

Université de Montréal

Nouveaux outils de pharmacodynamie des immunosuppresseurs chez des receveurs
pédiatriques de greffe d'organe

Par

Anne-Laure Lapeyraque

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade de M.Sc. en
Pharmacologie

Août 2012

©, Anne-Laure Lapeyraque, 2012

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	v
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	vi
SUMMARY AND KEYWORDS	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION	
1.1 Épidémiologie des transplantations d'organes au Canada	2
1.2 Le système HLA	3
1.2.1 Les antigènes majeurs d'histocompatibilité (antigènes HLA)	4
1.2.2 Les antigènes mineurs d'histocompatibilité	6
1.2.3 Compatibilité entre donneurs et receveurs en greffe d'organe solide	6
1.3 La réaction allogénique	7
1.3.1 La reconnaissance allogénique	7
1.3.2 L'activation des lymphocytes T du receveur	8
1.4 Les différents types de rejet	9
1.4.1 Le rejet hyperaigu	10
1.4.2 Le rejet aigu cellulaire	10
1.4.3 Le rejet chronique	11
1.4.4 Le rejet humoral	11
1.5 Les immunosuppresseurs	12
1.5.1 Les corticostéroïdes	13
1.5.2 Les inhibiteurs de la calcineurine	14
1.5.3 Les mycophénolates	15
1.6 La tolérance	16
1.7 Individualisation des traitements immunosuppresseurs	18
1.7.1 Outils de pharmacocinétique	21
1.7.2 Outils de pharmacogénétique	22
1.7.2.1 Variabilité de l'effet direct des immunosuppresseurs sur la réponse immunitaire	24
1.7.2.2 Génétique des protéines régulant la réponse des lymphocytes T	24
1.7.3 Outils de pharmacodynamie	25

1.7.3.1 Critères pharmacodynamiques spécifiques des inhibiteurs de la calcineurine	25
1.7.3.2 Critères pharmacodynamiques spécifiques de l'acide mycophénolique	27
1.7.3.3 Critères pharmacodynamiques évaluant la fonction lymphocytaire résiduelle	28
1.8 Objectifs de l'étude	32
1.8.1 Évaluation du degré d'immunosuppression chez les patients traités par immunosuppresseurs	32
1.8.2 Discriminer le rôle respectif des immunosuppresseurs dans l'immunosuppression globale observée chez les patients	34

CHAPITRE DEUXIÈME : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel	39
2.1.1 Patients	39
2.1.2 Contrôles et témoins	40
2.2 Méthodes	40
2.2.1 Prélèvements sanguins	40
2.2.2 Mise en culture	40
2.2.3 Quantification de la fonction lymphocytaire <i>ex vivo</i>	41
2.2.3.1 Quantification de l'activation lymphocytaire	
2.2.3.2 Quantification du cycle cellulaire lymphocytaire	
2.2.4 Évaluation des paramètres immunologiques pouvant modifier la fonction lymphocytaire évaluée <i>ex vivo</i>	43
2.2.4.1 Quantification de la sécrétion de interleukines (Il-2, Il-10, TNF α et TGF β)	
2.2.4.2 Phénotypage des lymphocytes T circulants et quantification des lymphocytes T régulateurs et des lymphocytes T naïfs	
2.2.5 Évaluation de la fonction lymphocytaire T après compensation de l'effet de chacun des deux immunosuppresseurs	44
2.2.6 Études pharmacocinétiques	45
2.2.7 Analyses statistiques	46

CHAPITRE TROISIÈME : RÉSULTATS

3.1 Caractéristiques cliniques et biologiques des patients	48
3.2 Caractéristiques cliniques des sujets contrôles	50
3.3 Quantification de la fonction lymphocytaire T <i>ex vivo</i>	51
3.3.1 Comparaison des deux mitogènes	51
3.3.2 Comparaison des différents paramètres étudiés	53
3.3.3 Variabilité de la fonction lymphocytaire résiduelle chez les patients	57
3.3.4 Détermination de deux groupes de patients selon leur fonction lymphocytaire résiduelle	61
3.3.5 Évaluation des paramètres immunologiques pouvant modifier les fonctions immunitaires résiduelles observées <i>ex vivo</i> pour ces deux groupes de patients	64

3.3.5.1 Étude de la sécrétion de interleukines (Il-2, Il-10, TNF α et TGF β)	
3.3.5.2 Étude des lymphocytes T régulateurs (CD4CD25Foxp3) et des lymphocytes T naïfs (CD31CD45RA)	
3.4 Discrimination du rôle respectif des immunosuppresseurs dans l'immunosuppression observée chez les patients	67
3.4.1 Étude ex vivo de la restauration par l'Il-2	68
3.4.2 Étude de la restauration par la guanosine et la xanthosine	71

CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Type de prélèvement utilisé	78
4.2 Choix du mitogène	78
4.3 Choix du test optimal pour quantifier la fonction lymphocytaire résiduelle des patients sous immunosuppresseurs	79
4.4 Variabilité intra et interindividuelle	82
4.5 Variabilité au cours de la journée	83
4.6 Détermination de deux groupes de patients selon leur fonction lymphocytaire résiduelle	84
4.7 Étude de la synthèse des interleukines par les lymphocytes T activés	86
4.8 Étude des lymphocytes T régulateurs et des lymphocytes T naïfs	88
4.9 Détermination du rôle respectif des immunosuppresseurs dans l'immunosuppression observée chez les patients	89
4.10 Conclusion	91
 BIBLIOGRAPHIE	 93

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Nouveaux outils de pharmacodynamie des immunosuppresseurs chez des receveurs pédiatriques
de greffe d'organe

Présenté par :

Anne-Laure Lapeyraque

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Docteur Françoise Le Deist

Directeur de recherche

Docteur Pierre Hardy

Membre du jury

RÉSUMÉ

L'immunosuppression optimale après greffe d'organe solide est une balance délicate et propre à chaque individu entre le risque de rejet et les risques liés à une surexposition au traitement immunosuppresseur. L'évaluation de la fonction résiduelle des lymphocytes T après stimulation par un mitogène (pharmacodynamie effective) devrait permettre de mesurer l'effet direct des médicaments immunosuppresseurs sur leur cible.

Nous avons étudié différents paramètres de pharmacodynamie effective chez 34 receveurs pédiatriques de greffe d'organes solides traités par tacrolimus et mycophénolate. Les tests proposés dans ce travail sont adaptés au milieu pédiatrique et à une réalisation en temps réel.

La quantification du CD25 parmi les CD4 activés par l'OKT3 permet de distinguer deux groupes de patients selon leur degré d'immunosuppression. L'âge médian est plus bas et la concentration plasmatique médiane en MPA plus élevée dans le groupe de patients plus fortement immunosupprimés.

L'étude des paramètres immunologiques pouvant influencer la réponse (sécrétion des interleukines, proportion des sous-populations lymphocytaires CD4, CD8, T naïfs et Trég) ainsi que l'étude du pouvoir de restauration de la fonction lymphocytaire par l'Il-2, la guanosine ou la xanthosine, ne permettent pas de mieux comprendre les variabilités interindividuelles observées.

Ces résultats devront être confirmés sur une cohorte plus grande de patients afin de juger de leur intérêt en pratique clinique.

MOTS CLÉS

Pédiatrie, immunosuppression, pharmacodynamie, pharmacocinétique, tacrolimus, mycophénolate, interleukine, lymphocytes T.

SUMMARY

Optimal immunosuppression following solid organ transplantation is unique to each individual and requires a balance between risks of rejection and overexposure to immunosuppressive therapy. The evaluation of residual function of T lymphocytes after mitogen stimulation (effective pharmacodynamic monitoring) should allow measurement of the direct effect of immunosuppressive drugs on their target.

We studied various parameters of effective pharmacodynamic monitoring in 34 paediatric patients receiving solid organ transplants and treated with tacrolimus and mycophenolate (MPA). The tests proposed in this work are adapted to the paediatric setting in real time.

Quantification of CD25 among CD4 cells activated by OKT3 can differentiate two groups of patients according to their degree of immunosuppression. Median values for age and MPA plasma concentration are lower and higher, respectively, in the patient group most heavily immunosuppressed.

Neither study of the parameters that may influence the response (secretion of interleukins, proportion of lymphocyte subpopulations CD4, CD8, naive and regulatory T cells) nor study of the restoration of basal cell function brought about by IL2, guanosine or xanthosine, helped to explain the observed inter-individual variability.

These results should be confirmed in a larger cohort of patients in order to test their relevance in clinical practice.

KEYWORDS

Pediatric, immunosuppression, pharmacodynamic monitoring, pharmacokinetic monitoring, tacrolimus, mycophenolate, interleukine, T lymphocytes

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques cliniques, biologiques et pharmacocinétiques des 34 patients au moment des 54 prélèvements

Tableau II. Test de fonction lymphocytaire chez les témoins après stimulation par l'OKT3 (4 jours) et la ConA (3 jours)

Tableau III. Test de fonction lymphocytaire résiduelle chez les 34 patients traités par l'association de TAC et de mycophénolate

Tableau IV. Étude de la corrélation entre les différents paramètres étudiés dans les 54 échantillons sanguins prélevés chez 34 patients traités par l'association de TAC et de mycophénolate

Tableau V. Expression du CD25 dépendante de l'OKT3 parmi les lymphocytes T CD4, données de pharmacocinétiques et délai entre deux prélèvements chez 7 patients ayant eu plus de deux prélèvements au cours de l'étude

Tableau VI. Caractéristiques cliniques, biologiques et pharmacocinétiques des patients selon leur groupe d'immunosuppression

Tableau VII. Quantification de la sécrétion de interleukines (Il-2, Il-10, TNF α et TGF β) dans le surnageant de cultures sans (NS), avec stimulation par OKT3 ou OKT3 + PMA (24 heures) chez 14 patients sous bithérapie et 7 témoins

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Activation des lymphocytes T
- Figure 2. Synthèse de novo des bases puriques
- Figure 3. Mesure *ex vivo* de l'activation (expression du CD25 ou du CD71 (%)) et de la prolifération (% de cellules en cycle) lymphocytaire dépendante de l'OKT3 parmi les lymphocytes T CD4 et CD8 chez les témoins et chez les patients traités par TAC et mycophénolate
- Figure 4. Évolution du marqueur d'activation cellulaire (expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3) au cours du temps chez 7 patients ayant eu plus de deux échantillons sanguins prélevés
- Figure 5. Concentrations de MPA et pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 stimulés par l'OKT3 au cours du temps après une dose de mycophénolate reçue à temps 0
- Figure 6. Distribution des patients et des contrôles en fonction du pourcentage de lymphocytes T CD4 exprimant le CD25 après stimulation par l'OKT3 (4 jours)
- Figure 7. Quantification de la sécrétion des interleukines (IL-2, IL-10, TNF α et TGF β) dans le surnageant de cultures sans (NS), avec stimulation par l'OKT3 ou OKT3 + PMA (24 heures) chez 14 patients sous bithérapie et 7 témoins
- Figure 8. Etude *ex vivo* de l'effet de l'IL-2 à la concentration de 40 UI/mL sur l'activation des lymphocytes T CD4 dépendante de l'OKT3 chez 43 témoins
- Figure 9. Étude *ex vivo* de l'effet de l'IL-2 sur de l'acquisition dépendante de l'OKT3 du CD25 par les lymphocytes T CD4 sur les échantillons sanguins prélevés chez les patients traités par bithérapie (TAC et mycophénolate) et chez les sujets contrôles traités par mycophénolate en monothérapie
- Figure 10. Etude *ex vivo* de l'effet de la guanosine (G) à différentes concentrations sur l'activation des lymphocytes T CD4 dépendante de l'OKT3 chez 14 témoins
- Figure 11. Etude *ex vivo* de l'effet de la guanosine (G) sur l'acquisition dépendante de l'OKT3 du CD25 par les lymphocytes T CD4 chez 17 patients traités par bithérapie (12A) et 5 contrôles traités par mycophénolate en monothérapie (12B)
- Figure 12. Etude *ex vivo* de l'effet de la xanthosine (X) à différentes concentrations sur l'activation des lymphocytes T CD4 dépendante de l'OKT3 chez 12 témoins
- Figure 13. Etude *ex vivo* de l'effet de la xanthosine (X) sur l'acquisition dépendante de l'OKT3 du CD25 par les lymphocytes T CD4 chez 16 patients traités par

bithérapie (14A) et 3 sujets contrôles traités par mycophénolate en monothérapie (14B)

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATION

ABO :	groupes sanguins A, B et O
AUC :	de l'anglais «area under the curve»
CHU :	centre hospitalier universitaire
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	de l'anglais «cyto-mégalo-virus »
CN :	calcineurine
ConA :	concanavaline A
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
EBV :	de l'anglais « Epstein-Barr Virus »
FKBP12 :	de l'anglais «FK binding protein 12»
HLA :	de l'anglais « Human Leucocyte Antigen »
IFN :	interféron
IL :	interleukine
IMP :	inosine monophosphate
IMPDH :	inositol monophosphate déshydrogénase
MPA :	acide mycophénolique
mTOR :	de l'anglais «mammalian target of rapamycine »
NK :	de l'anglais «natural killer»
NFAT:	de l'anglais «Nuclear factor of activated T-cells»
NFκB :	de l'anglais «nuclear factor kappa B»
OKT3 :	anticorps monoclonal anti CD3
PBMC :	de l'anglais «peripheral blood mononuclear cells»
PHA :	phytohémaglutinine

SNP : de l'anglais «single nucleotide polymorphism»

STP : suivi thérapeutique pharmacologique

Tac : tacrolimus

TGF: de l'anglais «tumoral growth factor»

TNF : de l'anglais «tumoral necrosis factor»

REMERCIEMENTS :

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, le Dr Françoise Ledeist, pour son enseignement, son aide, son soutien constant et sa grande rigueur tout au long du projet.

Je tiens à remercier Sylvie St Amour, Rose-Marie Brito et Jocelyne Dansereau pour leur accueil si chaleureux dans le laboratoire, tous leurs bons conseils et leurs précieux services.

Je tiens également à remercier vivement le Dr Isabelle Fernandez pour sa participation active à ce projet.

Enfin je tiens à remercier la Fondation Canadienne du Rein qui a fourni une subvention de recherche ayant permis l'accomplissement de ce projet.

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

1.1 Epidémiologie de la transplantation d'organe au Canada

L'histoire de la greffe d'organes se concentre sur le XXème Siècle.

L'évolution durant ce dernier siècle est marquée par plusieurs acquisitions fondamentales telles que l'amélioration des sutures vasculaires, la meilleure identification de la mort cérébrale, l'amélioration des techniques de conservation des greffons, et enfin une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques de rejet, et la découverte de nouvelles molécules immunosuppressives.

Ainsi, depuis la fin du 20ème siècle, la transplantation d'organes solides constitue le traitement de choix d'une insuffisance rénale, cardiaque, pulmonaire, pancréatique ou hépatique au stade terminal [1-3]. Les taux de réussite de ces greffes sont en constante croissance grâce à de formidables progrès techniques et l'utilisation de nouvelles molécules immunosuppressives permettant de diminuer drastiquement le taux de rejet aigu, principale cause d'échec dans la phase précoce post greffe [4]. Ce type de traitement est ainsi proposé à un éventail toujours plus large de patients, à des âges plus extrêmes de la vie et présentant des co-morbidités plus nombreuses [5].

