisme impliquant l'activation conjointe de la PKC et de la calcium-calmoduline-kinase (Irons et coll.1992).

Enfin, l'ET3 stimule la production du NO à partir des cellules endothéliales, par l'intermédiaire des récepteurs ET-B, et peut jouer le rôle d'un régulateur du NO (Baynash et coll. 1994). L'ET1 et l'ET3 peuvent stimuler la production des plusieurs prostaglandines, ce qui contribue à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Thimermann et coll. 1989), à une vasodilatation transitoire (Miura et coll. 1991) et à la bronchoconstriction (Maquin-Mavier et coll. 1989).

## **6.6 La physiopathologie des endothélines.**

Plusieurs études ont montré l'importance des endothélines dans la pathologie cardiovasculaire. Chez l'humain, la concentration plasmatique d'ET1 a été augmentée après l'infarctus du myocarde (Battistini et coll. 1993), et l'infusion intraveineuse d'ET1 a réduit d'une façon significative le débit coronarien (Kurihara et coll. 1989). Chez les rats, la concentration plasmatique de l'ET1 a été augmenté dans la partie distale d'une occlusion coronarienne, et l'infusion des anticorps à l'ET1 avant l'occlusion a diminué de 45 % la taille de l'infarctus. (Watanabe et coll. 1990). Similairement, chez le chien, l'infusion de l'antagoniste des récepteurs ET-A, le BQ 123 a réduit de 40 % la taille de l'infarctus myocardique (Grover et coll. 1993). Dans le modèle d'ischémie/reperfusion myocardique chez les rats, la libération d'ET1 est augmentée d'une façon importante durant la reperfusion (Branner et coll. 1992). Ces études suggèrent un rôle pathogénétique de l'ET1 dans l'endommagement myocardique qui suite l'ischémie aigue, et montrant que l'utilisation des antagonistes spécifiques peut contribuer à la protection myocardique.

Chez l'humain, lors de la défaillance cardiaque modérée ou grave, la concentration plasmatique d'ET1 a augmenté d'une façon significative, et elle a été en corrélation avec la gravité de cette maladie, quelqu'en soit la cause (Pacher et coll. 1993). Cette élévation de la concentration plasmatique d'ET1 lors de la défaillance cardiaque peut induire le bronchospasme par l'intermédiaire des récepteurs ET-A. (Miura et coll. 1991) et peut stimuler la production d'aldostérone (Rosolovsky et coll. 1991) en contribuant respectivement à la dysfonction respiratoire et à la défaillance cardiaque. Clavel et coll. (1994) ont observé dans un modèle canin de défaillance cardiaque que l'infusion d'un antagoniste des récepteurs ET-A (le FR-139317) a réduit la résistance vasculaire périphérique et la pression artérielle systémique.

Des études récentes ont montré l'importance du rôle de l'ET1 dans le développement des lésions neo-intimales après l'angioplastie coronarienne. L'administration des antagonistes aux d'ET-A après l'angioplastie de l'artère carotide commune, a diminué de 50% l'étendue des lésions neo-intimales (Douglas et coll. 1994).

Le rôle que les endothélines jouent dans l'hypertension artérielle est controversé. Des séries d'études expérimentales et cliniques ont montré que l'ET1 n'est pas important dans le développement de l'hypertension essentielle (Yokohama et coll. 1991; Kurihara et coll. 1994). Par contre, la concentration plasmatique d'ET1 a été augmenté chez les femmes avec pré-éclampsie (Branch et coll. 1991).

L'ET1 contribue également à plusieurs maladies rénales, à la néphrotoxicité induite par la CSA. Lanese et coll. (1993) ont montré que la CSA a un effet vasoconstricteur direct sur les artérioles rénales afférentes, et que cet effet est médié par l'endothéline. Brooks et coll. (1993) ont conclu dans une étude réalisée sur un modèle canin qu'il y avait une interaction importante entre la CSA et l'endothéline, spécifiquement dans la dysfonction cardiaque et dans la vasoconstriction rénale.

Chez l'humain, Bunchmann et coll. (1991) ont montré que la néphrotoxicité induite par la CSA est en partie causée par la production d'ET1. Également, l'inhibition de l'action de l'ET1 a prévenu la vasoconstriction dans les artères rénales isolées chez les rats (Lanese et coll. 1993) et possède un effet protecteur contre la néphrotoxicité induite par la CSA in vivo (Fogo et coll. 1992).

Enfin, les endothélines jouent un rôle dans la physiopathologie de la maladie coronaire du greffon chez les transplantés cardiaques. Ce rôle a été mentionné dans plusieurs études parmi eux, celle de Hasegawa et coll. (1993). En utilisant le modèle canin ces auteurs ont montré que la concentration plasmatique de l'ET1 dans le sinus coronaire n'a pas changé durant la circulation extracorporelle, mais elle a augmenté durant la période de reperfusion. Berkenboom et coll. (1995) ont démontré chez les transplantés cardiaques, que la réponse anormale à l'administration intracoronarienne de ser a été influencée par la concentration plasmatique d'endothéline. Cette hypersensibilité au ser peut être responsable de l'agrégation plaquettaire et de l'athérosclérose du greffon. Également, dans une autre étude clinique, Grief et coll. (1993) ont conclu que l'administration orale de la CSA a augmenté la concentration plasmatique d'ET1 chez les patients transplantés. Par contre, Dengler et coll. (1995) ont conclu qu'il n'y avait pas de corrélation entre les niveaux des endothélines sanguines et le processus de rejet aigu chez les transplantés cardiaques. Selon ces auteurs le niveau d'endothéline ne peut pas servir comme marqueur dans le diagnostic de rejet.

---

## Chapitre 7

### La protéine G (PG)

#### 7.1 Introduction

Trois composantes distinctes de nature protéiniques interviennent dans la transmission de l'information entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme : le récepteur, la PG et l'effecteur.

La PG, dénommée ainsi parce qu'elle fixe et hydrolyse la GTP au cours de son cycle de fonctionnement, est localisée sur la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire. L'effecteur peut être un canal ionique sodique, potassique ou calcique, ou une enzyme. Généralement, l'enzyme effectrice, l'AC, la PLC, la PLA<sub>2</sub> assure la formation des seconds messagers (AMPc, DAG, IP3). Le second messager a pour rôle de moduler les mécanismes de phosphorylation des protéines, directement responsables des effets cellulaires observés. Les protéines G interviennent dans les mécanismes de transduction de plusieurs récepteurs, comme les récepteurs à activité tyrosine-kinase (ceux de l'insuline), et comme les récepteurs à une hélice membranaire dépourvue d'activité tyrosine-kinase. Ainsi les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines comme les récepteurs des Ags lymphocytaires B et T, pourraient être couplés à des PG (revue dans Dohmann et coll. 1991, Harnett et Klaus 1988).

Chez l'humain, les PG sont présentes dans les cellules endothéliales des artères coronaires. Le niveau immunoréactif de ces PG est significativement réduit avec la vieillissement, et avec l'étendue de l'athérosclérose coronarienne. Ce niveau est aussi diminué chez les patients qui souffrent d'hypertension artérielle et d'hyperlipidémie (Tsutsui et coll. 1994 ).

#### 7.2 Structure des protéines G

Les protéines G assurent la transduction de l'activation d'un récepteur

par un agoniste, pour aboutir à une réponse cellulaire particulière. Les PG sont des hétérotrimères et représentent la première composante de la cascade d'amplification cellulaire issue de la liaison d'un agoniste à son récepteur. En effet, la transduction d'un signal extracellulaire par le système "récepteur-PG-effecteur" s'accompagne d'un processus d'amplification du message (revue dans Casey et coll. 1987).

Les premières études ont permis de distinguer cinq types de PG : 1) la PGs, stimulante de l'AC, 2) la PGi, inhibitrice de l'AC, 3) la PGt, ou transducine, qui active une phosphodiesterase dépendante du GMPc suite à l'activation de la rhodopsine par l'absorption lumineuse par la rétine, 4) la PGo, ou autres (other) et 5) la PGq, qui active la PLC. Toutes ces PG sont formées de l'association de trois sous-unités, dénommées  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dont les masses moléculaires respectives sont 38-45 kDa, 35-36 kDa et 6-8 kDa. Les protéines G se distinguent les unes des autres par leurs sous-unités  $\alpha$ . Leurs sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont semblables. Les sous-unités  $\alpha$  confèrent aux protéines G leur spécificité (Bourne et coll. 1990, 1991).

### 7.2.1 La sous-unité $\alpha$ .

La sous-unité  $\alpha$  joue un rôle déterminant dans le couplage "récepteur-effecteur". Chaque type de cette sous-unité interagit sélectivement avec un groupe de récepteurs, et active un effecteur donné. Les techniques de biologie moléculaire, ont conduit à l'identification de plusieurs sous-unités  $\alpha$ , qui ont permis de proposer sur la base de leur homologies de séquence cinq groupes de PG (mentionnés plus-haut) (Kaziro et coll. 1991; Simon et coll. 1991).

La PGt (transducine), existe sous deux isoformes contenant des sous-unités  $\alpha$  légèrement différentes. Des déterminations histochimiques ont permis de localiser l'une de ces isoformes ( $Gt\alpha1$ ) dans la partie photosensible des bâtonnets, et l'autre ( $Gt\alpha2$ ), présente dans les cônes. Dans le cas de la PGs,

deux variantes ont été identifiées, dont les masses moléculaires relatives sont de 46 et 44.5 kDa. La sous-unité  $\alpha_i$  existe sous trois isoformes, et possèdent une masse moléculaire qui varie autour de 40 kDa. L'analyse de la séquence des acides aminés, fait apparaître une homologie de 95% entre ces trois variantes (Broy et coll. 1986; Kim et coll. 1988).

En comparant les séquences des diverses sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha_t, \alpha_i$ ), le taux d'homologie est proche de 80%. Les variantes sont réparties dans des zones séparant quatre parties très similaires. (Bourne et coll. 1993; Masters et coll. 1986). Les éléments saillants de l'organisation structurale commune des sous-unités  $\alpha$  comprennent : 1) une absence de régions hydrophobes, aussi bien dans les séquences homologues que dans les parties variables, en accord avec le caractère hydrosoluble des sous-unités  $\alpha$  activées. 2) un ensemble de quatre segments de faibles longueurs et dont la localisation affecte fortement la structure tridimensionnelle. Elles forment des boucles à la jonction de feuillet  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$ . Les interactions assurant la fixation du GDP au GTP sont spécifiquement dépendantes de la composition de ces parties. 3) un ensemble de quatre acides aminés qui assurent la fixation du GDP au niveau du cycle de la guanine et au niveau de la chaîne phosphate en bêta. 4) la partie C-terminale établirait la relation entre la sous-unité  $\alpha$  et le récepteur. Dans les sous-unités  $\alpha_t$ ,  $\alpha_i$ , et  $\alpha_o$ , cette séquence comporte une cystéine distante de trois acides aminés de l'extrémité, et au niveau de laquelle peut se fixer un adénosine-diphosphate-ribose sous l'action de la toxine de Bordetella Pertusis. 5) une boucle disposée de manière opposée à la partie C-terminale, par rapport au site de fixation du GDP, et qui établirait la relation avec l'effecteur (Bourne et coll. 1986).

La fixation de GDP sur la sous-unité  $\alpha$ , stabilise fortement l'association avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  par l'intermédiaire de la partie  $\text{NH}_2$  terminale. Cette dernière partie, contient aussi une sérine qui serait appliquée dans la liaison du GTP (Lochrie et Simon 1988).

### 7.2.2. Les sous-unités $\beta$ et $\gamma$ .

Comme la sous-unité  $\alpha$ , la sous-unité  $\beta$  est un membre étendue. Les conséquences fonctionnelles de cette appartenance sont moins évidentes avec la sous-unité  $\beta$  qu'avec la sous-unité  $\alpha$ . La séquence des acides aminés de la sous-unité  $\beta$ , suggère qu'elle est constituée de deux types différents de structure. La région terminale avec 39 acides aminés, et une autre constituée de sept unités répétitives de 43 acides aminés (Lupas et coll. 1992; Denker et coll. 1992; Fong et coll. 1987).

La sous-unité  $\gamma$  présente des variations en fonction des données électrophorétiques et immunologiques (Casey et Gilman 1988). Fonctionnellement, les sous-unités  $\gamma$  auraient une fonction d'ancrage temporaire du complexe  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  sur la surface cytoplasmique de la membrane. Cette fonction doit-être labile si les PG sont mobiles, comme Gt, qui est susceptible de se déplacer dans le cytoplasme sous la surface membranaire, afin de se lier uniquement à une molécule de rhodopsine existante. Le couplage se réalise vraisemblablement avec la sous-unité  $\alpha$  au niveau d'une partie de la molécule réceptrice, qui ne peut qu'être localisée dans l'espace cytoplasmique. La capacité d'ancrage de la sous-unité  $\gamma$ , favoriserait l'interaction avec le récepteur (Chabre et coll. 1987).

L'existence des 4 types de la sous-unité  $\beta$  et de 7 types différents de la sous-unité  $\gamma$ , suggère que 28 différentes combinaisons sont possibles. (Pronin et Gauthmann 1992). Les différentes paires des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  diffèrent par leur habilité de se conformer avec les sous-unités  $\alpha$  (Fawzi et coll. 1991).

### 7.3 Interaction PG-récepteur.

Le fonctionnement de la PG, se résume par les changements que subissent la sous-unité  $\alpha$ , en remplaçant une molécule GTP-forme active- par une autre GDP -formre inactive-. Le cycle fonctionnel des PG est marqué par la succession des étapes suivantes : 1) l'association au récepteur du complexe

formé par les sous-unités  $\alpha$ -GDP et  $\beta\gamma$ . 2) l'accélération de l'échange GDP par du GTP sur la sous-unité  $\alpha$  en réponse à la stimulation du récepteur par un agoniste. 3) la dissociation de la sous-unité  $\alpha$ -GTP et du dimère  $\beta\gamma$  en réponse à la stimulation du récepteur. 4) l'interaction entre la sous-unité activée et l'effecteur. 5) la transformation du GTP en GDP avec désactivation de la sous-unité  $\alpha$ . 6) la reconstitution du complexe "récepteur-PG". (Florio et Stercoeis 1985, Hekman 1987).

Des études récentes ont contribué à mieux comprendre le mécanisme de regulation de l'activation de la PG. Il a été démontré que deux effecteurs, la PLC (Berstein et coll. 1992) et la phosphodiesterase dépendante de la GMPc (Arshavzky et Bownds 1992), stimulent l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  qui les contrôle. Cet argument, qu'un effecteur peut moduler l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$ , signifie qu'un tel effecteur peut lui même influencer sa durée d'activation (revu dans Neer 1993).

Lors d'une stimulation du récepteur par un agoniste, la PG subit plusieurs modifications : 1) accélération de l'échange GDP-GTP, le remplacement du GDP par le GTP entraînant une dissociation de l'hétérotrimère en deux fragments : sous-unité activée et  $\beta\gamma$ . Ce processus, est favorisé par la présence de magnésium. 2) activation d'une activité GTPasique intrinsèque à la sous-unité  $\alpha$  et qui utilise le GTP fixé comme substrat. Cette activité est marquée par sa faible vitesse. Elle est aussi dépendante de la présence de magnésium. 3) la dissociation du complexe "récepteur-PG" entraîne une diminution de l'affinité du récepteur pour son agoniste ( Carty et coll. 1990, Hekman et coll. 1987 ).

Deux mécanismes d'arrêt du signal sont induits, au niveau du récepteur par diminution de l'affinité, et au niveau de la sous-unité  $\alpha$  par retour du GTP au GDP sous l'effet de la GTPase ( revue dans Neer 1993).

Le fonctionnement de la PG, peut être perturbé en reproduisant, prolongeant, ou bloquant les conséquences de l'interaction "agoniste-récepteur"

(Denker et coll. 1992). Dans le cas des protéines Gt, et Gs, une prolongation de l'état d'activation est observée en présence de la cholera toxin, et d'un facteur de ribosylation qui est lui même une protéine fixant du GTP. Ce facteur provoque la fixation covalente d'un ADP-ribose sur une arginine en position 201 très proche du site de fixation du guanine nucléotide (Robishaw et coll. 1986), ce qui entraîne une inhibition de l'activité GTPasique, et donc la prolongation de la présence de GTP qui maintient la sous-unité  $\alpha$  sous sa forme active ( l'action pathologique du bacille du choléra, marquée au niveau intestinal par la production de diarrhées très intenses et abondantes, serait la conséquence d'une activation permanente de l'AC. Cela induit une formation excessive d'AMPc qui provoque une hypersécrétion intestinale ). Toutefois, la cholera toxin est sans effet sur les protéines Gi ou Go, bien que leurs sous-unités contiennent aussi une arginine homologue de celle où se fixe l'ADP-ribose dans les sous-unités  $\alpha_t$  ou  $\alpha_s$ . Cette différence de sensibilité pourrait être attribuée à une capacité moindre à interagir avec le facteur de ribosylation, ou à des différences dans l'organisation structurals secondaire ou tertiaire de cette région qui limiterait la possibilité d'insertion de l'ADP-ribose. (Spiegel et coll. 1987).

Une autre toxine produite par Bordatella Pertussis, la toxine de pertussis, est aussi capable de provoquer la fixation d'un ADP-ribose sur la sous-unité  $\alpha$ . Cette fixation se réalise au niveau d'une cystéine, présente sur l'extrémité C-terminale de  $\alpha_t$ ,  $\alpha_i$ , et  $\alpha_o$  dont les PG correspondantes sont seules sensibles à l'action de cette toxine. La modification structurale de la partie C-terminale empêche l'association de la PG avec le récepteur. Il en résulte que l'activation du récepteur ne peut plus retenir sur l'effecteur puisque le mécanisme de couplage est dissocié, rendant impossible toute transduction du message. Cette dissociation entraîne le passage du récepteur à son niveau de faible affinité pour ses agonistes. En plus de l'ADP-ribosylation induite par la toxine deperussis, il faut mentionner la possibilité d'un processus endogène de fixation d'ADP-ribose qui pourrait intervenir comme mécanisme de régulation (West et coll. 1985; Shram et Selinger 1984; Ui et coll. 1984).

#### 7.4 Interaction PG-effecteur

L'adénylyl cyclase (AC), est le meilleur exemple de la régulation interactive d'un effecteur par les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de la PG. (Tang et Gilman 1991, 1992). Tous les sous-types de l'AC peuvent être activés par les sous-unités  $\alpha$ s, cependant les autres sous-types de la sous-unité  $\alpha$  ne partagent pas cet effet avec les  $\alpha$ s; par contre une spécificité existe dans l'interaction entre les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  avec les sous-types d'AC. Le type I d'AC, qui est sensible à la calmoduline, et qui se présente dans le système nerveux, est inhibé par les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Le type III d'AC, est ni inhibé ni activé par les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , par contre les types II et IV d'AC sont activés par les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Taussing et coll. 1993).

A part de pouvoir activer l'AC, la PG peut jouer le rôle d'un rétro-inhibiteur de l'AC. En effet, en utilisant des membranes cellulaires reconstituées, Gilman et coll. (1987) ont mis en évidence que le complexe  $\alpha$ i-GTP a une activité inhibitrice certaine, mais réduite par rapport à celle du dimère  $\beta$  et  $\gamma$ . Cela fut interprété en admettant que ce dimère n'agit pas directement sur la sous-unité catalytique, mais exerce un effet suppresseur. Cet effet serait d'autant plus marqué que la concentration en  $G_i$  est supérieure à celle de  $G_s$  (Gilman et coll. 1987). Dans ces conditions, l'activation des récepteurs couplés à des  $PG_i$  provoquerait la libération de dimères  $\beta$  et  $\gamma$  en quantité importante (Spiegel et coll. 1987; Gilman et coll. 1987), ce qui pourraient agir directement comme inhibiteurs de l'activité enzymatique.

La PLC qui existe en plusieurs versions, peut elle aussi être contrôlée par la PG. (Black et coll. 1991; 1992; Taylor et coll. 1991; Boyer et coll. 1992; Wu et coll. 1993). Comme le cas avec L'AC, la régulation de la PLC- $\beta$  par la PG est spécifique et se diffère pour chaque isoforme. La sous-unité  $\alpha_q$ , active la PLC- $\beta$  avec un ordre de priorité qui commence par PLC- $\beta_1$ , PLC- $\beta_2$  et PLC- $\beta$ . Cette sous-unité  $\alpha_q$  ne subit pas les modifications covalentes par la toxine de pertussis, d'où elle est résistante à l'effet inhibiteur de cette toxine. Les sous-

unités  $\beta$  et  $\gamma$  stimulent aussi la PLC- $\beta$  mais avec un ordre de priorité différent qui commence par PLC- $\beta$ 3, PLC- $\beta$ 2 et PLC- $\beta$ 1 (Smrcka et Sterweis 1993). Contrairement à l'AC, l'activation de la PLC- $\beta$  par les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  est indépendante et n'exige pas l'amorce de l'enzyme soit par  $\alpha$  ou par  $\beta$  et  $\gamma$  (Smrcka et Sternweis 1993). L'action indépendante de ces sous-unités sur la PLC reflète ses liaisons avec des régions différentes de l'enzyme (Park et coll. 1993, Wu et coll. 1993).

### 7.5 La question de la spécificité de la PG.

Actuellement, l'état de connaissance sur la PG est très développé, cependant plusieurs points restent inconnus, comme par exemple le maintien de la spécificité de la réponse cellulaire vis-à-vis les différents agents et hormones (Raymond et coll. 1995).

Le coeur est l'organe qui présente d'une façon exemplaire cette spécificité de la réponse cellulaire. Le coeur répond à la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques avec une augmentation de la fréquence et de la force de la contraction, et répond à la stimulation des récepteurs cholinergiques muscariniques avec une diminution de la fréquence et de la force de contraction (Neer et Clapham 1988). Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont couplés au Gs, qui stimule l'AC, ainsi que les récepteurs muscariniques sont couplés au Gi qui possède une action inverse sur l'AC. (Neer et Clapham 1988). Les cellules cardiaques sont capables de garder d'une façon distincte les deux voies d'activation. Même quand les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont maximalelement stimulés, ils sont capables d'activer les canaux potassiques. Similairement, les récepteurs muscariniques ne causent pas une augmentation dans le niveau d'AC (revu dans Neer 1993). Une explication probable à cette spécificité d'action, réside dans le fait que les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont capables d'agir avec la Gs mais pas avec la Gi (revue dans Neer 1993).

Les études de Kleuss et coll. (1991, 1992, 1993) nous donnent un autre exemple sur la spécificité de la signalisation transmembranaire. Ces auteurs ont

démonstré que l'élimination d'une isoforme de Go a bloqué l'inhibition des canaux calciques par les récepteurs de Somatostatine, ainsi que l'élimination des autres isoformes de Go a éliminé l'inhibition des mêmes canaux calciques par les récepteurs muscariniques.

La spécificité de la signalisation transmembranaire s'étend aussi aux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . L'élimination de ces sous-unités a complètement bloqué la réponse à ses récepteurs. Neer (1993) a interprété cet effet par le fait que des paires particulières des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont requises pour amener la sous-unité  $\alpha$  à son récepteur.

Il existe de plus en plus des arguments que la spécificité de la réponse cellulaire n'est pas reflétée dans la sélectivité de l'interaction entre les récepteurs et la PG. Actuellement, les points qui restent à clarifier sont les circonstances sous lesquelles une PG peut substituer une autre dans la cellule et jusqu'à quel degré une réponse peut être généralisée d'une cellule à l'autre. (Revue dans Neer 1993).

## **7.6 Inhibition pharmacologique de la PG.**

Plusieurs médicaments ont été proposés comme des inhibiteurs de la PG. La Suramine, est classiquement utilisée comme anti-helminthique. C'est un composé polyanionique qui se lie d'une façon non-sélective aux différentes protéines plasmatiques. La Suramine peut se comporter comme un antagoniste compétitif de divers facteurs de croissance. La Suramine peut inhiber non-compétitivement l'activité GTPasique basale de Gi mesurée sur des membranes cellulaires. L'affinité de Gi pour le GTP n'est pas affectée, mais la vitesse maximale est diminuée (Butler et coll. 1988).

La méthylxanthine, comme la théophylline, sont utilisées comme antiasthmatiques. Deux études (Church et Holgate 1986; Parsons et coll. 1988) ont montré que l'isobuthyl-méthylxanthine entraîne une activation de l'AC d'adipocytes chez le rat par un mécanisme dépendant de l'inhibition de Gi. L'activation de Gi, reverse l'effet de stimulation de l'AC par l'isobuthyl-

méthylxanthine. Ainsi, l'effet de ce dernier sur Gi est différent de celui de la toxine de pertussis (ADP-ribosylation) ou des esters de phorbol (phosphorylation par la protéine-kinase C). Les méthylxanthines diminuent l'activité de base de Gi (qui implique un déplacement lent du GDP par le GTP) et la dissociation des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Cet effet des méthylxanthines pourrait être important dans leurs propriétés cardiostimulantes et bronchodilatatrices. (Church et Holgate 1986; Parsons et coll. 1988).

Le Sulmazole, est une imidopyridine qui fait partie de la classe d'agents cardiotoniques, lequel contrairement aux digitaliques, n'inhibent pas la sodium (Na)/hydrogène (H) ATPase. Cependant, cet agent n'est pas utilisé en thérapeutique à cause de sa toxicité. Comme les méthylxanthines, le Sulmazole inhibe les phosphodiesterases de l'AMPc. Sa propriété cardiotonique serait en fait liée à une augmentation de la sensibilité au calcium des myofibrilles cardiaques (revue par Wetzel et Haeuël 1988). Le sulmazole, est également un antagoniste des récepteurs A1 de l'adénosine et un inhibiteur fonctionnel de la PG. (Parsons et coll. 1988).

### **7.7 La PG et dysfonction endothéliale**

L'endothélium est lésé mécaniquement et chimiquement après une cathétérisation par ballonnet, une transplantation d'organe ou une ischémie-reperfusion. Les cellules endothéliales endommagées sont remplacées en quelques semaines et forment un endothélium régénéré (Shimokawa et coll. 1987; Pearson et coll. 1990). Bien que la paroi vasculaire retrouve un revêtement endothélial, le rôle protecteur du nouvel endothélium est réduit. En fait, les artères précédemment lésées présentent une altération sélective de la libération du NO, alors que la réponse des cellules musculaires lisses au NO et aux agonistes constricteurs est inchangée. (Shimokawa et coll. 1989; 1987; Pearson et coll. 1990). Dans l'artère de porc avec endothélium régénéré, les réponses endothélium-dépendantes aux plaquettes agrégées, à la sérotonine et aux cathécholamines sont altérées de quatre semaines à six mois après

cathétérisation, alors que les réponses à la BK et à l'adénosine diphosphate restent inchangées. Une observation similaire a été faite dans l'artère coronaire de chien douze semaines après une lésion de reperfusion sévère. (Pearson et coll. 1990). La réduction de la production d'EDRF en réponse à l'activation des récepteurs sérotoninergiques après agrégation plaquettaire pourrait contribuer à la survenue d'un vasospasme en laissant sans opposition l'effet vasoconstricteur direct de la monoamine sur le muscle vasculaire lisse. (Shimokawa 1989a, 1989b). Par contre, l'altération de la libération du NO peut compromettre le rôle protecteur de l'endothélium contre une adhésion-agrégation plaquettaire inappropriée et une infiltration des monocytes-macrophages, qui sont les principaux événements du développement de l'athérosclérose.