Au Canada par exemple, le nombre des patients transplantés d'organe a rapidement augmenté à la fin des années 90 pour ensuite se stabiliser pour le rein et le cœur et continuer à augmenter progressivement pour le foie, le pancréas et les poumons. Au total, 2080 transplantations d'organe solide ont été réalisées en 2008 se répartissant comme suit : 1216 reins, 453 foies, 164 cœurs, 165 poumons, 49 pancréas, 98 rein-pancréas (RCITO, rapport annuel 2010). A l'heure actuelle, la principale limite à une augmentation plus importante du nombre de greffes est l'accessibilité aux organes de

donneurs décédés qui est insuffisante. Depuis une quinzaine d'année, pour les greffes de rein et de foie, la promotion de la greffe d'organe faite à partir de donneurs vivants (apparenté ou non) a permis de remédier en partie à cette pénurie d'organes mais n'est pas toujours possible (incompatibilité ABO, co-morbidités des donneurs potentiels) [6-8]. Afin d'augmenter le nombre de donneurs vivants potentiel en greffe rénale, des programmes d'échanges de donneurs vivants sont développés, notamment au Canada. Ainsi, un premier couple donneur-receveur pour qui le donneur ne serait pas compatible au niveau des groupes sanguins peut échanger son donneur avec un second couple donneur-receveur si son receveur est compatible avec le donneur du premier couple et vice versa [9]. Les greffes des deux couples sont alors organisées et faites dans le même temps.

Parallèlement à cette augmentation du nombre et du type d'organes greffés, la nécessité de maintenir pendant toute la durée de vie du greffon un traitement immunosuppresseur a entraîné la survenue de nouvelles pathologies secondaire soit au déficit immunitaire chronique induit telles que des maladies malignes (syndrome lymphoprolifératif lié à l'EBV et cancers cutanés notamment) [10] et des infections sévères [11] soit aux effets délétères propres des immunosuppresseurs telle que la survenue de complications métaboliques (diabète, hypertension, dyslipidémie).

1.2. Le système HLA

Très vite après la découverte de l'importance de la compatibilité ABO au début de l'histoire des greffes d'organe, il s'avéra que le respect de cette compatibilité n'était pas suffisant pour éviter le rejet de greffe. Les antigènes responsables du rejet furent

dénommés les antigènes de transplantation puis antigènes d'histocompatibilité. Par la suite, en fonction de l'intensité de la réaction immunitaire induite, ils furent qualifiés d'antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité.

1.2.1 Les antigènes majeurs d'histocompatibilité (antigènes HLA)

Le premier antigène HLA (Human Leucocyte Antigen) a été initialement décrits par Dausset en 1958 à la surface des leucocytes [12]. Par la suite, de nombreux autres antigènes ont été décrits à la surface des cellules nucléées de l'organisme, appelés antigènes d'histocompatibilité. Leur combinaison particulière à la surface des cellules nucléées est différente d'un individu à l'autre et constitue une sorte de carte d'identité à l'échelon moléculaire de chaque individu.

Les antigènes d'histocompatibilité les plus importants résultent de l'expression d'une région chromosomique unique appelée le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ou complexe HLA chez l'homme se situant sur le bras court du chromosome 6. On distingue les antigènes HLA de classe I (HLA-A,-B,-C) présents à la surface de toutes les cellules nucléées et les antigènes de classe II (HLA-DP, -DQ, -DR) portés par un nombre restreint de cellules immunologiquement actives (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages et cellules cutanées de Langerhans).

Plusieurs allèles existent pour les gènes de classe I A, B, C et les gènes de classe II DPA1, DPB1, DQA1, DQB1, DRA1, DRB1 menant à l'existence de multiples spécificités du système antigène HLA.

Tout individu hérite un chromosome 6 de son père et un autre de sa mère et donc un allèle HLA de son père et un allèle HLA de sa mère. La détermination de ces allèles,

appelée groupage HLA d'un individu et conduisant au génotype HLA, est réalisée par des techniques de biologie moléculaire. Au cours de la différenciation des lymphocytes T dans le thymus, un processus appelé sélection thymique conduit à la sélection des lymphocytes T CD4 ou CD8, capables de reconnaître des peptides étrangers mais non des peptides du soi [13]. Cette sélection permettra la maturation du lymphocyte T seulement si le TCR (récepteur à la surface des lymphocytes T) de la cellule reconnaît des peptides dans le contexte du CMH du « soi » (sélection positive). Par contre, si le TCR reconnaît un antigène du soi avec une forte affinité, la cellule potentiellement autoréactive sera éliminée par le principe de sélection négative [14]. Enfin, si le TCR s'avère incapable de reconnaître le CMH de l'hôte, la cellule sera négligée et mourra (mort par négligence) [15]. Au terme de la sélection intrathymique, seuls 5% des thymocytes seront exportés vers la périphérie. Les cellules T possédant un TCR reconnaissant les molécules du CMH de classe I deviendront des cellules CD8+ tandis que celles dont le TCR reconnaît les molécules du CMH de classe II deviendront CD4+.

Les antigènes d'histocompatibilité ont pour fonction principale la présentation de peptides antigéniques aux cellules T dont l'activation nécessite la reconnaissance simultanée à la surface des cellules vivantes de ces peptides et des antigènes d'histocompatibilité. Les antigènes de classe I sont responsables de la présentation de peptides endogènes aux récepteurs des lymphocytes T CD8 alors que les antigènes de classe II sont responsables de la présentation de peptides exogènes aux récepteurs des lymphocytes T CD4. Les molécules HLA sont donc des initiateurs de la réponse immunitaire.

En greffe d'organe solide, le système immunitaire du receveur reconnaît comme du « non soi » les antigènes d'histocompatibilité portés par le greffon (reconnaissance allogénique). Cette reconnaissance est le point de départ de la réaction allogénique qui, sans traitement immunosuppresseur, conduit inéluctablement au rejet du greffon par le receveur.

1.2.2 Les antigènes mineurs d'histocompatibilité

L'intervention d'antigènes non HLA dans le rejet de greffe est bien démontrée par des rejets survenant chez des receveurs d'une allogreffe provenant d'un frère ou une sœur HLA identique. Ce sont des protéines polymorphes à partir desquelles des peptides alléliques peuvent être générés. Ils ne provoquent une réponse que lorsqu'ils sont présentés en tant que peptides allogéniques associés aux molécules HLA. Un exemple simple est l'antigène H-Y, présent chez les individus mâles et absent chez les individus femelles. Ainsi, sur une cohorte de 200 000 receveurs de rein de donneur cadavérique, le risque d'échec de greffe était plus important (risque ratio de 1.08 à 1 an) chez les femmes transplantées avec un rein d'un donneur masculin par rapport aux autres couples donneur-receveur [16].

En général, les antigènes mineurs d'histocompatibilité sont beaucoup moins polymorphes que les antigènes majeurs et provoquent une réponse immune moindre.

1.2.3 Compatibilité entre donneur et receveur en greffe d'organes solides

Ainsi en transplantation d'organe solide, en plus de la compatibilité dans le système ABO, la compatibilité dans le système HLA est le plus possible privilégiée afin de

réduire l'incompatibilité entre donneur et receveur. L'impact du degré d'incompatibilité a beaucoup été étudié et discuté en transplantation rénale où, grâce à la dialyse, les critères d'acceptation de l'organe peuvent être plus exigeants. Il est sûr qu'une parfaite compatibilité est associée à une durée de survie plus longue des greffons [17] mais la difficulté d'accès aux organes de donneurs cadavériques oblige à certains compromis. Il a été largement rapporté que la compatibilité dans les antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe II est celle qui a le plus d'impact sur la survie des greffons [17]. Plus récemment, il a été démontré que les incompatibilités dans le groupe HLA-DQ favorisent la survenue d'un rejet à composante humorale et d'un rejet chronique [18]. A l'Hôpital sainte Justine, en greffe rénale, les donneurs partageant au moins un HLA-DR (antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe II) commun avec le receveur sont acceptés si l'enfant attend depuis moins de deux ans sa greffe. A l'inverse, si il est en dialyse depuis plus de deux ans, une greffe sans aucune compatibilité HLA entre donneur et receveur pourra être pratiquée.

1.3. La réaction allogénique

Dans les greffes d'organes, l'identité du système HLA entre donneur et receveur ne peut être complète expliquant la réponse immunitaire du receveur contre le système HLA du donneur, appelée réaction allogénique.

Cette réaction allogénique peut être divisée en deux étapes : la reconnaissance allogénique et l'activation des lymphocytes T.

1.3.1 La reconnaissance allogénique :

Après une greffe d'organe, les cellules présentatrices d'antigènes, en particulier les cellules dendritiques, migrent vers les organes lymphoïdes. Elles présentent alors aux lymphocytes T (naïfs et mémoires) les antigènes HLA que les lymphocytes T alloréactifs reconnaissent comme non soi. Ce mécanisme de présentation directe conduit donc à l'activation de lymphocytes T et représente plus de 90% de l'intensité de la réaction allogénique et survient surtout durant les premières semaines post greffe.

Progressivement, les cellules dendritiques du donneur disparaissent et les cellules dendritiques du receveur sont responsables de l'alloréactivité par un mécanisme de présentation indirecte. Les peptides issus des molécules allogéniques du donneur (antigènes mineurs et majeurs d'histocompatibilité) sont alors présentés par les molécules HLA du receveur par les cellules présentatrices d'antigènes.

Ce mécanisme de présentation indirecte est le mécanisme supposé du rejet chronique.

1.3.2 L'activation des lymphocytes T du receveur (Figure 1) :

L'activation des lymphocytes est une condition nécessaire à la réaction allogénique. Elle conduit à la synthèse d'interleukines et à la prolifération des lymphocytes T activés par l'intermédiaire de 3 séries de signaux intracellulaires :

- Signaux 1 et 2 :

La reconnaissance du peptide présenté par la cellule présentatrice d'antigène (CPA) par le récepteur T induit le signal 1 et la formation de la synapse immunologique. La synapse recrute d'autres molécules telles que le co-récepteur CD28. La liaison de CD28 aux molécules CD80 et CD86 présents sur les cellules présentatrice d'antigènes induit le signal 2. Ces deux signaux activent trois voies de transduction du signal : la voie

dépendante de la calcineurine, la voie des Map-kinases et la voie NFκB [19-22]. Ces voies activent respectivement la translocation nucléaire de NFAT, la formation du complexe AP-1 et la translocation nucléaire de NFκB. Ces facteurs de transcription induisent l'expression de certains gènes dont celui du CD25 et de l'interleukine 2 (IL-2) [19]. L'IL-2 alors secrétée se lie à son récepteur de haute affinité, constitué de la chaîne α (CD25), β (CD122) et γ (CD132) exprimé par le lymphocyte T activé [23].

- Signal 3 : signal de progression du cycle cellulaire

Il est induit par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur de haute affinité. Cette fixation conduit entre autre à l'activation d'une kinase dénommée mTOR (mammalian target of rapamycine). L'activation de mTOR permet l'initiation de la traduction d'ARN et la synthèse de protéines de progression du cycle cellulaire. Ce signal conduit à la mitose des lymphocytes T activés et donc à leur prolifération après synthèse d'acides nucléiques à partir de bases puriques ou pyrimidiques [19].

La synthèse d'interleukines au cours de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T activés permet l'auto-amplification de la réponse immune et l'activation de lymphocytes B, de lymphocytes T cytotoxiques, de cellules NK et de macrophages. L'IL-2, synthétisée par les lymphocytes T activés, active de nombreuses cellules du système immunitaire. Son rôle est primordial dans la réaction allogénique. Le TNF-α, secrété également par les lymphocytes T activés et les macrophages, active les lymphocytes T, induit leur potentiel de cytotoxicité et favorise leur infiltration dans le greffon. L'interféron γ est secrété par les cellules NK, les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes T helper et joue un rôle important dans la stimulation de la réaction allogénique.

Les lymphocytes activés quittent les organes lymphoïdes et passent dans le sang par l'intermédiaire du canal thoracique.

1.4. Les différents types de rejets

Il existe différents types de rejet en fonction du mécanisme de la réaction allogénique :

1.4.1 Le rejet hyperaigu : il survient dans les heures qui suivent la greffe et est lié à l'existence d'anticorps anti-HLA préformés (due à une alloimmunisation à l'occasion d'une transfusion, d'une grossesse ou d'une greffe antérieure par exemple). Ces anticorps se fixent sur l'endothélium du greffon lors de la revascularisation. Ce type de rejet entraîne le plus souvent la perte du greffon. Le seul traitement de ce type de rejet est préventif et repose sur la recherche d'anticorps anti-HLA chez le patient en attente de greffe et la réalisation d'un cross match juste avant la greffe. Ce dernier permet la recherche chez le receveur d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA du greffon que l'on s'apprête à greffer. Il consiste à mettre en contact les lymphocytes du donneur avec le sérum du receveur (test de lymphocytotoxicité). Un test positif serait une contre-indication formelle à la greffe.

1.4.2 Le rejet aigu cellulaire :

Ce type de rejet est l'expression de la réaction allogénique due à l'incompatibilité entre les antigènes HLA du donneur et receveur [2]. L'intensité de cette réaction est évitée ou diminuée par les traitements immunosuppresseurs sans lesquelles elle conduirait le plus souvent à une destruction inéluctable du greffon

Il met plusieurs jours à survenir (au moins 5 jours) et va prendre une expression différente selon l'organe greffé. Il survient essentiellement dans les trois premiers mois après la greffe. Il peut aussi s'observer plus tardivement en cas de manque d'adhésion au traitement immunosuppresseur. Il est souvent diagnostiqué par une dysfonction de l'organe greffé et confirmé par l'étude histopathologique d'une biopsie de cet organe.

1.4.3 Le rejet chronique : il s'agit d'une réponse immunitaire à bas bruit, initiée par la présentation indirecte des antigènes et dirigée principalement contre les structures vasculaires et notamment endothéliales du greffon. Les processus de réparation des dommages liés à cette agression font appel à la synthèse de facteurs de croissance qui induisent la fibrose et le rétrécissement progressif de la paroi des vaisseaux et à d'autres mécanismes immunologiques comme l'activation de la cascade du complément. La physiopathologie du rejet chronique n'est pas encore totalement élucidée. Son traitement par les immunosuppresseurs actuels en est bien souvent décevant.

1.4.4 Le rejet humoral :

Le rejet aigu secondaire à la réaction allogénique peut s'accompagner de la production *de novo* d'anticorps spécifiques dirigés contre le donneur. La production de tels anticorps est associée à un mauvais pronostic en greffe rénale [24] et favorisée par la non-adhésion au traitement immunosuppresseur et l'incompatibilité au niveau de certains antigènes HLA de classe II. Le principal mécanisme physiopathologique incriminé dans le développement des lésions médiées par les anticorps est l'activation du système du complément et le recrutement in situ de neutrophiles [25]. L'immunité

humorale pourrait ainsi contribuer à la pathogénèse du rejet d'allogreffe, notamment dans sa forme chronique. Sa physiopathologie, son importance et son traitement optimal reste encore à élucider.

Le risque de rejet varie en fonction de facteurs liés au receveur tels que l'âge, le temps en dialyse avant la greffe (pour la greffe de rein), le degré de sensibilisation avant la greffe (existence d'anticorps anti-HLA préformés), l'ethnie, l'existence d'une obésité, d'une hyperlipidémie, d'un retard de fonction du greffon, ou d'une infection à CMV. Il varie également en fonction de la plus ou moins grande compatibilité entre le système HLA du donneur et celle du receveur.

Le risque de rejet aigu est plus élevé dans les 3 premiers mois post greffe.

Le traitement immunosuppresseur doit donc être à son maximum pendant cette période puis être diminué progressivement pour atteindre une dose minimum à la fin de la première année post greffe. Ce pallier ou dose minimale peut être variable d'un patient à l'autre selon le risque immunologique et selon les événements survenus après la greffe (infections, neutropénie, diabète).

1.5. Les immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs visent à diminuer la réaction allogénique en détruisant les lymphocytes T ou en empêchant leur activation et leur prolifération par inhibition d'un ou plusieurs des signaux d'activation.

Les molécules les plus couramment utilisées sont les inhibiteurs de la calcineurine (Cyclosporine et Tacrolimus (TAC)), les anticorps monoclonaux dirigés contre le

récepteur de l'IL-2 (anti-R-IL-2) ou contre les lymphocytes T (thymoglobulines), les bloqueurs de la progression du cycle cellulaire (rapamycine), les inhibiteurs de la synthèse des bases puriques tels que l'azathioprine et les mycophénolates (mycophénolate sodique ou mycophénolate mofétil) et les corticostéroïdes.

Les schémas thérapeutiques sont très variables selon l'organe transplanté, l'âge du receveur, son état d'immunisation préalable et les habitudes des équipes de transplantation. Un régime associant une triple thérapie a été associé, dans de nombreuses études randomisées contrôlées en greffe rénale, à une survie du greffon supérieure à 90% à 1 an avec un taux de rejet inférieur à 20%. Au CHU Sainte Justine, après un traitement d'induction par anti- R-IL-2, le traitement immunosuppresseur repose sur une trithérapie associant corticostéroïdes, TAC et mycophénolate en cas de greffe cardiaque ou rénale et sur une bithérapie (corticostéroïdes et TAC) en cas de greffe hépatique. Le mycophénolate peut être introduit chez ces patients en remplacement du TAC en cas de néphrotoxicité ou en complément en cas de rejet aigu sous bithérapie. Dans tous les cas la dose de corticostéroïdes est diminuée dès le premier mois après la greffe en raison de leurs effets secondaires. Seules les greffés de reins gardent une corticothérapie à dose minimale à long terme.

1.5.1 Les corticostéroïdes

Ils sont utilisés en greffe d'organes solides pour leur propriété anti-inflammatoire et pour leur action immunosuppressive par des mécanismes encore imparfaitement définis.

La prednisone est métabolisée par le foie en prednisolone, le composé actif qui a une fonction anti-inflammatoire inhibant les fonctions des macrophages et des

polynucléaires et une fonction immunosuppressive en se fixant comme agoniste sur le récepteur cytosolique des glucocorticoïdes. Le complexe stéroïde-récepteur se lie par la suite à des éléments de réponse aux corticoïdes (GRE) sur l'ADN et module l'expression de certains gènes. Elle augmente notamment l'expression du gène de l'inhibiteur de NFkB, IKB, entraînant ainsi une diminution de la sécrétion de interleukines par les lymphocytes T [26].

1.5.2 Les inhibiteurs de la calcineurine : la cyclosporine et le Tacrolimus

La cyclosporine est un polypeptide dérivé d'un champignon dont les propriétés immunosuppressives ont été découvertes en 1972. Elle a été à l'origine de progrès considérables en transplantation. A cause de ses effets secondaires cosmétiques (hirsutisme, hypertrophie gingivale), elle a progressivement été remplacée dans la plupart des centres transplantateurs européens et nord américains par le Tacrolimus (TAC).

Le Tacrolimus est un antibiotique de la famille des macrolides dont l'effet immunosupresseur a été identifié en 1983.

La cyclosporine et le Tacrolimus agissent en inhibant la calcineurine après s'être fixé sur leur cible protéique intracellulaire (respectivement la cyclophiline et la FKBP12).

La calcineurine (CN) est une phosphatase dépendante du calcium composée de 2 sous-unités, une sous-unité catalytique, la CN A (CNA) et une sous-unité régulatrice, la CN B (CNB). Deux isoformes, α et β de la CNA sont présentes dans les lymphocytes T et sont codées par 2 gènes (PPP3CA et PPP3CB) [27]. Au cours de l'activation lymphocytaire T, la CN déphosphoryle les facteurs de transcription NFAT (NFATc1, NFATc2 et

NFATc4) intra-cytoplasmiques permettant ainsi leur translocation dans le noyau [28]. Le complexe cyclosporine-cyclophiline ou TAC-FKBP12 se lie à la CN en dehors de son site catalytique, inhibe son activité phosphatase, et de ce fait inhibe la déphosphorylation des composés NFATc secondaire à l'activation lymphocytaire rendant compte, en partie, de l'activité immunosuppressive de ces molécules [29].

Il existe plusieurs immunophilines capables de se lier au TAC et le rôle d'autres complexes (Tac/FKBP12.6 et Tac/FKBP51) est aussi suggéré [30, 31]. Cependant, en plus d'être un inhibiteur de la CN, le TAC possède une autre action immunosuppressive en inhibant les canaux potassiques voltage-dépendants (Kv1.3) [31, 32]. Ces canaux Kv1.3 sont les principaux canaux de ce type dans les lymphocytes T, et en maintiennent le potentiel transmembranaire permettant la fonction des canaux calciques de type iCRAC [32]. De ce fait, leur inhibition prévient tous les événements dépendants de l'augmentation du calcium intracytoplasmique au cours de l'activation lymphocytaire T [33, 34]. Au total, le TAC inhibe, par au moins deux mécanismes différents, les signaux 1 et 2 de l'activation lymphocytaire T.

1.5.2. Les mycophénolates : Le mycophénolate mofétil (MMF) et le mycophénolate sodique (EC-MPS)

Après leur absorption dans l'estomac pour le MMF et dans le jéjunum pour le EC-MPS, ces deux molécules sont rapidement et complètement transformées en acide mycophénolique (MPA).

Le MPA est un antimétabolite, tout comme l'azathioprine et le méthotrexate. Ces molécules s'opposent à la division cellulaire en limitant la synthèse des bases puriques.

Comme illustré dans la figure 2, la synthèse des bases puriques dépend d'enzymes transformant le Ribose 5P en Inosine MP puis de l'adénosine désaminase pour la synthèse d'adénosine et de l'inositol monophosphate déshydrogénase (IMPDH) pour la synthèse de guanosine. Cette synthèse est contrôlée par rétro-inhibition par les ribonucléotides synthétisés (IMP, AMP, GMP).

Le MPA agit principalement comme puissant inhibiteur de l'IMPDH, enzymes essentielles à la synthèse *de novo* des bases puriques. Deux isoenzymes de l'IMPDH existent et sont codées par des gènes différents. Contrairement à l'isoenzyme II, l'isoenzyme I est constitutivement exprimée. Cependant les deux isoenzymes sont induites au cours de l'activation lymphocytaire T [35, 36]. Le MPA inhibe 5 fois plus l'isoforme II que l'isoforme I [37]. L'inhibition de l'IMPDH résulte donc en une déplétion en guanosine intracellulaire et à l'inhibition de la synthèse *de novo* des bases puriques et donc au blocage de la transition G1/S du cycle cellulaire. La déplétion en nucléotide a pour conséquence l'abrogation de l'expression de la cycline D3, indispensable à l'activité kinase dépendante des cyclines [38]. Contrairement aux autres cellules de l'organisme qui peuvent utiliser deux voies de synthèse des bases puriques, appelées voie *de novo* et voie de sauvetage, la prolifération des lymphocytes T dépend principalement de la synthèse *de novo* car elle s'avère plus efficace et constitue ainsi une cible privilégiée du MPA [39, 40]. Cependant, l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T par le MPA, n'est pas uniquement liée à l'inhibition de la synthèse d'ADN, mais aussi, probablement à l'inhibition de la transcription de certains gènes incluant le gène codant le CD25 indispensable à la prolifération lymphocytaire [41, 42].

1.6. La tolérance

La réaction allogénique décrite ci dessus peut être diminuée par des mécanismes immunologiques conduisant dans certains cas à l'absence de réaction du receveur aux antigènes étrangers du donneur, phénomène appelé tolérance. Ce phénomène est beaucoup plus fréquent chez les greffés du foie (jusque 20 à 30% des greffés) que chez les patients recevant une greffe rénale (moins de 10%) [43].

Les mécanismes immunologiques aboutissant à la tolérance en transplantation d'organes sont multiples :

- L'anergie :

L'inactivation fonctionnelle des lymphocytes T ou anergie peut survenir via de nombreux mécanismes dont le manque de signaux de costimulation [44] et pourrait être un phénomène important après transplantation.

- L'ignorance :

La tolérance peut survenir si le système immunitaire « ignore » l'existence d'un alloantigène en particulier si ce dernier est localisé dans un endroit inaccessible aux cellules T. La greffe de cornée doit en partie son succès au fait que la chambre antérieure de l'œil est un site privilégié de ce point de vue.

- L'épuisement clonal :

La stimulation chronique des cellules T peut entraîner leur apoptose par le mécanisme de mort induite par activation. Ce mécanisme paraît médié par le CD95 et pourrait agir comme un rétrocontrôle négatif dans le cas d'une stimulation chronique du système immunitaire comme c'est le cas avec les alloantigènes [45].

- Les cellules T régulatrices (CD4+CD25+Foxp3+) (Trég) :

C'est de loin le mécanisme le plus important. Ces cellules T diminuent activement la réponse immune. Ces cellules, naturellement anergiques et suppressives, semblent produites par le thymus normal en tant qu'une sous-population distincte de lymphocytes T [46, 47]. Elles pourraient jouer un rôle déterminant en régulant l'activité des cellules T alloréactives. Dans des modèles expérimentaux, ces cellules sont capables de transférer la tolérance à des antigènes étrangers [48, 49].

Les Trég expriment le facteur de transcription Foxp3. Une augmentation de l'ARN messager de ce facteur a été retrouvée chez 4 patients porteurs d'une transplantation combinée de rein et de moelle osseuse chez qui l'immunosuppression a pu être arrêtée entre 9 et 14 mois après la greffe et chez des receveurs de greffe hépatique [43, 50].

Des études récentes suggèrent que les inhibiteurs de la CN interfèrent avec l'expansion, la survie et la fonction des Trég *in vitro* et *in vivo*. Ceci pourrait expliquer que cette classe de médicaments ait été rapportée comme délétère dans des protocoles d'induction de tolérance *in vivo*. A l'inverse, la rapamycine ou les mycophénolates n'interfèrent pas avec la survie, l'expansion et la fonction des Trég, et favoriserait ainsi l'induction de la tolérance. Ainsi, chez des receveurs adultes de greffes hépatiques, la conversion de l'inhibiteur de la CN par du mycophénolate a été associée à une augmentation des Trég 6 mois plus tard. L'implication clinique en terme d'induction de tolérance et donc de diminution du risque de rejet malgré une diminution du traitement immunosuppresseur reste encore à prouver [48]. L'étude plus systématique de l'impact des immunosuppresseurs utilisés en greffe d'organes solides sur cette population cellulaire bénéfique pour le receveur permettrait d'optimiser l'équilibre entre cellules réactives et cellules régulatrices et ainsi favoriser la tolérance du receveur pour son greffon,

permettant ainsi de diminuer et dans certains cas d'arrêter le traitement immunosuppresseur afin d'en éviter les complications à long terme.

1.7. Individualisation des traitements immunosuppresseurs

L'efficacité des nouveaux immunosuppresseurs utilisés en greffe d'organes solides a permis une diminution importante de l'incidence des rejets aigus (moins de 20% dans la première année post greffe pour les transplantations hépatiques et rénales). En revanche, tous les immunosuppresseurs ont des effets secondaires importants soit par leur effet immunologique (sur-immunosuppression exposant au risque d'infections sévères et de cancers) soit par des effets toxiques directes (toxicité rénale des inhibiteurs de la CN, augmentation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire par augmentation du diabète, de l'hypertension artérielle et des hyperlipidémies). La toxicité de ces traitements pourrait expliquer l'absence d'augmentation de la survie à long terme des greffons et des patients alors que le nombre de rejets aigus a nettement diminué [51, 52]. A l'inverse, une sous-exposition en immunosuppresseurs augmente fortement le risque de rejet aigu et chronique et donc le risque de perte du greffon [19].

Ainsi, l'immunosuppression optimale d'un patient est une balance délicate entre le risque de rejet et les effets secondaires des immunosuppresseurs. Cet équilibre est d'autant plus difficile à obtenir que les médicaments immunosuppresseurs ont une fenêtre thérapeutique étroite c'est à dire que la différence entre l'exposition conduisant à l'efficacité ou à la toxicité est restreinte.

De plus, cette exposition peut, pour une posologie donnée, être variable d'un individu à l'autre et chez un même individu au cours du temps en fonction de nombreux paramètres

influençant le métabolisme des médicaments (variabilité pharmacocinétique), tels que l'âge du patient, son patrimoine génétique, l'existence de comorbidités ou de comédications responsables d'interactions médicamenteuses.

Enfin, pour une exposition donnée mesurée par des marqueurs pharmacocinétiques, l'effet du médicament sur sa cible peut aussi être variable d'un individu à l'autre et au cours du temps chez un même individu (variabilité pharmacodynamique) en fonction de paramètres liés au système immunitaire du receveur (état d'activation de son système immunitaire, nombre de lymphocytes circulants, répartition des sous populations lymphocytaires) ou liés à des polymorphismes sur les gènes codant pour les enzymes cibles des immunosuppresseurs.

Une stratégie visant à individualiser l'utilisation des immunosuppresseurs pourrait ainsi permettre un meilleur équilibre de la balance bénéfique/risque pour chaque patient et ainsi améliorer le taux de survie des greffons et des patients après transplantation d'organe solide.

Jusqu'à présent, les marqueurs utilisés dans la plupart des centres sont les concentrations sanguines ou plasmatiques de médicaments (outils de pharmacocinétique), les biomarqueurs de fonction d'organes (taux de créatinine sérique, enzymes hépatiques), les signes cliniques ou échographiques (en greffe cardiaque notamment) ou les résultats de l'analyse histopathologique des biopsie des organes greffés.

Excepté ce dernier qui est invasif pour le patient, les autres outils utilisés dans le suivi sont peu spécifiques et peu sensibles pour dépister une sur ou une sous immunosuppression chez un individu donné dans un contexte particulier après sa greffe.

L'étude de l'influence de certains polymorphismes d'enzymes clés dans le métabolisme des médicaments immunosuppresseurs ou dans leur mécanisme d'action (pharmacogénétique) a beaucoup aidé dans la compréhension des variabilités de pharmacocinétique et d'effet (pharmacodynamie) observées entre les individus mais l'intérêt de ces tests de pharmacogénétique sur le devenir à long terme des greffons reste à préciser.

Enfin, l'existence d'une variabilité inter et intra-individuelle dans la réponse du système immunitaire à un même taux d'immunosuppresseur et l'effet synergique, additif ou antagoniste de l'association de plusieurs molécules rendent peu fiable le suivi pharmacologique par pharmacocinétique seule.

Pour résoudre ce problème, des outils de pharmacodynamie ont été proposés, visant à évaluer non plus l'exposition (en terme de concentration sanguine ou plasmatique) mais l'effet des immunosuppresseurs administrés. Il peut s'agir de tests mesurant un effet spécifique d'un médicament donné (mesure de l'activité de l'enzyme cible par exemple) ou de tests visant à évaluer la fonction lymphocytaire mesurée *ex vivo* chez les patients.

1.7.1 Outils de pharmacocinétique

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) permet, par la mesure de la concentration d'un médicament, d'ajuster la dose administrée à un individu. Quatre conditions sont nécessaires pour qu'un médicament soit éligible au STP :

1. sa réponse pharmacologique doit être difficilement accessible par une mesure clinique d'effet,
2. son effet doit être en rapport plus étroit avec les concentrations obtenues dans le compartiment sanguin ou plasmatique qu'avec la posologie quotidienne prise,
3. il doit présenter une fenêtre thérapeutique étroite,
4. il doit exister une grande variabilité pharmacocinétique inter- ou intra-individuelle.