L'expression des sous-unités  $\alpha$  des protéines Gi n'est pas empêchée dans les cellules endothéliales régénérées de l'artère coronaire de porc et dans les cellules endothéliales en culture présentant une altération de la libération du NO (Day et coll. 1995; Borg-Capra et coll. 1996). Dans les cellules endothéliales en culture, la stimulation de l'ADP-ribosylation des PGi par la toxine de pertussis est également réduite dans l'endothélium régénéré. De même, l'activité guanosine triphosphatase des PGi est réduite dans les cellules endothéliales régénérées en culture. (Borg-Capra et coll. 1996). Ainsi, une altération de la fonction des PGi expliquerait la moindre libération du NO pendant l'activation de la voie sensible à la toxine de pertussis dans les cellules endothéliales régénérées d'artère coronaire de porc, quatre semaines après dénudation par ballonnet. Une inhibition sélective de la libération du NO sensible à la toxine de pertussis a également été obtenue dans des modèles animaux d'hyperlipidémie et d'athérosclérose. (Shimokawa et coll. 1989a; 1989b; Shibano et coll. 1994). L'altération de la fonction des protéines Gi endothéliales observée dans ces conditions pourrait être liée à un effet inhibiteur direct de la lysophosphatidylcholine sur la fonction des protéines Gi et/ou à l'inhibition de l'expression des protéines Gi causée par la forme oxydée des protéines de basse densité. (Flavahan 1993; Liao et coll. 1995). L'expression des PGi endothéliales

est diminuée dans les artères coronaires humaines athéromateuse. (Tutsui et coll.1994). Cette altération est limitée aux gros troncs coronariens sujets à l'athérosclérose, alors que les PGI sont exprimées à faible niveau dans les artères intramyocardiales plus petites, même dans les conditions normales. (Shimokawa et coll. 1996). La faible présence de PGI dans les microvaisseaux humains corrobore les premiers résultats obtenus dans l'artère coronaire de porc, ce qui montre que dans les artères intramyocardiques, à la différence des grosses artères épicaudiques, la ser provoque des relaxations dépendantes de l'endothélium qui sont insensibles à la toxine de pertuisis ainsi qu'à l'exposition aux LDL oxydées. (Richard et coll. 1990; Tshudi et coll. 1991; Tanner et coll. 1991). De plus, la perte du rôle protecteur de l'endothélium dans l'athérosclérose est probablement accélérée par l'inhibition de l'expression de NO-synthase endothéliale et après la formation accrue d'ET-1 induite par les LDL oxydées. (Liao et coll. 1995; Boulanger et coll. 1992; Lerman et coll. 1991).

En conclusion, les différents aspects du fonctionnement des PG, montrent que le rôle de ces protéines dépassent leur simple implication dans les mécanismes de transduction des messages portés par les neurotransmetteurs et les hormones. Ces protéines peuvent être la cible directe de médiateurs, et la cible directe de messagers intracellulaires lipidiques qui possèdent de plus des propriétés de médiateurs intercellulaires. Les outils immunologiques spécifiques permettent de mieux caractériser les sous-types de ces protéines et de les localiser aisément dans les divers types cellulaires.

---

**Partie 2 : Contribution originale**

**Chapitre 8**

**La Cyclosporine A Diminue Le Débit Coronarien Chez Le Chien**

Ahmad Khalil, Michel Carrier, Jean-Gilles Latour, Louis-Conrad Pelletier.

Annales de Chirurgie

Vol. 49 (8), pp. 689-693, 1995

## La cyclosporine A diminue le débit coronarien chez le chien

A. KHALIL<sup>1</sup>, M. CARRIER<sup>1,2</sup>, J.G. LATOUR<sup>3</sup>, L.C. PELLETIER<sup>3</sup>

KHALIL A., CARRIER M., LATOUR J.G., PELLETIER L.C. – La cyclosporine A diminue le débit coronarien chez le chien.

*Ann Chir.* 1995, 49, n° 8, 689-693.

**RÉSUMÉ :** La cyclosporine (CSA) est un agent immunosuppresseur qui possède un effet de constriction sur les vaisseaux périphériques. L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de la CSA sur les artères coronaires et plus spécifiquement sur le débit coronarien et la réactivité vasculaire coronarienne. Un groupe de 6 chiens a été utilisé. Après l'anesthésie, une sternotomie était pratiquée. Les débits de l'artère coronaire interventriculaire antérieure et de l'artère coronaire circonflexe ont été mesurés avec un débitmètre électromagnétique. Les niveaux sanguins intracardiaques de cyclosporine ont été mesurés. Les paramètres hémodynamiques ont été enregistrés de façon continue durant l'expérience. Deux doses de CSA, une première de 5 mg et une deuxième de 10 mg, ont été administrées directement dans l'artère interventriculaire antérieure de chaque animal, entrecoupées des périodes de stabilisation de 30 minutes. La mesure du débit de l'artère coronaire circonflexe a servi de témoin durant l'expérience. Le débit de l'artère coronaire interventriculaire antérieure a diminué de  $24 \pm 9\%$  ( $p = 0,002$ ) et de  $18 \pm 11\%$  ( $p = 0,009$ ) respectivement après l'injection de 5 et 10 mg de CSA, alors que le débit de l'artère circonflexe ne présentait aucune variation significative. La résistance vasculaire de l'artère coronaire interventriculaire antérieure a augmenté de  $31 \pm 9\%$  ( $p = 0,005$ ) et de  $16 \pm 24\%$  ( $p = 0,1$ ) respectivement après l'injection de 5 et 10 mg de CSA. Les niveaux de cyclosporinémie étaient de  $453 \pm 226$  nmol/l et  $1087 \pm 199$  nmol/l respectivement après 5 et 10 mg de CSA ( $p = 0,0003$ ). En conclusion, ces résultats suggèrent que la CSA peut induire une vasoconstriction aiguë sur les artères coronaires.

**MOTS-CLÉS :** Artères coronaires. – Transplantation.

KHALIL A., CARRIER M., LATOUR J.G., PELLETIER L.C. – Cyclosporine A decreases coronary blood flow in the dog. (In French).

*Ann Chir.* 1995, 49, n° 8, 689-693.

**SUMMARY :** The objective of the present study was to determine the effect of cyclosporine (CSA) on coronary artery reactivity. Six mongrel dogs, weighing 20 to 30 kg were anesthetized with sodium pentobarbital and were artificially ventilated. A median sternotomy was performed to expose the heart. Left anterior and circumflex coronary flows were measured with an electromagnetic flowmeter. Heart rate, mean arterial pressure, coronary sinus pressure and dP/dt were monitored during all experiments. Blood samples were withdrawn from the coronary sinus to measure CSA. Injections of 5 and 10 mg of CSA in the left anterior descending coronary artery were administered to all animals and the measure of the circumflex coronary blood flow was used as control during the experiments. The decrease in left anterior descending coronary artery blood flow averaged  $24 \pm 9\%$  ( $p = 0.002$ ) and  $18 \pm 11\%$  ( $p = 0.009$ ), and the increase in coronary vascular resistance averaged  $31 \pm 12\%$  ( $p = 0.005$ ) and  $16 \pm 24\%$  ( $p = 0.1$ ) after 5 and 10 mg of CSA, respectively. There were no significant changes in circumflex coronary artery blood flow and in dP/dt during the experiments. Cyclosporine blood levels averaged  $453 \pm 226$  nmol/l and  $1087 \pm 199$  nmol/l after injections of 5 and 10 mg of CSA, respectively. In conclusion, this study suggests that CSA can cause acute vasoconstriction of the arterial coronary vasculature.

**KEY-WORDS :** Organ transplantation, drug treatment. – Coronary arteries.

1. Laboratoire de Chirurgie Expérimentale,  
2. Département de Chirurgie,  
3. Laboratoire de Pathologie Expérimentale,  
Institut de Cardiologie de Montréal, 5000, rue Bélanger,  
MONTRÉAL, Québec, H1T 1C8 (Canada).

Correspondance : Dr M. Carrier (adresse ci-contre).

Manuscrit reçu à la Rédaction le 10 juillet 1995.

Journée de la Recherche en Chirurgie, Montréal, 1994.

## INTRODUCTION

La cyclosporine (CSA) est un endécapeptide cyclique utilisé en clinique comme agent immunosuppresseur après la greffe d'organe. L'utilisation prolongée de la CSA a été reliée à de graves effets secondaires tels l'insuffisance rénale chronique et l'hypertension artérielle [1, 2]. De plus, la CSA pourrait jouer un rôle dans l'apparition précoce de l'artériopathie accélérée après la transplantation cardiaque [3]. L'effet de la CSA sur les artères coronaires chez l'homme peut avoir une implication clinique importante. On a suggéré que la CSA diminue le débit sanguin quand elle est administrée par voie intracoronarienne directe. Le but de cette étude était de déterminer l'effet de la CSA sur la réactivité coronarienne.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Six chiens pesant entre 20 et 30 kg ont été anesthésiés avec du pentobarbital sodique (30 mg/kg), intubés et ventilés avec un respirateur de type Harvard. Des cathéters ont été placés dans l'artère et dans la veine fémorale pour la mesure de la pression artérielle systémique, les prélèvements sanguins et l'infusion des médicaments. Une sternotomie médiane a été pratiquée. La partie proximale de l'artère coronaire circonflexe et la partie moyenne de l'artère coronaire interventriculaire antérieure ont été disséquées et isolées. Des sondes électromagnétiques ont été placées près de l'origine des 2 artères coronaires pour la mesure des débits. Un cathéter était inséré directement d'une façon rétrograde dans la partie proximale de l'artère interventriculaire antérieure pour les infusions intracoronariennes. Le volume interne du cathéter étant de 0,3 ml, la CSA atteignait la circulation coronarienne après 90 secondes du début de l'infusion. Normalement, l'implantation de ce cathéter ne modifie pas le débit coronarien. Aucune manipulation de l'artère coronaire circonflexe n'était effectuée après l'application proximale du débitmètre électromagnétique. Un cathéter placé dans le sinus coronarien via la canulation transauriculaire droite servait à enregistrer la mesure de la pression dans le sinus et à obtenir des échantillons sanguins. Un cathéter capteur de pression à haute fidélité a été suturé d'une façon rétrograde à travers la paroi apicale du ventricule gauche pour la mesure de la pression intraventriculaire et de ses dérivés (dP/dt).

La pression aortique moyenne, le dP/dt, la fréquence cardiaque et le débit sanguin de l'artère coronaire interventriculaire antérieure et de l'artère coronaire circonflexe ont été enregistrés de façon continue avec

un système enregistreur durant toute la durée de l'expérience. La résistance coronarienne a été calculée en utilisant la formule suivante : pression aortique moyenne - pression de sinus coronarien / débit coronarien.

Après la chirurgie, une période de stabilisation de 30 minutes était accordée. Après l'instrumentation, un test de la réactivité vasculaire a été fait séparément pour l'artère coronaire interventriculaire antérieure et l'artère coronaire circonflexe en pratiquant une occlusion artérielle transitoire de 20 secondes ; par la suite, l'hypérémie réactive a été enregistrée. Bien que la mesure du débit sanguin coronarien de l'artère circonflexe servait de mesure témoin durant l'expérience, des injections contrôles de solution saline ont aussi été réalisées dans l'artère coronaire interventriculaire antérieure afin de simuler et comparer ces effets à ceux reliés aux injections de CSA.

### ■ Protocole expérimental

Un groupe de 6 chiens a été étudié et chacun a reçu 2 injections consécutives intracoronariennes de 5 et 10 mg de CSA directement dans l'artère interventriculaire antérieure, alors que le débit sanguin coronarien était mesuré au niveau des artères interventriculaire antérieure et circonflexe. Une période de stabilisation de 30 minutes entre chaque injection était observée. La cyclosporine a été dissoute dans une solution saline normo-thermique (37°C) et lentement injectée dans l'artère coronaire interventriculaire antérieure avec une pompe à infusion sur une période de 10 minutes (0,2 ml/min). Une solution saline normo-thermique respectant les mêmes conditions décrites précédemment a d'abord été injectée directement dans l'artère interventriculaire antérieure alors que la mesure du débit sanguin de l'artère coronaire circonflexe servait de témoin durant toute la période de l'étude.

Un test de la réactivité vasculaire a été réalisé au début et à la fin de chaque expérience. Une occlusion de 20 secondes était appliquée sur l'interventriculaire antérieure et la circonflexe et l'hypérémie réactive qui a suivi était monitorisée. Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité de déontologie sur les soins animaux et réalisées en accord avec le « Guide des soins et de l'utilisation des animaux expérimentaux » (Conseil canadien des soins aux animaux, publication # [ISBN] 0-909 187-10-8, 1980-1984, Ottawa, Ontario, Canada).

### ■ Déterminations biochimiques

La cyclosporinémie a été mesurée sur des échantillons de sang total provenant du sinus coronarien en utilisant une méthode d'immunofluorescence par un anticorps monoclonal (TDx, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) [4].

TABLEAU I. – Effets hémodynamiques après les injections intracoronariennes de la solution saline, et celle de 5 mg et 10 mg de CSA.

TABLE I. – Hemodynamic effects after intracoronary injections of saline solution, 5 mg and 10 mg of CSA.

	Valeur initiale	Variations maximales après solution saline		Valeur basale	Variations maximales après 5 mg de CSA		Valeur basale	Variations maximales après 10 mg de CSA	
	Moyenne	Moyenne	%		Moyenne	%		Moyenne	%
Fréquence cardiaque (bpm)	150 ± 21	147 ± 20	- 2 ± 3	148 ± 20	140 ± 22	- 5 ± 5	140 ± 22	138 ± 22	- 2 ± 6
PAM (mm Hg)	116 ± 22	111 ± 20	- 4 ± 8	113 ± 20	109 ± 20	- 3 ± 3	108 ± 18	99 ± 16	- 8 ± 9
Débit IVA (ml/mn)	12 ± 5	12 ± 5	1 ± 20	13 ± 5	10 ± 5	- 24 ± 9*	14 ± 6	12 ± 6	- 18 ± 11*
Débit Cx (ml/min)	32 ± 7	29 ± 6	- 9 ± 7	31 ± 7	30 ± 8	- 5 ± 5	28 ± 8	27 ± 7	- 5 ± 6
RV IVA † (mm Hg/ml/mn)	10 ± 3	10 ± 5	- 1 ± 18	8 ± 2	11 ± 3	31 ± 12*	9 ± 2	10 ± 4	16 ± 24
RV Cx † (mm Hg/ml/mn)	3,2 ± 1	3 ± 1	4 ± 9	3,2 ± 1	3 ± 1	3 ± 5	3 ± 1	3 ± 1	- 3 ± 9
dP/dt (mm Hg/sec.)	1593 ± 489	1615 ± 523	1 ± 9	1630 ± 596	1359 ± 595	- 16 ± 18	1365 ± 575	1284 ± 587	- 7 ± 10

CSA : Cyclosporine. PAM : Pression artérielle moyenne. IVA : Artère coronaire interventriculaire antérieure. Cx : Artère coronaire circonflexe. RV : Résistance vasculaire.

\*p = 0,05.

† La résistance vasculaire coronarienne a été calculée selon la formule suivante :  $\frac{\text{pression artérielle moyenne} - \text{pression du sinus coronarien}}{\text{débit coronarien}}$   
Les données sont exprimées en moyenne ± écart type.

## ■ Analyse des données

Les données sont présentées en termes de moyenne et d'écart-type. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test *t* païré de Student, afin de comparer les valeurs témoins à celles obtenues après les injections intracoronariennes dans l'artère interventriculaire antérieure. Un test *t* non païré de Student a servi à l'analyse des données comparant les changements dans les mesures obtenues entre l'artère coronaire interventriculaire antérieure et l'artère coronaire circonflexe. Le niveau de la signification statistique a été établi à 95%.

## RÉSULTATS

### ■ Effet du test de la réactivité vasculaire

Le débit basal de l'artère coronaire interventriculaire antérieure était de 12 ± 5 ml/min et l'hypérhémie réactive était de 58 ± 19 ml/min, une augmentation de 46 ± 16 ml/min. Le débit basal de l'artère coronaire

circonflexe était de 33 ± 8 ml/min et l'hypérhémie réactive était de 118 ± 41 ml/min, une augmentation de 85 ± 34 ml/min.

### ■ Effet d'une solution saline dans l'artère coronaire interventriculaire antérieure

Après l'injection intracoronarienne d'une solution saline normo-thermique, le débit sanguin de l'artère coronaire interventriculaire antérieure et de l'artère coronaire circonflexe n'a pas présenté de variation significative (tableau I): Il n'y avait pas de changement significatif dans la fréquence cardiaque, la pression artérielle moyenne, le dP/dt et la résistance vasculaire coronarienne des artères interventriculaire antérieure et circonflexe durant ces injections.

### ■ Effet des injections de 5 et 10 mg de CSA dans l'artère coronaire interventriculaire antérieure

Le débit coronarien de l'artère interventriculaire antérieure a diminué jusqu'à 20 minutes après l'injection de CSA et cet effet a été mesuré comme étant

l'effet maximal de la CSA. Le débit sanguin dans l'artère coronaire interventriculaire antérieure a diminué de  $13 \pm 5$  ml/min à  $10 \pm 5$  ml/min ( $-3 \pm 1$  ml/min,  $-24 \pm 9\%$ ;  $p = 0,002$ ) et de  $14 \pm 6$  ml/min à  $12 \pm 6$  ( $-2 \pm 1$  ml/min,  $-18 \pm 11\%$ ;  $p = 0,009$ ) respectivement après 5 et 10 mg de CSA. Il n'y avait aucun changement significatif dans la fréquence cardiaque, la pression artérielle moyenne, le dP/dt et dans le débit sanguin de l'artère coronaire circonflexe durant ces études.

La résistance vasculaire de l'artère coronaire interventriculaire antérieure a augmenté de  $8 \pm 2$  à  $11 \pm 3$  mm Hg/ml/min ( $31 \pm 12\%$ ;  $p = 0,005$ ) et de  $9 \pm 2$  à  $10 \pm 4$  mm Hg/ml/min ( $16 \pm 24\%$ ;  $p = 0,1$ ) respectivement après 5 et 10 mg de CSA. Il n'y avait pas de changement significatif dans la résistance vasculaire de l'artère coronaire circonflexe durant et après l'injection de CSA. La cyclosporinémie moyenne des échantillons du sinus coronarien était de  $453 \pm 226$  nmol/l et  $1087 \pm 199$  nmol/l après 5 et 10 mg de CSA. Il n'y avait pas une corrélation significative entre les niveaux de la cyclosporinémie et les changements du débit coronarien observés.

## DISCUSSION

Plusieurs études ont démontré que la CSA cause une vasoconstriction rénale et périphérique significative [5-8]. La vasoconstriction rénale est secondaire à une relâche locale d'endothéline et l'atteinte périphérique fait suite à une stimulation sympathique. Une diminution du débit cardiaque a été démontrée chez le rat traité à la CSA. Kishimoto, 1992 [7] et Edwards *et al.* [9] ont démontré une diminution du débit cardiaque, lorsque la CSA était administrée conjointement à l'endothéline chez le chien. Dans cette étude, nous avons étudié, de façon spécifique, l'effet vasoconstricteur coronarien de la CSA. Le développement d'une maladie sténosante et occlusive des artères coronaires est la principale cause de décès à long terme après transplantation cardiaque [3, 10]. Peu d'intérêt a été accordé à un effet vasculaire coronarien de la CSA et son rôle potentiel dans le développement de cette maladie coronarienne. Pourtant, l'introduction de la CSA a permis le contrôle du phénomène de rejet myocardique sans diminuer l'atteinte coronarienne survenant à court et à moyen termes, après la transplantation. Les données actuelles indiquent que la CSA pourrait mener à des effets négatifs sur la circulation coronarienne [6]. La CSA administrée de façon aiguë et intra-artérielle induit une vasoconstriction coronarienne significative et diminue le débit sanguin de l'artère perfusée localement, soit l'artère interventriculaire antérieure. Dans notre étude, aucun

effet vasoconstricteur n'a été noté au niveau de l'artère coronaire circonflexe servant de témoin à l'étude. Les niveaux sanguins intracardiaques de CSA étaient élevés, atteignant des niveaux thérapeutiques cliniques.

Les injections consécutives de 5 et 10 mg de CSA ont causé une diminution semblable du débit sanguin coronarien. Cette diminution ne semble donc pas être reliée à la dose de CSA administrée. Ainsi, la vasoconstriction coronarienne secondaire à la CSA pourrait être reliée à un effet toxique sur l'endothélium coronarien.

L'effet de la CSA sur la circulation coronarienne chez l'homme peut avoir des implications cliniques importantes. Des études antérieures ont démontré que la CSA peut avoir un effet dommageable sur la capacité de l'endothélium à sécréter la prostacycline [11] et peut stimuler la production de l'endothéline [12]. Notre étude suggère que la CSA cause une diminution du débit sanguin coronarien. Cette diminution peut être due à une augmentation des niveaux plasmatiques d'endothéline intracardiaque. Chez les patients, après transplantation cardiaque, Lerman [13] et Haas [14] ont démontré une élévation significative des niveaux plasmatiques d'endothéline. La CSA cause aussi une libération d'endothéline en culture cellulaire [15]. Carrier *et al.* [5] ont démontré que la CSA cause une augmentation de la relâche d'endothéline au niveau rénal. L'endothéline induit une contraction puissante et prolongée sur les muscles vasculaires lisses chez l'animal [16] et une augmentation de la résistance coronarienne des artères de petit calibre [17]. L'endothéline possède donc des propriétés pouvant expliquer certaines conditions pathologiques chez l'homme.

Un effet systémique de la CSA sur la circulation coronarienne ne peut être exclu, malgré l'hypothèse d'un effet toxique local sur l'endothélium coronarien causant la relâche d'endothéline. Des études antérieures ont suggéré d'autres mécanismes d'action. La CSA augmente la concentration cytosolique du calcium dans les cellules isolées des muscles lisses. Cette augmentation est due à l'augmentation de l'influx ou à la libération des réserves intracellulaires [18]. Chez l'homme, on a démontré que la CSA empêche la vasodilatation endothélium-dépendante des artères sous-cutanées [8]. D'autres ont rapporté un dommage à la fonction endothéliale et musculaire lisse après exposition chronique à la CSA chez le rat [6]. Enfin, la CSA diminue la formation de prostacycline dans les cultures des cellules endothéliales [19] et prévient aussi la relaxation endothélium-dépendante à l'acétylcholine [20].

En conclusion, la CSA, administrée directement dans une artère coronaire, cause une vasoconstriction aiguë chez le chien. Des études supplémentaires devront permettre de mettre en évidence les mécanismes locaux responsables de ces effets.

## RÉFÉRENCES

1. MYERS B.D. - Cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1986; 30: 964-974.
2. BELLET M., CABROL C., SASSANO P., LÉGER P., CORVOL P., MENARD J. - Systemic hypertension after cardiac transplantation: Effect of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Cardiol* 1985; 56: 927-931.
3. CARRIER M., PELLETIER G.B., GENEST J. Jr, CARTIER R., LECLERC Y., PELLETIER L.C. - Cholesterol-lowering intervention and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg* 1994; 57: 353-356.
4. Consensus Document. - Hawk's Cay Meeting on Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine. *Transplant Proc* 1990; 22: 1357-1361.
5. CARRIER M., TRONC F., STEWART D., PELLETIER L.C. - Dose-dependent effect of cyclosporin on renal arterial resistance in dogs. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1991; 261: H1791-H1796.
6. CARTIER R., DAGENAIS F., HOLLMANN C., CAMBRON H., BULURAN J. - Chronic exposure to cyclosporine affects endothelial and smooth muscle reactivity in the rat aorta. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 789-794.
7. KISHIMOTO T., TSUJINO T., NAKATANI T., KIM T., OHYAMA A., SAKAMOTO W. - Effect of cyclosporin on cardiac output and regional blood flow in rats: Cyclosporin-induced nephropathy and its prevention with calcium channel blocker. *Nephron* 1992; 61: 204-210.
8. RICHARDS N.T., POSTON L., HILTON P.J. - Cyclosporin A inhibits endothelium-dependent prostanoid-induced relaxation in human subcutaneous resistance vessels. *J Hypertens* 1990; 8: 159-163.
9. EDWARDS B.S., LLOYD M.A., ANDERSON L.M. - The synergistic effects of cyclosporine and endothelin - Demonstration of an important cardiodepressor action. *Transplantation* 1993; 55: 8-11.
10. COLIZZA F., PELLETIER, G.B., CARRIER M., WATERS D. - Syncope: A symptom of coronary artery spasm after cardiac transplantation. *Can J Cardiol* 1992; 8: 299-302.
11. BROWN Z., NEILD G.H. - Cyclosporine inhibits prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Transplant Proc* 1987; XIX: 1178-1180.
12. CAIRNS H.S., ROGERSON M., FAIRBANKS L.D., WESTWICK J., NEILD G.H. - Endothelin and cyclosporin nephrotoxicity. *Lancet* 1988; ii: 1496-1497.
13. LERMAN A., KUBO S.H., TSCHUMPERLIN L.K., BURNETT J.C. Jr. - Plasma endothelin concentrations in humans with end-stage heart failure and after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 849-853.
14. HAAS G.J., WOODING-SCOTT M., BINKLEY P.F., MYEROWITZ, P.D., KELLEY R., CODY R.J. - Effects of successful cardiac transplantation on plasma endothelin. *Am J Cardiol* 1993; 71: 237-240.
15. NAKAHAMA H. - Stimulatory effect of cyclosporine A on endothelin secretion by a cultured renal epithelial cell line, LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol* 1990; 180: 191-192.
16. BRAIN S.D. - The direct observation of arteriolar constriction induced by endothelin *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 1989; 160: 401-403.
17. KURIHARA H., YOSHIZUMI M., SUGIYAMA T., YAMAOKI K., NAGAI R., TAKAKU F. et al. - The possible role of endothelin-1 in the pathogenesis of coronary vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 (suppl 5): S132-S137.
18. KASUYA Y., ISHIKAWA T., YANAGISAWA M., KIMURA S., GOTO K., MASAKI T. - Mechanism of contraction to endothelin in isolated porcine coronary artery. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1989; 257: H1828-H1835.
19. McNALLY P.G., FEEHALLY J. - Pathophysiology of cyclosporin A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 791-804.
20. DINH XUAN A.T., FAN T.P.D., HIGENBOTTAM T.W., WALLWORK J. - Cyclosporine *in vitro* reduces endothelium-dependent relaxation to acetylcholine but does not affect relaxation to nitrovasodilators. *Transplant Proc* 1990; 22: 1723-1725.



## ANNALES DE RADIOLOGIE

Revue d'Imagerie médicale - Médecine nucléaire

Rédaction - Abonnements - Publicité : 31, bd de Latour-Maubourg, 75007 PARIS  
Tél. : (1) 40 62 64 00 - Télécopie : (16-1) 45 55 69 20

### ABONNEMENTS

(8 numéros par an)

	France	Etranger
— Abonnement simple.....	1 450 FF	2 025 FF
— Étudiant.....	725 FF	1 090 FF

Les abonnements sont payables au comptant et ne sont mis en service qu'après réception du règlement.

Les chèques bancaires en provenance de l'étranger devront être adressés au compte n° 11854-50 CIC, 7, rue Armand Moisant, 75015 PARIS Cedex (France).  
Checks drawn on banks in countries other than France should be made payable to account number 11854-50 CIC, 7, rue Armand Moisant, 75015 PARIS Cedex (France).

---

## Chapitre 9

### **Cyclosporin A-Induced Coronary Artery Vasoconstriction Through Myogenic and Endothelium-Dependent Mechanisms**

Ahmad Khalil, Michel Carrier, Jean-Gilles Latour, Louis-Conrad Pelletier

Circulation

Vol. 94 (suppl II), pp. II-308-II-311, 1996.

### 9.1 Résumé (français)

**Introduction.** Le mécanisme exacte de la toxicité vasculaire de la Cyclosporine A (CSA) reste encore inconnu. Il a été rapporté que la CSA peut affecter la réactivité vasculaire endothélium-dépendant.

**Méthodes et résultats.** Nous avons étudié la réponse aux injections intracoronaires d'acétylcholine (Ach) (30 ng/kg), d'adénosine (Ade) (100 ng/kg) et de la nitroglycérine (NTG) (1.7 µg/kg) avant et après l'infusion intracoronaire de la CSA (20 mg sur une période de 20 min) et de la L-arginine (l-arg) (10 mg/kg/min). Les expériences sont réalisées sur 11 chiens anesthésiés et préparés pour mesurer le débit sanguin coronaire (DSC) dans l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA) et dans l'artère coronaire circonflexe (Cx), ainsi que la  $dP/dt$ , la pression artérielle moyenne et la pression du sinus coronaire. La CSA, la l-arg, l'Ach, l'Ade et la NTG sont injectés dans l'IVA et la Cx a servi comme témoin. L'augmentation du DSC dans l'IVA avait comme moyenne  $21 \pm 11$  ml/min avant CSA et  $15 \pm 10$  ml/min après CSA, et  $15 \pm 8$  ml/min durant l'injection de la l-arg ( $p=0.2$ ). L'Ade a causé une augmentation dans le DSC de l'IVA qui avait une moyenne  $20 \pm 10$  ml/min avant CSA et  $10 \pm 8$  ml/min après CSA, et  $17 \pm 12$  ml/min après l-arg. ( $p=0.004$ ). La NTG a causé une augmentation dans le DSC de l'IVA qui avait une moyenne de  $21 \pm 10$  ml/min avant CSA et  $13 \pm 11$  ml/min après CSA, et  $14 \pm 7$  ml/min après l-arg. ( $p=0.009$ )

**Conclusion.** Ces résultats suggèrent que l'injection intracoronaire de la CSA peut induire une réponse vasoconstrictrice à travers un mécanisme endothélium-dépendant et myogénique. La réponse endothéliale muscarinique n'était pas affectée par la CSA, tandis que l'action purinergique de la CSA était rétabli après l'administration de la l-arg.