Mise en forme : Puces
et numéros

Les immunosuppresseurs répondent à ces 4 critères, faisant du STP un outil largement utilisé en transplantation d'organes [41,53]. Cependant, la variabilité inter et intra-individuelle de l'effet immunosuppresseur pour une concentration donnée et l'absence de cibles thérapeutiques précises à atteindre selon l'organe greffé en sont des limites indéniables.

Il existe différents outils de STP : mesure de la concentration prédose ou résiduelle (C_0), de la concentration à un temps fixe donné après la prise (par exemple C_2 pour le suivi de la cyclosporine) ou mesure de l'aire sous la courbe des concentrations au cours des 12 heures séparant deux prises (AUC_{0-12h}). Ce dernier est le meilleur reflet de l'exposition d'un individu au médicament. La pertinence des différents outils varie en fonction des molécules immunosuppressives utilisées et de leur métabolisme.

En ce qui concerne le TAC, le C_0 reste encore à ce jour la méthode de référence [54] malgré certaines controverses. Ce dosage peut être très variable d'un sujet à l'autre pour une posologie (en mg/kg/jour) donnée et dans le temps pour un même sujet. Il peut en effet être modifié par de nombreux facteurs tels que l'alimentation, le cycle circadien, le temps post greffe, les comédications ou les comorbidités éventuelles.

Pour le suivi du traitement par mycophénolate, la mesure de l'AUC_{0-12h} est la méthode de choix pour évaluer l'exposition au MPA du fait d'un second pic plasmatique de MPA lié à la recirculation entéro-hépatique des métabolites se retransformant en principe actif dans l'intestin grêle au contact de la flore digestive contribuant pour 30 à 50 % de l'exposition totale au MPA, très variable d'un patient à l'autre [55]. Cette mesure n'est toutefois pas réalisable en clinique de transplantation car elle nécessite une présence de 12 heures du patient et de multiples prélèvements.

1.7.2 Outils de pharmacogénétique

La pharmacogénétique est l'étude de l'influence des polymorphismes génétiques d'enzymes clés du métabolisme ou du transport des immunosuppresseurs sur la pharmacocinétique et de protéines clés dans la réponse immunologique ou cible des traitements immunosuppresseurs sur la pharmacodynamie (effet du médicament sur sa cible).

La variabilité de réponse aux immunosuppresseurs dépend au moins en partie de polymorphismes génétiques.

Si certains polymorphismes génétiques tels que celui identifié dans le Cytochrome p450 isoforme 3A5 (CYP3A5), très impliqué dans le métabolisme digestif et hépatique du tacrolimus, expliquent une grande part des variabilités interindividuelles de pharmacocinétiques, le rôle des polymorphismes d'enzymes impliquées dans la pharmacodynamie reste encore à préciser.

Ces polymorphismes génétiques pourraient entraîner :

- soit une variabilité de l'effet direct des IS sur la réponse immunitaire en touchant les gènes codant pour les protéines cibles telles que l'IMPDH1 et 2, FKBP12, CALNA, CLNB) ou les protéines en aval de celles-ci (les facteurs NFATc).
- soit une variabilité de la réponse immunitaire en affectant des protéines régulant la réponse des lymphocytes T incluant les interleukines et leur récepteur

1.7.2.1. Variabilité de l'effet direct des immunosuppresseurs sur la réponse immunitaire :

La grande variabilité interindividuelle de l'activité IMPDH chez les patients avant traitement par IS et l'existence de deux isoformes de cet enzyme démontre l'intérêt d'une approche pharmacogénétique [56]. Wang et col en 2008 ont décrit deux polymorphismes de type *Single Nucléotide Polymorphisme* (SNP) de l'IMPDH1 associés à une incidence plus élevée de rejets aigus dans la première année post greffe rénale dans une série de 191 patients traités par mycophénolate [57]. L'IMPDH2 est plus conservée que l'IMPDH1. Cependant, un SNP de l'*IMPDH2*, T3757C, serait associé au rejet précoce [58] mais l'effet de ce polymorphisme sur l'activité enzymatique n'est pas connu. Concernant la variabilité interindividuelle pharmacodynamique vis à vis du TAC, aucune étude de pharmacogénétique sur les gènes codant les protéines cibles de cet IS tel que FKBP12 n'est rapportée à ce jour.

1.7.2.2. Génétique de protéines régulant la réponse des lymphocytes T

Le risque de rejet lors d'une greffe de rein est corrélé à une sécrétion élevée d'IL-2 *in vitro* par les lymphocytes T du receveur [59]. La variabilité de synthèse de l'IL-2

observée entre les sujets sains est liée à certains SNP dans le gène codant l'IL-2, en particulier le SNP en position -330 G/T [60]. Cependant, chez des patients ayant eu une greffe de rein ou de foie, ce SNP ne semble pas associé à une variabilité de l'incidence du rejet aigu précoce [58, 61]. En greffe de cellules souches hématopoïétiques, l'effet de ce SNP est variable d'une étude à l'autre sur la survenue d'une réaction du greffon contre l'hôte [61, 62]. Au moins 6 SNP du gène codant le CD25 ont été rapportés associés à des maladies auto-immunes tels que le diabète de type 1 [63-65], la sclérose en plaque [64, 66] et l'arthrite chronique juvénile [67]. Les conséquences fonctionnelles de ces SNP restent encore méconnus et leur importance chez les patients transplantés n'est pas rapportée. Quatre SNP sont connus pour réguler la synthèse de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire. Il est clair que l'incidence de rejet aigu après greffe corrèle avec les allèles de ces SNP conférant une faible synthèse de cette cytokine mais les SNP associés au rejet diffèrent selon les organes greffés [61, 68-71].

1.7.3. Outils de pharmacodynamie

Les tests disponibles actuellement en laboratoire visent à évaluer soit l'effet spécifique d'un médicament immunosuppresseur soit l'effet du régime immunosuppresseur sur les fonctions lymphocytaires du receveur après stimulation par un mitogène.

1.7.3.1 Critères pharmacodynamiques spécifiques des inhibiteurs de la calcineurine

- ***L'activité phosphatase de la calcineurine*** : La possibilité d'effectuer un suivi thérapeutique pharmacodynamique basé sur la mesure de l'activité phosphatase de la CN a donné lieu à des résultats contradictoires. Ainsi, certains ont montré l'existence d'une

relation entre le degré d'inhibition de l'activité de la CN et les concentrations sanguines de TAC [72, 73] alors que d'autres ont indiqué que cette inhibition ne pouvait pas être prédite par les concentrations de TAC [74] et qu'elle n'était pas corrélée à la survenue de complications cliniques telles que des infections ou un rejet [75]. De plus, le degré d'inhibition de la CN, tel que testé dans la littérature avec un système acellulaire, ne rend pas compte de l'inhibition des canaux potassiques Kv1.3 par le TAC, en partie responsable de son action immunosuppressive [31].

- *Mesure de l'expression des gènes régulés par NFAT (Nuclear factor of Activated T-Cell)*

Plusieurs équipes proposent d'évaluer l'inhibition de la CN en quantifiant l'expression de gènes dont la transcription est régulée par NFAT (gènes codant pour l'IL-2, l'interféron γ , le TNF- α). En effet, Brunet et col [76] ont démontré que l'expression de ces gènes est inversement corrélée aux taux de Ciclosporine ou de TAC et qu'elle peut être très variable d'un patient à l'autre (témoignant de degré variables d'immunosuppression) mais assez stable dans le temps pour le même patient [77, 78]. Le niveau d'expression de ces 3 gènes est inversement corrélé à la survenue de cancers cutanés et d'infections chez des receveurs de greffe de rein ayant des concentrations sanguines comparables de cyclosporine [77-79]. L'intérêt clinique de ce test a donc été démontré en greffe de reins. Cet intérêt doit être confirmé avec le TAC, plus largement utilisé actuellement, sur un plus grand nombre de patients, et dans le suivi de greffe des autres organes solides.

1.7.3.2. Critères pharmacodynamiques spécifiques de l'Acide Mycophénolique.

- **L'activité IMPDH** : Les résultats de la mesure de l'activité IMPDH décrits dans la littérature sont contradictoires.

Une diminution [80, 81] ou une augmentation paradoxale [82] de l'activité IMPDH dans les cellules mononuclées des patients traités par mycophénolate ont été rapportées. Cette différence semble liée à la durée du traitement par mycophénolate au moment de l'étude [81]. L'augmentation paradoxale de l'activité observée par certaines équipes serait liée à une augmentation de la transcription des deux isoformes de l'enzyme IMPDH I et II [83]. De plus, l'activité IMPDH ne reflète pas la capacité de la cellule à constituer un pool de nucléotides car la voie de sauvetage de synthèse des bases puriques peut être induite dans les lymphocytes des patients traités par mycophénolate, résultant en la constitution d'un pool de nucléotides indépendante de la synthèse *de novo* et donc de l'IMPDH [81]. Cependant, l'activité IMPDH chez les sujets avant traitement par mycophénolate, très variable d'un patient à l'autre, pourrait constituer un paramètre prédictif d'efficacité ou de toxicité du traitement [56].

Récemment, Glander et col ont validé un test de mesure de l'activité IMPDH ayant une meilleure reproductibilité et précision et nécessitant une plus petite quantité de sang que les tests connus jusqu'à présent [56]. Ce test pourrait donc être un outil applicable avant la greffe pour ajuster la dose initiale prescrite.

- **Le pouvoir inhibiteur de la prolifération cellulaire exercé par le sérum des patients.**

Le MPA est liée à 97% à l'albumine et seule sa fraction libre est échangeable avec le compartiment cellulaire et est active [84]. Le MPA est métabolisé en deux métabolites :

l'acyl-glucuronide MPA (AcMPAG) et le 7-O-MPA- β glucuronide (MPAG). L'AcMPAG inhibe l'activité de l'IMPDH *in vitro* [85], et le MPAG, en se liant à l'albumine, déplace le MPA et en conséquence augmente la fraction libre de MPA. L'effet immunosuppresseur exercé par le MPA peut être donc modifiée par la quantité de ces métabolites et le taux d'albumine plasmatique.

Cependant, la majorité des études pharmacocinétiques dosent le MPA total sans faire cas de ces métabolites et de la concentration de MPA libre. La capacité du sérum d'un patient à inhiber la prolifération d'une lignée cellulaire, en l'occurrence la lignée CEM, insensible aux autres IS, présente l'avantage de refléter l'effet du MPA libre susceptible d'inhiber l'IMPDH intracellulaire [76, 86]. Chez certains receveurs adultes de greffe de foie, le puissant pouvoir inhibiteur de la prolifération exercé par leur sérum peut ainsi contraster avec une concentration sanguine basse de MPA [76], mettant en évidence l'intérêt de ce test.

1.7.3.3. Critères pharmacodynamiques évaluant la fonction lymphocytaire résiduelle

La fonction lymphocytaire constitue un paramètre de pharmacodynamie qui présente plusieurs avantages : il mesure la fonction que l'on veut inhiber *in vivo* par l'administration d'IS et il permet de tester l'effet global de l'association d'IS [87-89]. La fonction lymphocytaire peut être testée *ex vivo* en présence de mitogènes qui entraînent de manière non spécifique l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Les mitogènes les plus souvent utilisés dans la littérature sont la Concanavaleine A (ConA) [89, 90] et la phytohémataglutinine (PHA) [72]. L'association ionomycine et phorbol 12-myrate 13 acétate (PMA) est également utilisée [91]. La fonction lymphocytaire peut

être évaluée en mesurant l'activation des lymphocytes (tests d'activation) ou leur capacité à proliférer (test de prolifération). Ces tests sont réalisés sur sang total ou sur les cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMC) [87].

L'activation des lymphocytes T peut être évaluée *in vitro* ou *ex vivo* par la quantification de l'expression à la surface cellulaire de différents marqueurs d'activation membranaires tels que des récepteurs protéiques (récepteur de l'IL-2 (CD25) ou le récepteur de la transferrine (CD71) [92] ou des molécules de costimulation telle que le CD26 ou le CD30 [93]. Elle peut aussi être évaluée par la quantification *ex vivo* de la sécrétion de interleukines tels l'IL-2 [72, 94], l'IL-4 [95], le TNF- α et l'interféron- γ [92] ou de la forme soluble de molécules de co-stimulation telle que le CD30 (sCD30) par les lymphocytes activés [93].

L'expression du CD25 et du CD71 a été étudiée dans des cultures de sang total de volontaires sains, de patients dialysés et de greffés hépatiques, cardiaques et rénaux [87, 96, 97]. Une corrélation a pu être mise en évidence entre l'expression de ces marqueurs d'activation membranaire et la concentration sanguine de l'immunosuppresseur [90, 98]. Les principales limites rencontrées ont été la présence d'une grande variabilité inter et intra-individuelle dans les résultats de ces tests, l'absence de corrélation entre les différents tests utilisés, l'impossibilité de départager l'effet des immunosuppresseurs sur les différentes sous populations lymphocytaires, l'impossibilité de différencier l'effet de chaque immunosuppresseur chez un patient donné. De plus assez peu de patients ont été inclus dans ces études. [89, 90, 92, 97, 99, 100].

Le CD26 est une protéine multifonctionnelle qui agit comme une molécule de costimulation. Une expression élevée de CD26 a permis de prédire le rejet avec une

sensibilité de 100% et une spécificité de 69% dans une étude faite sur 35 greffés rénaux [101]. Ce biomarqueur prometteur a maintenant besoin d'être étudié sur de plus grandes cohortes de patients, avec des protocoles d'immunosuppression variés et différents types d'organes greffés.

Une diminution de la synthèse d'IL-2 a été rapportée chez des volontaires sains [102] sous cyclosporine et chez des receveurs de reins traités par cyclosporine et mycophénolate ou mycophénolate en monothérapie après stimulation par le PHA [99]. Cette diminution était liée aux concentrations sanguines de cyclosporine chez des volontaires sains mais pas chez les receveurs de reins. Chez ces derniers, une diminution significative de l'IFN- γ a par contre été retrouvée 2h après la prise de cyclosporine et non après la prise de mycophénolate. L'IFN- γ semble donc un marqueur plus spécifique de l'immunosuppression par la cyclosporine.

Le sCD30 mesuré avant et après la greffe a été rapporté comme un marqueur du risque de rejet [103]. Dans une étude multicentrique chez 3900 transplantés de reins, l'association d'un taux élevé de sCD30 et de la présence d'anticorps anti-HLA avant la greffe était associée au risque de perte du greffon 5 ans après la greffe [104]. Un taux bas de sCD30 a été associé à un taux plus élevé d'infections en post greffe [105]. Ces données n'ont par contre pas été retrouvées chez des receveurs de reins de donneurs vivants et chez des receveurs de greffe cardiaque prouvant que la pertinence de ces tests est encore à démontrer.

La prolifération lymphocytaire peut être mesurée soit par la quantification de l'incorporation de thymidine radioactive dans du DNA nouvellement synthétisé en phase

S, soit par quantification de l'incorporation d'iodure de propidium dans le noyau des lymphocytes T, soit par la mesure de l'expression d'antigènes nucléaires tel que l'antigène nucléaire de cellules en prolifération (PCNA), une protéine auxiliaire de la DNA polymérase, soit par la mesure de l'activité mitochondriale.

La mesure de l'activité mitochondriale par la mesure de la concentration d'ATP dans les lymphocytes T CD4 après stimulation par la PHA peut être réalisée par un kit commercialisé et approuvé par la « Food and Drug Administration » (Immuknow Cylex assay ; Cylex Inc., Columbia, MD) [106]. Dans une étude multicentrique faite sur 127 receveurs de reins, de foie et de pancréas, la réponse à la stimulation par la PHA mesurée par ce test était abaissée chez les patients par rapport aux volontaires sains mais n'était pas corrélée aux concentrations sanguines de TAC. De plus, les résultats des patients et les volontaires sains se chevauchaient, démontrant la faible spécificité de ce test [107]. Plus récemment, le résultat de ce test réalisé chez 583 transplantés de reins adultes n'a pas permis de prédire le risque de rejet dans les 90 jours suivant le test [108]. Néanmoins, une diminution de la réponse à la stimulation mesurée par ce test en période d'infection et une augmentation en période de rejet a été rapportée chez des patients adultes [109]. Des études prospectives, contrôlées, en double aveugle, sont maintenant nécessaires pour confirmer l'intérêt d'un suivi longitudinal des patients avec ce test et l'intérêt potentiel de le cumuler avec d'autres.

1.8. Objectifs de l'étude

1.8.1. Evaluer le degré d'immunosuppression globale chez des patients pédiatriques receveurs de greffe d'organes solides traités par une combinaison d'immunosuppresseurs.

1.8.2. Discriminer le rôle respectif des immunosuppresseurs dans l'immunosuppression observée chez les patients.

1.8.1 Evaluation du degré d'immunosuppression chez les patients traités par immunosuppresseurs

1.8.1.1 Quantification du degré d'immunosuppression par mesure de l'expression des marqueurs d'activation lymphocytaire (expression par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ d'antigènes membranaires dépendants de l'activation tels que le CD25 et le CD71) et de la prolifération lymphocytaire (étude du cycle cellulaire mesuré par incorporation d'Iodure de Propidium dans le noyau des lymphocytes T CD4+ et CD8+).

Cette quantification sera faite après stimulation des lymphocytes T par l'OKT3 (anticorps monoclonal anti-CD3) ou par la Concanavaline A (ConA). L'OKT3 nous paraît plus approprié car sa cible (CD3), complexe moléculaire responsable de la transmission du signal dépendant du TcR (signal 1), est parfaitement connue ainsi que les événements biochimiques qu'il induit. (Figure 1). Quand utilisé sous forme soluble en culture, l'activation des lymphocytes par l'OKT3 est dépendante de la présence des monocytes et donc probablement du signal 2. La prolifération observée dans ces conditions est principalement dépendante de la boucle IL-2-RIL-2 (signal 3). Nous

comparerons nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature et valideront l'intérêt de ces tests dans une population pédiatrique.

Notre hypothèse est que l'utilisation de l'OKT3 comme mitogène et l'étude des sous populations lymphocytaires CD4 et CD8 permettront d'augmenter la sensibilité et/ou la spécificité des paramètres pharmacodynamiques utilisés.

1.8.1.2 Evaluation des paramètres immunologiques pouvant modifier les fonctions immunitaires quantifiées

Dans les cultures telles que pratiquées dans les études *ex vivo*, il existe au moins deux paramètres immunologiques qui peuvent modifier de façon significative l'activation et la prolifération lymphocytaire T :

- Les lymphocytes T régulateurs appelés Trég qui sont capables de supprimer la réponse immunitaire (71). Il s'agit de lymphocytes T CD4 qui expriment CD25 et le facteur de transcription FoxP3. Leur développement intrathymique indépendant de l'IL-2 contraste avec leur survie dépendante de cette interleukine [49]. Le traitement par les inhibiteurs de la CN tel que le Tacrolimus entraîne une diminution des Trég et pourrait donc paradoxalement augmenter la réponse des lymphocytes T du receveur traité à l'organe greffé [48, 110]. Au contraire, le MPA ne modifie pas la présence des Trég chez les patients traités [48].
- L'IL-10 est synthétisée dans les conditions de culture utilisées et capable de supprimer l'activation et la prolifération lymphocytaire T. Cette suppression de fonction immunitaire, dépendante de l'IL-10 sécrétée, pourrait varier d'un patient à

l'autre en fonction des polymorphismes du gène codant pour cette interleukine qui en influencent le degré de sécrétion [60].

Nous faisons l'hypothèse qu'un nombre variable de Trég et/ou une variabilité de synthèse de l'IL-10 interindividuelle pourrait expliquer au moins en partie la variabilité du niveau d'immunosuppression induite par les médicaments immunosuppresseurs. Nous étudierons également la synthèse d'autres interleukines secrétées par les lymphocytes T activés : l'IL-2, le $TNF\alpha$ et le TGF

1.8.2 Discriminer le rôle respectif des immunosuppresseurs dans l'immunosuppression globale observée chez les patients

Afin d'ajuster le traitement le plus précisément possible selon les résultats de l'étude pharmacodynamique, nous chercherons à discriminer le rôle respectif de chaque immunosuppresseur utilisé chez un même patient.

La principale conséquence de l'inhibition de la CN et des canaux Kv1.3 par le TAC est l'inhibition de la translocation des NFATc au cours de l'activation lymphocytaire et en conséquence une inhibition de la synthèse d'IL-2. Chez des patients atteints de déficit immunitaire héréditaire lié à un défaut de canal calcique avec défaut de translocation de NFAT, il a été montré que l'adjonction exogène d'IL-2 restaure l'expression du CD25 et la prolifération des lymphocytes T [34]. Ceci suggère que l'IL-2 est capable de compenser les effets du TAC.

Les principales conséquences de la déplétion en guanosine due à l'action du MPA sont l'arrêt du cycle cellulaire et probablement l'inhibition de la transcription de certains gènes comme le CD25 qui peuvent être compensés par de la guanosine [39].

La guanosine étant capable de contrôler la formation d'IMP par rétrocontrôle négatif (Figure 2), nous faisons l'hypothèse que la xanthosine (précurseur de la guanosine) pourrait aussi compenser l'inhibition de la transcription de certains gènes sans avoir le même effet de rétrocontrôle négatif.

Nous faisons l'hypothèse qu'il est possible de compenser, ex vivo, l'effet du Tacrolimus par l'addition d'IL-2 exogène et l'effet de l'Acide Mycophénolique par l'addition de nucléotides (guanosine ou xanthosine), ce qui permettrait de discriminer le rôle respectif de ces 2 immunosuppresseurs dans l'immunosuppression observée chez les patients recevant les 2 molécules en association.

Figure 1 : Activation des Lymphocytes T (d'après Feske et col)

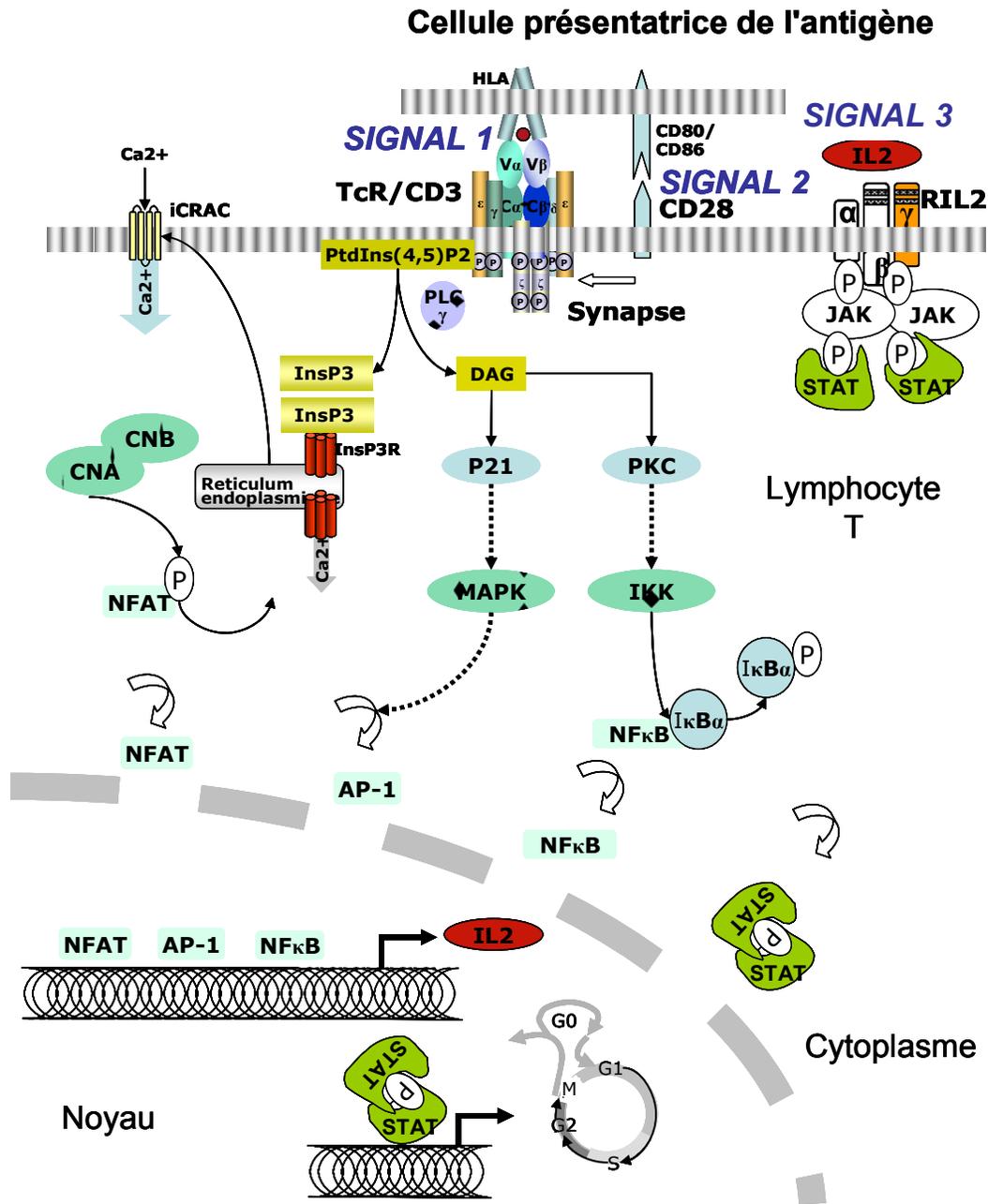
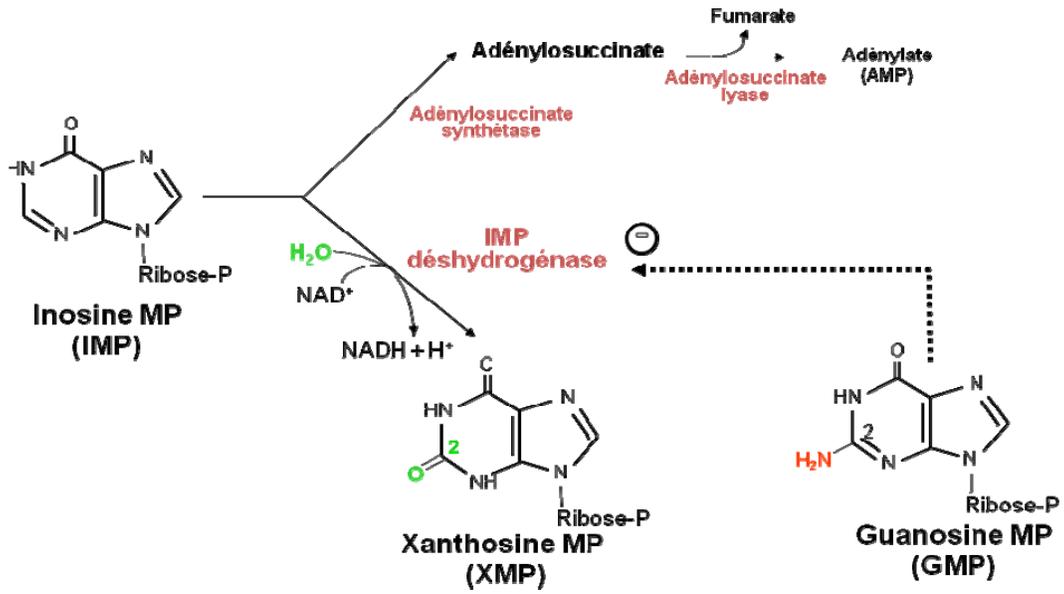


Figure 2 : Synthèse *de novo* des bases puriques

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1 Matériel

2.1.1 Patients

Des échantillons sanguins sont prélevés chez des patients suivis après transplantation rénale, cardiaque, ou hépatique. Les prélèvements sont faits lors d'une visite de routine en même temps qu'un dosage prédose de TAC (C_0 TAC) ou lors d'une hospitalisation pour dosages répétés d'acide mycophénolique (MPA) dans le but de calculer une aire sous la courbe (AUC) ou bien lors d'une hospitalisation pour suspicion de rejet ou d'infection sévère nécessitant un ajustement du traitement immunosuppresseur.

Tous les patients doivent recevoir un traitement immunosuppresseur depuis au moins 1 mois à dose stable associant du Tacrolimus (Prograf® ou Advagraf®) et un mycophénolate (Cellcept® ou Myfortic®) avec ou sans prednisone dont la posologie ne doit pas dépasser 0.3 mg/kg/j.

La posologie de TAC et de mycophénolate (dose de mycophénolate sodique convertie en dose de mycophénolate mofétil avec une conversion équimolaire), les concentrations de TAC et de MPA, le nombre/mm³ de lymphocytes totaux, des sous populations lymphocytaires, le taux d'hématocrite, la concentration d'albumine plasmatique est relevé en même temps que chaque prélèvement d'échantillons sanguins de pharmacodynamie pour chaque patient. Pour certains patients, plusieurs dosages de concentration de MPA et un calcul de l'aire sous la courbe des concentrations de MPA est disponible.

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique du centre de recherche du CHU Sainte Justine et les prélèvements ont tous été faits après le consentement écrit et éclairé de chaque patient et/ou de leurs parents.

2.1.2 Contrôles et témoins

Des échantillons sanguins ont été prélevés :

- Chez des patients sous monothérapie c'est à dire ne recevant que du TAC ou que du mycophénolate plus ou moins de la prednisone (posologie < 0.3 mg/kg/jour). Ces patients sous monothérapie serviront de contrôles pour les expériences visant à discriminer le rôle de chaque immunosuppresseur.
- Chez des volontaires sains qui servent de témoin pour chaque expérience.

2.2 Méthodes

2.2.1 Prélèvements sanguins : 5 ml de sang total sont prélevés sur un tube contenant de l'héparinate de sodium juste avant la prise de la dose de TAC et/ou du mycophénolate pour chacun des patients. Les prélèvements sont conservés à température ambiante jusqu'à la mise en culture qui doit avoir lieu dans les 24 heures suivants le prélèvement.

Le prélèvement des sujets contrôles est fait selon le même protocole.

Le prélèvement des témoins est fait selon le même protocole mais sans horaire précis.

2.2.2 Mise en culture : Le sang total est dilué au dixième dans du milieu RPMI additionné de GlutaMAX (Gibco) et incubé à 37°C sous 5% de CO₂ en présence de l'un des deux mitogènes utilisés dans des plaques de culture de 24 puits (1 ml par puit) (Corning Incorporated, USA).

Les deux activateurs lymphocytaires utilisés sont la Concanavoline A (ConA) et un anticorps monoclonal anti-CD3, l'OKT3. La ConA lyophilisée (Sigma Aldrich, St Louis, USA) est reconstituée dans du milieu RPMI additionné de GlutaMAX (utilisé pour toutes les dilutions) à la concentration de 1 mg/ml, conservée à -20°C, elle est

diluée extemporanément afin d'obtenir une concentration finale dans les puits de 2.5 µg/ml. L'OKT3 à 1 mg/ml (e-Biosciences, San Diego, USA) est conservé à 4°C. Après dilutions, la concentration finale obtenue dans les puits est de 50 ng/ml.