## Cyclosporin A-Induced Coronary Artery Vasoconstriction Through Myogenic and Endothelium-Dependent Mechanisms

Ahmad Khalil, MD; Michel Carrier, MD; Jean-Gilles Latour, PhD; L. Conrad Pelletier, MD

**Background** The exact mechanism of vascular toxicity of cyclosporin A (CSA) remains unknown. It has been reported that an impairment of endothelium-mediated vascular reactivity may be involved.

**Methods and Results** We studied the response to intracoronary injections of acetylcholine (ACh) (30 ng/kg), adenosine (100 ng/kg), and nitroglycerin (NTG) (1.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) before and after intracoronary infusion of CSA (20 mg over 20 minutes) and of L-arginine (10 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  min<sup>-1</sup>). Experiments were performed on 11 open-chest dogs anesthetized and instrumented for measurements of coronary blood flow (CBF) in the left anterior descending (LAD) and left circumflex (LCx) coronary arteries, left ventricular dP/dt, mean aortic pressure, and coronary sinus pressure. CSA, L-arginine, ACh, adenosine, and NTG were injected into the LAD, and the LCx served as control. The increase in CBF in the LAD with ACh administration averaged  $21 \pm 11$  mL/min be-

fore CSA,  $15 \pm 10$  mL/min after CSA, and  $15 \pm 8$  mL/min during L-arginine injection ( $P=2$ ). Adenosine caused an increase in CBF in the LAD averaging  $20 \pm 10$  mL/min before CSA,  $10 \pm 8$  mL/min after CSA, and  $17 \pm 12$  mL/min during L-arginine injection ( $P=.004$ ). NTG caused an increase in CBF in the LAD averaging  $21 \pm 10$  mL/min before CSA,  $13 \pm 11$  mL/min after CSA, and  $14 \pm 7$  after administration of L-arginine ( $P=.009$ ).

**Conclusions** These results suggest that direct intracoronary injection of CSA induces a vasoconstrictive response through endothelium-dependent and myogenic mechanisms. The muscarinic endothelial response was not affected by CSA, whereas the purinergic action of CSA was restored after L-arginine administration. (*Circulation*. 1996;94[suppl II]:II-308-II-311.)

**Key Words** • cyclosporine • endothelium •

The results of organ transplantation have improved dramatically since the introduction of CSA as part of the immunosuppressive regimen. CSA is a peptide with a lipophilic structure that modifies T-cell function without suppressing bone marrow. However, CSA has toxic effects on both renal and vascular functions.<sup>1</sup>

CSA toxicity has been characterized in humans<sup>2,3</sup> and in experimental animals.<sup>4,5</sup> The exact mechanism of the vascular toxicity caused by CSA remains a matter of controversy.<sup>6</sup> Studies have suggested that primarily an impairment of the endothelial function affecting vascular tone is involved.<sup>7</sup> Conversely, the importance of direct damage to the vascular smooth muscle cell is unclear, since the response to endothelium-independent vasoactive agents appears inconsistent.<sup>8</sup>

Endothelial dysfunction and vascular toxicity are the main basis for CSA involvement in the development of transplant coronary disease, which is the single most important risk factor for death in heart transplant recipients surviving beyond the first postoperative year.<sup>9</sup>

The aim of the present study was to evaluate the vascular dysfunction of coronary arteries after acute treatment with CSA and to explore the possible reversibility of the vascular changes in the dog.

### Methods

Eleven adult mongrel dogs of either sex, weighing between 20

IV). The dogs were intubated and ventilated with positive-pressure ventilation supplemented with oxygen (Anesthesia Ventilator, Ohio Medical Products).

Catheters were placed in a femoral artery and vein and in the jugular vein for measurement of arterial pressure and infusion of drugs, respectively. The heart was exposed through a median sternotomy and suspended in a pericardial cradle. A segment of the LAD and the LCx was dissected and isolated for placement of a transit-time flow probe (model T-206, Transonic System Inc). A segment of the LAD was also exposed proximal to the flow probe for insertion of a 24-gauge catheter into the artery (Criticon Inc). The catheter was then attached to a 20-gauge tubing, through which intracoronary infusions were done. A catheter was inserted into the coronary sinus through the right atrium. This catheter was used for sampling coronary venous blood and measurements of coronary sinus pressure.

A high-fidelity pressure transducer (model SPC-370, Millar Mikrotip) was inserted into the LV through the apex for measurements of LV pressure and LV dP/dt. ECG recording was used to measure heart rate. All hemodynamic variables were recorded continuously on an eight-channel galvanometric recorder (Gould, TA 400). Coronary vascular resistance was calculated by the following standard formula:  $(\text{MAP} - \text{CSP}) \div \text{CBF}$ .

Animals were allowed to stabilize for 20 minutes before the experiment was begun. Vascular reactivity was tested separately in the LAD and the LCx. An occlusion of 20 seconds was performed, and the reactive hyperemic response was recorded. This test was performed at the beginning and at the end of each experiment.

Heparin (15 000 IU IV) was given to prevent blood clotting. The dead space of the catheter was 0.3 mL. CSA and L-arginine began reaching the coronary circulation 90 seconds after the beginning of infusion. CSA blood levels were measured by the immunofluorescent method with monoclonal antibodies (TDX, Abbott Laboratories) in venous blood samples drawn from the coronary sinus.<sup>10</sup>

Drugs used were CSA (intravenous Sandimmune, Sandoz), L-arginine hydrochloride (Sigma), acetylcholine chloride (Sigma), adenosine (Sigma), and NTG (Nitroject 5 mg/mL, Omega).

From the Departments of Surgery and Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Michel Carrier, MD, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada.

© 1996 American Heart Association, Inc.

### Selected Abbreviations and Acronyms

ACh = acetylcholine  
 CBF = coronary blood flow  
 CSA = cyclosporin A  
 CSP = coronary sinus pressure  
 LAD = left anterior descending coronary artery  
 LCx = left circumflex coronary artery  
 LV = left ventricle, left ventricular  
 MAP = mean arterial pressure  
 NTG = nitroglycerin

All animals were treated in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1985).

### Experimental Protocol

ACh (30 ng/kg), adenosine (100 ng/kg), and NTG (1.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were injected directly into the LAD before and after administration of CSA and L-arginine (Fig 1). CSA solution (20 mg) was infused directly into the LAD with an infusion pump over a period of 20 minutes. L-Arginine (10  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) was administered directly into the LAD over a period of 10 minutes. A blood sample from the coronary sinus was drawn immediately at the end of CSA infusion for measurement of CSA blood level.

MAP and CBF in the LAD and in the LCx were allowed to stabilize before injection of ACh, adenosine, and NTG. The drugs were diluted in normal saline and injected at a temperature of 37°C.

### Statistics

Maximal changes in CBF before and after drug injections were analyzed with a Student's *t* test for paired data. Responses to and maximal changes with ACh, adenosine, and NTG before and after CSA and L-arginine were compared by one-way ANOVA for repeated measures and by Fisher's exact test. A two-sided significance level of  $P < .05$  was considered statistically significant. Results were expressed as mean  $\pm$  SD.

## Results

### Effects of Intracoronary Infusion of CSA and of L-Arginine on Hemodynamic Variables

CSA decreased CBF in the LAD significantly, from  $19 \pm 6$  to  $11 \pm 4$  mL/min ( $P = .001$ ), a maximal change of  $-44 \pm 13\%$ . CSA increased coronary vascular resistance of the LAD from  $6 \pm 2$  to  $11 \pm 5$  mm Hg  $\cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $P = .006$ ). CSA blood levels in the coronary sinus averaged  $1074 \pm 261$  nmol/L at the end of injections. Heart rate, MAP, CSP, LV dP/dt, and CBF of the LCx remained stable during injections of CSA in the LAD. L-Arginine did not cause any significant change in hemodynamic variables. Blood flow in the LAD averaged  $18 \pm 6$  mL/min before and  $23 \pm 9$  mL/min after L-arginine ( $P = .14$ ).

### Effects of Intracoronary Injection of ACh Before and After CSA

ACh injection increased CBF in the LAD from  $14 \pm 3$  to  $35 \pm 13$  mL/min ( $P = .0001$ ) before CSA, from  $12 \pm 5$  to  $27 \pm 13$  mL/min ( $P = .002$ ) after CSA, and from  $19 \pm 8$  to  $34 \pm 15$  mL/min ( $P = .008$ ) after L-arginine infusion. The maximal changes in CBF of the LAD with ACh averaged  $21 \pm 11$  mL/min before and  $15 \pm 10$  mL/min after CSA. After L-arginine infusion, ACh caused a maximal change in CBF averaging  $15 \pm 8$  mL/min, a nonsignificant difference ( $P = .2$ ) compared with the response with CSA (Fig 2). Heart rate, MAP, CSP, LV dP/dt, and CBF of the LCx

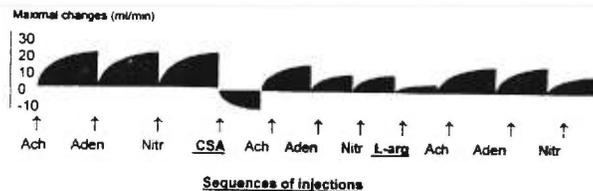


FIG 1. Sequence of injections and responses to ACh, adenosine (Aden), and NTG (Nitr) before and after the administration of CSA and L-arginine (L-arg).

remained stable during infusion of CSA and ACh in the LAD.

### Effects of Intracoronary Injections of Adenosine Before and After CSA

Adenosine injection increased CBF in the LAD from  $19 \pm 7$  to  $39 \pm 14$  mL/min ( $P = .0001$ ) before CSA, from  $16 \pm 5$  to  $25 \pm 11$  mL/min ( $P = .02$ ) after CSA, and from  $18 \pm 6$  to  $36 \pm 16$  mL/min ( $P = .002$ ) after L-arginine infusion. The maximal change in CBF of the LAD with adenosine averaged  $20 \pm 10$  mL/min before and  $10 \pm 8$  mL/min after CSA, a significant difference ( $P < .05$ ). After L-arginine, the maximal change in CBF averaged  $17 \pm 12$  mL/min, a significant increase compared with the response with CSA ( $P < .05$ ) (Fig 2). Heart rate, MAP, CSP, LV dP/dt, and CBF of the LCx remained stable during infusion of CSA and of adenosine in the LAD.

### Effects of Intracoronary Injection of NTG Before and After CSA

NTG increased CBF in the LAD from  $20 \pm 7$  to  $41 \pm 13$  mL/min ( $P = .0001$ ) before CSA, from  $17 \pm 6$  to  $30 \pm 15$  mL/min ( $P = .01$ ) after CSA, and from  $17 \pm 7$  to  $31 \pm 12$  mL/min ( $P = .003$ ) after L-arginine infusion. The maximal change in CBF of the LAD with NTG averaged  $21 \pm 10$  mL/min before and  $13 \pm 11$  mL/min after CSA, a significant difference ( $P < .05$ ). After L-arginine, the maximal change in CBF with NTG averaged  $14 \pm 7$  mL/min, a nonsignificant difference compared with the response with CSA ( $P > .05$ ) (Fig 2). Heart rate, MAP, CSP, LV dP/dt, and CBF of the LCx remained stable during infusion of CSA and of NTG in the LAD.

### Effects of CSA on Hyperemic Response to Ischemia

The hyperemic responses to ischemia averaged  $44 \pm 30$  mL/min before and  $22 \pm 13$  mL/min after CSA in the LAD ( $P = .02$ ), and the increase in CBF averaged  $81 \pm 17$  mL/min before and  $55 \pm 26$  mL/min after CSA in the LCx ( $P = .04$ ) (Fig 3).

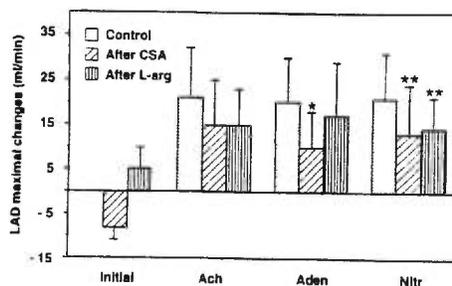


FIG 2. Effects and maximal changes after intracoronary injections of ACh, adenosine (Aden), and NTG (Nitr) before and after CSA and L-arginine (L-arg) infusions on the LAD CBF. \* $P = .004$  vs control; \*\* $P = .009$  vs control.

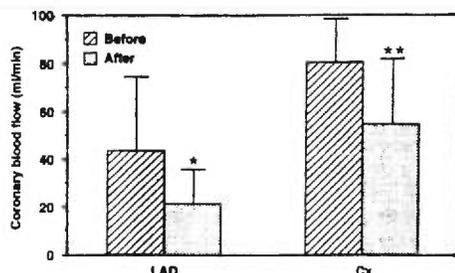


FIG 3. Effects of brief periods of coronary artery occlusion before and after CSA and L-arginine infusions on the LAD and LCx (Cx) CBF. \* $P=.02$ ; \*\* $P=.04$ , before vs after.

### Discussion

In the present study, CSA administered into the LAD caused a significant coronary vasoconstriction. Whereas ACh vasorelaxation was similar before and after CSA infusion, adenosine vasodilation was decreased after CSA infusion and was restored with injection of L-arginine. The vasorelaxant effect of the nonenzymatic NO donor NTG was attenuated after CSA and did not recover after L-arginine intracoronary infusion. This study provides new data on the mechanisms of CSA-induced vascular toxicity and the role of the endothelium in the vascular regulatory mechanisms. The vasoconstrictor effect of CSA on CBF is consistent with previous *in vivo* studies in our laboratory<sup>11</sup> as well as *in vitro* studies reported by others.<sup>12</sup>

The present experiments have shown that the vasorelaxation induced by ACh, a known endothelium-dependent vasodilator, is preserved after injection of CSA. ACh-induced relaxation is mainly the effect of a stimulated intracellular formation of NO, which after diffusion to the smooth muscle cells activates soluble guanylate cyclase.<sup>13</sup> In the dog, ACh causes potent endothelium-dependent relaxations in all arteries, including the coronary arteries.<sup>14</sup> Our results are consistent with those of O'Neil et al,<sup>15</sup> who concluded that CSA does not reduce NO formation in human coronary arteries, although others have suggested that acute intravenous administration of CSA impairs ACh-induced vasorelaxation in the coronary circulation.<sup>6</sup>

The increase in CBF with adenosine was suppressed after CSA and restored with L-arginine infusion. As suggested by Parent et al,<sup>16</sup> adenosine may stimulate NO release from coronary microvascular endothelium. There is evidence that both freshly isolated and cultured rat aorta smooth muscle cells contain high-affinity adenosine receptors coupled to guanylate cyclase as well as receptors of much lower affinity coupled to adenylate cyclase.<sup>17</sup> The adenosine-sensitive guanylate cyclase is in the particulate fraction of disrupted cells, as is the enzyme stimulated by atriopeptins,<sup>18</sup> suggesting that adenosine acts through a receptor-regulated guanylate cyclase distinct from the "soluble" cyclase that mediates nitrites and endothelium-dependent vasodilation. Heterogeneity has been reported for soluble guanylate cyclase,<sup>19,20</sup> and it is possible that the different forms are differentially regulated. Moreover, NO activation of washed and partially purified particulate forms of guanylate cyclase has been demonstrated.<sup>21,22</sup> CSA may affect the vasodilation response to adenosine in competing for adenosine cell receptors.

Gallego et al<sup>12</sup> suggested that the mechanism of toxicity of CSA is probably located along the pathway leading from NO to cGMP generation. The different effects of

vasorelaxation of ACh and adenosine after CSA and L-arginine treatments could be explained by activation of a specific form of phosphodiesterase by CSA, although the present study was not designed to answer the latter hypothesis. The cGMP formed by the soluble guanylate cyclase exerts its main action through activation of cGMP-dependent protein kinase, at least in vascular smooth muscle and platelets.<sup>23</sup> The inactivation of cGMP is catalyzed by phosphodiesterases, and five distinct families have been identified, one of which is cGMP specific.<sup>24</sup>

A defect at the level of the vascular smooth muscle cells was further investigated by measurement of the relaxing effect of NTG, a known endothelium-independent vasodilator that elicits relaxation by increasing cGMP. Our results show that the relaxation caused by NTG is impaired after CSA treatment. It has been suggested that removal of the endothelium prevents the formation of cGMP induced by ACh but not the response to NTG or NO.<sup>25</sup> Our results are consistent with those of others<sup>8,26</sup> who showed that CSA impaired the vasodilator response to endothelium-independent vasodilation.

Bunke and Wilder<sup>27</sup> and Voss et al<sup>28</sup> suggested that cyclooxygenase plays a role in the CSA-mediated endothelial damage. These authors have shown that CSA reduces the metabolism of arachidonic acid by cyclooxygenase and increases the amount of thromboxane A<sub>2</sub> produced relative to that of prostacyclin in cultured endothelial cells. The relation between NO and the regulation of eicosanoid synthesis in vascular endothelial cells may represent an important mechanism of vascular control.

The reactive hyperemic responses to ischemia in the LAD and in the LCx were shown to be decreased at the end of each experiment. Reactive hyperemia after brief coronary occlusion is considered to be mediated largely by endothelium-dependent and myogenic mechanisms.<sup>17,29,30</sup> The latter observation is consistent with our conclusion that both endothelium-dependent and myogenic mechanisms are involved in the coronary endothelial response to CSA.

Our results suggest that direct intracoronary infusion of CSA causes a coronary vasoconstriction through both an endothelium-dependent effect and a direct effect on the vascular smooth muscle. The muscarinic endothelial response is not affected by CSA, whereas the purinergic response is restored after L-arginine administration. The potential role of CSA therapy in the development of endothelial cell dysfunction and subsequent posttransplant vasculopathy cannot be excluded, and it remains to be further clarified.

### Acknowledgments

This study was supported in part by the Medical Research Council of Canada. We thank Pierre Thai for his devoted technical assistance.

### References

- Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs*. 1993;45:953-1040.
- Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RSA, Ring S, Hanson P, Mohanty PK, Victor RG. Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med*. 1990;323:693-699.
- Weir MR, Klassen DK, Shen SY, Sullivan D, Buddemeyer EU, Handwerger BS. Acute effects of intravenous cyclosporine on blood pressure, renal hemodynamics, and urine prostaglandin production of healthy humans. *Transplantation*. 1990;49:41-47.

4. Whiting PH, Thomson AW, Simpson JG. Cyclosporine: toxicity, metabolism, and drug interactions: implications from animal studies. *Transplant Proc.* 1985;17(suppl 1):134-144.
5. Carrier M, Pelletier CR, Pelletier LC. Effect of direct injection of cyclosporine on the arterial vessels of the isolated hind limb in the dog. *Can J Cardiol.* 1991;7:91-95.
6. Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, De Groot CJM, Taylor RN, Chou TM, Yock PG, Chatterjee K. Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation.* 1994;90:3018-3023.
7. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai F-X. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension.* 1994;23(pt II):II-957-II-961.
8. Rego A, Vargas R, Wroblewska B, Foegh ML, Ramwell PW. Attenuation of vascular relaxation and cyclic GMP responses by cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252:165-170.
9. Haverich A, Costard-Jäckle A, Cremer J, Herrmann G, Simon R. Cyclosporin A and transplant coronary disease after heart transplantation: facts and fiction. *Transplant Proc.* 1994;26:2713-2715.
10. Consensus Document: Hawk's Cay Meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc.* 1990;22:1357-1361.
11. Khalil A, Carrier M, Latour JG, Pelletier LC. La cyclosporine A diminue le débit coronarien chez le chien. *Ann Chir.* 1995;49:689-693.
12. Gallego MJ, Villalón ALG, Farre AJL, García JL, Garrón MP, Casado S, Hernando L, Caramelo CA. Mechanisms of the endothelial toxicity of cyclosporin A: role of nitric oxide, cGMP, and Ca<sup>2+</sup>. *Circ Res.* 1994;74:477-484.
13. Lüscher TF, Cooke JP, Houston DS, Neves RJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc.* 1987;62:601-606.
14. De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall: importance of the endothelium. *Circ Res.* 1982;51:439-447.
15. O'Neil GS, Chester AH, Kushwaha S, Rose M, Tadjkarimi S, Yacoub MH. Cyclosporin treatment does not impair the release of nitric oxide in human coronary arteries. *Br Heart J.* 1991;66:212-216.
16. Parent R, Al-Obaidi M, Lavallée M. Nitric oxide formation contributes to  $\beta$ -adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circ Res.* 1993;73:241-251.
17. Kurtz A. Adenosine stimulates guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1987;262:6296-6300.
18. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest.* 1986;78:1-5.
19. Yuen PST, Potter LR, Garbers DL. A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry.* 1990;29:10872-10878.
20. Chhajlani V, Frändberg P-A, Ahlner J, Axelsson KL, Wikberg JES. Heterogeneity in human soluble guanylate cyclase due to alternative splicing. *FEBS Lett.* 1991;290:157-158.
21. Lad PJ, White AA. Activation of particulate guanylate cyclase by nitroprusside and MNNG after filipin treatment. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1979;5:315-325.
22. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.* 1987;39:163-196.
23. Popescu LM, Panoiu C, Henescu M, Nutu O. The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1985;107:393-394.
24. Beavo JA, Reifsnnyder DH. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11:150-155.
25. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983;52:352-357.
26. Verbeke M, Van de Voorde J, de Ridder L, Lameire N. Functional analysis of vascular dysfunction in cyclosporin treated rats. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1152-1156.
27. Bunke M, Wilder L. Cyclosporine inhibits mesangial cell prostaglandin production. *Kidney Int.* 1989;35:402A. Abstract.
28. Voss BL, Hamilton KK, Samara ENS, McKee PA. Cyclosporine suppression of endothelial prostacyclin generation: a possible mechanism for nephrotoxicity. *Transplantation.* 1988;45:793-796.
29. Kostic MM, Schrader J. Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ Res.* 1992;70:208-212.
30. Eikens E, Wilcken DEL. Reactive hyperemia in the dog heart: effects of temporarily restricting arterial inflow and of coronary occlusions lasting one and two cardiac cycles. *Circ Res.* 1974;35:702-712.

---

## Chapitre 10

### **Coronary Vascular Response and G-Protein Involvement After Immunosuppressive Treatment : A Comparative Study Between Cyclosporine A and Tacrolimus**

Ahmad Khalil, Guy Rousseau, Michel Carrier, Jean-Gilles Latour,  
Louis-Conrad Pelletier

Soumis  
à Circulation  
Novembre 1997

## 10.1 Résumé (français)

**Contexte.** La Cyclosporine A et le Tacrolimus (FK) sont deux agents immunosuppresseurs qui sont largement utilisés dans la prévention des phénomènes de rejet. Les deux agents possèdent une importante toxicité vasculaire et myocardique. Le but de cette étude est d'examiner l'effet de la CSA et du FK sur la réactivité vasculaire coronaire, sur la fonction endothéliale vasculaire et sur le système de signalisation transmembranaire dépendant de la Protéine-G (PG) dans le myocarde.

**Méthodes et résultats.** Le protocole expérimental a inclu 8 groupes de chiens, où nous avons étudié l'effet des injections intracoronaires d'acétylcholine (Ach) (30ng/kg) d'adénosine (Ade) (100ng/kg) et de la nitroglycérine (NTG) (1.7µg/kg), ou de la sérotonine (Ser) (1µg/kg), bradykinine (BK) (200ng/kg) et Substance P (SP) (1ng/kg). Les injections sont administrées avant et après l'infusion de la CSA (20mg) et de la l-arginine (l-arg) (10 mg/kg/min) ou de FK (0.05mg/kg) et de la l-arg. Les expériences sont réalisées sur des chiens anesthésiés et instrumentés pour la mesure de débit sanguin coronaire (DSC) dans l'artère interventriculaire antérieure (IVA) et dans l'artère circonflexe (Cx), la dP/dt, la pression artérielle moyenne et la pression du sinus coronaire. Les niveaux plasmatiques d'endothéline-1 sont mesurés avant et après CSA. L'AMPc et l'activité GTPasique dans les tissus myocardiques sont mesurées avant et après CSA et FK. Dans le premier groupe, l'effet vasorelaxant de la Ser, BK, et de la SP était significativement diminué après CSA, et n'était pas rétabli après l-arg. Dans le deuxième groupe la CSA n'a pas affecté les concentrations plasmatiques d'endothéline-1. Dans le troisième groupe, le FK a significativement supprimé l'effet vasorelaxant d'Ach, d'Ade et de la NTG, et n'a pas affecté l'effet vasorelaxant de la Ser, BK, et SP. Il n'y avait pas des changements significatives dans la réponse vasorelaxante coronarienne suivant les trois injections successives d'Ach, d'Ade et de la NTG (cinquième groupe) et de la Ser, BK, et SP (sixième groupe). Dans le septième groupe, l'activité d'adénylyl cyclase stimulée par la forskoline a augmenté significativement après

CSA ( $72.6 \pm 25$  pmol/min/mg de protéine avant et  $96.3 \pm 15.3$  pmol/min/mg de protéine après CSA ;  $p=0.003$ ) et elle n'a pas changé dans le huitième groupe ( $65.7 \pm 17.4$  pmol/min/mg de protéine avant et  $74.4 \pm 23.2$  pmol/min/mg de protéine après FK). l'activité GTPasique a augmenté significativement après CSA ( $249.8 \pm 98.6\%$ ) comparée à l'augmentation après FK ( $84.2 \pm 27.6\%$ ) ( $p=0.018$ ).

**Conclusion.** l'infusion intracoronaire directe de la CSA et du FK a causé une dysfonction vasculaire à travers un mécanisme qui est à la fois endothélium-dépendant et myogénique. Ainsi, la vasoconstriction coronaire induite par la CSA n'était pas médiée par la production d'endothéline-1, et la CSA et non le FK a pu influencer les activités d'adénylyl cyclase et GTPasique de la PG dans les tissus myocardiques.

## Abstract

**Background** Cyclosporin A (CSA) and tacrolimus (FK) have strong immunosuppressive potential, and they showed a remarkable vascular and myocardial toxicity. The purpose of this study was to examine the effect of CSA and FK on coronary vascular reactivity, and on G protein (GP) functioning in the myocardium.

**Methods and Results** In open chest dogs instrumented to measure coronary and systemic hemodynamic parameters, we studied the effect of intracoronary (IC) injections of serotonin (Ser) (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), bradykinin (BK) (200  $\text{ng}/\text{kg}$ ), and substance P (SP) (1  $\text{ng}/\text{kg}$ ) and acetylcholine (Ach) (30  $\text{ng}/\text{kg}$ ), adenosine (Ade) (100  $\text{ng}/\text{kg}$ ) and nitroglycerin (NTG) (1.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) before and after IC infusions of CSA (20 mg over 20 minutes) and L-arginine (L-arg) (10  $\text{mg}/\text{kg}/\text{min}$ ) or FK (0.05  $\text{mg}/\text{kg}$  over 20 minutes) and L-arg. The coronary vasorelaxant effect of Ser, BK, and SP was significantly suppressed after CSA and did not recover after L-arg. CSA did not affect blood concentrations of endothelin-1. FK significantly impaired the vasorelaxant effect of Ach, Ade, and NTG. Forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity ( $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$  of protein) increased after CSA (72.6 $\pm$ 9.6 before and 96.3 $\pm$ 5.9 after;  $P=.003$ ) and did not change after FK (65.7 $\pm$ 7.1 before and 74.4 $\pm$ 9.7 after). The GTPase activity significantly increased after CSA (249.8 $\pm$ 49.3%) compared to the increase after FK (84.2 $\pm$ 13.8%) ( $P=.018$ ).