Dans les expériences utilisant l'IL-2, 40 unités par ml d'IL-2 (Proleukine, Novartis) sont rajoutées dans les puits le jour de début de culture. Les cultures en présence de Con A et d'OKT3 sont incubées respectivement pendant 3 et 4 jours.

2.2.3 Quantification de la fonction lymphocytaire des patients ex vivo :

2.2.3.1 Quantification de l'activation lymphocytaire

Tous les anticorps et les solutions utiles à la cytométrie sont fournis par Becton Dickinson (BD Biosciences, San Diego, USA). Les deux puits de chaque condition sont réunis dans un tube adapté à la cytométrie (Falcon). Après centrifugation (400 g pendant 10 minutes), les cellules sont marquées par incubation à 0°C pendant 20 minutes avec les anticorps suivants : anti-CD4 humain couplé à l'allophycocyanine (APC), anti-CD8 humain couplé à l'APC-Cy7, anti-CD25 couplé à la phycoérythrine (PE) et anti-CD71 couplé à la fluorescéine (FITC) (10 µl de chaque anticorps déposé sur le culot cellulaire). Les globules rouges sont lysés avec 2 ml de solution de Facs Lysing pendant 10 minutes. Après 2 lavages par centrifugation (400 g pendant 5 minutes), les lymphocytes CD4 et CD8 sont acquis sur un cytomètre FACSCanto II selon une région d'acquisition qui permettra l'analyse de 20 000 lymphocytes CD4 ou CD8. Les cellules sont analysées avec le logiciel DIVA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules exprimant le CD25 ou le CD71 parmi les lymphocytes CD4 (région d'analyse déterminée sur le dot plot FSC= f(APC) ou parmi les lymphocytes T CD8 (région d'analyse déterminée sur le dot plot FSC= f(APC-Cy7). Après exclusion des cellules

double-positives CD4 APC et CD8 APC-Cy7, les pourcentages de cellules CD25 et CD71 sont déterminés sur le dot plot (PE)/f(FITC).

2.2.3.2 Quantification du cycle cellulaire lymphocytaire

Les cellules sont marquées par les anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8 de la même manière que précédemment. Après lyse des globules rouges selon le même protocole, les cellules sont perméabilisées avec 0.5 ml d'une solution de FACS Permeabilising dilué au dixième pendant 10 minutes, puis après deux lavages, marquées avec 0.5 ml d'une solution contenant 50 µg/ml d'Iodure de Propidium (IP) (Sigma Aldrich) et 50 µg/ml de Rnase Dnase-Free (Sigma Aldrich). 20 000 lymphocytes CD4+ ou CD8+ sont acquis. L'analyse du cycle cellulaire, qui détermine les pourcentages de cellules en phase G0/G1, S, G2M du cycle est faite avec le logiciel Modfit parmi les lymphocytes CD4 et les CD8 repérés sur les dot plot FSC= fCD4-APC et FSC= fCD8-APC-Cy7 après exclusion des doublets visualisés sur le dot plot IP- FLW = f IP-FLA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de lymphocytes T CD4 ou CD8 en phase S ou G2M du cycle cellulaire (cellules en cycle) parmi la population lymphocytaire considérée.

La réponse spécifique à la stimulation par la ConA et l'OKT3 sera évaluée selon la formule :

% fonction lymphocytaire T (FLT) =

(% FLT parmi les cellules activées - % FLT parmi les cellules non activées) x 100

(100 - % FLT parmi les cellules non activées)

2.2.4 Evaluation des paramètres immunologiques pouvant modifier la fonction lymphocytaire évaluée ex vivo

2.2.4.1 Quantification de la sécrétion de interleukines (IL-2, IL-10, TNF- α et TGF- β)

La sécrétion d'IL-2, d'IL-10, TNF- α et de TGF- β est étudiée après 24 heures de culture de sang des patients dilué au 1/10 (v/v) dans du RPMI en présence d'OKT3 (50 ng/ml) ou d'OKT3 (50 ng/ml) plus phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA 200 ng/ml) (Sigma Aldrich). La PMA, activateur de la PKC est utilisé comme co-activateur. Les surnageants de culture sont récoltés après centrifugation et congelés (-80°C) jusqu'au moment de la quantification de l'IL-2, de l'IL-10 et du TNF- α faite par une technique basée sur la technologie xMAP (de l'Anglais « Multi-analyte profiling beads »). La mesure d'une interleukine donnée est basée sur la fixation de l'interleukine sur des anticorps spécifiques couplés aux billes de polystyrène couplé à un fluorochrome. Cette technologie permet la quantification de plusieurs interleukines simultanément avec une sensibilité de 10 pg/mL/, utilisant l'appareil Perkin Elmer CS1000 (Downers Grove, IL) pour la lecture et le logiciel Xponent 3.0. (Luminex, Toronto, Canada) pour l'analyse des données. Les trousseaux utilisés sont fournies par le fabricant Panomics (Santa Clara, CA). Les courbes standards et les contrôles sont inclus selon les recommandations du fabricant.

2.2.4.2 Phénotypage des lymphocytes T circulants et quantification des lymphocytes T régulateurs (Trég)

Le phénotypage des lymphocytes T circulants inclut la numération des lymphocytes T CD3, CD8, et les lymphocytes naïfs thymiques CD4⁺ CD45RA⁺CD31⁺.

Ce phénotypage est pratiqué sur sang total prélevé sur EDTA. 100 µl de sang sont incubés avec les anticorps spécifiques anti-CD4APC (BD) anti-CD8APC (BD) anti-CD45RAPE (Beckman Coulter, Mississauga, Canada) et anti-CD31 FITC (BD) pendant 20 minutes dans la glace. Les globules rouges sont lysés avec du FACS lysing (BD). Les cellules sont acquises grâce à un cytomètre FASCanto II et analysées utilisant le logiciel DIVA.

La quantification des lymphocytes Trég (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) est pratiquée sur sang total prélevé sur EDTA. 100 µl de sang sont incubés avec les anticorps spécifiques anti-CD4FITC (BD), anti-CD25PE (BD) pendant 20 minutes dans la glace. Après lyse des globules rouges avec du FACS lysing (BD) puis perméabilisation avec du FACS permeabilizing (BD), les cellules sont mises en contact avec un anticorps spécifique anti-Foxp3 APC (eBioscience) pendant 1 heure dans la glace. Les cellules sont acquises grâce à un cytomètre FACSCanto II et analysées en utilisant le logiciel DIVA.

2.2.5 Evaluation de la fonction lymphocytaire T après compensation de l'effet de chacun des deux immunosuppresseurs :

Les cultures pratiquées comme décrit ci-dessus sont faites en présence d'IL-2 (40 UI/mL) pour compenser l'effet du TAC ou en présence de guanosine (75, 200 µM)

(Sigma Aldrich) et de xanthosine (75 ; 200 ; 400 μM) (Sigma Aldrich) pour compenser l'effet du MPA rajoutés au début de la culture comme décrit. Les effets de l'IL-2, de la guanosine et de la xanthosine et leur spécificité seront validés chez les patients contrôles traités respectivement par TAC seul dans le cadre de la prévention du rejet de greffe hépatique ou par mycophénolate dans le cadre du traitement de maladies auto-immunes. L'activation lymphocytaire est évaluée comme décrit ci-dessus.

2.2.6 Etudes pharmacocinétiques

Les études pharmacocinétiques sont pratiquées dans le laboratoire de pharmacocinétique du CHU Sainte Justine.

Des échantillons de sang total sont prélevés sur EDTA puis congelés à -20°C .

Les concentrations sanguines pré-dose du TAC (C_0 TAC) sont mesurées par la technique MEIA (trousse immunologique IMx de Abbott).

Les dosages plasmatiques de MPA sont effectués avec la technique d'HPLC-MSMS (quantification minimale de 0.1 ng/mL).

L'aire sous la courbe (AUC) de 0 à 12h (AUC_{0-12h}) est calculée en utilisant la méthode trapézoïdale linéaire à partir de plusieurs prélèvements pré et post dose de mycophénolate (C_0 , C30mn, C1h, C2h, C3h, C4h, C6h, C8h, C12h).

2.2.7 Analyses statistiques

Les données cliniques des patients sont exprimées en médiane (med) avec le minimum (min) et le maximum (max).

Les tests de comparaison sont faits avec un test non paramétrique [Mann-Whitney], apparié ou non (test de Wilcoxon) tel que approprié pour chaque situation. L'intervalle de confiance (IC) choisi est de 95%

Les patients sont classifiés en groupes correspondant au degré d'immunosuppression induit évalué sur le critère de l'acquisition du CD25 par les CD4 induite par l'OKT3.

Les comparaisons des valeurs des paramètres étudiés *ex vivo*, des données cliniques, biochimiques, de phénotypage et de pharmacocinétiques entre les groupes sont faites à l'aide d'un test non paramétrique [Mann-Whitney] avec un IC de 95%.

Les tests de corrélation entre deux variables sont fait par le test de Spearman (r =coefficient de corrélation) avec un intervalle de confiance de 95%.

Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel Graphpad PRISM5.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Caractéristiques cliniques et biologiques des patients (tableau I) :

Au total, 81 échantillons sanguins ont été prélevés et étudiés chez 52 patients transplantés. Les échantillons ont été numérotés par ordre d'inclusion puis sous numérotés par ordre de prélèvements pour un même patient. Dix de ces patients greffés étaient en monothérapie au moment du prélèvement, 8 d'entre eux recevaient de l'azathioprine en association avec le TAC et l'un d'entre eux recevait une haute dose de prednisone de 0.5 mg/kg/j. Ainsi, après l'application des critères d'inclusion définis ci-dessus, nous avons retenus 54 échantillons sanguins prélevés chez 34 patients (17 de sexe masculin) suivis après transplantation rénale (n=25), cardiaque (n=7) ou hépatique (n=2). Tous les patients inclus recevaient un traitement immunosuppresseur depuis au moins 1 mois à dose stable associant du TAC (Prograf® ou Advagraf®) et un mycophénolate (Cellcept® ou Myfortic®). Seuls les 25 greffés rénaux recevaient de la prednisone (73 % des patients), à une posologie inférieure à 0.3 mg/kg/j.

Parmi les 34 patients étudiés, dix ont eu plusieurs prélèvements d'échantillons sanguins (2 à 4) pendant la durée de l'étude. La durée médiane entre les prélèvements est de 46 jours (3-1354). L'âge médian des patients inclus est de 15.3 ans. Le plus jeune a 5.4 ans alors que le plus vieux est âgé de 22 ans. Le poids médian de ces patients est de 56.8 kg (19.6-114.5).

Le délai médian de suivi post greffe est de 30.7 mois (1.7-247.3).

Parmi ces échantillons, 4/54 sont étudiés dans un contexte de rejet et 1/54 dans un contexte d'infection à EBV chez un receveur de rein. Le diagnostic de rejet est confirmé par l'étude histopathologique de la biopsie du cœur greffé pour 3 patients et du rein greffé pour un patient.

Tableau I. Caractéristiques cliniques, biologiques et pharmacocinétiques des 34 patients au moment des 54 prélèvements. (med = médiane)

Caractéristiques	
Age (années) (n=54) med (min-max)	15.3 (5.4-22.1)
Sexe, n Masculin/Féminin	17/17
Poids (kg) (n= 54) med (min-max)	56.8 (19.6-114.5)
Délai post greffe (mois) (n=54) med (min-max)	31.2 (1.7-247.3)
Première greffe, n	34/34
Type de greffe, n	
Rein	25/34
Cœur	7/34
Foie	2/34
Prélèvements effectués en présence d'un rejet, n	4/54
Prélèvements effectués dans contexte d'infection, n	1/54
Hématocrite sanguin (%) (n= 54) med (min-max)	36.8 (30.5-45.3)
Lymphocytes totaux (/mm ³) (n= 54) med (min-max)	2500 (700-6200)
Lymphocytes T CD3 (/mm ³) (n= 21) med (min-max)	1848 (710-2905)
Lymphocytes T CD4 (/mm ³) (n= 21) med (min-max)	906 (116-1680)
Albumine plasmatique (gr/L) (n= 54) med (min-max)	40 (31-46)
Posologie de TAC (mg/kg/24h) (n= 54) med (min-max)	0.12 (0.03-0.25)
Posologie de mycophénolate (mg/kg/24h) (n= 54) med (min-max)	16.2 (3.8-50)
C ₀ de TAC (ng/ml) (n= 54) med (min-max)	6.9 (2.2-18.6)
C ₀ de MPA (ng/ml) (n= 34) med (min-max)	2.34 (0.37-5.9)
Nombre de prélèvements par patients, n	
1 prélèvement	24/34
2 prélèvements	3/34
3 ou 4 prélèvements	7/34

Le nombre/mm³ de lymphocytes sanguins, de lymphocytes T CD3 et CD4, l'hématocrite et la concentration en albumine plasmatique sont rapportés pour chaque patient à chaque prélèvement.

Les posologies de TAC et de mycophénolate sont disponibles pour chaque patient à chaque prélèvement. La posologie médiane de TAC reçue par les patients était de 0.12 mg/kg/j (0.03-0.25) et la posologie médiane de mycophénolate de 16.2 mg/kg/24h (3.8-50).

Les concentrations résiduelles ou prédose (C₀) de TAC (C₀ TAC) et de MPA (C₀ MPA) sont disponibles pour chaque prélèvement pour le TAC et pour 34/54 prélèvements pour le MPA.

Le C₀ de TAC médian est de 6.9 ng/mL (2.2-18.6) (n=54). Le C₀ de MPA médian est de 2.34 ng/mL (0.37-5.9) (n=34).

L'AUC de MPA est disponible pour 7/54 prélèvements. Sa médiane est de 55.8 ng.h/mL (47.15-79.5).

3.2 Caractéristiques cliniques des sujets contrôles :

- Sujets contrôles sous monothérapie : 21 patients sous monothérapie ont eu 29 prélèvements : 8 chez 6 patients traités par TAC seul et 21 chez 15 patients traités par mycophénolate ± prednisone (posologie < 0.3 mg/kg/jour) (patients suivis pour un lupus érythémateux disséminé ou une hépatite auto-immune).
- Sujets témoins : le prélèvement de témoins volontaires d'âge pédiatrique a été d'emblée refusé afin de s'assurer d'avoir des témoins indemnes de toute pathologie connue pour perturber la réponse immunitaire d'une part et pour des raisons éthiques

évidentes d'autre part. Il a donc été effectué 63 prélèvements chez des adultes volontaires sains, ne recevant aucun traitement immunosuppresseur.

3.3 Quantification de la fonction lymphocytaire T ex vivo

3.3.1 Comparaison des deux mitogènes :

Quantification de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 après stimulation par deux mitogènes : la concanavoline A (ConA) et un anticorps monoclonal anti-CD3 (OKT3).

Chez les témoins (Tableau II), on note une différence pour tous les différents paramètres étudiés entre les deux mitogènes. Cette différence est statistiquement significative ($p < 0.05$, test apparié de Wilcoxon) pour tous les paramètres excepté pour l'expression du CD71 dans les CD8.

Les niveaux d'activation lymphocytaire observés après stimulation avec l'OKT3 sont plus importants qu'après stimulation par la ConA, et ceci de manière encore plus marquée dans les CD4 que dans les CD8. Par contre, cette supériorité de l'OKT3 n'est pas retrouvée lors de l'étude de la prolifération lymphocytaire.