**Conclusions** Direct IC infusions of CSA and FK causes vascular dysfunction through endothelium-dependent and myogenic mechanisms, CSA-induced coronary vasoconstriction is not mediated by endothelin-1 production, and CSA but not FK interferes with adenylyl cyclase activity and GP functioning.

***Key Words:*** cyclosporin A • tacrolimus • coronary circulation • endothelium • G protein  
• heart transplantation

Cyclosporin A (CSA) and tacrolimus (FK) are both immunosuppressive drugs widely used for prophylaxis of acute rejection after solid organ transplantation. Although, structurally different, CSA and FK have remarkably similar effects on the immune system that are mediated by selective inhibition of the early phase of T cells activation and cytokin production.<sup>1</sup> The in vitro potency of FK was initially found to be greater than CSA in inhibiting T cell activation.<sup>2</sup> Both agents have been associated with side effects like nephrotoxicity and hypertension which are often the limiting factor for their administration.<sup>3</sup> Clinical and experimental use of CSA and FK, has been associated with development of endothelial dysfunction.<sup>4-8</sup> Despite improvement in short-term clinical results, transplant coronary artery disease (TCD) remains a major complication among long-term survivors treated with CSA and FK following heart transplantation.<sup>9,10</sup> Many clinical variables have been associated with development of TCD in transplanted hearts.<sup>11,12</sup> However, the underlying cause of TCD remains to be determined and no treatment to prevent its occurrence has been firmly established.

Endothelial dysfunction is an early and characteristic feature of both native and allograft coronary artery disease.<sup>13,14</sup> It would be helpful if this pathophysiological marker could be used to detect early disease activity before the occurrence of significant vessel wall disease. Thus, the purpose of this study was to investigate the acute effects of CSA and FK on endothelial coronary function and coronary vascular reactivity, on endothelin-1 release and on cAMP generation and GTPase activity in myocardial tissues.

## Materials and Methods

### Surgical Procedure

Seventy-five adult mongrel dogs of either sex weighing between 20 and 30 kg were sedated with pentobarbital sodium (30 mg/kg i.v.). The dogs were intubated and ventilated with positive pressure ventilation supplemented with oxygen (Ohio Anesthesia Ventilator, Ohio Medical Products). Catheters were placed in a femoral artery and vein and in jugular vein for measurement of mean arterial pressure (MAP) and infusion of drugs respectively. The heart was exposed through a median sternotomy and suspended in a pericardial cradles. A segment of the left anterior descending (LAD) and of the circumflex (Cx) was dissected and isolated for placement of transit time flow probe (Transonic System Inc., model T-206). A segment of LAD was also exposed proximal to the flow probe for inserting a 24-gauge catheter (Criticon Inc.). The catheter was then attached to a 20-gauge tubing through which intracoronary infusions were done. A catheter was inserted into the coronary sinus through the right atrium and served for blood sampling and measurement of coronary sinus pressure (CSP). A high fidelity pressure transducer (Millar mikrotip model SPC-3700) was inserted into the left ventricle through the apex for measurements of left ventricular pressure and its time derivative ( $dp/dt$ ). ECG recording served to measure heart rate. All hemodynamic variables were recorded continuously on eight channel galvanometric recorder (Gould, TA 400, Valley View, OH). Animals were allowed to stabilize during 20 minutes before starting experiments. Vascular reactivity was tested separately in LAD and Cx, where the latest served as control. An occlusion of 20 seconds was performed and the reactive hyperemic response recorded. This test was performed at the beginning and the end of each experiment. Heparin (1500 IU) was given intravenously to prevent blood clotting. The dead

space of the catheter was 0.3 mL, and CSA, FK and L-arginine (L-arg) began reaching the coronary circulation 90 seconds after infusion's start. CSA blood levels were measured by immunofluorescent method with monoclonal antibodies (TDX, Abbott Laboratories, Abbot Park, IL),<sup>15</sup> and FK blood levels were measured by enzyme immunoassay (Imx Tacrolimus assay, Abbott Laboratories).<sup>16</sup>

### **Endothelin-1 Assays**

Endothelin-1 was measured in extracted plasma by a specific radioimmunoassay according to the following protocol: 5 mL of blood were simultaneously collected from the coronary sinus and the aorta in EDTA-containing tubes and centrifuged at 1800 g for 20 minutes. SepPak C18 cartridges (Waters, Mississauga, Ontario, Canada) activated with methanol, 8M urea, and water were used for plasma extraction. Endothelin was eluted using 100% methanol, reconstituted in assay buffer, and assayed by a double-antibody radioimmunoassay according to manufacturer's recommendations (Peninsula Laboratories). Cross-reactivities of the radioimmunoassay were 10% for big endothelin and 5% for endothelin-3. The assay sensitivity was 0.12 pg/tube, with inter- and intra-assay coefficients of variation of 9% and 12% respectively.

### **Tissue Acquisition**

Intramyocardial biopsies were obtained by using a standard biotom (Tru-cut biopsy needle, Baxter) after IC infusion of CSA and/or FK. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen. In all of the data presented, the pretreatment biopsies were used as each subject own control, thus allowing for paired comparisons.

### Membrane Preparation

Tissues were minced with scissors and homogenized with a 10-second burst of a polytron homogenizer set at high speed in the following buffer: 5 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 2 mmol/L EDTA, 5 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor, and 10 µg/mL benzamidine, 200 µmol/L PMSF (4°C). The lysates were centrifuged 5 minutes at 1000x g and filtered through four layers of gauze. The supernatant was then centrifuged at 4°C (Sorvall Dupont RC26) for 20 minutes at 40000x g. The pellets were washed twice in the same buffer, resuspended in 0.5 mL of buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mmol/L EDTA, 5 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor, and 10 µg/mL benzamidine, 200 µmol/L PMSF (4°C); 200 µL were kept frozen to measure the GTPase activity. The 300 mL remaining were completed at 10 mL with the same buffer and centrifuged again. The pellet was resuspended in a buffer containing 250 mmol/L sucrose, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L HEPES, pH 7.4, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor, 200 µmol/L PMSF and 10 µg/mL benzamidine (4°C) and immediately frozen for adenylyl cyclase activity as described below. Protein content was determined according to the method of Bradford (Bio-Rad).<sup>17</sup>

### Adenylyl Cyclase Activity

Adenylyl cyclase activity was measured according to the method of Salomon et al<sup>18</sup>. Briefly 5 µg of membrane proteins were added in a total volume of 50 µL. The incubation mixture included 120 µmol/L ATP, 1 µCi (alpha 32P)-ATP, 100 µmol/L cAMP, 53 µmol/L GTP, 2.8 mmol/L phosphoenolpyruvate, 0.2 U of pyruvate kinase, 1 U of myokinase, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mmol/L EDTA, and 0.1 mmol/L isobutylmethylxanthine.

Reactions were initiated by the addition of the membranes and the assay mixture was incubated for 15 minutes at 37°C. Reactions were terminated by the addition of 1 mL of an ice-cold solution containing 0.4 mmol/L ATP, 0.3 mmol/L cAMP and (<sup>3</sup>H) cAMP (100 000 dpm). The (<sup>32</sup>P) cAMP was isolated by sequential chromatography on a Dowex cation exchange resin and aluminium oxide. Enzyme activity was determined in duplicate in the absence (basal activity) or in the presence of activators (forskolin 100 µmol/L).

### **GTPase Activity**

Approximately 10 µg of membrane proteins were added in a total volume of 100 µL. The incubation mixture included 1 mmol/L App (NH)P, 1 mmol/L ATP, 1 mmol/L ouabain, 10 mmol/L creatine phosphate, 2.5 U/mL creatine phosphokinase, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L dithiothreitol, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.5 µmol/L of GTP and 0.5 µCi gamma (<sup>32</sup>P) GTP. Reactions were initiated by the addition of the membranes and the assay mixture was incubated for 20 minutes at 37°C. Reactions were terminated by the addition of 900 µL of an ice-cold solution containing 5% (w/v) activated charcol slurry in 20 mmol/L phosphoric acid (pH 2.3). The tubes are then centrifuged at 12000 g for 20 minutes at 4°C and 500 µL aliquots of the supernatant fluid are removed and counted.

### **Drugs**

Drugs used were cyclosporin A, 20 mg diluted in 20 mL saline and IC infused over a period of 20 minutes (sandimmune i.v. Sandoz), tacrolimus 0.05 mg/kg diluted in 20 mL saline and IC infused over a period of 20 minutes. Boluses of nitroglycerine 1.7 µg/kg (nitroject 5 mg/mL,

Omega), 5-hydroxytryptamine 1 µg/kg, acetylcholine 30 µg/kg, adenosine 100 µg/kg, bradykinin 200 µg/kg, and substance P 1 µg/kg (Sigma), were diluted in 2 mL saline and IC injected. A 20 minutes stabilisation period of CBF was allowed between different administration protocols.

### **Experimental Protocol**

Eight groups of animals were used. In the first group (n=13) Ser (1 µg/kg), BK (200 ng/kg) and SP (1 ng/kg) were injected directly into the LAD before and after IC infusion of CSA and L-arg. In the second group (n=6) endothelin-1 blood levels were measured before and after CSA. In the third group (n=9) Ach (30 ng/kg), Ade (100 ng/kg) and NTG (1.7 µg/kg) and in the fourth group (n=8) Ser, BK, and SP (in doses similar to group 1) were IC injected before and after infusion of FK and L-arg. The fifth (n=8) and the sixth (n=8) groups served as control groups where Ach, Ade, and NTG and Ser, BK, and SP (similar doses to groups 1 and 3) were IC injected in three time series respectively, to confirm the specific vascular response to each agent used. In the seventh group cAMP generation (n=7) and GTPase activity (n=4) were measured before and after CSA IC infusion. In the eighth group cAMP generation (n=6) and GTPase activity (n=4) were measured before and after FK IC infusion.

MAP and CBF of LAD and Cx were allowed to stabilize before drug administration. Drugs were diluted in normal saline and injected at 37°C. The sequence of drug administration was randomized to eliminate any confounding factor in each group of experiments.

All animals were treated in accordance with the guide for care and use of laboratory animals published by the National Institute of Health (NIH, publication no. 85-23, revised 1985).

## Statistics

Maximal changes in CBF and in hemodynamic parameters, values of endothelin-1 before and after CSA, and values of cAMP generation and GTPase activity before and after CSA and FK infusions were analyzed with Student *t* test for paired data. Responses to and maximal changes with Ach, Ade, and NTG or Ser, BK, and SP before and after infusions of CSA, FK and L-arg were compared by one-way analysis of variance for repeated measures and by the Student-Newman-Keuls post-test. A two-side significance level at  $P < .05$  was considered statistically significant. Results were expressed as mean  $\pm$  standard error.

## Results

### Effects of IC Infusion of CSA and L-arg

CSA significantly decreased CBF of LAD from  $8.2 \pm 1.5$  to  $3 \pm 1$  mL/min ( $P = .0001$ ), a maximal decrease of  $64 \pm 18\%$ . CSA IC infusion decreased MAP from  $106 \pm 5.7$  to  $83.8 \pm 4.9$  mm Hg ( $P = .01$ ). CSA blood levels in the coronary sinus averaged  $1250 \pm 0$  nmol/L at the end of CSA infusion. Heart rate, CSP, dP/dt and CBF of Cx remained stable during IC infusion of CSA. L-arg IC infusion significantly increased CBF of Cx from  $24 \pm 1.7$  to  $28 \pm 1.8$  mL/min ( $P = .01$ ) and the dP/dt from  $1621 \pm 163$  to  $2000 \pm 190$  mm Hg/s ( $P = .04$ ). L-arg did not cause any significant changes in other hemodynamic variables. The peak reactive hyperemic blood flow rate after 20 seconds of coronary occlusion was decreased by CSA in the LAD (from  $584 \pm 86\%$  to  $296 \pm 97\%$ ,  $P = .058$ ) and in the Cx (from  $344 \pm 34\%$  to  $216 \pm 40.5\%$ ,  $P = .01$ ).

### Effects of Ser, BK, and SP Before and After CSA

Ser significantly increased MAP (from  $84 \pm 5.6$  to  $100 \pm 8.3$  mm Hg after CSA;  $P=.03$ , and from  $80 \pm 3.6$  to  $92 \pm 6.9$  mm Hg after L-arg;  $P=.02$ ) and dP/dt (from  $1720 \pm 238.6$  to  $2280 \pm 216$  mm Hg/s after CSA;  $P=.01$ ), and SP significantly increased MAP (from  $77 \pm 5.6$  to  $83 \pm 4.4$  mm Hg after CSA;  $P=.04$ , and from  $75 \pm 3.6$  to  $84 \pm 6.1$  mm Hg after L-arg;  $P=.04$ ) and dP/dt (from  $1787 \pm 193.6$  to  $2049 \pm 207.5$  mm Hg/s after L-arg;  $P=.03$ ). The maximal changes in CBF of the LAD with Ser averaged  $34.2 \pm 6.1$  mL/min before CSA and  $19.5 \pm 3.6$  mL/min after CSA, a significant difference ( $P=.001$ ) (Table 1). After L-arg, the maximal change in CBF with Ser averaged  $14.5 \pm 2.6$  mL/min, a non-significant difference compared with the response to CSA ( $P=NS$ ) (Table 1). The maximal change in CBF of the LAD with BK averaged  $27.2 \pm 6.6$  mL/min before and  $13.2 \pm 2.9$  mL/min after CSA, a significant difference ( $P=.02$ ) (Table 1). After L-arg, the maximal change in CBF with BK averaged  $12.1 \pm 2.4$  mL/min, a non-significant difference compared with the response to CSA ( $P=NS$ ) (Table 1). The maximal changes in CBF of the LAD with SP averaged  $22.8 \pm 4.2$  mL/min before and  $7 \pm 2.1$  mL/min after CSA, a significant difference ( $P=.0001$ ) (Table 1). After L-arg, the maximal change in CBF with SP averaged  $8.5 \pm 1.7$  mL/min, a non-significant difference compared with the response with CSA ( $P=NS$ ) (Table 1). The maximal change in CBF of Cx with SP averaged  $22.7 \pm 5.2$  mL/min before and  $6.4 \pm 1.6$  mL/min after CSA, a significant difference ( $P=.01$ ) (Table 1).

### Effects of CSA on Endothelin-1 Levels

CSA did not influence the production of endothelin-1 in the arterial circulation ( $0.61 \pm 0.06$  pg/mL before CSA and  $0.66 \pm 0.1$  pg/mL after CSA;  $P = .59$ ) and in the coronary sinus ( $0.35 \pm 0.09$  pg/mL before CSA and  $0.62 \pm 0.3$  pg/mL after CSA;  $P = .41$ ).

### Effects of IC Infusion of FK and L-arg

Hemodynamic variables and CBF of LAD and Cx remained stable during IC administration of FK in the third and fourth groups of animals. FK blood levels in the coronary sinus averaged 60  $\mu$ g/L at the end of infusion in both groups. The hyperemic response to ischemia averaged  $513 \pm 88.3\%$  before and  $238 \pm 65.3\%$  after FK in the LAD ( $P = .01$ ) and the increase in CBF of Cx averaged  $291 \pm 38.3\%$  before and  $261 \pm 44.3\%$  after FK ( $P = .6$ ) in the third group of animals ( $n = 9$ ), and similar results were obtained in animals of group 4, ( $n = 8$ ).

### Effects of Ach, Ade, and NTG Before and After FK

In the third group ( $n = 9$ ), the maximal change in CBF of the LAD with Ach averaged  $12.7 \pm 2.1$  mL/min before and  $5 \pm 1.3$  mL/min after FK, a significant difference ( $P = .001$ ) (Table 2). After L-arg the maximal change in CBF with Ach averaged  $5.1 \pm 1$  mL/min, a non-significant difference compared with the response with FK ( $P = \text{NS}$ ) (Table 2). The maximal change in CBF of the LAD with Ade averaged  $21.2 \pm 4.6$  mL/min before and  $13 \pm 2.6$  mL/min after FK, a significant difference ( $P = .006$ ) (Table 2). After L-arg, the maximal change in CBF with Ade averaged  $10.8 \pm 2.7$  mL/min, a non-significant difference compared with the response with FK ( $P = \text{NS}$ ) (Table 2). The maximal change in CBF of the LAD with NTG averaged  $20.9 \pm 3.3$  mL/min before

and  $10.8 \pm 2.7$  mL/min after FK, a significant difference ( $P=.01$ ) (Table 2). After L-arg, the maximal change in CBF with NTG averaged  $13 \pm 3.1$  mL/min, a non-significant difference compared with the response with FK ( $P=NS$ ) (Table 2). The maximal changes in CBF of Cx with Ach, Ade, and NTG were not significant before and after FK and L-arg (Table 2). Heart rate, MAP, CSP and LV dP/dt remained stable during infusion of FK, Ach, Ade and NTG in the LAD.

#### **Effects of Ser, BK, and SP Before and After FK**

In the fourth group ( $n=8$ ), maximal changes in CBF of LAD and Cx with Ser, BK, and SP were not significant before and after FK and L-arg (Table 3). Heart rate, MAP, CSP and LV dP/dt remained stable during infusion of FK, L-arg, Ser, BK and SP in the LAD.

#### **Effects of Consecutive Injections of Vasorelaxing Agents**

In the fifth ( $n=8$ ) and in the sixth ( $n=8$ ) groups of animals, the maximal changes in CBF of LAD in response to three successive series of IC injections of Ach, Ade, and NTG (Fig 1) and Ser, BK, and SP (Fig 2) respectively, did not reveal any significant difference.

#### **Effects of CSA and FK on cAMP Generation and GTPase Activity**

There was no significant changes in basal cAMP generation before ( $8.16 \pm 12.6$  pmol/min/mg protein) and after CSA ( $6.99 \pm 0.36$  pmol/min/mg protein) (seventh group,  $n=7$ ), and before ( $9.89 \pm 2.57$  pmol/min/mg protein) and after FK infusion ( $7.43 \pm 1.55$  pmol/min/mg protein) (eighth group,  $n=6$ ). Forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity increased significantly after CSA ( $72.6 \pm 9.6$  before and  $96.3 \pm 5.9$  pmol/min/mg protein after CSA;  $P=.003$ ), and did not change after

FK ( $65.7 \pm 7.1$  before and  $74.4 \pm 9.7$  pmol/min/mg protein after FK). There was a significant difference between the increase of GTPase activity after CSA ( $249.8 \pm 49.3\%$ ; seventh group,  $n=4$ ) and after FK ( $84.2 \pm 13.8\%$ ; eighth group,  $n=4$ ) ( $P=.018$ ) (Fig 3).

### Discussion

The present study confirms that CSA causes coronary artery vasoconstriction and demonstrates that the vasorelaxant effect of Ser, BK, and SP is attenuated following CSA treatment, and did not recover after L-arg. The advantage of using Ach, Ade, NTG, Ser, BK and SP in the current study, resulted from their short duration of action which yielded a brief injection protocol, limited adverse effects and enhanced study efficiency. The coronary vasoconstrictor effect of CSA is consistent with previous studies in our laboratory<sup>6,19</sup> as well as with studies reported by others.<sup>5</sup> Our data showed that CSA did not influence peripheral and myocardial endothelin release. Similar results have been reported by Sudhir et al.<sup>8</sup> They investigated the effects of acute CSA administration on coronary endothelial function in a canine model, and founded that CSA did not result in any peripheral or myocardial elevation of endothelin levels. In contrast, CSA has been reported to affect the release and production of endothelin as a consequence of its vasoconstrictor effect. Carrier et al<sup>20</sup> demonstrated an increase in endothelin blood levels after CSA administration in dog's renal arteries. Bunchman et al<sup>21</sup> reported similar results on cultured human endothelial cells. Thus, in our study CSA-induced coronary artery vasoconstriction is not mediated by endothelin release. Since L-arg did not restore coronary vasorelaxation after CSA, it is conceivable that CSA toxicity may result from receptor-mediated mechanism.

Endothelial toxicity has been reported with CSA.<sup>4,5</sup> The endothelium of arterial wall is a source of several mediators of vasodilation, including prostacyclin, nitric oxide (NO) and endothelium-dependent hyperpolarizing factor (EDHF).<sup>22</sup> BK causes an endothelium-dependent relaxation in many blood vessels through B<sub>2</sub>-kinin receptor subtypes.<sup>23,24</sup> Thus, the suppressed vasorelaxation of BK observed in our study after CSA and L-arg could be the result of kinin-receptor dysfunction by CSA. The effects of CSA on tachykinin receptors were further investigated by testing the vasorelaxant effect of SP. Coronary vasodilator action of SP is endothelium-dependent and is mediated by tachykinin NK<sub>1</sub> receptor subtypes located on endothelial cells.<sup>25</sup> The suppressed vasorelaxation to SP after CSA and L-arg observed in this study is analogous to the observation made recently by Gitter et al<sup>26</sup> where they demonstrated a novel pharmacological profile of CSA, as tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonist. Our data showed that the vasodilator effect of Ser was impaired after CSA and was not restored after L-arg. Ser is a monoamine evoking coronary endothelium-dependent relaxation through 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes, whose effects are mediated via GP activation.<sup>27</sup> Unlike BK and SP, Ser does not evoke EDHF release and does have a direct effect on vascular smooth muscle.<sup>28</sup> Thus, as we have shown previously, CSA vascular toxicity could be mediated by both endothelium-dependent and myogenic mechanisms, most likely receptor-mediated.

The present study demonstrates that FK IC administration does not affect coronary blood flow. Like CSA<sup>6</sup> the coronary vasorelaxation with Ach, Ade, and NTG was impaired after FK and was not restored after L-arg. Although, contrary to CSA, FK administration did not affect Ser, BK, and SP-induced coronary relaxation. Our data show that differences of action between CSA and FK exist at the GP receptor level specifically, concerning cAMP formation and GTPase

activity. All experiments on cAMP formation reported here were carried out in the presence of blockers of phosphodiesterase, and hence the effects observed related to changes in the rate of synthesis of cAMP rather than to its degradation.

GP-mediated signal transduction begins by specific activation of a receptor by an agonist. This activated receptor is able to interact with the heterotrimeric, guanosine-diphosphate (GDP)-bound form of  $G\alpha$ .<sup>29,30</sup> The interaction of the activated receptor and GP leads to the exchange of GDP for guanosine-triphosphate (GTP) on the  $G\alpha$  subunit resulting in the dissociation of  $G\alpha$  from  $G\beta\gamma$ , as well as from the activated receptor.  $G\alpha$ -GTP is then able to bind and regulate the appropriate effector system, and in some cases  $G\beta\gamma$  also regulates effector activity of the  $\alpha$  subunit; the system is inactivated when the intrinsic GTPase activity of the  $\alpha$  subunit hydrolyses the GTP to GDP, the dissociated subunits reassociate, and the system returns to its resting state.<sup>29,30</sup> Thus, the GTPase activity of the  $\alpha$  subunit is the inactivation mechanism, and it is a direct measure of receptor stimulation of GP. Accordingly, the increase in GTPase activity following CSA treatment, was associated by concordant increase in forskolin-stimulated cAMP formation, indicating that CSA is able to stimulate GP regulatory cycle, and to upregulate the effector system. Although, cAMP stimulation is known to elicit a rise of  $Ca^{2+}$ , which is largely derived from extracellular pool by influx through dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  channels.<sup>31</sup> Hence, these data corroborate our results, regarding CSA-mediated coronary vasoconstriction. Similar results have been obtained by Martin et al,<sup>32</sup> who concluded that CSA increased cAMP production by a non-competitive inhibition of phosphodiesterase activity. Wenzel-Seifert et al<sup>33</sup> also found that FK, at supratherapeutic concentrations, partially inhibits neutrophil activation through a mechanism which is rapid in onset and does not involve inhibition of agonist binding to

peptide receptors, interference with GP or protein kinase C or changes in physical membrane state.

Despite reported differences between CSA and FK, both drugs share some common properties. The University of Pittsburgh group reported that combined use of FK and CSA increases adverse effects, like nephrotoxicity.<sup>34</sup> FK could cause an increase in serum creatinine concentrations, similar to those caused by CSA, probably secondary to a decrease in glomerular filtration.<sup>35</sup> CSA and FK have been shown to suppress serum nitrite and nitrate to control levels in graft-rejecting rats.<sup>7</sup> Akita et al<sup>4</sup> reported that, in monocultures of vascular smooth muscle and in murine macrophage cell lines, CSA and FK suppress iNOS induction stimulated by individual cytokines or lipopolysaccharides. CSA was active in suppressing iNOS at therapeutic concentrations and was more potent than FK in those cell lines. These results suggest that CSA has a specific action on iNOS activity that is not shared by FK. Sun et al<sup>36</sup> reported that FK, unlike CSA, did not adversely affect blood flow or absorption in small intestinal transplants in rats. However, like CSA, FK potently inhibits the production of leukotrienes.<sup>37</sup> Hamasaki et al<sup>38</sup> found that FK inhibits the production of peptide leukotrienes 4 and 5 and 5-HETE activity in intact cells.

The reactive hyperemic responses to ischemia were shown to be decreased after CSA and FK. CSA also decreases the reactive hyperemia in isolated renal arteries.<sup>39</sup> Reactive hyperemia after brief coronary occlusion is considered to be mediated mainly by endothelium-dependent and myogenic mechanisms.<sup>40,41</sup> These observations confirm that both endothelium-dependent and myogenic mechanisms are involved in CSA and FK-mediated vascular toxicity.

Certain limitations of the present study deserve emphasis. First, we studied the acute effect of CSA and FK on coronary endothelial function, chronic exposure could result in different dysfunctions. Second, it could be of interest to study adenylyl cyclase and GTPase activities in the coronary artery wall rather than in the myocardium, although levels were obtained before and after CSA and FK administration in each experiment.

Our results suggest that FK, unlike CSA, does not cause coronary artery vasoconstriction, although, the endothelium-dependent and myogenic coronary vasorelaxation are attenuated after CSA and FK, most probably through receptor-mediated mechanisms. CSA, but not FK, interferes with adenylyl cyclase activity and the functioning of GP.

### **Acknowledgments**

Dr A. Khalil was supported by the Medical Research Council of Canada. We thank Pierre Thai for his excellent technical assistance.

### References

1. Liu J, Farmer Jr JD, Lane W, Friedmann J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991;66:807-815.
2. Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Takabu F. Novel immunosuppressive agent FK506: in vitro effects on the cloned T-cell activation. *J Immunol*. 1987;139:1797-1803.
3. Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V, Fung J, Jensen C, Tzakis A, McCauley J, Carroll P, Ricordi C, Demetris AJ, Mitchell S, Jain A, Iwaki Y, Kobayashi M, Reyes J, Todo S, Hakala TR, Simmons RL, Starzl T. FK506 in clinical kidney transplantation. *Transplant Proc*. 1991;23:3065-3067.
4. Akita K, Dusting GJ, Hickey H. Suppression of nitric oxide production by cyclosporin A and FK506A in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1994;21:231-233.
5. Gallego MJ, Garcia Villalón A, López Farre AJ, García JL, Garrón MP, Casado S, Hernando L, Caramelo CA. Mechanisms of the endothelial toxicity of cyclosporin A. *Circ Res*. 1994;74:477-484.
6. Khalil A, Carrier M, Latour JG, Pelletier LC. Cyclosporin A-induced coronary artery vasoconstriction through myogenic and endothelium-dependent mechanisms. *Circulation*. 1996;94(suppl II):308-311.
7. Langrehr J, Muller A, Hoffman RA, Simmons RL, Schraut WH, Neuhaus P. Nitric oxide synthesis during rejection of orthotopic small bowel allografts is not a strain-specific phenomenon. *Transplant Proc*. 1993;25:2669.

8. Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, De Groot CJM, Taylor RN, Chou TM, Yock PG, Chatterjee K. Cyclosporine impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation*. 1994;90:3018-3023.
9. Sherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RSA, Ring S, Hanson P, Mohanty PK, Victor RG. Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med*. 1990;323:693-699.
10. Shibata T, Ogawa N, Koyama I, Kaneko N, Hokazono K, Omoto R. Does FK506 accelerate the development of coronary artery disease in transplanted hearts as well as native heart. *Transplant Proc*. 1993;25:1145-1148.
11. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin. *Drugs*. 1993;45:953-1040.
12. Haverich A, Costard-Jäckle A, Cremer J, Herrmann G, Simon R. Cyclosporin A and transplant coronary disease after heart transplantation: facts and fiction. *Transplant Proc*. 1994;26:2713-2715.
13. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Ludmer PL, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1990;81:491-497.
14. Yeung AC, Anderson TJ, Meredith IT, Uehata A, Ryan TJ, Selwyn AP, Mudge GH, Ganz P. Endothelial dysfunction in the development and detection of transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11:569-573.
15. The Hawk's Cay Meeting. Consensus document: Hawk's Cay meeting on therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc*. 1990;22:1357-1361.