La variabilité inter-échantillons des tests étudiés est de 14.4 à 42% et est plus basse lors de l'étude de l'activation cellulaire par la mesure de l'expression du CD25 dans les lymphocytes T CD4 stimulés par l'OKT3. Pour ce même paramètre, la variabilité est plus importante après stimulation par la ConA qu'après stimulation par l'OKT3 (23.87 vs 14.4%).

L'OKT3 semble donc être un mitogène plus discriminant (plus grande puissance et moindre variabilité) que la ConA pour mesurer l'activation des lymphocytes T après stimulation chez les témoins.

Nous privilégierons donc les données obtenues après stimulation par l'OKT3 dans les résultats suivants.

Tableau II. Test de fonction lymphocytaire chez les témoins après stimulation par l'OKT3 (4 jours) et la ConA (3 jours)

Paramètre statistique	Marqueurs d'activation (%)				Cellules en cycle (%)	
	CD71	CD25	CD71	CD25	S+G2M	S+G2M
	/CD4		/CD8		/CD4	/CD8
OKT3						
Médiane	81.5	80.87	67.68	63.61	36.46	32.6
Coefficient de variation (%)	15.8	14.43	24.05	23.99	35.25	41.89
Moyenne	79.05	79.68	67.66	65.83	37.37	31.99
Dérivation standard	12.47	11.5	16.27	15.79	13.17	13.4
Erreur standard	2.17	1.53	2.83	2.05	1.73	1.77
ConA						
Médiane	67.49	66.16	59.32	55.25	40.85	35.27
Coefficient de variation	25.25	23.87	28.01	27.51	37.68	39.7
Moyenne	66.82	65.13	62.23	59.11	45.06	36.71
Dérivation standard	16.87	15.54	17.43	16.26	16.98	14.57
Erreur standard	3.77	2.74	3.89	2.87	3	2.57
P ConA/OKT3	0.02	0.0002	Ns	0.023	0.029	0.04

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression de CD25 ou de CD71 et de cellules en cycle (voir matériel et méthodes) parmi les lymphocytes T CD4 et CD8.

3.3.2 Comparaison des différents tests étudiés :

Les résultats de l'étude de l'acquisition du CD25 et du CD71 et de la prolifération cellulaire après stimulation par OKT3 des lymphocytes CD4 et CD8 des patients sous bithérapie sont rapportés dans le Tableau III.

Tableau III. Test de fonction lymphocytaire résiduelle chez les 34 patients traités par association de TAC et de mycophénolate

Paramètre statistique	Marqueurs d'activation (%)				Cellules en cycle (%)	
	CD71	CD25	CD71	CD25	S+G2M	S+G2M
	/CD4		/CD8		/CD4	/CD8
OKT3						
Médiane	59.6	42.78	42.9	22.15	14	9.11
Coefficient de variation	63.3	70.18	72.74	91.21	99.77	106.47
Moyenne	46.05	40.48	34.86	27.38	16.91	11.8
Dérivation standard	29.15	28.41	25.36	24.98	16.87	12.57
Erreur standard	6	3.8	5.28	3.36	2.31	1.74

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression de CD25 ou de CD71 et de cellules en cycle (voir matériel et méthodes) parmi les lymphocytes T CD4 et CD8.

Nous observons une forte corrélation ($r = 0.72$ à 0.95) entre les résultats des différents tests étudiés après stimulation par l'OKT3 sur un même prélèvement chez les patients (Tableau IV). Les tests mesurant l'activation lymphocytaire par l'expression du CD25 ou du CD71 parmi les CD4 ou les CD8 ont les meilleurs taux de corrélation (0.89 à 0.95).

Tableau IV. Etude de la corrélation entre les différents paramètres étudiés dans les 54 échantillons sanguins prélevés chez 34 patients traités par association de TAC et de mycophénolate

r = coefficient de corrélation selon test de Spearman

r	CD71 /CD4	CD25 /CD4	CD71 /CD8	CD25 /CD8	S+G2M /CD4	S+G2M /CD8
CD71 /CD4		0.95	0.94	0.89	0.73	0.75
CD25 /CD4	0.95		0.93	0.95	0.79	0.72
CD71 /CD8	0.94	0.93		0.95	0.81	0.86
CD25 /CD8	0.89	0.95	0.95		0.77	0.75
S+G2M /CD4	0.73	0.79	0.81	0.77		0.89
S+G2M /CD8	0.75	0.72	0.86	0.75	0.89	

Comme illustré sur la figure 3, il existe une différence statistiquement significative entre les patients et les témoins sur l'ensemble des paramètres étudiés. Cette différence est toutefois plus importante dans les tests mesurant l'activation lymphocytaire que dans les tests mesurant la prolifération.

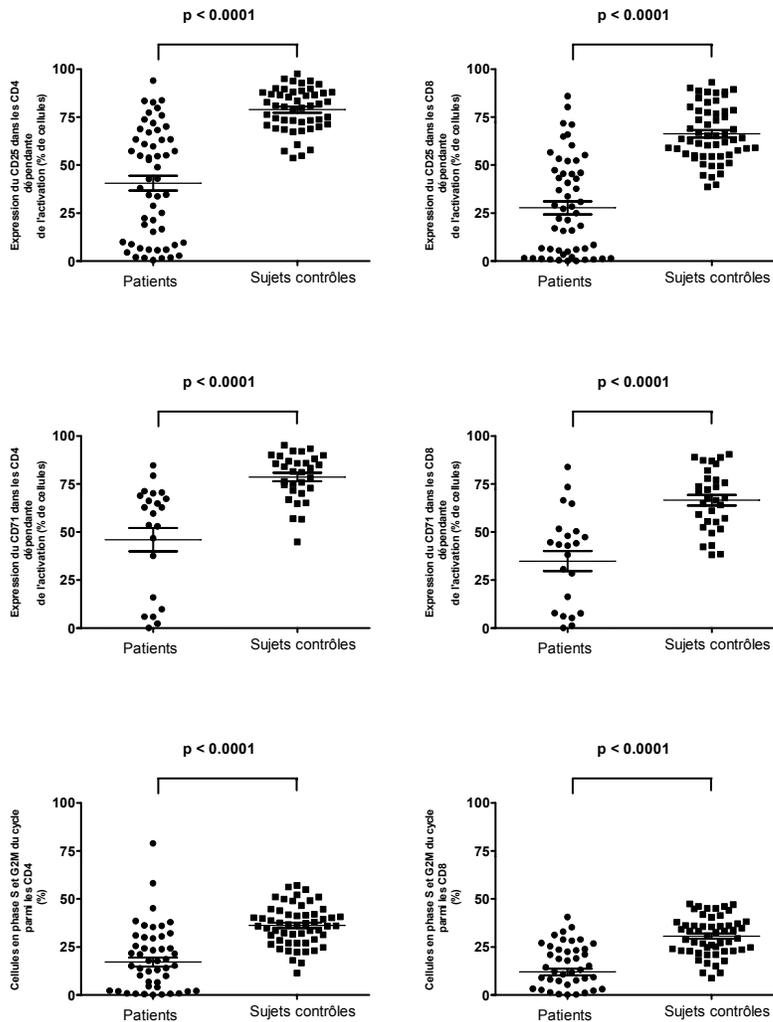
L'expression du CD25 et du CD71 parmi les lymphocytes T CD4 n'est pas corrélée au taux sanguins de lymphocytes totaux ($r= 0.17$) ni aux taux de lymphocytes T CD4 ou CD3 ($r < 0.1$).

En résumé, après stimulation par l'OKT3, l'expression du CD25 parmi les CD4

- est toujours supérieure à 50% chez les témoins
- est le test qui présente la moindre variabilité et une très bonne corrélation avec les autres tests mesurant l'activation et la prolifération lymphocytaire
- n'est pas corrélé au nombre total de lymphocytes T CD4 et CD3/mm³.

L'étude de l'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3 nous semble donc être le test le plus discriminant et sera donc choisi comme outil de mesure de la fonction lymphocytaire résiduelle dans les expériences suivantes.

Figure 3. Mesure ex vivo de l'activation (expression du CD25 ou du CD71 (%)) et de la prolifération (% de cellules en cycle) lymphocytaire dépendante de l'OKT3 parmi les lymphocytes T CD4 et CD8 chez les témoins (n=63) et chez les patients traités par TAC et mycophénolate (n=54)
n= nombre d'échantillons sanguins étudiés



Après activation par l'OKT3 (4 jours), le pourcentage de lymphocytes T activés et exprimé comme le pourcentage de lymphocytes T CD4 ou CD8 exprimant le CD25 ou le CD71 et le pourcentage de lymphocytes en cycle est exprimé comme le pourcentage de lymphocytes T CD4 ou CD8 en phase S ou G2M. Les pourcentages spécifiques d'activation et de cellules en cycle dépendant des mitogènes sont calculés comme suit : $(\% P \text{ en présence d'OKT3} - \% P \text{ sans OKT3}) \times 100 / (100 - \% P \text{ sans OKT3})$;
P = paramètre étudié

3.3.3 Variabilité de la fonction lymphocytaire résiduelle des patients :

- Variabilité inter et intra individuelle :

Tel qu'illustré dans la figure 3, la fonction lymphocytaire résiduelle mesurée par l'expression du CD25 parmi les CD4, mais aussi par l'étude des autres paramètres, est très variable d'un patient à l'autre.

Cette variabilité est également observée au cours du temps pour un même patient. Nous avons étudié plus de deux échantillons sanguins chez 7 patients au cours de notre étude. Le pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4, les C_0 de TAC et de MPA le jour du prélèvement ainsi et le délai entre deux prélèvements chez ces 7 patients sont rapportés dans le tableau V. La figure 4 illustre la variation de l'expression des CD25 parmi les lymphocytes T CD4 stimulés par l'OKT3 chez ces patients. On note que le pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 est constamment inférieur à 50% chez deux patients (patient 6 et 12) alors qu'il est très variable dans le temps chez les 5 autres patients. Chez ces deux patients, le délai entre deux prélèvements pouvait être très grand (jusque 42 mois).

Le pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 varie sans relation avec la variation des C_0 de TAC et de MPA chez ces patients (tableau V).

Figure 4. Evolution du marqueur d'activation cellulaire (expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3) au cours du temps chez 7 patients ayant eu plus de deux échantillons sanguins prélevés.

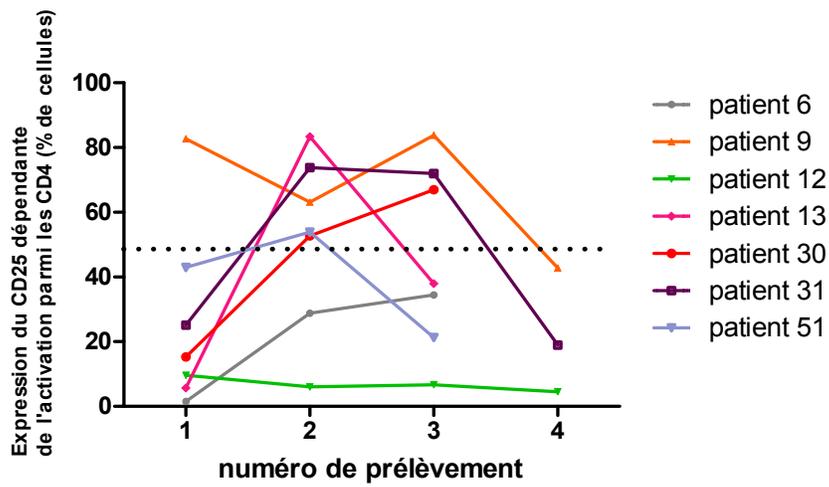


Tableau V. Expression du CD25 dépendante de l'OKT3 parmi les lymphocytes T CD4, données de pharmacocinétiques et délai entre deux prélèvements chez 7 patients ayant eu plus de deux prélèvements au cours de l'étude.

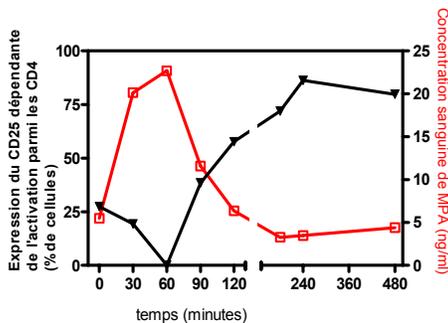
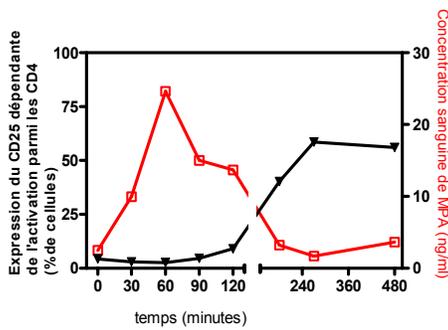
	%CD25/CD4	C ₀ TAC (ng/ml)	C ₀ MPA (ng/ml)	Délai (jour)
Patient 6				
1	1.5	7.2	2.35	
2	28.8	7.9	1.56	18
3	34.4	7.5	3.81	1267
Patient 9				
1	82.7	10.2	0.42	
2	63.1	18.6	0.7	31
3	83.8	8.2		320
4	42.8	11.3	1.55	924
Patient 12				
1	9.6	4.5	0.97	
2	6	6.4	1.29	3
3	6.7	2.2		1130
4	38	3.4		25
Patient 13				
1	5.7	4	2.33	
2	83.4	7.5		51
3	38	7.8		1240
Patient 30				
1	15.3	13.7	4.16	
2	52.7	5.3		70
3	67	8.7		35
Patient 31				
1	25.1	7.1	2.89	
2	73.8	9.3	2.77	42
3	71.9	4.5		42
4	18.9	5.2	0.88	37
Patient 51				
1	43	4.7	3.43	
2	53.8	6.7		882
3	21.3	4.2		16

- **Variabilité au cours de la journée :**

Deux sujets contrôles, suivis pour maladies auto-immunes et traités par mycophénolate en monothérapie, ont été étudiés après avoir effectué plusieurs prélèvements 0 à 8 heures après la prise du mycophénolate.

Comme illustré dans la figure 5, l'expression des CD25 parmi les lymphocytes T CD4 est variable dans le temps compris entre deux prises de l'immunosuppresseur. Le pourcentage d'expression du CD25 parmi les CD4 évolue à l'inverse de la concentration sanguine de MPA entre 0 et 12h après la prise du mycophénolate.

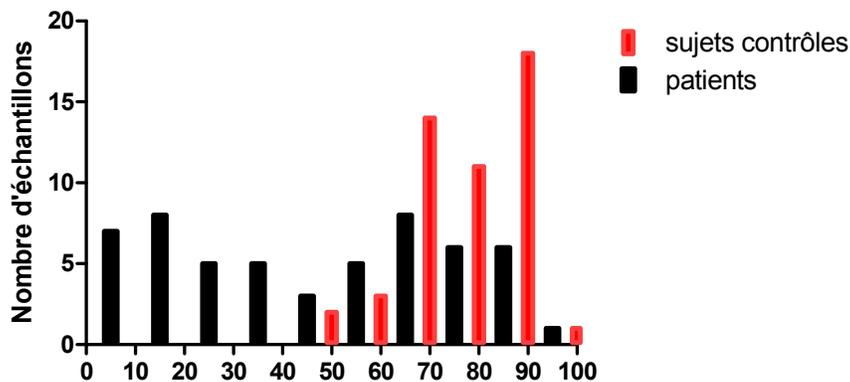
Figure 5. Concentrations de MPA et pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 stimulés par l'OKT3 au cours du temps après une dose de mycophénolate reçue à temps 0.