16. Tamura K, Kobayashi M, Hashimoto K, Kojima K, Nagase K, Iwasaki K, Kaizu T, Tanaka H, Niwa M. A highly sensitive method to assay FK506 levels in plasma. *Transplant Proc.* 1987;19(suppl 6):23-29.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
18. Salomon Y. Adenylate cyclase assay. *Adv Cyclic Nucl Res.* 1979;10:35-55.
19. Khalil A, Carrier M, Latour JG, Pelletier LC. La cyclosporine A diminue le débit coronarien chez le chien. *Ann Chir.* 1995;49:689-693.
20. Carrier M, Tronc F, Stewart D, Pelletier LC. Dose-dependent effect of cyclosporin on renal arterial resistance in dogs. *Am J Physiol.* 1991;261:H1791-H1796.
21. Bunchman TE, Brookshire CA. Cyclosporin stimulated synthesis of endothelin by human endothelial cells in tissue culture. *Kidney Int.* 1990;37:365A. Abstract.
22. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988;93:515-524.
23. Schini VB, Boulanger C, Regoli D, Vanhoutte PM. Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252:1197-1201.
24. Toda N, Bian K, Akiba T, Okamura T. Heterogeneity in mechanisms of bradykinin action in canine isolated blood vessels. *Eur J Pharmacol.* 1987;135:321-329.
25. Stewart-Lee A, Burnstock G. Actions of tachykinins on the rabbit mesenteric artery: substance P and [Glp<sup>6</sup>,L-Pro<sup>9</sup>] SP<sub>6-11</sub> are potent agonists for endothelial neurokinin-1 receptors. *Br J Pharmacol.* 1989;97:1218-1224.

26. Gitter BD, Waters DC, Threlkeld PG, Lovelace AM, Matsumoto K, Bruns RF. Cyclosporin A is a substance P (tachykinin NK<sub>1</sub>) receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1995;289:439-446.
27. Cohen R, Sheperd J, Vanhoutte PM. 5-HT can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol.* 1983;245:H107-H1080.
28. Moore LK, Burt JM. Gap junction function in vascular smooth muscle: influence of serotonin. *Am J Physiol* 1995;269:H1481-H1489.
29. Carty DJ, Padrell E, Codina J, Birnbaumer L, Hildebrandt JD, Iyengar RJ. Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three Gi proteins. *J Biol Chem.* 1990;265:6268-6273.
30. Linder ME, Ewald DA, Miller RJ, Gilman AG. Purification and characterization of G<sub>oα</sub> and three types of G<sub>iα</sub> after expression in Escherichia Coli. *J Biol Chem.* 1990;265:8243-8251.
31. Antoni FA, Hoyland J, Woods MD, Mason WT. Glucocorticoid inhibition of stimulus-evoked adrenocorticotrophin release caused by suppression of intracellular calcium signals. *J Endocrinol.* 1992;133:R13-R16.
32. Martin EF, Bedoya F. Effects of cyclosporine A on cyclic AMP generation and GTP-binding proteins in isolated islets. *Biochem Pharmacol.* 1992;44:359-364.
33. Wenzel-Seifert K, Seifert R. Partial inhibition of human neutrophil activation by FK506 at supratherapeutic concentrations. *Naunyn-Schmeideberg's Arch Pharmacol.* 1993;348:7-13.
34. Fung JJ, Todo S, Tzakis A, Demetris A, Jain A, Abu-Elmagd K, Alessiani M, Starzl TE. Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK 506-based immunosuppression: benefits and pitfalls. *Transplant Proc.* 1991;23:14-21.

35. McCauley J, Fung S, Jain A, Todo S, Starzl TE. The effects of FK 506 on renal function after liver transplantation . *Transplant Proc.* 1990;22(suppl):17-20.
36. Sun S, Katz SM, Schechner RS, Tellis VA, Greenstein SM. Effect of tacrolimus on hemodynamics and absorption of experimental small intestinal transplants. *Transplantation.* 1996;61:1447-1450.
37. Cirillo R, Triggiani M, Siri L, Ciccarelli A, Petit GR, Condorelli M, Marone G. Cyclosporin A rapidly inhibits mediator release from human basophils presumably by interacting with cyclophilin. *J Immunol.* 1990;144:3891-3897.
38. Hamasaki Y, Kobayashi I, Matsumoto S, Zaitu M, Muro E, Ichimaru T, Miyazaki S. Inhibition of leukotriene production by FK506 in rat basophilic leukemia-1 cells. *Pharmacology.* 1995;50:137-145.
39. Barthelmebs M, Billing A, Stephan D, Krieger JP, Grima M, Imbs JL. Modification de la réactivité vasculaire rénale endothélium-dépendante par la ciclosporine A. *Arch Mal Cœur.* 1993;86:1233-1235.
40. Kurz MA, Lamping KG, Bates JN, Eastham CL, Marcus ML, Harrison DG. Mechanisms responsible for the heterogeneous coronary microvascular response to nitroglycerin. *Circ Res.* 1991;68:847-855.
41. Kostic MM, Schrader J. Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ Res.* 1992;70:208-212.

### Figure Legends

- Figure 1. Maximal changes in coronary blood flow of the left anterior descending coronary artery (LAD) in the fifth group (n=8).
- Figure 2. Maximal changes in coronary blood flow of the left anterior descending coronary artery (LAD) in the sixth group (n=8).
- Figure 3. The GTPase activity after cyclosporin A and tacrolimus.

**TABLE 1. Maximal Changes in Coronary Blood Flow in the First Group (n=13)**

	LAD Flow (mL/min)	Cx Flow (mL/min)
	$\Delta$	$\Delta$
<b>Control</b>	0	0
Serotonin	34.2±6.1	36.2±10.8
Bradykinin	27.2±6.6	19.5±3.4
Substance P	22.8±4.2	22.7±5.2
<b>Cyclosporin A</b>	-5.2±1	-3.3±1.5
Serotonin	19.5±3.6*	31.7±9.7
Bradykinin	13.2±2.9**	24.3±6.3
Substance P	7±2.1†	6.4±1.6‡
<b>L-arginine</b>	0	4.3±1.4
Serotonin	14.5±2.6*	36.1±8.5
Bradykinin	12.1±2.4**	14.4±4.6
Substance P	8.5±1.7†	14.4±4.4

LAD indicates left anterior descending; Cx, circumflex; and  $\Delta$ , maximal changes values. Data are presented as mean±standard error.

\*  $P=.001$  vs serotonin control

\*\*  $P=.02$  vs bradykinin control

†  $P=.0001$  vs substance P control

‡  $P=.01$  vs substance P control

**TABLE 2. Maximal Changes in Coronary Blood Flow in the Third Group (n=9)**

	LAD Flow (mL/min)	Cx Flow (mL/min)
	$\Delta$	$\Delta$
<b>Control</b>	0	0
Acetylcholine	12.7±2.1	5.2±1.7
Adenosine	21.2±4.6	20.2±10.2
Nitroglycerin	20.9±3.3	13.3±4.4
<b>Tacrolimus</b>	0.22±1.2	-1.4±1.1
Acetylcholine	5±1.3*	3.7±1.5
Adenosine	13±2.6**	10.8±4.5
Nitroglycerin	10.8±2.7†	11.4±4.4
<b>L-arginine</b>	8±5.6	1.4±0.4
Acetylcholine	5.1±1*	3.6±1.2
Adenosine	10.8±2.7**	12.8±6.5
Nitroglycerin	12.9±3.1†	20±8

LAD indicates left anterior descending; Cx, circumflex; and  $\Delta$ , maximal changes values. Data are presented as mean±standard error.

\*  $P=.001$  vs acetylcholine control

\*\*  $P=.006$  vs adenosine control

†  $P=.01$  vs nitroglycerin control

**TABLE 3. Maximal Changes in Coronary Blood Flow in the Fourth Group (n=8)**

	<b>LAD Flow (mL/min)</b>	<b>Cx Flow (mL/min)</b>
	$\Delta$	$\Delta$
<b>Control</b>	0	0
Serotonin	26.3±6	80.9±16.5
Bradykinin	13.9±2.4	26.9±8.6
Substance P	13.5±3.8	3.9±1.6
<b>Tacrolimus</b>	-1.5±2	4.9±2.4
Serotonin	26.8±6.9	87.6±14.7
Bradykinin	6±1.3	10.8±5.3
Substance P	14.1±3.8	22.1±13
<b>L-arginine</b>	3.4±1.6	2.9±1.2
Serotonin	17±5.8	61±15.9
Bradykinin	14±5	28.3±7.9
Substance P	7.9±1.6	8.1±2.7

LAD indicates left anterior descending; Cx, circumflex; and  $\Delta$ , maximal changes values. Data are presented as mean±standard error.

FIGURE 1

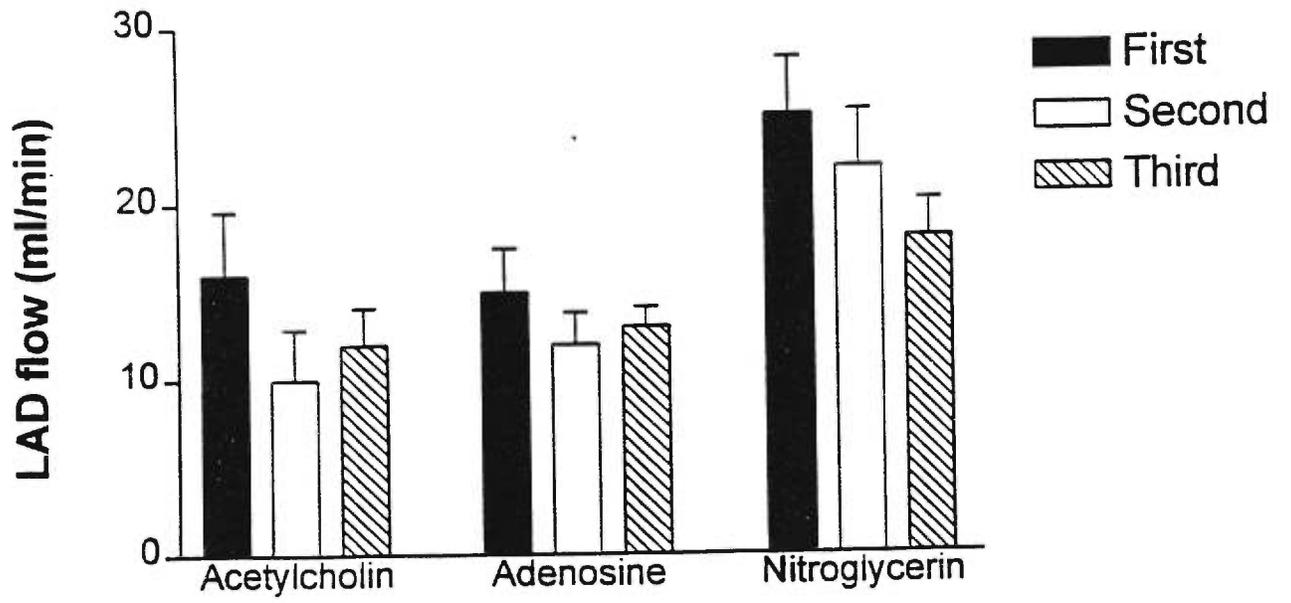


FIGURE 2

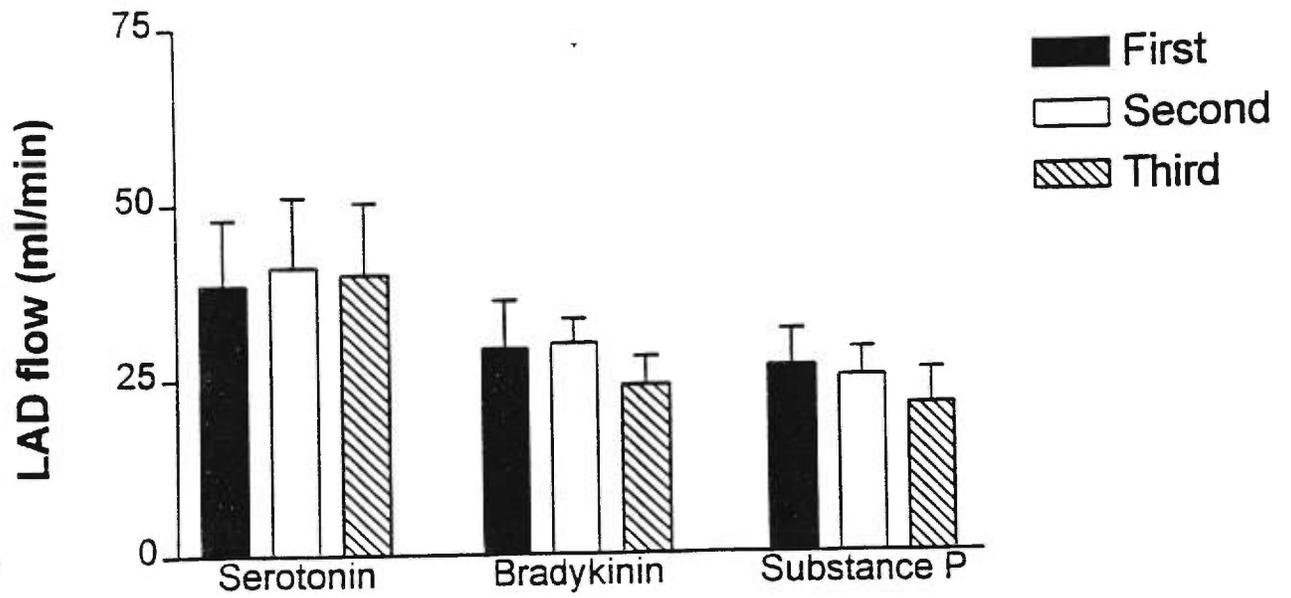
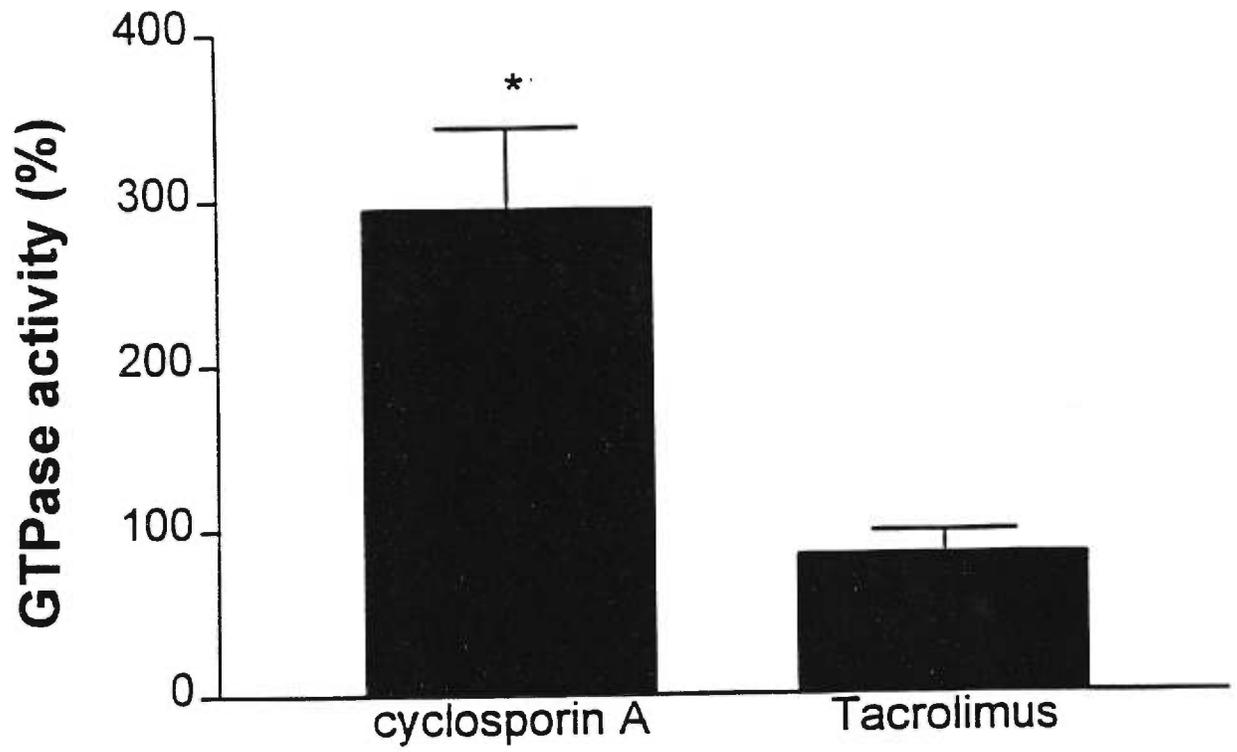


FIGURE 3



---

## Chapitre 11

### Discussion

L'utilisation de la CSA a permis d'améliorer nettement la survie des patients transplantés en diminuant les phénomènes de rejet mais en causant plusieurs effets secondaires, comme l'hypertension artérielle et la néphrotoxicité. Cependant, malgré cette amélioration dans les résultats cliniques à court terme, le pronostic à long terme reste lourdement grevé par l'apparition de coronaropathies, cause essentielle de la défaillance des greffons. La CSA n'a pas diminué l'incidence de survenue de ces lésions coronaires tandis que la survie plus prolongée des patients permet à cette coronaropathie de s'exprimer.

Dans la première partie de cette étude nous avons démontré que l'administration intracoronarienne de la CSA induit une vasoconstriction coronarienne significative. Aucun effet vasoconstricteur n'a été noté au niveau de l'artère coronaire circonflexe servant de témoin à l'étude. Les niveaux sanguins intracardiaques de la CSA ont été élevés, atteignant des niveaux thérapeutiques cliniques. Les injections consécutives de 5 et 10 mg de CSA ont causé une diminution semblable du débit sanguin coronarien. Cette diminution ne semble pas être reliée à la dose de CSA administrée.

L'effet vasoconstricteur coronarien de la CSA a été observé dans d'autres études (Gallego et coll. 1994). Cependant, un effet systémique de la CSA sur la circulation coronarienne ne peut pas être exclu. Des études antérieures ont suggéré que la CSA augmente la concentration cytosolique du  $Ca^{2+}$  dans les cellules isolées des muscles lisses. L'augmentation de  $Ca^{2+}$  cytosolique est la conséquence de l'activation de la PLC qui en résulte, par la libération calcique intracellulaire médiée par l'IP<sub>3</sub>, suivie par l'influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire. Le processus de la libération calcique se réalise par l'intermédiaire de la PG, par la modulation rétroactive de la PKC et par la modulation de potentiel membranaire. Goldberg et coll. (1989) ont préincubé des cellules mésangiales

avec la CSA et ils ont observé une légère élévation mais significative dans le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique basale, une augmentation considérable dans la phase pic de la réponse calcique après l'addition d'un vasoconstricteur, et une augmentation similaire dans la phase soutenue de la réponse calcique en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. L'addition d'un agent vasoconstricteur en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire a causé seulement une augmentation dans la phase pic de la réponse calcique (Kremer et coll.1989). Cet effet de la CSA d'augmenter l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  exclu le mécanisme d'inhibition de l'extrusion calcique comme étant le seul mécanisme responsable de l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, et supporte un effet direct de la CSA sur la perméabilité transmembranaire du  $\text{Ca}^{2+}$ .

La dysfonction vasculaire induite par la CSA est multifactorielle et peut être due à plusieurs mécanismes qui affectent les différentes structures vasculaires. Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons démontré que la toxicité vasculaire de la CSA implique à la fois un mécanisme endothélium-dépendant et myogénique. Nous avons démontré aussi que les niveaux d'endothéline plasmatique périphériques et intracardiaques n'ont pas été affectés par la CSA. Dans cette partie, nous avons observé que l'effet vasorelaxateur de l'Ach était similaire avant et après la CSA et celui de l'Ade a diminué après la CSA et il a été restauré après la l-arg. Toutefois, la vasorelaxation induite par la Ser, BK et SP a été supprimée après la CSA et n'a pas été restaurée après l-arg. L'effet de la NTG qui est un donneur direct du NO a été aussi testé et s'est révélé supprimé par la CSA et non rétabli après l-arg. Les résultats de cette partie ont fourni des nouvelles données sur le mécanisme et le rôle endothélial dans la toxicité vasculaire de la CSA.

La toxicité vasculaire de la CSA est bien identifiée dans les études cliniques et expérimentales, soit au niveau de la circulation rénale, hépatique, intestinale ou cardiaque. L'effet nocif vasculaire de la CSA peut être la conséquence de la diminution des médiateurs vasorelaxants comme le NO et la  $\text{PGI}_2$ , ou de

l'augmentation de la formation des agents vasoconstricteurs comme l'endothéline. Diederich et coll (1994) ont conclu que la CSA est capable d'éliminer l'effet vasorelaxant du NO dans les artères mésentériques des rats à travers la production et la libération des radicaux libres. L'administration chronique de la CSA chez les cochons a causé une dysfonction endothéliale au niveau des artères coronaires (Berkenboom et coll.1994). Ainsi, Gallego et coll. (1994) ont observé dans leur étude sur les aortes isolées des rats que l'administration chronique de la CSA a affecté la fonction endothéliale en altérant la relaxation médiée par l'Ach, et en interférant dans le contrôle des concentrations calciques dans les cellules endothéliales. Cette altération de la vasorelaxation a été renversée par la régénération de la GMPc.

Nos données démontrent que l'effet vasorelaxateur de l'Ach n'a pas été affecté par la CSA. L'Ach est un agent vasorelaxateur dépendant de l'endothélium, qui agit en stimulant la formation du NO, et en activant la guanylate cyclase soluble. Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par O'Neil et coll. (1991) qui ont conclu que la CSA ne réduit pas la formation du NO dans les artères coronaires chez l'humain. Par contre Sudhir et coll. (1994) ont démontré que l'administration intraveineuse de la CSA a supprimé la vasorelaxation induite par l'Ach dans la circulation coronarienne et ils ont conclu que la CSA a altéré la libération de NO dans les artères coronaires de conductance et de résistance chez le chien. Toutefois, dans notre étude la vasorelaxation induite par l'Ade a été supprimé après CSA et restauré après l-arg. L'effet endothélium-dépendant de l'Ade a été démontré dans plusieurs études, parmi eux celle de Parent et coll. (1993) qui ont observé que l'Ade est capable de stimuler la formation du NO dans l'endothélium vasculaire, et celle de Kurtz et coll. (1987) qui ont montré une sensibilité accrue dans le couplage entre les récepteurs purinergiques aortiques et la guanylate cyclase. Cependant, cette guanylate cyclase sensible à l'Ade est différente de la forme soluble qui fait médier l'effet vasorelaxant de l'Ach et des nitrates. L'hétérogénéité a été

rapportée dans les formes solubles de l'adénylate cyclase, et c'est possible que les différentes formes soient contrôlées par des mécanismes différents (Yuen et coll.1990, Chajlani et coll.1991). Ainsi, cette différence dans l'effet de la CSA sur l'effet vasorelaxant de l'Ach et de l'Ade peut être due à l'activation d'une forme spécifique de la phosphodiesterase ; celle-ci a été identifiée sous cinq différentes familles, l'une d'elles est spécifique à la GMPc (Beavo 1990).

Dans notre étude, l'effet de la CSA sur les muscles vasculaires lisses a été aussi examiné en mesurant l'effet vasorelaxant coronarien de la NTG, lequel est un agent endothélium-indépendant qui agit en augmentant la GMPc. Nos données montrent que la vasorelaxation induite par la NTG a été altérée après CSA et non restaurée après l-arg.

L'effet de la CSA sur les récepteurs kininergiques, tachykininergiques et serotoninergiques a été aussi étudié. Nos résultats démontrent que la vasorelaxation coronarienne induite par la 5-HT, la SP et la BK a été supprimée après CSA et non rétablie après l-arg, ce qui indique que la CSA possède un effet spécifique et différentiel sur les différents récepteurs endothéliaux. La SP est connue pour son effet vasorelaxant endothélium-dépendant sur les artères coronaires réalisé à travers les récepteurs tachykininergiques de type NK1. Ces résultats concernant l'effet de la CSA sur la vasorelaxation coronarienne induite par la SP, corroborent avec ceux de Gitter et coll. (1995). Ces auteurs ont démontré une nouvelle propriété pharmacologique de la CSA comme étant un antagoniste des récepteurs tachykininergiques de type NK1. Ainsi, différemment de la BK et de la SP, la 5-HT possède non seulement un effet vasorelaxant endothélium-dépendant, mais aussi un effet direct sur les muscles vasculaires lisses, ce qui confirme la dualité de l'effet nocif de la CSA soit au niveau endothélial et soit au niveau musculaire lisse.

La toxicité vasculaire de la CSA peut être aussi le résultat de la production et la libération des agents vasoconstricteurs, comme l'endothéline. Nos données démontrent que la CSA n'a pas affecté les concentrations plasmatiques de

l'endothéline ni au niveau de la circulation périphérique (intra-aortique), ni au niveau intracardiaque (dans le sinus coronaire). L'endothéline est un peptide vasoconstricteur très puissant qui agit soit à travers les récepteurs ET-A en causant une vasoconstriction, soit à travers les récepteurs ET-B en causant une vasodilatation. Dans tout les tissus, la liaison entre l'endothéline avec ses récepteurs provoque une augmentation des taux du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Cette augmentation des concentrations calciques est la conséquence de l'activation conjointe d'au moins deux systèmes membraneuses, la PKC et l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les canaux calciques. Nos résultats sont analogues avec ceux de Sudhir et coll. (1994). Ces auteurs ont montré que sur les artères coronaires isolées de chien, la CSA a causé une altération dans la libération de NO, et que cette dysfonction endothéliale n'a pas été associée à une élévation dans les concentrations périphériques et intracardiaques de l'endothéline. Par contre, un effet stimulant de la CSA sur la libération d'endothéline a été rapporté (Carrier et coll.1993), et l'administration des anticorps monoclonaux contre l'endothéline a pu renverser l'effet vasoconstricteur de la CSA sur la circulation rénale (Bunchmann et coll.1991). Donc, nos résultats indiquent que l'effet vasoconstricteur coronarien de la CSA n'est pas médié par l'endothéline, mais plutôt par un mécanisme qui influence les récepteurs endothéliaux et myogéniques. Toutefois un effet de la CSA sur le système de formation de NO pourrait être envisagé mais avec beaucoup de précautions en tenant compte de l'effet de l'Ade après CSA et l-arg, mais par contre, ce mécanisme ne pourrait être envisagé si nous tenons compte de l'effet de 5-HT, BK, SP, et NTG après CSA et l-arg.

Dans la quatrième partie de notre étude, nous avons examiné l'effet de l'administration intracoronarienne du FK sur la fonction endothéliale et myogénique des artères coronaires. Le FK est un nouveau agent immunosuppresseur qui malgré sa différence structurale de la CSA, possède de propriétés anti-lymphocytaires similaires. Comme la CSA, le FK inhibe d'une

façon sélective la synthèse de l'IL2. Le FK se lie à la protéine FKBP et inhibe de façon compétitive la calcineurine. Le FK partage plusieurs des effets secondaires avec la CSA comme l'hypertension artérielle, la néphrotoxicité et la maladie coronaire de greffon chez les transplantés cardiaques. Nos résultats démontrent que le FK n'a pas affecté le débit coronaire basal. Contrairement à l'effet vasoconstricteur de la CSA, il a été démontré que le FK ne cause pas une vasoconstriction systémique (revue dans Nossal 1991), aussi Benigni et coll. (1992) ont observé que le FK n'a pas induit la libération des médiateurs vasoactifs et n'a pas augmenté la résistance vasculaire rénale. Ces auteurs ont aussi examiné la génération des métabolites d'acide arachidonique et de l'endothéline par les cultures des cellules endothéliales exposées au FK, et ils ont conclu qu'il n'y avait pas de production significative de thromboxane A2 et d'endothéline dans ces cellules. Toutefois, quand les mêmes cultures cellulaires ont été incubées avec la CSA une augmentation dose-dépendante de thromboxane A2 a été observée. Cependant, malgré qu'il n'a pas causé une vasoconstriction coronaire, le FK a montré une toxicité vasculaire en supprimant l'effet vasorelaxant coronaire de l'Ach, l'Adé et de la NTG et sans que cet effet puisse se rétablir après l-arg. Par contre l'effet vasorelaxant coronaire de la 5-HT, BK, et SP n'a pas été influencé par le FK. L'effet toxique du FK sur les différentes structures vasculaires a été mentionné dans plusieurs études cliniques et expérimentales. L'administration prolongée du FK a été associée avec le développement d'une vasculite généralisée (Collier et coll.1987, Todo et coll.1988). Hisatomi et coll. (1995) n'ont pas observé une différence significative dans la gravité de la maladie coronaire de greffon entre les groupes de patients traités soit avec la CSA, soit avec le FK. Meiser et coll. (1991) et Arai et coll. (1992) ont montré que le FK a causé une maladie coronaire sévère dans les coeurs des rats transplantés. En outre, plusieurs études ont rapporté un effet vasculaire moins toxique du FK, comparé à la CSA. Benigni et coll. (1992) ont montré que le FK n'a pas causé des endommagements dans les cellules

endothéliales in vitro. Armitage et coll. (1995) et Izutani et coll. (1995) ont effectué un suivi de court terme chez les greffés cardiaques, et ils ont conclu que le FK n'induit pas la maladie coronaire de greffon. Marumo et coll. (1995) ont démontré que la CSA, et non le FK, possède un effet inhibiteur sur la iNOS et ils ont suggéré que l'effet inhibiteur de la CSA s'exerce à travers une voie différente que celle inhibitrice de la calcineurine.

Cette différence d'action du FK se reflète aussi dans nos données, où le FK a différemment affecté l'effet vasorelaxant coronaire des différents agents vasoactifs. Cette action du FK peut être expliquée par un effet spécifique et différentiel sur les différents récepteurs endothéliaux et myogéniques. Ainsi, il a été rapporté que les différents sous-types de récepteurs varient dans leurs habiletés à activer la PG et peuvent varier aussi dans leurs sensibilités aux altérations inhibitrices de la PG (Kurose et coll.1991).

Dans la cinquième partie de notre étude, nous avons comparé l'effet de la CSA et du FK sur le système de signalisation transmembranaire, spécifiquement sur la formation d'AMPc et sur l'activité GTPasique de la PG dans les cellules myocardiques. Nous avons démontré que la CSA et non le FK a affecté le fonctionnement d'adénylyl cyclase et a augmenté l'activité GTPasique.

La PG est localisée sur la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire. La PG assure la transduction de l'activation d'un récepteur par un agoniste, pour aboutir à une réponse cellulaire particulière. Le fonctionnement de la PG se résume par les changements que subissent la sous-unité  $\alpha$ , en remplaçant une molécule GTP-forme active- par une autre GDP -forme inactive-. L'effecteur peut être un canal ionique sodique, potassique ou calcique, ou une enzyme. Généralement l'enzyme effectrice, l'adénylyl cyclase assure la formation des seconds messagers (AMPc, DAG, IP3). Le second messenger a pour rôle de moduler les mécanismes de phosphorylation des protéines responsables des effets cellulaires observés. Donc, la mesure de la génération de l'AMPc après CSA et FK reflète l'action de ces deux agents sur l'adénylyl cyclase.

L'activité GTPasique, est une activité intrinsèque spécifique de la sous-unité  $\alpha$ , laquelle est responsable du passage de la PG de son état d'activation à son état de repos en hydrolysant la GTP en GDP. Ainsi, l'activité GTPasique est considérée comme un mécanisme inhibiteur du signal.

Dans notre étude, le niveau basal de la formation d'AMPC n'a pas été affecté ni par la CSA ni par le FK, par contre la formation d'AMPC stimulée par forskoline a été significativement augmentée après CSA. Comme il a été suggéré par Baukal et coll. (1994) ces résultats indiquent que la CSA possède une action potentialisatrice sur l'AMPC seulement en présence d'activateur de l'adénylyl cyclase. Cette différence d'action de la CSA suggère que l'augmentation d'AMPC après CSA est conditionnelle et exige l'activation récepteur-dépendante de Gs.

L'effet immunosuppresseur de la CSA et du FK se réalise en se reliant aux immunophylines correspondantes et en inhibant la calcineurine. La calcineurine est une protéine phosphatase qui joue un rôle essentiel dans la cascade d'activation des cellules T.

Plusieurs études ont rapporté l'effet des agents immunosuppresseurs sur le fonctionnement de système de signalisation transmembranaire. Antoni et coll. (1995) ont examiné l'effet de la calcineurine, de la CSA, et du FK sur la formation d'AMPC, et ils ont conclu que la calcineurine a inhibé l'augmentation de la formation d'AMPC induite par un agoniste, et que l'addition de la CSA et du FK a éliminé cet effet de la calcineurine. Baukal et coll. (1994) ont étudié l'effet de l'angiotensine II sur la formation d'AMPC stimulée par l'adrenocorticotropine et par forskoline dans les cellules adrénales isolées. Ils ont démontré une élévation dans la formation d'AMPC après l'addition d'angiotensine II, et que cette élévation a été inhibée par la CSA et le FK. Ils ont conclu que la production d'AMPC peut être contrôlée par la calcineurine. Des résultats similaires ont été trouvés par Martin et Bedoya (1992) qui ont démontré que la CSA a augmenté les niveaux basals de la formation d'AMPC, et

n'a pas influencé ces niveaux après stimulation par forskoline. Ils ont conclu que la CSA affecte l'activité adénylyl cyclase en inhibant la PGs.

Malgré la similarité dans le mécanisme d'action entre la CSA et le FK, ce dernier n'a pas affecté le fonctionnement de la PG. Cette différence entre les deux agents peut être due à une sensibilité différentielle entre la calcineurine et les différents types d'adénylyl cyclase. La régulation calcium-dépendant de la génération d'AMPc a été documentée dans plusieurs études comme celle de Yoshimura et coll.(1992) où ils ont démontré que le complexe  $Ca^{2+}$ -calmodulin est capable de stimuler les types I et II d'adénylyl cyclase et d'inhiber le type VI.

Nos données concernant l'effet du FK sur le fonctionnement de la PG corroborent avec celles rapportées par Wenzel-Seifert (1993). Ces auteurs ont examiné l'effet du FK sur l'activation des neutrophiles chez l'humain et ils ont conclu que les concentrations thérapeutiques du FK n'ont pas inhibé l'activation des neutrophiles, par contre, les concentrations supra-thérapeutiques du FK ont inhibé l'activation de neutrophiles à travers un mécanisme qui n'implique pas la PG.

Les recherches futures devraient clarifier en profondeur l'implication de la PG dans la toxicité vasculaire de la CSA et du FK. Également, elles devraient être appliquées directement sur les artères coronaires et elles incluront la quantification de la PG. Cette thèse a décrit l'effet du traitement immunosuppresseur sur des coeurs natifs et intacts. L'approche expérimental futur devrait utiliser les coeurs transplantés, lesquels seront exposés à un traitement immunosuppresseur prolongé. Enfin, la thérapie anti-rejet chez les patients transplantés, utiliserait des nouveaux agents qui auraient agit sur le deuxième signal de l'activation lymphocytaire. Cette thérapie, hypothétique, consisterait à une période de traitement moins longue que celle de la CSA et du FK.

---

## Conclusion

Cette étude a démontré que l'administration intracoronarienne de la CSA a causé une réponse vasoconstrictrice aiguë et dose-indépendant dans la circulation coronarienne. Cette vasoconstriction n'a pas été médiée par la libération et la formation d'endothéline. Par contre l'administration intracoronarienne du FK n'a pas induit une telle réponse dans la circulation coronarienne.

Toutefois, la CSA et le FK ont causé une toxicité coronarienne en supprimant l'effet vasorelaxant coronaire endothélium-dépendant et indépendant des agents vasoactifs. Cette toxicité vasculaire a été médiée par un mécanisme endothélium-dépendant et myogénique.

Nos données nous ont permis de suggérer que la CSA et non le FK est capable d'affecter le fonctionnement de système de signalisation transmembranaire dépendant de la PG, en augmentant la formation d'AMPc stimulée par forskoline, et l'activité GTPasique.

## Bibliographie

- Adorini L, Muller S, Cardinaux F, Lehmann P, Falcioni F, and Nagy Z.** In vivo competition between self peptides and foreign antigens in T-cell activation. *Nature* 1988;334:623-625.
- Agrawal B, Fraga E, and Singh B.** Up-regulation of the MHC class II molecules on B cells by peptides ligands. *J Immunol* 1994;152:965.
- Akagi H, Reynolds A, Hjelm M.** Cyclosporin A and its metabolites, distribution in blood and tissues. *J Inter Med Res* 1991;19:1-18.
- Alessiani M, Kusne S, Fung J, Torre-Cisneros J, Abu-Elmagd K, Takaya S, Cillo U, Martin M, Todo S, and Starzl T.** CMV infection in liver transplantation under cyclosporine or FK506 immunosuppression. *Transplant Proc* 1991;23(6):3035-3037.
- Allison A, Eugui EM.** Mycophenolate mofetil, a rationally designed immunosuppressive drug. *Clin Transpl* 1993;7:96-112.
- Amemiya H.** Deoxyspergualin: clinical trials in renal graft rejection. *Ann NY Acad Sci* 1993;685:196-201.
- Angermann C, Spes C, Willems S, Dominiak P, Kemkes B, and Theisen K.** Regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive heart transplant recipients treated with enalapril furosemide and verapamil. *Circulation* 1991;84:583-593.
- Antoni FA, Barnard R, Shipston MJ, Smith SM, Simpson J, and Peterson JM.** Calcineurin feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation. *J Biol Chem* 1995 ;270(47) :28055-28061.
- Anversa P, Ricci R, and Olivetti G.** Coronary capillaries during normal and pathological growth. *Can J Cardiol* 1986;2(2):104-113.
- Arai S, Teramoto S, and Senoo Y.** The impact of FK506 on graft coronary disease of rat cardiac allograft-A comparison with cyclosporine A. *J Heart Lung Transplant* 1992 ;11 :757-62.

**Aramori I, and Nakanishi S.** Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1992;267(18):12468-12474.

**Archer S.** Measurement of nitric oxide in biological models . *FASEB J* 1993;7:349-360.

**Armitage J, Kormos R, Fung J, and Starzl T.** The clinical trial of FK506 as primary and rescue immunosuppression in adult cardiac transplantation. *Transplant Proc* 1991;23(6):3054-3057.

**Armitage J, Kormos R, Fung J, Lavee J, Fricker F, Griffith B, Stuart R, Marrone G, Hardesty R, Todo S, Tzakis A, Starzl T.** Preliminary experience with FK506 in thoracic transplantation. *Transplantation* 1990;52:164-167.

**Auchincloss H, Jr.** Immunologic issues in clinical transplantstion. Bach F, and Auchincloos H, Jr. eds. In : *Transplantation immunology*. New York. Wiley-liss. 1995:131-145.

**Auch-Schwelk W, Bossaler C, Gotze S, Thelen J, and Fleck E.** Endothelial and vascular smooth muscle function after achronic treatment with cyclosporin A. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;1:435-440.

**Auphan N, DiDanto J, Rosette C, Helmberg A, Karin M.** Immunosuppression by glucocorticoids:inhibition of NF-kB activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science* 1995;270:286-290.

**Bader P, Bendings S, Wagner H, and Heeg K.** Cyclosporin A(CSA) prevents the creation of mature thymic T cells but spares T lymphocytes. *Curr Opin Microbiol Immunol* 1991;173:81-89.

**Baldwin JM.** Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin in Cell Biol* 1994;6:180-190.

**Bantle J, Boudreau R, Ferris T.** Suppression of plasma renin activity by cyclosporine. *Am J Med* 1987;83:59-64.

**Barker E, Westphal R, Schmidt D, and Sanders-Bush E.** Constitutively active 5-hydroxytryptamine 2c receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J Biol Chem* 1994;269(16):11687-11690.

**Battistini B, D'Orleans-Juste P, and Sirois P.** Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Laboratory Invest* 1993;68(6):600.

**Battistini B, Challer P, D'Orleans-Juste P, BriPre N and Sirois P.** Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 1993;14:385-399.

**Baukal AJ, Hunyadi L, Catt K, and Balla T.** Evidence for participation of calcineurin in potentiation of agonist-stimulated cAMP formation by the calcium-mobilizing hormone, Angiotensin II. *J Biol Chem* 1994 ;269(40) :24546-24549.

**Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson J, Emoto N, Hammer R, and Yanagisawa M.** interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994;79:1277-1285.

**Beavo JA, and Reifsnyder DH.** Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1990 ;11(4) :150-5.

**Becker DM, Chamberlain B, Swank R, Hegewald M, Girardet R, Baughman K, Kwiterovich P, Pearson T, Ettinger W, Relund D.** Relationship between corticosteroid exposure and plasma lipid levels in heart transplant recipients. *Am J Med* 1988;85:632-638.

**Becker DM, Chamberlain B, Swank R, Hegewald MG, Girardet R.** Relationship between corticosteroid exposure and plasma lipid levels in heart transplant recipients. *Am J Med* 1988;85:632-638.

**Bender J, Pardi R, Kosek J, and Engelman E.** Evidence that cytotoxic lymphocytes alter and traverse allogenic endothelial cell monolayers. *Transplantation* 1989;47:1047-1053.

**Benigni A, Morigi M, Perico N, Zoja C, Amuchastegui C, Piccinelli A, Donadelli R, and Remuzzi G.** The acute effect of FK506 and cyclosporine on

endothelial cell function and renal vascular resistance. *Transplantation* 1992 ;54 :775-780.

**Berdeaux A, Garnier M, Boissier JR, Giudicelli JF.** The role beta-adrenoreceptors in coronary blood flow distribution in normal and ischemic canine myocardium. *Eur J Pharmacol* 1979;53:261-271.

**Berdeaux A, Ghalen B, Dubois-RandJ JL, ViguJ B, Drieu La Rochelle C, Hittinger L, Giudicelli JF.** Role of the vascular endothelium in exercise-induced of large coronary arteries in conscious dogs. *Circulation* 1994;89:2799-2808.

**Berkenboom G, Brjkine D, Unger P, Gulbis B, and Fontaine J.** Coronary vasomotor responses in cyclosporine-treated piglets. *Cardiovasc Drug Ther* 1996;10:17-22.

**Berkenboom G, Giot C, Unger P, Vachierey JL, Antoine M, and LeClerc JL.** Plasma endothelin and early coronary endothelial dysfunction in recipients of a cardiac transplant. *Am Heart J* 1995;129:1178-84.

**Berne MR.** Cardiac nucleotides in hypoxia:a possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 1963;204:317-322.

**Berne R.** The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res* 1980;47(6):807-813.

**Berne RM, Blackmon JR, Gardner TH.** Hypoxemia and coronary blood flow. *J Clin Invest* 1975;36:1101-1106.

**Berne RM.** Effect of epinephrine and norepinephrine on coronary circulation *Circ Res* 1958;6:644-655.

**Beukers R, De Rave S, Van Den Berg J, and Schalm S.** Oral pharmacokinetics of cyclosporin in patients with primary biliary cirrhosis and patients with skin diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 1992;6:459-468.

**Beyens A, Wijnen R, Beuman G, Van Der Heyden J, Kootstra G, and Van As H.** FK506: monitoring in plasma or in whole blood. *Transplant Proc* 1991;23(6):2745-2747.

- Billingham M.** Graft coronary disease: the lesions and the patients. *Transplant Proc* 1989;21(4):3665-3666.
- Birnbaumer L.** With G protein subunits are the active mediators in signal transduction. *TIPS* 1987;8:209-211.
- Bishop G, Waugh J, Landers D, Kransky A, and Hall B** Microvascular destruction in renal transplant rejection. *Transplantation* 1989;48(3):408-414.
- Borel J, Feurer C, Gubler H, and Stahelin H.** Biological effects of cyclosporinA:a new antilymphocytic agent. *Agents and Actions* 1976;6/4:468-474.
- Borel J, Feurer C, Magnje C and Stahelin H.** Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporine A in animals. *Immunology* 1977;32:1017-1025.
- Borkon A.** Morbidity following heart transplantation. In : Baugmartner, Reitz, Achuff, eds. *Heart and Heart lung transplantation*. Philadelphia : W.B.Saunders Company, 1990: 249-259.
- Bosaler C, Forstermann U, Hertel R, Olbricht C, Rescke V, and Fleck E.** Cyclosporin A inhibits endothelium-dependent vasodilation and vascular prostacyclin production. *Eur J Pharmacol* 1989;165:165-169.
- Boucher LM, Wiegmann K, Futterer A, Pfeffer K, Machleidt T, Schutze S, Mak T, and Kronke M.** CD28 signals through acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 1995;181:2059-2068.
- Boudewijn M, Burgering Th and Coffey P.** Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995;376:599-602.
- Boulanger C, and Lusher T.** Release of endothelin from the porcine aorta.Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990;85:587-590.
- Bourne H, Nicol R.** Molecular machines integrate coincident synaptic signals. *Cell* 1993;72(supp 10):65-75.

- Bourne H, Sanders D, and McCormick F.** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990;348:125-132.
- Bourne H, Sanders D, and McCormick F.** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991;349:117-127.
- Bourne H.** One molecular machine can transduce diverse signals. *Nature* 1986;321:814-816.
- Bouwman E, Ijzermans J, Heineman E, de Brin R, Marquet R, and Jeekel J.** Class II antigen expression on vascular endothelium of the graft in rat heart transplantation. *Transplant Proc* 1987;19(1):198-199.
- Branch D, Dudley D, Mitchell M.** Preliminary evidence for homeostatic mechanism regulating endothelin production in pre-eclampsia. *Lancet* 1991;337:943-45.
- Bray P, Carter A, Simons C, Guo V, Puckett C, Kamholz J, Spiegel A.** Human cDNA clones for four species of G $\alpha$ s signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8893-8897.
- Brinbaumer L, Abramovitz J and Brown A.** Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990;1031:163-224.
- Briscoe D, Shoen F, Edgar Rice G, Bevilacqua M, Ganz P, Pober J.** Induced expression of endothelial-leucocyte adhesion molecules in human cardiac allografts. *Transplantation* 1991;51(2):537-547.
- Brodde OE.**  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenoreceptors in the human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1991;43:203-242.
- Brown C, and Willard H.** The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature* 1994;368:154-156.
- Brown Z, and Neild G.** Cyclosporine inhibits prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Transplant Proc* 1987;19(1):1178-1180.
- Brunner F, Du Toit E, and Opie H.** Endothelin release during ischaemia and reperfusion of isolated perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:1291-1305.

- Brynskov J, Freund L, Campanini M, and Kampanini J.** Cyclosporin pharmacokinetics after intravenous and oral administration in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:961-967.
- Bunchman T, and Brookshire C.** Cyclosporin-induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991;88:310-314.
- Burgering B, and Bos J.** Regulation of Ras-mediated signaling: more than one way to skin a cat. *TIBS* 1995;20:18-22.
- Burns S, DeGuzman B, Newbwrger J, Mayer J, Neufeld E, and Briscose D.** P-selectin expression in myocardium of children undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:924-33.
- Butler SJ, Kelly E, McKenzie FR, Guild SB, Wakelam MJ and Milligan G.** Differential effects of suramin on the coupling of receptors to individual species of pertussis-toxin-sensitive guanine-nucleotide-binding proteins. *Biochem J* 1988;251:201-205.
- Butman S.** Hyperlipidemia after cardiac transplantation: be aware and possibly wary of drug therapy for lowering of serum lipids. *Am Heart J* 1991:1585-1590.
- Cadoff E, Venkataramanan R, Krajack A, Jain A, Fung J, Todo S and Starzl T.** Assay of FK 506 in plasma. *Transplant Proc* 1990;22(supp 1):50-51.
- Calvo V, Crews GM, Vik TA and Bierer BE.** Interleukin 2 stimulation of p70 S6 kinase activity is inhibited by the immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7571-7575.
- Cantrell D.T** cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259-274.
- Caroll P, Caohuy H, Lee G, De la Fuente M, Polaard H, and Atwater I.** Synexin: a target for toxic effects of cyclosporine and FK506 in endocrine cells. *Transplant Proc* 1991;23(6):3166-3168.

**Carrier M, and Pelletier C.** Characteristics and diagnosis of acute rejection after cardiac transplantation. In : cardiac surgery : state of the art reviews. Philadelphia. Hanley and Belfus Inc 1988:631-639.

**Carrier M, Pelletier G, Genest J, Cartier R, leclerc Y, and Pelletier C.** Cholesterol-lowering intervention and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Ann Thor Surg* 1994;57:353-6.

**Carrier M, Perrault L, Tronc F, Stewart D, and Pelletier C.** Pentoxifylline decreases cyclosporine-induced renal endothelin release and vasoconstriction. *Ann Thor Surg* 1993;55:490-2.

**Carrier M, Tronc F, Stewart D, Nattel S, and Pelletier C.** Blockade of cyclosporine-induced vasoconstriction by the calcium channel blocker diltiazem in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:487-90.

**Cartier R, Dagenais F, Holman C, Cambron H, and Buluran J.** Chronic exposure to cyclosporine affects endothelial and smooth muscle reactivity in the rat aorta. *Ann Thorac Surg* 1994;58:789-94.

**Carty D, Padrell E, Codina J, Brinbaumer L, Hildebrandt J, and Ivengar R.** Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three G1 proteins. *J Biol Chem* 1990;265(11):6268-6273.

**Case RB, Felix A, Watcher M, Kyriakidis G, Castellana F.** Relative effects of CO<sub>2</sub> on canine coronary vascular resistance. *Circ Res* 1987;42:410-418.

**Casey L.** Role of cytokines in the pathogenesis of cardiopulmonary-induced multisystem organ failure. *Ann Thorac Surg* 1993;56:S92-6.

**Casey P, and Gilman A.** G protein involvement in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 1988;257:2577-2580.

**Casey P, Graziano M, and Gilma A.** G protein subunits from bovine brain and retina: equivalent catalytic support of ADP-ribosylation of " subunits by pertussis toxin but differential interactions with Gs". *Biochemistry* 1989;28:611-616.

- Caterina R, Tanaka H, Nakagawa T, Hauptman P, and Libby P.** The direct effect of injectable cyclosporine and its vehicle, cremophor, on endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Transplantation* 1995;60(3):270-275.
- Chabre M.** The G protein connection: is it in the membrane or the cytoplasm. *TIBS* 1987.12;213-215.
- Chajlani V, Frandberg PA, Ahlner J, Axelsson KL, Wikberg JES.** Heterogeneity in human soluble guanylate cyclase due to alternative splicing. *FEBS Lett* 1991 ;290 :157-158.
- Chan A, Kadlecsek T, Elder M, Filipovich A, Kuo WL, Iwashima M, parslow T, Weiss A.** ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994;264:1599-1601.
- Chen DG, Dai XZ, Zimmermann BG, Bache RJ.** Post synaptic alpha1-and alpha2 adrenergic mechanisms in coronary vasoconstriction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;11:61-67.
- Chomette G, Auriol M, Desruennes M, et Cabrol C.** Modifications vasculaires semi-tardives et tardives du greffon cardiaque humain. *Arch Mal Coeur* 1990;83:1793-8.
- Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR and Blenis J.** Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992;69:1227-1236.
- Church MK and Holgate ST.** Adenosine and asthma. *TIPS* 1986;7:49-50.
- Clapham D, and Neer E.** New roles for G-protein beta-gamma dimers in transmembrane signaling. *Nature* 1993;365:403-406.
- Clavell A, Wright S, Thomas M, Brandt R, Opgenorth T, Burnrtt J Jr.** Elevated endogenous endothelin mediates systemic vasoconstriction in experimental chronic congestive failure. *JACC* 1994;1A-484A.
- Cocks TM, Angus JA.** Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenalin and serotonin. *Nature* 1983;305:627-630.

**Codina J, Yatani A, Grenet D, Brown A, Birnbaumer L.** The alpha subunit of the GTP binding protein G<sub>k</sub> opens atrial potassium channels. *Science* 1987;236:442-445.

**Cohen R, Sheperd J, and Vanhoutte P.** 5-HT can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* 1983;245:H1077-H1080.

**Collier DSTJ, Thiru S, Calne R.** Kidney transplantation in the dog receiving FK506. *Transplant Proc* 1987 ;19(suppl 6) :62.

**Cooke J, Rossitch E.Jr, Andon N, Loscalzo J, and Dzau V.** Flow activates a specific endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *Arch Intern Pharmacodyn* 1990;305:238 (abstract).

**Cox DA, Hintze TH, Vatner SF.** Effects of acetylcholine on large and small arteries in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225:764-769.

**Cox DA, Vita J, Treasure C, Fish D, Alexandre R, Ganz P, and Selwyn A.** Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989;80:458-465.

**Dalmasso A, Vercellotti G, Platt J, and Bach F.** Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. *Transplantation* 1991;52(3):530-533.

**Dausset J.** The major histocompatibility complex in man. *Science* 1981;213:1469-1474.

**Davies P, and Tripathi S.** Mechanical stress mechanisms and the cell .An endothelial paradigm. *Circ Res* 1993;72:239-245.

**Day N, Ge T, Codina J, Birnbaumer L, Vanhoutte P, and Boulanger C.** Gi proteins and the response to 5-HT in porcine cultured endothelial cells with impaired release of EDRF. *Br J Pharmacol* 1995;115:822-827.

**De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner T and Vane J.** Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and

endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9797-9800.

**Dec D, Semigran M, and Vlahakes G.** Cardiac transplantation: current indications and limitations. *Transplant Proc* 1991;23(4):2095-2106.

**Dejana E.** Endothelium, vessel injury and thrombosis. *Hematologica* 1987;72:89-94.

**Dengler T, Zimmermann R, Tiefenbacher C, Braun K, Sack FU, and Kubler W.** Endothelin plasma levels in acute graft rejection after heart transplantation. *Transplantation* 1995;14:1057-64.

**Denker B, Schmidt C, and Neer E.** Promotion of the GTP-liganded state of the Go-alpha protein by deletion of the C terminus. *J Biol Chem* 1992;267(14):9998-10002.

**Denn MJ, Stone HL.** Autonomic innervation of dog coronary arteries. *J Appl Physiol* 1976;41:30-35.

**Diedrich D, Skopec J, Diedrich A, Dai FX.** Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension* 1994;23(part 2):957-961.

**Diedrich D, Yang Z, and Lusher T.** Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:1291-1297.

**DiPadova F.** Pharmacology of cyclosporine (sandimmune) V. Pharmacological effects on immune function : in vitro studies. *Pharmacol Rev* 1989;41(3):373-405.

**Dohlman H.** Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 1991;60:653-88.

**Douglas S, Loudon C, Vickery-Clark L, Storer B, Hart T, Feuerstein G, Elliott J, Ohlstein E.** A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the

novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 1994;75:190-197.

**Downey JM, Kirk ES.** Distribution of the coronary blood flow across the canine heart wall during systole. *Circ Res* 1974;34:251-257.

**Drewe J, Beglinger C and Kissel T.** The absorption site of cyclosporin in the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmac* 1992;33:39-43.

**Drexler H, Zeiher A, Wollshlager H, Meinertz T, Just H, and Bonzel T.** Flow-dependent coronary artery dilation in humans. *Circulation* 1989;80:466-474.

**Drieu la Rochelle C, Richard V, Dubois-RandJ JL, Roupie E, Giudicelli JF, Hittinger L, and Berdeaux A.** Potassium channel openers dilate large epicardial coronary arteries in conscious dogs by an indirect endothelium-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263(3):1091-1096.

**Dunn M, Rose M, Latif N, Bradd S, Lovegrove C, Seymour C, Pomerance A, and Yacoub M.** Demonstration by western blotting of antiheart antibodies before and after cardiac transplantation. *Transplantation* 1991;51(4):806-812.

**Dzau V.** Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension* 1986;8:553-559.

**Edwards B, Lloyd M, and Anderson L.** The synergistic effects of cyclosporine and endothelin-demonstration of an important cardiopressor action. *Transplantation* 1993;55:8-11.

**Eghashira K, Inou T, Yamada a, Hirooka Y, and Takeshita A.** Preserved endothelium-dependent vasodilation at the vasospastic site in patients with variant angina. *J Clin Invest* 1992;89:1047-1052.

**Eguchi S, Hirata Y, Imai T, and Marumo F.** Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 1993;132:524-529.

- Eich D, Jhson D, Hastillo A, Thompson J, Barnhart G, Ko D, Lower R, Hess M.** Accelerated coronary atherosclerosis in cardiac transplantation. *Chapitre 13*:199-211.
- Ellis AK, Klocke FJ.** Effects of preload on the transmural distribution of perfusion and pressure-flow relationships in the canine coronary vascular bed. *Circ Res* 1979;46:68-77.
- Erard F, Corthys P, Nabholz M, Lowenthal J, Zaech P, Plaetnick G, and Macdonald R.** Interleukin 2 is both necessary and sufficient for the growth and differentiaiton of lectin-stimulated cytolytic T lymphocyte precursors. *J Immunol* 1985;134(3):1644-1652.
- Esmore D, Spratt P, Keogh A, Chang V.** Cyclosporine and azaathioprine immunosuppression without maintenance steroids:a prospective randomized trial. *J Heart Transpl* 1989;8:194-9.
- Faustman D, and Coe C.** Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens. *Science* 1991;252:1700-1702.
- Fawzi A, Fay D, Murphy D, Tamiir H, Erdos J, and Northups J.** Rhodopsin and the retinal G-protein distinguish among G-protein beta -gamma subunit forms. *J Biol Chem* 1991;266(19):12194-12200.
- Feigl EO.** Coronary physiology. *Physiol Rev* 1983;63(1):1-205.
- Feigl EO.** Parasympathetic control of coronary blood flowin dogs. *Circ Res* 1969;25:509-519.
- Feigl EO.** Reflex parasympathetic coronary vasodilation elicited from cardiac receptors in the dog. *Circ Res* 1975;37:175-182.
- Ferns G, Reidy M, and Ross R.** Vascular effects of cyclosporine A,in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 1990;137(2):403-413.
- Ferrario R, Foulkes R, Salvati P, and Patrono C.** Hemodynamic and tubular effects of endothelin and thromboxane in the isolated perfused rat kidney. *Eur J Pharmacol* 1989;171:127-134.

- Ferry B, Haltunnen J, Leszczynski D, Schellenkens H, Meide P, and Hayry P.** Impact of class II major histocompatibility complex antigen expression on the immunogenic potential of isolated rat vascular endothelial cells. *Transplantation* 1987;44(4):499-503.
- Fisher G, Wittman-Liebold B, Lang K, Kiefshaber T, and Schmid F.** Cyclopholin and peptidyl-propyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 1989;337:476-478.
- Flavahan N, and Vanhoutte P.** Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations evoked by fluoride. *Eur J Pharmacol* 1990;178(1):121-4.
- Flavahan N, and Vanhoutte P.** Receptor reserve and heterogeneity of vascular responses to vasodilator stimuli. *Vasodilation : vascular smooth muscle . Peptides, autonomic nerves and endothelium.* Raven Press, NY, 1988:201-210.
- Flavahan N.** Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Circulation* 1992;85(5):1927-1938.
- Flavahan N.** Lysophosphatidylcholine modifies G-protein-dependent signaling in porcine endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;264:H722-H727.
- Flomenberg.** Cellular immunology. In : Bach F, and Auchincloss H. eds. *Transplantation immunology.* New York Wiley-Liss 1995:53-86.
- Fogo A, Hellings S, Inagami T and Kon V.** Endothelin receptor antagonism is prospective in in vivo acute cyclosporine toxicity. *Kidney International* 1992;42:770-774.
- Fruman D, Klee C, Bierer B, and Burakoff S.** Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A. *Immunology* 1992;89:3686-3690.
- Fung J, Abu-Elmagd A, Gordon R, Tzakis A, Todo S, Takaya S, Alessiaini M, Demetris A, Bronster O, Martin M, Micles L, Selby R, Reyes J, Doyle H, Stieber A, Casavilla A, and Starzl T.** A randomized trial of primary liver transplantation under immunosuppression with FK506 vs cyclosporine. *Transplant Proc* 1991;23(6):2977-2983.

**Fung J, Alessiani M, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Van Thiel D, Armitage A, Jain A, McCauley J, Selby R, and Starzl T.** Adverse effects associated with the use of FK506. *Transplant Proc* 1991;23(6):3105-3108.

**Fung J, Todo S, Jain A, McCauley L, Alessiani M, Scotti C and Starzl T.** Conversion from cyclosporine to FK 506 in liver allograft recipients with cyclosporine-related complications. *Transplant Proc* 1990;22(supp 1):6-12.

**Fung-Leung WP, Surth C, Lijedahl M, Pang J, Leturcq D, Peterson P, Webb S, Karlsson L.** Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science* 1996;271:1278-1281.

**Furchgott R, and Zawadzki J.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.

**Furchgott R.** Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983;53(5):557-573.

**Gage JE, Hess OM, Murakami T, Ritter M, Grimm J, Krayenbuehl HP.** Vasoconstriction of stenotic coronary arteries during dynamic exercise in patients with classic angina pectoris:reversibility by nitroglycerin. *Circulation* 1986;73:865-876.

**Gallego M, Garcia Villalon A, Lopez Farre A, Garcia J, Garron M, Casado S, Hernando L, Caramelo C.** Mechanisms of the endothelial toxicity of cyclosporin A. *Circ Res* 1994;74:477-484.

**Gao S, Schroder J, Hunt S, and Stinson E.** Retransplantation for severe accelerated coronary artery disease in heart transplant recipients. *Am J Cardiol* 1988;62:876-881.

**Gao SZ, Alderman E, Schroder J, Silverman J, Hunt S.** Accelerated coronary vascular disease in the heart transplant patient:coronary arteriographic findings. *JACC* 1988;12:334-40.

**Gao SZ, Schroder J, Alderman E, Hunt S, Silverman J, Wiederhold V, and Stinson E.** Clinical and laboratory correlates of accelerated coronary artery disease in the cardiac transplant patient. *Circulation* 1987;76(supp V):V-56-V-61.

**Gao SZ, Schroder J, Alderman E, Hunt S, Valentine H, Wiederhold V, and Stinson E.** Prevalence of accelerated coronary artery disease in heart transplant survivors. *Circulation* 1989;80(supp III):III-100-III-105.

**Gao SZ, Schroder JS, Alderman LE, Hunt SA, Valentine HA.** Prevalence of accelerated coronary artery disease in heart transplant survivors: comparison of cyclosporine and azathioprine regimens. *Circulation* 1989;80(supp 3):100-103.

**Gauchat JF, Khandjian E, and Weil R.** Cyclosporine A prevents induction of the interleukin 2 receptor gene in cultured murine thymocytes. *Cell Biology* 1986;83:6430-6434.

**Geller D, Lowenstein C, Shapiro R, Nussler A, Di Silvo M, Wang S, Nakayama D, Simmons R, Snyder S, and Billiar T.** Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3491-3495.

**Gilbert E, Anderson J, Cohen F, Pollara B, Meuwissen H.** Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972;2:1067-1069.

**Gillis S, Smith KA.** Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. *Nature* 1977;268:154-156.

**Gilman A.** G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* 1987;56:615-49.

**Gitter B, Waters D, Threlked P, Lovelace A, Matsumoto K, Burns R.** Cyclosporine A is a Substance P (tachykinin NK1) receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1995 ;289 :439-446.

**Goes N, Urmson J, ramassar V and Halloran P.** Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. *Transplantation* 1995;59:565-572.

**Goes N, Urmson J, Vincent D, Ramassar V, Halloran P.** Effect of recombinant human insulin-like growth factor -1 on the inflammatory response to acute renal injury. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:710-720.

**Goetz K, Wang B, Madwed J, Zhu J, and Leadley R, Jr.** Cardiovascular, renal and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am J Physiol* 1988;255:R1064-R1068.

**Goldberg HJ, Wong PY, Cole EH, Levy GA, Skorecki KL.** Dissociation between the immunosuppressive activity of cyclosporine derivatives and their effects on intracellular calcium signaling in mesangial cell. *Transplantation* 1989 ;47 :731-733.

**Gomez E, Menendez L, Frost P.** Efficacy of mycophenolic acid for the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1979;1:531-537.

**Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H, Ishikawa T, Kimura S, Yanagisawa M, and Masaki T.** Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive voltage-dependent Ca channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3915-3918.

**Gould K, and Kelly K.** Physiological significance of coronary flow velocity and changing stenosis geometry during coronary vasodilation in awake dogs. *Circ Res* 1982;50:695-704.

**Granelli-Piperno A, Andrus L, and Steinman R.** Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human cells. *J Exp Med* 1986;163:922-937.

**Granelli-Piperno A.** Lymphokine gene expression in vivo is inhibited by cyclosporin A. *J Exp Med* 1990;171:533-544.

**Greenberg A, Egel J, Thompson M, Hardesty R, Griffith B, Bahnson H, Bernstein R, Hastillo A, Hess M, and Pushett J.** Early and late forms of

Cyclosporine nephrotoxicity : studies in cardiac transplant recipients. *Am J Kidn Dis* 1987;9(1):12-22.

**Grevel J.** Optimisation of immunosuppressive therapy using pharmacokinetic principles. *Clin Pharmacokinet* 1992;23(5):380-390.

**Grieff M, Loertscher R, Shohaib S, and Stewart D.** Cyclosporine-induced elevation in circulating endothelin-1 in patients with solid-organ transplants. *Transplantation* 1993;56:880-884.

**Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thompson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K and Navia MA.** X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 1995;82:507-522.

**Griffith T, Edwards D, Davies R, Harrison T, and Evans K.** EDRF coordinates the behavior of vascular resistance vessels. *Nature* 1987;329:442-445.

**Gross GK, Buck JD, Warltier DC.** Transmural distribution of blood flow during activation of coronary muscarinic receptors. *Am J Physiol* 1981;240:H941-H946.

**Grover G, Dzwonczyk S, and Parham C.** The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduces infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1993;27:1613-1618.

**Gwartz PA, Overn SP, Mass HJ, Jones CE.** Alpha-adrenergic constriction limits coronary flow and cardiac function in running dogs. *Am J Physiol* 1986;250:H1117-H1126.

**Halloran P, Broski A, Batiuk T, and Mardenas J.** The molecular immunology of acute rejection : an overview. *Transpl Immunol* 1993;1:3-7.

**Hansen J, Christensen N, Fogh-Andersen N, Standgaard S.** Effects of the prostacyclin analogue iloprost on cyclosporin-induced renal hypoperfusion in stable renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:340-346.

**Harding M, Galat A, Uehling D, and Schreiber S.** A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-propyl isomerase. *Nature* 1989;341:758-760.

**Harding M, Hand-Schumacher R, and Speicher D.** Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J Biol Chem* 1986;261(18):8547-8555.

**Hasegawa S, Sunamori M, Miyamoto H, and Suzuki A.** Role of endothelin in orthotopic canine heart transplantation. *Transplant Proc* 1993;25(6):3027-3030.

**Haverich A.** Cyclosporine in heart transplantation. *Transplant Proc* 1992;24(4):82-84.

**Hayashi Y, Tomoike H, Nagsawa K, Yamada A, Nishijima H, Adachi H, and Nakamura M.** Functional and anatomical recovery of endothelium after denudation of coronary artery. *Am J Physiol* 1988;254:H1081-H1090.

**Heck C, Shumway S, and Kay M.** The registry of the international society for heart transplantation:sixth official report- 1989. *J Heart Transplant* 1990:271-276.

**Hekman M, Holzhofer A, Gierschik P, IM MJ, Jakobs KH, Pfeuffer T, and Helmreich J.** Regulation of signal transfer from beta-1 adrenoceptor to adenylate cyclase by beta-gamma subunits in a reconstituted system. *FEBS* 1987;169:431-439.

**Henricsson S, Lindholm A, and Johanson A.** Identification of a sulfate conjugate of cyclosporin. *Transplant Proc* 1989;21(1):837-838.

**Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducroco C, Boucher JL, and Guissani A.** EPR characterization of molecular targets for NO in mamalian cells and organelles. *FASB J* 1993;7:1124-1134.

**Herzberg RM, Rubio R, Berne RM.** Coronary occlusion an embolization:effect on blood flow in adjacent arteries. *Am J Physiol* 1966;210:169-175.

**Hess A, and Tutshka P.** Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. *J Immunol* 1990;124(6):2602-2608.

- Hess DS, Bache TJ.** Transmural distribution of myocardial blood flow systole in the awake dog. *Circ Res* 1976;38:5-15.
- Hickey K, Rubanyi G, Paul R, and Highsmith R.** Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985;248:C550-C556.
- Hintze T, and Vatner S.** Reactive dilation of large coronary arteries in conscious dogs. *Circ Res* 1984;54:50-57.
- Hirschberg H, Braathen L, and Thorsby E.** Antigen presentation by vascular endothelial cells and epidermal langerhans cells:the role of HLA-DR. *Immunol Rev* 1982;66:57-77.
- Hisatomi K, Isomura T, Ohashi M, Tamehiro K, Sato T, Tayama E, Ohishi K, and Kohjiro M.** Effect of dose of cyclosporine or FK506 and antithrombotic agents on cardiac allograft vascular disease in heterotopically transplanted hearts in rats. *J Heart Lung Transplant* 1995 ;14 :113-7.
- Hoffman J, and Spaan J.** Pressure-flow relations in coronary circulation. *Physiol Rev* 1990;70(2):331-390.
- Hoffman J.** A critical view of coronary reserve. *Circulation* 1987;75(supp D):1-6.
- Hoffman J.** Maximal coronary flow and the concept of coronary vascular reserve. *Circulation* 1984;70(2):153-159.
- Holt D, and Jhonston A.** Cyclosporin monitoring:its role in autoimmune indications. *J Autoimmun* 1992;5(supp A):177-182.
- Holtz J, Giesler M, and Bessenge E.** Two dilatory machanisms of anti-angnal drugs on epicardial coronary arteries in vivo : indirect, flow-dependent, endothelium-mediated dilation and direct smooth muscle relaxation. *Z Kardiol* 1993;72(supp 3):98-106.
- Honbo T, Kobayashi M, Hane K, Hata T, and Ueda Y.** The oral dosage form of FK506. *Transplant Proc* 1987;19(5)(supp 6):17-22.

**Howard M, Matis L, Malek T, Shevach E, Kell W, Cohen D, Nakanishi K, and Paul W.** Interleukin 2 induces antigen-reactive T cell lines to secrete BCGF-1. *J Exp Med* 1983;158:2024-2039.

**Hu RM, Levin E, Pedram A, and Frank H.** Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267(24):17384-17389.

**Ibrahim M, chain b, and Katz D.** The injured cell:the role of the dendritic cell system as a sentinel recpetor pathway. *Immunol Today* 1995;16(4):181-186.

**Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns R, and Chaudhuri G.** Endothelium-derived factor produced and released from artery and veins is ntric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9269.

**Ihle J, Witthuhn B, Quelle F, Yamamoto K, Thierfelder W, Kreider B, and Silvennoinen O.** Signaling by cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *TIBS* 1994;19:222-227.

**Inaba K, Granelli-Piperno A, and Steinman R.** Dendritic cells induce T lymphocytes to release B cells-stimulating factors by an interleukin 2-dependent mechanism. *J Exp Med* 1983;158:2040-2057.

**Inoue T, Tomoike H, Hisano k, Nakamura M.** Endothelim determines flow-dependent dilation of the epicardial coronary artery in dogs. *JACC* 1988;11:187-91.

**Inoue T, Tomokoie H, Hisano K, Nakamura M.** Endothelium detrmines flow-dependent dilation of the epicardial artery in dogs. *JACC* 1988;11(1):187-91.

**Irons C, Sei C, Hidaka H, and Glembotski C.** Protein kinase C and calmodulin kinase are required for endothelin-stimulated atrial natriuretic factor secretion from primary atrial myocytes. *J Biol Chem* 1992;267(8):5211-5216.

**Isakov N, Mally M, Scholz W, and Altman A.** T-lymphocytes activation:the role of protein kinase C and the bifurcating inositol phospholipid signal transduction pathway. *Immunol Rev* 1987;95:89-111.

**Izutani H, Miyagawa S, Shirakura R, Matsumiya G, Nakata S, Shimazaki Y and Matsuda H.** Evidence that graft coronary arteriosclerosis begins in the early phase after transplantation and progresses without chronic immunoreaction. *Transplantation* 1995 ;60 :1073-1079.

**Jain A, Venkataramanan R, Cadoff E, Fung J, Todo S, Krajack A and Satrzl T.** Effect of hepatic dysfunction and T tube clamping on FK 506 pharmacokinetics and trough concentrations. *Transplant Proc* 1990;22(supp 1):57-59.

**Jamieson S, Reitz B, Oyer P, Bieber C, Stinson E, and Shumway N.** Current management of cardiac transplant recipients. *Br Heart J* 1979;42:703-708.

**Janeway C,Jr.** Ligands for the T-cell receptor:hard times for avidity madels. *Immunol Today* 1995;16(5):223-225.

**Janeway C.** Immunogenicity signals 1,2,3...and 0. *Immunol Today* 1989;10(9):283-286.

**Jarcho J, Naftel D, Shroyer T, Kirklin J, Bourge R, Barr M, Pitts D, Starling R and the cardiac transplant research database group.** Influence of HLA mismatch on rejection after hearttransplantation:a multiinstitutional study. *J Heart Lung Transpl* 1994;13:583-96.

**Jenkins M, Schwartz R, Pardoll D.** Effects of cyclosporin A on T cell development and clonal deletion. *Science* 1988;241:1655-1658.

**Jessup M, Cavarocchi N, Narins B, McClurken J, and Koff J.** Antihypertensive therapy in patients after cardiac transplantation:a step-care approach. *Transplant Proc* 1988;20(1)(supp 1):801-802.

**Jones CJH, Defily DV, Patterson JL, Chilian WM.** Endothelium-dependent relaxation competes with alpha1 and alpha2 adrenergic constriction in the canine epicardial coronary microcirculation. *Circulation* 1993;87:1264-1274.

**June CH, Bluestone JA, Nadler LM and Thompson CB.** The B7 and CD28 receptor families. *Immunology Today* 1994;15:321-331.

- Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P.** Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-530.
- Kahan B.** Cyclosporine. *N Eng J Med* 1989;321(25):1725-1738.
- Kay J, Benzie C, Goodier M, Wick C, and Doe S.** Inhibition of T-lymphocyte activation by the immunosuppressive drug FK506. *Immunology* 1989;67:473-477.
- Kay J, Doe S, and Benzie R.** The mechanism of action of the immunosuppressive drug FK506. *Cellular Immunol* 1989;124:175-181.
- Kaye D, Thompson J, Jennings G, Esler M.** Cyclosporine Therapy after cardiac transplantation causes hypertension and renal vasoconstriction without sympathetic activation. *Circulation* 1993;88:1101-1109.
- Keravis T, Nehling H, Delacroix MF, Regoli D, Hiley C, and Soclet JC.** High-affinity bradykinin B5 binding sites sensitive to guanine nucleotides in bovine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1991;207:149-155.
- Kiao J, and Clarck S.** Regulation of G-protein alpha2 subunit expression by oxidized low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95:1457-1463.
- Kilbridge P, Mayer j, Newbuger J, Hickey P, Walsh A, and Neufeld E.** Induction of intracellular adhesion molecule-1 and E-selectin mRNA in heart and skeletal muscle of pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107(5):1183-92.
- King S.** An assessment of phosphoinositide hydrolysis in antigenic signal transduction in lymphocytes. *Immunology* 1988;65:1-7.
- Kino T, Inamura N, Sakai F, Nakahara K, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, and Ochiai T.** Effect of FK506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant Proc* 1987;19(5)(supp 6):36-39.
- Kino Y, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, and Ochia T.** FK506, a novel

immunosuppressant isolated from a streptomyces. *J Antibiotics* 1987;XL(9):1256-1265.

**Kirby J, Givan A, Shenton B, Talbot D, Forsythe J, Lennard T, Proud G, and Taylor R.** Renal allograft rejection. *Transplantation* 1990;50(2):225-229.

**Kissinger C, Parge H, Knighton D, Tempczyk A, Kalish V, Tucker K, Showalter R, Moomaw E, Gastinel L, Habuka N, Chen X, Maldonado F, Barker J, Baquet R and Villafranca E.** Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 1995;378:641-644.

**Kitahara S, Makuuchi M, Kawasaki S, Ishizone S, Matsunami H, Kamada N, Kawarazaki H, Iwanaka T.** Lymphoproliferative disorders after FK506. *Lancet* 1991;337:1234.

**Kohno M, Yasunari K, Yokohama K, Murakawa KI, Horio T, and Takeda T.** Inhibition by atrial natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin II and thrombin of cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1991;87:1999-2004.

**Koller A, Seyedi N, Gerristen M, and Kaley G.** EDRF release from microvascular endothelial cells dilates arterioles in vivo. *Am J Physiol* 1991;261:H128-H133.

**Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie B, Ichikawa I and Hoover R.** Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney International* 1990;37:1487-1491.

**Kowalski L, Falqui L, Lacy P.** Feline leukemia virus-associated lymphosarcoma following renal transplantation in a cat. *Transplantation* 1991;52(6):1097.

**Kramer B, Nishida M, Kelly R, and Smith T.** Endothelins .Myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation* 1992;85(1):355-356.

- Kremer S, Margolis B, Harper P, Skorecki K.** Cyclosporine-induced alterations in vasopressin signaling in the glomerular mesangial cell. *Clin Invest Med* 1989 ;12 :201-206.
- Kriett J, and Kaye M.** The registry of the international society for heart and lung transplantation: eight official report-1991. *J Heart Lung Trans* 1991:491-498.
- Kuga T, Egashira k, Mohri M, Tsutsui H, Harasawa Y, Urabe Y, Ando S, Shimokawa H, Takeshita A.** Bradykinin-induced vasodilation is impaired at the atherosclerotic site but is preserved at the spastic site of human coronary arteries in vivo. *Circulation* 1995;92:183-189.
- Kurihara H, Yamaoki K, Nagai R, Yoshizumi M, Takaku F, Satoh H, Inui J, and Yazaki Y.** Endothelin: a potent vasoconstrictor associated with coronary vasospasm. *Life Sci* 1989;44:1937-1943.
- Kurihara K, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao H, Kamada N, Jishage K, Ouchi Y, Azuma, Toyoda Y, Ishikawa T, Kumada, and Yazaki Y.** Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin -1. *Nature* 1994;368:703-710.
- Kurose H, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ.** Functional interactions of recombinant alpha 2 adrenergic receptor subtypes and G protein in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1991 ;30(13) :3335-41.
- Kurtz A.** Adenosine stimulates guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987 ;262 :6296-6300.
- La Rochelle C, Dubois-RandJ JL, Richard V, Hittinger L, Giudicelli JF, and Berdeaux A.** The role of NO release in the control of large and small coronary artery tone in conscious dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(supp 7):S17-S21.
- Lafferty K, Prowse s, and Simeonovich C.** Immunobiology of tissue transplantation : a return to the passenger leucocyte concept. *Ann Rev Immunol* 1983;1:143-73.

- Lai JH, and Tan TH.** CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I $\kappa$ B- $\alpha$  which can be prevented by the immunosuppressant Rapamycin. *J Biol Chem* 1994;269(48):30077-30080.
- Lamb F, and Webb C.** Cyclosporine augments reactivity of isolated blood vessels. *Life Sci* 1987;40:2571-2578.
- Lammerant J, De Schryver C, Bescei I, Camphyn M, Mertens-Strijthagen J.** Coronary circulation response to hyperoxia after vagotomy and combined  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors blockade in the anesthetized intact dog. *Pfluegers Arch* 1969;308:185-196
- Lanese D, and Conger J.** Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporin-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J Clin Invest* 1993;91:2144-2149.
- Langer SZ.** Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *Br J Pharmacol* 1977;60:481-497.
- Langrehr J, Muller A, Markus P, Simmons R, and Hoffman R.** FK506 inhibits nitric oxide production by cells infiltrating sponge matrix allografts. *Transplant Proc* 1991;23(6):3260-3261.
- Languille L, and O'Donnell.** Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986;231:405-407.
- Ledingham IMCA, McBride TI, Parrat JR, Vance JP.** The effect of hypercapnia on myocardial blood flow and metabolism. *J Physiol* 1970;210:87-105.
- Lee C, Jusko W, Shaefer M, Klintmalm G, Hebert M, Piergies A, Schechter P, Mekki Q.** Pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1993;53(2):181.
- Lee S, Tsou AP, Chan H, Thomas j, Petrie K, Eugui EM and Allison AC.** Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 $\beta$  gene

and decrease the stability of interleukin 1 mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1204-1208.

**Lefroy D, Crake T, Uren N, Davies G, and Maseri A.** Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation* 1993;88:43-54.

**Lensmeyer G, Wiebe D, Carlson I, and Subramanian R.** Concentrations of cyclosporin A and its metabolites in human tissues postmortem. *J Analyt Toxicol* 1991;15:110-115.

**Lerman A, Edwards B, Hallet J, Heublein D, Saandberg S, and Burnett J, Jr.** Circulating and tissue endothelin activity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:997-1001.

**Lever J, Ahmed M, Irvine G.** Neuromuscular and intercellular relationships in the coronary arterioles. A morphological and quantitative study by light and electron microscopy. *J Anat* 1965;99:829-840.

**Levin E.** Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333(6):356-363.

**Levitzi A.** Transmembrane signalling to adenylate cyclase in mammalian cells and in *Saccharomyces cerevisiae*. *TIBS* 1988;13:298-301.

**Liao J, Soo Hin W, Lee W, and Clarke S.** Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270(1):319-324.

**Libby P, Salomon RN, Payne DD, Shoen F, and Pober J.** Functions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Transplant Proc* 1989;21(4):3677-3648.

**Liu J, Albers W, Wandless T, Luan S, Alberg D, Belshaw P, Cohen P, Mackintosh C, Klee C, and Schreiber S.** Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 1992;31:3896-3901.

**Liu J, Farmer J, Lane W, Friedmann J, Weissman I, Schreiber S.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-815.

**Lochrie M, and Simon M.** G protein multiplicity in eukaryotic signal transduction systems. *Biochemistry* 1988;27(14):4957-4965.

**Loeb A, Izzo N, Jr, Jhonson R, Garrison J, and Peach M.** Endothelium-derived relaxing factor release associated with increased endothelial cell inositol triphosphate and intracellular calcium. *Am J Cardiol* 1988;62:36G-40G

**Logothetis D, Kurachi Y, Galper J, Neer E, and Clapham D.** The beta-gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K channel in heart. *Nature* 1987;325:321-326.

**London N, Farmery S, Will E, Davison A, Lodge J.** Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995;346:403-06.

**Lucey M, Kolars J, Merion R, Campbell D, Aldrich M, Watkins P.** Cyclosporin toxicity at therapeutic blood levels and cytochrome P-450 IIIA. *Lancet* 1990;335:11-15.

**Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Wayne Alexander R, Ganz P.** Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986;315:1046-10521.

**Lusher T, Richard V, Tschudi M, Yang Z, Boulanger C.** Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries. *JACC* 1990;15(3):519-27.

**Maki N, Sekiguchi F, Nishimaki J, Miwa K, Hayano T, Takahashi N and Suzuki M.** Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidylpropyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin. *Proc Ntl Acad Sci USA* 1990;87:5440-5443.

**Malek T and Ashwell J.** Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone. *J Exp Med* 1985;161:1575-1580.

**Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, and Tomboulion P.** Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Comm* 1993;193(3):1076-1082.

**Mantovani A, and Dejana E.** Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today* 1989;10(11):370-375.

**Maquin-Mavier I, Levame M, Istin N and Harf A.** Mechanisms of endothelin-mediated bronchoconstriction in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;250:740-745.

**Marcus M, Chilian W, Kanatsuka H, Dellsperger K, Eastham C, and Lamping K.** Understanding the coronary circulation through studies at the microvascular level. *Circulation* 1990;82:1-7.

**Marletta M.** Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993;268(17):12231-12234.

**Martin F, and Bedoya F.** Effects of cyclosporine A on cAMP generation and GTP-binding proteins in isolated islets. *Biochem Pharmacol* 1992 ;44(2) :359-364.

**Marumo T, Nakaki T, Hishikawa K, Suzuki H, Kato R, Satura T.** Cyclosporine A inhibits nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995 ;25(part 2) :764-768.

**Masaki T.** Endothelins:homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocrine Reviews* 1993;14(3):256-268.

**Masters S, Stroud R, and Bourne H.** Family of G protein alpha chains:amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. *Protein Engineering* 1986;1(1):47-54.

**Matzinger P.** Tolerance, danger, and the extended family. *Ann Rev Immunol* 1994;12:991-1045.

**Maurer G, Lemaire M.** Biotransformation and distribution in blood of cyclosporine and its metabolites. *Transplant Proc* 1986;18(6)(supp 5):25-34.

- McBride J, Kim S, Rodgerson D, Reyes A, and Ota M.** Measurement of cyclosporine by liquid chromatography and three immunoassays in blood from liver , cardiac and renal transplant recipients. *Clin Chem* 1992;38(11):2300-2306.
- McCauley J, Fung J, Jain A, Todo S and Starzl T.** The effects of fK 506 on renal function after liver transplantation. *Transplant Proc* 1990;22(supp 1):17-20.
- Meiser B, Billingham M, Morris R.** Effects of cyclosporin, FK506, and rapamycin on graft-vessel disease. *Lancet* 1991 ;338 ;1297-1298.
- Meister A.** *Advances in enzymology and related areas of molecular biology.* Wiley 1992An interscience publications; Vol 65. New York.
- Meyers BD, Ross J, Newton L.** Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Eng J Med* 1984;311:1183-1188.
- Meyers BD, Sibley R, Newton L, Tomlanovitch ST, Bosshkos C.** The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int* 1988;33:590-600.
- Miller Y, Masters S, Sullivan K, Beiderman B, and Bourne H.** A mutation that prevents GTP-dependent activation of the alpha chain of Gs. *Nature* 1988;334:712-715.
- Milton A, Spencer S, and Fabre J.** Detailed analysis and demonstration of differences in the kinetics of induction of class I and class II major histocompatibility complex antigens in rejecting caediac and kidney allografts in the rat. *Transplantation* 1986;41(4):499-508.
- Misko T, Moore W, Kasten T, Nickols G, Corbett J, Tilton R, McDaniel M, Williamson J, and Currie M.** Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993;233:119-125.
- Mitsui A, and Suzuki S.** Immunosuppressive effect of mycophenolic acid. *J Antibiot* 1969;22(8):358-3363.

- Miura K, Yukimura T, Yamashita Y, Shimmen T, Okumura M, Yamanaka S, Imanishi M and Yamamoto K.** Renal and femoral vascular responses to endothelin-1 in dogs:role of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:11-17.
- Mohrman DE, Feigl EO.** Competition between sympathetic vasoconstriction and metabolic vasodilation in the canine coronary circulation. *Circ Res* 1978;42:79-86.
- Mombouli JV, and Vanhoutte P.** Kinins and endothelium-dependent relaxations to converting enzyme inhibitors in perfused canine arteries. *J Cardiovasc Phamacol* 1991;18:926-927.
- Moncada S, Palmer R, and Higgs E.** Nitric oxide:physiology,pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43(2):109-142.
- Morgan B, Lyson T, Sherrer U, and Victor R.** Cyclosporine causes sympaathetically mediated elevations in arterial pressure rats. *Hypertension* 1991;18:458-466.
- Morgan D, Ruscetti F, and Gallo R.** Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193:1007-1008.
- Morgan D.** Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-134.
- Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC.** Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193:1007-1008.
- Morris R.** New small molecule immunosuppressants for transplantation:review of essential concepts.Bach F, and Auchincloos H, Jr. eds. In : *Transplantation immunology*. New York Wiley-Liss 1995:199-210.
- Mullick F, McAllister H, Wagner B, and Fenoglo J.** Drug related vasculitis. *Human Pathology* 1979;10(3):313-325.
- Munro M, Cotran R.** The pathogenesis of atherosclerosis:atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988;58(3):249-261.
- Myers B, Sibley R, Newton L, Tomlanovich S, Boshkos C, Stinson E, Lutscher J, Whitney D, Krasny D, Coplon N, and Perlroth M.** The long-

term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Inter* 1988;33:590-600.

**Nakagawa T, Hirano T, Nakagawa N, Yoshizaki K, and Kishimoto T.** Effect of recombinant IL 2 and gamma-IFN on proliferation and differentiation of human B cells. *J Immunol* 1985;134(2):959-966.

**Nathan C.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-3064.

**Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Webers G, and Suzuki K.** Two distinct cDNA for human IMP dehydrogenase. *J Biol Chem* 1990;265(9):5292-5295.

**Neer E. G** protein : critical control points for transmembrane signals *Protein Science* 1994;3:3-14.

**Neild G, Rocchi G, Imberti L, Fumagali F, Brown Z, Remuuzzi G, and Williams D.** Effect of cyclosporine on prostacyclin synthesis by vascular tissue in rabbit. *Transplant Proc* 1983;15(4):2398-2400.

**Nelson P, Eugui E, Wang C, and Allison A.** Synthesis and immunosuppressive activity of some side-chain variants of mycophenolic acid. *J Med Chem* 1990;3:833-838.

**Neumayer HH, and Kunzendorf U.** Renal protection with the calcium antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991.;8(supp 1):S14-S18.

**Neumayer HH, Kunzendorf U, and Schreiber M.** Protective effects of calcium antagonists in human renal transplantation. *Kidney Inter* 1992;41:S-87-S-93.

**Neumayer HH, Schreiber M, and Wagner K.** Prevention of delayed graft function by diltiazem and illoprost. *Transplant Proc* 1989;21(1):1221-1224.

**Nossal GJ.** Summary of the first international FK506 congress : perspectives and prospects. *Transplant Proc* 1991 ;23(6) :3371-5.

**O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid R, Tocci MJ and O'Neill EA.** FK-506- and CSA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992;357:692-693.

**Ochiai T, Hamaguchi K, and Isono K.** Histopathologic studies in renal transplant recipient dogs receiving treatment with FK506. *Transplant Proc* 1987;19(5)(supp 6):93-97.

**Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Hori S, Asano T, and Isono K.** Studies of the induction and the maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation* 1987;44:734-738.

**Olesen SP, Clapham D, and Davies P.** Haemodynamic shear stress activates a K current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988;331:168-170.

**Opelz G and Henderson R.** Incidence of non-hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* 1993;342:1514-16.

**Opelz G and Wujciak T.** The influence of HLA compatibility on graft survival after transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:816-9.

**Oza N, Schwartz J, Danana Goud H, and Levinsky N.** Rat aortic smooth muscle cells in culture express kalikrein, kininogen, and bradykininase activity. *J Clin Invest* 1990;85:597-600.

**Pacher R, Bergler-Klein J, Globits S, Teufelsbauer H, Shuller M, Krauter A, Ogris E, Rodler S, Wutte M, and Hartter E.** Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1993;71:1293-1299.

**Painter P, Van Meter S, Dabbs R, and Clement G.** Analytical evaluation and comparison of dupont aca lactate dehydrogenase-1(LD1)isoenzyme assay diagnostic efficiency for acute myocardial infarction detectin with other LD1 methods and aca CK-MB. *Angiology* 1994;45(7):585-595.

**Parent R, Al-Obaidi M, Lavallée M.** Nitric oxide formation contributes to beta-adrenergic dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Circ Res* 1993 ;73 :241-251.

**Parsons WJ, Ramkumar V and Stiles GL.** Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein Gi. *Molecular pharmacology* 1988;34:37-41.

**Parsons WJ, Ramkumar V and Stiles GL.** The new cardiotoxic agent sulmazole is an A1 adenosine receptor antagonist and functionally blocks the inhibitory regulator, Gi. *Molecular Pharmacology* 1988;33:441-448.

**Paul L, Van Es L, Van Rood J, Leeuwen A, De La RiviPre G, and Graeff J.** Antibodies directed against antigens of the endothelium of peritubular capillaries in patients with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1979;27(3):175-179.

**Pearson P, Shaff H, and Vanhoutte P.** Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 1990;81:1921-1927.

**Pitt B, Eliot EC, Gregg DE.** Adrenergic receptor activity in the coronary arteries of the unanesthetized dog. *Circ Res* 1967;21:75-84.

**Platt J, Lindman B, Geller R, Noreen H, Swanson J, Dalmaso A, and Bach F.** The role of natural antibodies in the activation of xenogenic endothelial cells. *Transplantation* 1991;52(6):1037-1034.

**Pober J, Collins T, Gimborne M, Jr, Libby P, and Reiss C.** Inducible expression of class II Major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium. *Transplantation* 1986;41(2):141-146.

**Pober J.** Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am J Pathol* 1988;133(3):426-433.

**Pohl U, Holtz J, Busse R, and Bessenge E.** Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986;8:37-44.

**Powis SH, Mockridge I, Kelly A, Kerr LA, Glynne R, Gileadi U, Beck S and Trowsdale J.** Polymorphism in a second ABC transporter gene located

within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1463-1467.

**Pronin A, and Gautman N.** Interaction between G-protein beta and gamma subunit types is selective. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6220-6225.

**Propper D, Woo J, Thompson A, Catto G, and Macleod A.** FK506 - its influence on anti-class 1 MHC alloantibody responses to blood transfusions. *Transplantation* 1990;50:267-271.

**Pruzansky J, and Patterson R.** Limiting concentrations of human basophil-bound IgE antibody required for histamine release. *Immunology* 1988;64:307-310.

**Quyyumi A, Dakak N, Andrews N, Husain S, arora s, Gilligan D, Panza J, and Canon III R.** Nitric oxide activity in the human coronary circulation. *J Clin Invest* 1995;95:1747-1755.

**Radeke H, Christians U, Sewing K, and Resch K.** The synergistic immunosuppressive potential of cyclosporin metabolite combinations. *Int J Immunopharmac* 1992;14(4):595-604.

**Rao A.** NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokines genes. *Immunol Today* 1994;15(6):274-280.

**Rapoport R, Draznin M, and Murad F.** Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983;306:174-176.

**Ratner A, and Clarck W.** Role of TNF-alpha in CD45\* cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J Immunol* 1993;150:4303.

**Raymond J.** Multiple mechanisms of receptor-G-protein signaling specificity. *Am J Physiol* 1995;269:F141-F158.

**Reed M, Shapiro M, Strom T, Milford E, Carpentier C, Weinberg D, Reimann K, Letvin N, Waldmann T, and Kirkman R.** Prolongation of primate renal allograft survival by anti-tac , an anti-human IL2 receptor monoclonal antibody. *Transplantation* 1989;47(1):55-59.

**Rees D, Palmer M, and Moncada S.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3375-3378.

**Reid JVO, Ito BR, Huang AH, Buffington CW, Feigl EO.** Parasympathetic control of transmural coronary blood flow in dogs. *Am J Physiol* 1985;249:H337-H343.

**Reyes J, Tzakis M, Green B, Nalesnik M, Van Thiel D, Mmartin M, Breinig M, Fung J, Cooper M, and Starzl T.** Posttransplant lymphoproliferative disorders occurring under primary FK506 immunosuppression. *Transplant Proc* 1991;23(6):3044-3046.

**Richard V, Tanner F, Tschudi M, and Luscher T.** Different activation of L-arginine pathway by bradykinin,serotonin,and clonidine in coronary arteries. *Am J Physiol* 1990;:H1433-H1439.

**Robishaw J, Russel D, Harris B, Smigel M, and Gilman A.** Deduced primary structure of the alpha subunit of the GTP-binding stimulatory prtein of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1251-1255.

**Rosen F, Cooper M and Wedgwood R.** The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1995;333:431-440.

**Rosolowsky L, and Campbell W.** Endothelin enhances adrenocorticotropin-stimulated aldosterone release from cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* 1990;126:1860-1866.

**Rubanyi G, Romero J, and Vanhoutte P.** Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;H1145-H1149.

**Ryffel B, Woerly G, Quesniaux V, Husi H, and Foxwell B.** Covalent binding of cyclosporin inhibits irreversibly T-lymphocyte activation. *Biochem Pharmacol* 1992;43(5):953-960.

**Ryffel B, Worly G, Greiner B, Haendler B, Mihatsh M, Foxwell B.** Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 1991;72:399-404.

- Ryffel B.** Pharmacology of cyclosporine. *Pharmacol Rev* 1989;41(3):407-422.
- Saed G, Carretero O, McDonald R, and Scili G.** Kallikrein messenger RNA in rat arteries and veins. *Circ Res* 1990;67:510-516.
- Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T, Enoki T, Ohtani T, Sakurai T, Nakao K, Toyo-Oka T, and Masaki T.** Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin A-selective antagonist and endothelin B-selective agonists. *J Biol Chem* 1993;268(13):8547-8553.
- Sakurai T, Yanagisawa M, and Masaki T.** Molecular characterization of endothelin receptors. *TIPS* 1992;13:103-108.
- Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, and Takaku F.** Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol* 1987;139:1797-1803.
- Scheinman R, Cogswell P, Lofquist A, Baldwin A.** Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283-286.
- Scherrer U, Vissinc S, Morgan B, Rollins J, Tindall R, Ring S, Hanson P, Mohanty P, and Victor R.** Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med* 1990.323;11:693-9.
- Schmid T, Landry G, Fields B, Belzer F, Haworth R, and Southa J.** The use of myocytes as a model for developing successful heart preservation solutions. *Transplantation* 1991;52(1):20-26.
- Schmidt C, Thomas T, Levine M, and Neer E.** Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J Biol Chem* 1992;267(20):13807-13810.
- Schramm M, and Selinger Z.** Message transmission :receptor controlled adenylate cyclasesystem. *Science* 1984;225:1350-1356.
- Shapiro R, Fung J, Jain A, Arks P, Todo S and Starzl T.** The side effects of FK 506 in humans. *Transplant Proc* 1990;22(supp 1):35-36.

**Shapiro R, Jordan M, Scantelbury V, Fung J, Jensen C, Tzakis A, McCauley J, Carroll P, Ricordi c, Demetris A, Mitchell S, Jain A, Iwaki Y, Kobayashi M, Reyes J, Todo S, Hakala H, Simmons R, and Starzl T.** FK506 in clinical kidney transplantation. *Transplant Proc* 1991;23(6):3065-3067.

**Shi Y, Sahai B, and Green D.** Cyclosporine A inhibits activation induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 1989;339:625-626.

**Shibano T, Codina J, Birnbaumer L, and Vanhoutte P.** Perussis toxin-sensitive G-proteins in regulated endothelial cells of porcine coronary artery. *Am J Physiol* 1994;267:H979-H981

**Shimakawa H, Tsutsui M, Mizuki T, Hase K, Kuwaoka I, Nogami N, Okamatsu S, and Nakanishi K.** Endothelial Gi protein expression is markedly low in human coronary microvassels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:297-302.

**Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, and Shaw S.** Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 1992;13:106-112.

**Shimokawa H, Aarhus L, and Vanhoutte P.** Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 1987;61:256-270.

**Shimokawa H, Flavahan N, and Vanhoutte P.** Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelium removal in porcine coronary arteries. *Circ Res* 1989;65:740-753.

**Shimokawa H, Flavahan N, Sheperd J, and Vanhoutte P.** Endothelium-dependent inhibition of ergonovine-induced contraction is impaires in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *Circulation* 1989;80:643-650.

**Shirakami G, Nakao K, Saito Y, Magaribuchi T, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Suga SI, Mori K, and Imura H.** Low doses of endothelin-1 inhibit atrial natriuretic peptide secretion. *Endocrinology* 1993;132:1905-1912.

- Shumacher A, and Nordheim A.** Progress towards a molecular understanding of cyclosporin-A-mediated immunosuppression. *Clin Investig* 1992;70:773-779.
- Simard j, Ohashi P, Griesser H, Tanigushi T, Paige C, Mak T.** Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 1995;268:1472-1476.
- Simonson M, and Dunn M.** Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 1990;4:2989-3000.
- Simonson M.** Endothelins;multifunctional renal peptides. *Physiol Rev* 1993;73:375-411.
- Simonsson M, and Herman W.** Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. *J Biol Chem* 1993;268(13):9347-9357.
- Sokolovsky M, Ambar I, and Galron R.** A novel subtype of endothelin receptors. *J Biol Chem* 1992;267(29):20551-20554.
- Sokolovsky M.** Endothelins and sarafotoxins:physiological regulation,receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmac Ther* 1992;54:129-149.
- Sperling A, Gren JM, Lee mosley R, Smith P, DiPaolo RJ, Klein JR, Bluestone JA and Thompson CB.** CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J Exp Med* 1995;182:139-146.
- Spiegel A.** Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 1987;49:1-16.
- Springer T and Lasky L.** Sticky sugars for selectins. *Nature* 1991;349:196-197.
- Springer T.** Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-433.
- Steiger J, Nickerson P, Steurer W, Moscovotich-Lopatin M, and Strom T.** IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol* 1995;155:489-498.

**Stein PL, Lee HM, Rich S and Soriano P.** p59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 1992;70:741-750.

**Straus D and Weiss A.** Genetic evidence for the involvement of the Ick tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 1992;70:585-593.

**Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, De Groot C, Taylor RN, Chou TM, Yock PG, and Chatterjee K.** Cyclosporine A impairs release of endothelium-derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* 1994 ;90 :3018-3023.

**Susiu-Foca N, Reed E, D'Agati V, Ho E, Cohen D, Benvenisty A, McCabe R, Brensilver J, King D, and Hardy M.** Soluble HLA antigens , anti-HLA antibodies , and antiidiotypic antibodies in the circulation of renal transplant recipients. *Transplantation* 1991;51(3):593-601.

**Suzuki H, Kundig T, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Suzuki S, Amemiya H.** 15-Deoxyspergualin a novel immunosuppressant: experimental studies and clinical trials. *Transplant Immunol Lett* 1990;7:17.

**Suzuki T, Hoshi H, and Mitsui Y.** Endothelin stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium. *FEBS* 1990;268(1):149-151.

**Takahashi N, Hayano T, and Suzuki M.** Peptidyl-propyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 1989;337:473-475.

**Takuwa N, Takuwa Y, Yangisawa M, Yamashita K, and Masaki T.** A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1989;264(14):7856-7861.

**Tamura K, Kobayashi M, Hashimoto K, Kojima K, Nagase K, Iwasaki K, Kaizu T, Tanaka H, and Niwa M.** A high sensitive method to assay FK506 levels in plasma. *Transplant Proc* 1987;19(5)(supp 6):23-29.

- Tanaka H, Swanson S, Sukhova G, Schoen F, and Libby P.** Early proliferation of medial smooth muscle cells in coronary arteries of rabbit cardiac allografts during immunosuppression with cyclosporine A. *Transplant Proc* 1995;27(3):2062-2065.
- Tanner F, Noll G, Boulanger C, and Luscher T.** Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. *Circulation* 1991;83:2012-2020.
- Tarnow J, Bruckner JB, Eberlein HJ, Getmann JW, Hess W, Platschke D, Wilde J.** Blood pH and PaCO<sub>2</sub> as chemical factors in myocardial blood flow control. *Basic Res Cardiol* 1975;70:685-696.
- Taylor D, Thompson J, Hastillo A, Barnhart G, Rider S, Lower R, and Hess M.** Hyperlipidemia after clinical transplantation. *J Heart Transpl* 1989;8:209-213.
- Taylor P, Rose M, Yacoub M, and Pigott R.** Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac allografts. *Transplantation* 1992;54(3):451-457.
- Tepper M, Nadler S, Esseltyn J, and Sterbenz K.** Deoxyspergualin inhibits kappa light chain expression in 70z/3 pre-B cells by blocking lipopolysaccharide-induced NF-kB activation. *J Immunol* 1995;155:2427-2436.
- Tesfamarian B, and Cohen R.** Inhibition of adrenergic vasoconstriction by endothelial cell shear stress. *Circ Res* 1988;63:720-725.
- Thiemermann C, Lidbury P, Thomas R, and Vane J.** Endothelin-1 release prostacyclin and inhibits ex vivo platelet aggregation in the anesthetized rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13(supp 5):S138-S141.
- Thiru S, Collier D, and Calne R.** Pathological studies in canine and baboon renal allograft recipients immunosuppressed with FK506. *Transplant Proc* 1987;19(5)(supp 6): 98-99.

**Thompson A, Stephen M, Woo J, Hasan N, and Whiting P.** Immunosuppressive activity, T cell subset analysis, and acute toxicity of FK506 in rats. *Trans.Proc.*1989;21(1):1048-1049.

**Thompson M, Shapiro A, Jhonsen AM, Itzkoff J, Hardesty R, Griffith B, Bahnson H, McDonald R, Hastillo A, and Hess M.** The contrasting effects of cyclosporine-A and azathioprine on arterial blood pressure and renal function following cardiac transplantation. *Intern J Cardiol* 1986;11:219-229.

**Timmermans PBMWM, Van Zweiten PA.** The postsynaptic alpha2 adrenoreceptor. *J Auto Pharmacol* 1981;1:171-183.

**Tinley N, Whitley W, Diamond J, Kupiec-weglinski J, and Adams D.** Chronic rejection - an undefined conundrum. *Transplantation* 1991;52(3):389-398.

**Tinubu S, Hakimi J, Kondas Jo, Bailon P, Familletti P, Spence C, Crittenden M, Parenteau G, Dirbas F, Tsudo M, Bacher J, Kasten-Sportes C, Matrinucci J, Goldman C, Clark R, Waldmann T.** Humanized antibody directed to the iL-2 receptor beta-chain prolongs primate cardiac allograft survival. *J Immunol* 1994;153:4330.

**Tocci M, Matkovich D, Collier K, Kwok P, Dumont F, Lin S, Degudicibus S, Siekierka J, Chin J, and Hutchinson N.** The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* 1989;143:718-726.

**Toda N.** Mechanism of histamine actions in human coronary arteries. *Circ Res* 1987;61:280-286.

**Todo S, Ueda Y, Demtris A, Imventarza O, Nalesnik M, Venkataramanan R, Makowka L, and Starzl T.** Immunosuppression of canine, monkey and boboon allografts by FK506: with special reference to synergism with other drugs to tolerance induction. *Surgery* 1988;104:239-49.

**Tronc F, Carrier M, and Pelletier C.** Mechanism of hind limb vasoconstriction due to cyclosporin A in the dog. *Circ Res* 1992;71:1159-1164.

**Truman M, Casali P, Notkins A, Bach F, and Platt J.** Polyreactivity and antigen specificity of human xenoreactive monoclonal and serum natural antibodies. *Transplantation* 1991;53(4):710-717.

**Tschudi M, Richard V, Buhker F, and Lusher T.** Importance of endothelium-derived nitric oxide in porcine coronary arteries. *Am J Physiol* 1991;260:H13-H20.

**Tsutsui M, Shimokawa H, Tanaka S, Kuwaoka I, Hase K, Nogami n, Nakanishi K, and Okamatsu S.** Endothelial Gi protein in human coronary arteries. *Eur Heart J* 1994;15:1261-1266.

**Ui M.** Islet-activating protein, pertussis toxin:a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. *TIPS* 1984:277-279.

**Vathsala A, Weinberg RB, Schonberg L, Grevel J, Dunn J.** Lipid abnormalities in cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1989;48:37-43.

**Venkataramanan R, Jain A, Cadoff E, Warty V, Iwasaki k, Nagase K, Krajack A, Inventarza O, Todo S, Fung J and Starzl T.** Pharmacokinetics of FK 506:preclinical and clinical studies. *Transplant Proc* 1990;22 (supp 1):52-56.

**Ventura H, Milani R, Lavie C, Smart F, Stapleton D, Toups T, Price H.** Cyclosporine-induced hypertension. *Circulation* 1993;88(part 2):281-285.

**Verbeke M, Van de Voorde J, de Ridder L, and Lemeire N.** Functional analysis of vascular dysfunction in cyclosporim treated rats. *Cardiovasc Res* 1994;28:1152-1156.

**Voss B, Hamilton K, Scott Samara E, and McKee P.** Cyclosporine suppression of endothelial prostacycline generation.. *Transplantation* 1988;45:793-796.

**Wagner K, Henkel M, Heinemeyer G, and Neumayer HH.** Interaction of calcium blockers and cyclosporine. *Trasplant Proc* 1988;20(2)(supp 2):561-568.

**Walsh C, Hayashi F, Saffran D, Ju ST, Berke G, and Clarck W.** Cell-mediated cytotoxicity results from, but may not be critical for, primary allograft rejection. *J Immunol* 1996;156:1436-1441.

**Warty V, Diven W, Cadoff E, Todo S, Starzl T, Sanghvi A.** FK506:a novel immunosuppressant agent. Characteristics of binding and uptake by human lymphocytes. *Transplantation*.1988;46:453-455.

**Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A.** Endothelin in myocardial infarction. *Nature* 1990;344:114.

**Wenger RM.** Cyclosporine:conformation and analogues as tools for studying its mechanism of action. *Transplant Proc* 1988;20(2)(supp 2):313-318.

**Wenger RM.** Synthesis of cyclosporin and analogues:structures and conformational requirements for immunosuppressive activity. *Prog Allergy* 1986;38:46-64.

**Wenzel-Seifert K, and Seifert R.** Partial inhibition of human neutrophil activation by FK-506 at suprathapeutic concentrations. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 1993 ;348 :7-13.

**West R, Jr, Moss J, Vaughan M, Liu T, and Liu TY.** Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. *J Biol Chem* 1985;260(27):14428-14430.

**Whittington P, Emond J, Whittington S, Broelsch C, and Baker A.** Small bowel length and the dose of cyclosporine in children after liver transplantation. *N Engl J Med* 1990;322:733-8.

**Wiemer G, Scholkens B, Becker R, and Busse R.** Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension* 1991;18:558-563.

**Woollard HH.** The innervation of the heart. *J Anat Physiol* 1926;60:75-86.

**Wuthrich K, Von Freyberg B, Weber C, Wider G, Traber R, Widmer H, Braun W.** Receptor-induced conformation change of the immunosuppressant cyclosporin A. *Science* 1991;29:953-954.

**Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, and Yanagisawa M.** ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994;78:473-485.

**Xue H, Bukoski R, McCarron D, and Bennett W.** Induction of contraction in isolated rat aorta by cyclosporine. *Transplantation* 1987;43(5):715-718.

**Yee G, and Pharm D.** Recent advances in cyclosporine pharmacokinetics. *Pharmacotherapy* 1991;11(5):130S-134S.

**Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Murakawa KI, Yasunari K, Nakagawa K, Hamada T, Otani S, Yanagisawa M, and Takeda T.** Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Int Med* 1991;114:213-215.

**Yoshimura M, and Cooper DM.** Cloning and expression of a calcium-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ;89 :6716-6720.

**Yoshimura N, Matsui S, Hamashima.** Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on human lymphocyte responses in vitro. *Transplantation* 1989;47:356-359.

**Young MA, Knight DR, Vatner SF.** Autonomic control of large coronary arteries and resistance vessels. *Prog Cardiovasc Dis* 1987;30:211-234.

**Yuen PST, Potter LR, Garbers DL.** A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 1990 ;29 :10872-10878.

**Zeiber AM, Drexler H, Wollshlager H, Just H.** Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991;83:391-401.

**Zhang W, Zimmer G, Chen J, Ladd D, Il E, Alt F, Wiederrecht G, Cryan J, O'Neill E, Seidman C, Abbas A, and Seidman J.** T cell responses in calcineurin A-alpha deficient mice. *J Exp Med* 1996;183:413-420.

---

**Zheng XF, Fiorentino D, Chen J, Crabtree GR, Schreiber SL.** TOR kinase domains are required for two distinct functions , only one of wich is inhibited by rapamycin. *Cell* 1995;82:121-30.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord, à remercier les membres de ma famille pour l'excellent support qu'ils m'ont accordé durant ces longs mois d'études et de travail.

Je tiens à remercier sincèrement le Docteur Michel Carrier, Directeur du Département de Chirurgie à l'Institut de Cardiologie de Montréal, pour son excellente collaboration et pour avoir accepté de diriger, avec dévouement et discernement, mes travaux de doctorat, de même que le Docteur Jean-Gilles Latour, Directeur du Département de Pathologie à l'Université de Montréal et du laboratoire de Pathologie Expérimentale à l'Institut de Cardiologie de Montréal pour avoir accepté la codirection de mon doctorat et pour son appui. Je voudrais remercier tout particulièrement Monsieur Pierre Thai, Docteur Guy Rousseau et Madame Marie-Andrée Normand pour la précieuse collaboration qu'ils m'ont accordé lors de mes études doctorales.

J'aimerais également remercier le Docteur Louis-Conrad Pelletier pour sa collaboration scientifique, et le Docteur Yahya Merhi pour les nombreuses discussions.

Finalement, j'aimerais remercier la direction scientifique du Centre de Recherche représentée par son Directeur le Docteur Stanley Nattel, et le personnel du secrétariat.