3.3.4. Détermination de deux groupes de patients selon leur fonction lymphocytaire résiduelle.

Après stimulation par l'OKT3, l'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 (CD25/CD4) suit une distribution bimodale permettant de distinguer deux groupes de patients : un groupe de 29 prélèvements de patients très immunosupprimés (mesure de l'expression du CD25/CD4 < 50%), significativement différent du groupe de témoins ($p < 0.0001$) et un autre groupe de 25 prélèvements de patients peu immunosupprimés (expression du CD25/CD4 $\geq 50\%$) mais cependant différents des sujets contrôles ($p < 0.0005$) (figure 6).

Figure 6. Distribution des patients et des contrôles en fonction du pourcentage de lymphocytes T CD4 exprimant le CD25 après stimulation par l'OKT3 (4 jours).



Le tableau VI résume les caractéristiques cliniques, biologiques et pharmacocinétiques des deux groupes de patients. L'âge et le poids du patient au moment du prélèvement ainsi que la concentration prédose (C_0) et la posologie quotidienne de mycophénolate (rapportée au poids) sont significativement différents entre les deux groupes de patients.

Les autres paramètres tels que le délai post greffe, le sexe, les nombres/mm³ de lymphocytes sanguins totaux, CD3, CD4, l'hématocrite, la concentration plasmatique d'albumine, la posologie quotidienne de TAC ou le C₀ de TAC ne sont pas différents entre ces deux groupes de patients.

L'âge est le paramètre de loin le plus différent entre les deux groupes et ce malgré l'absence de très jeunes patients dans notre population. Les plus jeunes enfants ont une expression plus basse du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3, témoignant d'une fonction lymphocytaire résiduelle plus faible donc d'une immunosuppression plus forte.

La posologie quotidienne de mycophénolate (rapportée au poids) ainsi que le C₀ de MPA sont également plus élevées chez ces jeunes patients plus fortement immunosupprimés.

Tableau VI. Caractéristiques cliniques, biologiques et pharmacocinétiques des patients selon leur groupe d'immunosuppression (med(min-max)).

Le groupe fortement immunosupprimé est défini par un pourcentage de lymphocyte T (LT) CD4 exprimant le CD25 inférieur à 50 (n=29) et le groupe faiblement immunosupprimé est défini par un pourcentage de LT CD4 exprimant le CD25 supérieur ou égale à 50 (n=25), après stimulation par l'OKT3.

	Patients fortement immunosupprimés	Patients faiblement immunosupprimés	P
Age (année)	12.9 (5.4-18.3) n=29	15.9 (11.5-22.1) n=25	0.003
Poids (kg)	40 (19.6-95) n=29	60 (40.5-114.5) n=25	0.015
Délai post greffe (mois)	28.7 (1.7-78.6) n=29	30.3 (3.1-247.3) n=25	0.85
Lymphocytes sanguins (/mm ³)	2200 (700-6200) n=29	2800 (1500-3900) n=25	0.38
LT CD3 (/mm ³)	1852 (710-2304) n=9	1736 (833-2905) n=12	0.57
LT CD4 (/mm ³)	973 (410-1377) n=9	860 (116-1680) n=12	0.79
LT CD4CD25Foxp3 (%)	3 (2-8.1) n=4	4 (2.8-5.8) n=5	0.62
LT CD31CD45RA (%)	44.5 (27-52) n=4	29 (20-47) n=5	0.28
Albuminémie (gr/l)	40 (38-46) n=29	41 (31-46) n=25	0.67
Hématocrite (%)	36.9 (30.5-44) n=29	37.5 (32.3-45.3) n=25	0.65
C ₀ TAC (ng/ml)	6.5 (2.2-13.7) n=29	7.4 (3.1-18.6) n=25	0.34
Posologie de TAC (mg/kg/24h)	0.12 (0.04-0.25) n=29	0.11 (0.04-0.24) n=25	0.33
C₀ MPA (ng/ml)	2.9 (0.37-5.9) n=21	1.48 (3.8-27.3) n=13	0.016
Posologie de mycophénolate (mg/kg/24h)	16.4 (8.9-50) n=29	12.7 (3.8-27.3) n=25	0.026

n = nombre de prélèvements, med = médiane, min = minimum, max = maximum

L'analyse statistique de comparaison des deux groupes est faite avec un t test de Mann Witney.

3.3.5 Evaluation des paramètres immunologiques pouvant modifier les fonctions immunitaires résiduelles observées *ex vivo* pour ces deux groupes de patients

3.3.5.1 Etude de la synthèse d'interleukines (IL 2, Il-10, TGF beta, TNF)

La sécrétion des interleukines IL-2, Il-10, TGFβ et TNFα a été étudiée *in vitro* chez 14 patients sous bithérapie et 7 témoins dans les surnageants de culture, après stimulation par l'OKT3 seul ou avec du PMA (tableau VII et figure 7).

Tableau VII. Quantification de la sécrétion des interleukines (IL-2, Il-10, TNFα et TGFβ) dans le surnageant de cultures sans (NS), avec stimulation par OKT3 ou OKT3 + PMA (24 heures) chez 14 patients sous bithérapie et 7 témoins. Les interleukines sont quantifiées selon la technologie xMAP, Panomics.

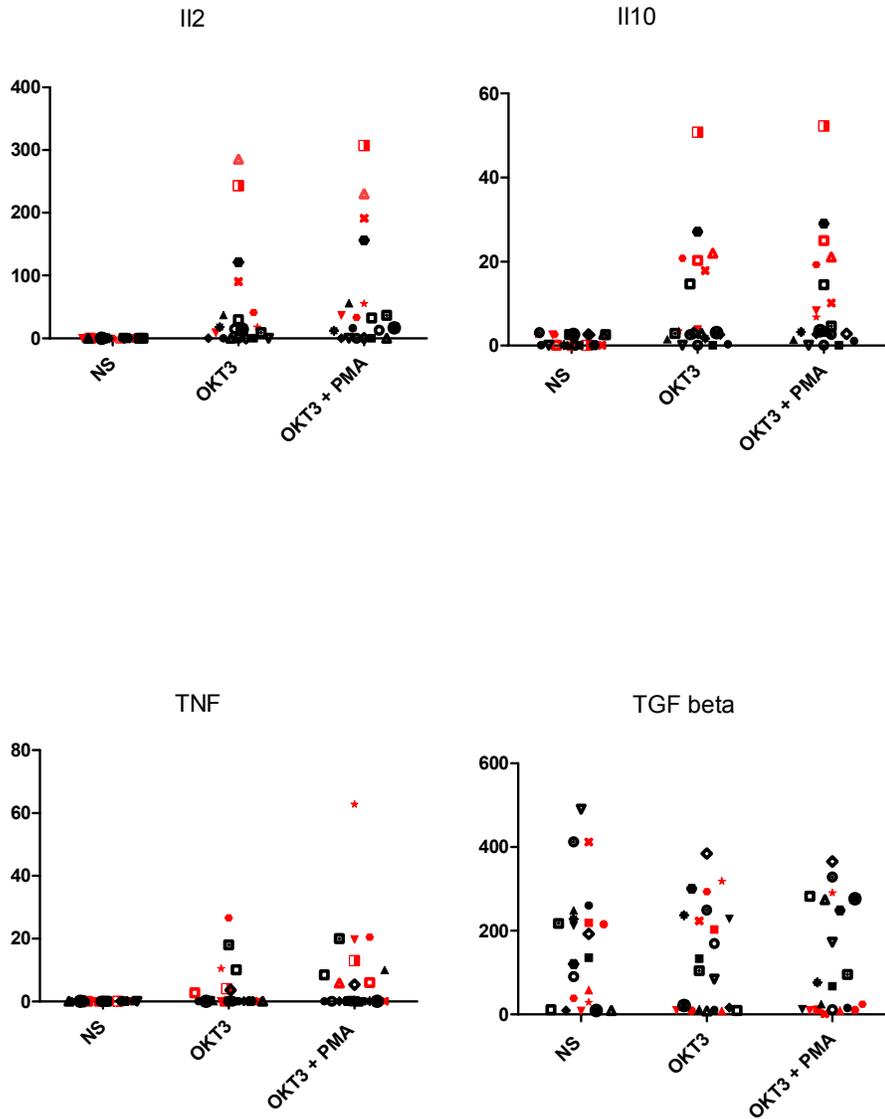
	NS	OKT3	OKT3 + PMA	p ₁	p ₂	p ₃
IL-2 témoins	0.1 (0.1-0.1)	65.7 (9.1-285)	193.4 (33.2-307)	0.003	0.69	0.003
IL-2 patients	0.1 (0.1-0.1)	4.6 (0.1-121)	12.4 (0.1-156)	0.003	0.64	0.001
Il-10 témoins	0.1 (0.1-2.7)	20.3 (3.5-50.8)	19.2 (6.7-52.3)	0.002	0.8	0.002
Il-10 patients	1.3 (0.1-3.1)	2.6 (0.1-26.6)	2.8 (0.1-29)	0.13	0.57	0.02
TNF témoins	0.1 (0.1-0.1)	2.8 (0.1-26.6)	13 (0.1-62.7)	0.03	0.13	0.003
TNF patients	0.1 (0.1-0.1)	0.1 (0.1-18)	0.1 (0.1-20)	0.08	0.69	0.04
TGF bêta témoins	57.5 (8.2-411)	202.9 (8.1-318)	10.2 (1-290)	1	0.48	0.09
TGF bêta patients	192 (9-490)	133 (8-441)	210 (11-476)	0.9	0.4	0.48

p₁ = NS/OKT3

p₂ = OKT3/OKT3 + PMA

p₃ = NS/ OKT3 + PMA

Figure 7. Quantification de la sécrétion des interleukines (IL-2, IL-10, TNF α et TGF β) dans le surnageant de cultures sans (NS), avec stimulation par l'OKT3 ou OKT3 + PMA (24 heures) chez 14 patients sous bithérapie (en noir) et 7 témoins (en rouge). Les interleukines sont quantifiées selon la technologie xMAP, Panomics.



Chez les témoins, nous observons une augmentation significative de la synthèse de l'IL-2, de l'IL-10 et du TNF α après stimulation des cellules par l'OKT3 \pm PMA. Cette augmentation de la synthèse d'interleukines dépendante de la stimulation est très variable d'un témoin à l'autre.

L'ajout de PMA ne permet pas d'augmenter de manière significative la synthèse des 4 interleukines étudiées. La synthèse de TGF β présente une grande variabilité avant stimulation entre les témoins et on ne note pas d'augmentation de cette synthèse après stimulation des lymphocytes par l'OKT3 \pm PMA.

Chez les patients sous immunosuppresseurs, les sécrétions d'IL-2, d'IL-10 et de TNF augmentent après stimulation des lymphocytes par l'OKT3 et le PMA. Cette augmentation est beaucoup moins importante que celle observée chez les sujets témoins. La concentration d'interleukine observée après stimulation reste toujours très inférieure à celle observée chez les sujets témoins excepté pour 1 à 4 patients selon l'interleukine étudiée (patient 91 pour l'IL-2, patients 91 et 21.4 pour l'IL-10 et patients 9.4, 21.4, 46.4 et 85 pour le TNF α).

Le pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3 chez ces patients est de 70.1% (patient 91), 94% (patient 21.4), 42.8% (patient 9.4), 79.7% (patient 46.4) et 63.4% (patient 85).

La sécrétion de TGF β présente une importante variabilité interindividuelle et n'augmente pas après stimulation des lymphocytes comme cela a été observé chez les témoins.

Parmi les interleukines étudiées, seuls les niveaux de synthèse d'Il-10 et de TNF corrèlent avec le pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3 chez les 14 patients. Cette corrélation est plus forte avec l'Il-10 (r (coefficient de spearman) = 0.77 avec un intervalle de confiance à 95% de 0.4 à 0.92). Les taux secrétés d'Il-10 (médiane (min-max)) sont également statistiquement différents ($p=0.0049$, test de Mann Whitney) entre les deux groupes de patients décrits ci-dessus, le groupe fortement immunosupprimé ayant des taux significativement plus bas (1.5 (0.1-2.9)) que le groupe faiblement immunosupprimé (3.1 (2.9-27.1)).

3.3.5.2 Etude des lymphocytes T régulateurs (CD4CD25Foxp3) et des lymphocytes T naïfs (CD31CD45RA)

Le pourcentage de lymphocytes T régulateurs (Trég) et de lymphocytes T naïfs thymiques (Tnaïfs) a été étudié chez 9 patients. Ce pourcentage varie de 2 à 8% pour les Trég et de 20 à 52% pour les Tnaïfs. On ne retrouve pas de corrélation entre les pourcentages de Trég et de Tnaïfs et le taux d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 dépendante de la stimulation par l'OKT3. Les pourcentages de Trég et de Tnaïfs ne sont pas différents entre les deux groupes de patients décrits ci-dessus (faiblement et fortement immunosupprimés) (tableau VI).

3.4 Discrimination du rôle respectif des immunosuppresseurs dans l'immunosuppression observée chez les patients.

Afin de comprendre les mécanismes qui conduisent à un degré différent d'immunosuppression induite par l'association TAC et mycophénolate observé dans les

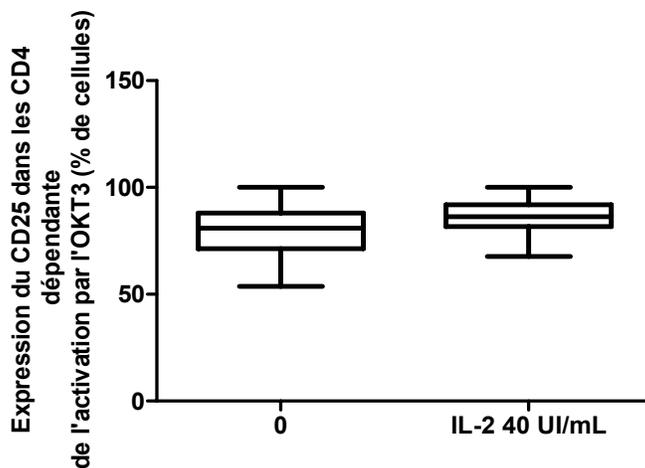
deux groupes de patients, nous cherchons à distinguer le rôle respectif de chaque immunosuppresseur dans l'immunosuppression induite.

3.4.1 Etude *ex vivo* de la restauration par l'IL-2

Chez les sujets volontaires sains (n=43):

L'ajout d'IL-2 à une concentration de 40 UI/mL n'a pas eu d'impact significatif sur l'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3 (figure 8). Cette concentration d'IL-2 sera donc utilisée pour tester les patients en bithérapie ainsi que les sujets contrôles en monothérapie.

Figure 8. Etude *ex vivo* de l'effet de l'IL-2 à la concentration de 40 UI/mL sur l'activation des lymphocytes T CD4 dépendante de l'OKT3 chez 43 témoins.



Le sang total des sujets est dilué au 1/10 et mis en culture en présence d'OKT3 pendant 4 jours sans ou avec IL-2 rajoutée au début de la culture.

Chez les patients sous bithérapie et les sujets contrôles sous monothérapie :

Nous avons testé *ex vivo* la correction de la fonction immunitaire par l'IL-2 chez les patients sous bithérapie mycophénolate-TAC et chez des sujets contrôles sous monothérapie par TAC ou par mycophénolate.

Sur 36 prélèvements effectués chez des patients en bithérapie, on observe une restauration de l'expression du CD25 dans les CD4 stimulés par l'OKT3 après ajout d'IL-2 au milieu de culture. En effet, le taux médian d'expression du CD25 dans les CD4 après stimulation par l'OKT3, est respectivement de 54.2 % (0-94) sans IL-2 et 73.1 % (11.1-95.7) avec IL-2 ($p = 0.0013$). Cette restauration est encore plus évidente chez les patients appartenant au groupe fortement immunosupprimé (figure 9 A et B).

Chez les 6 patients ne recevant que du TAC, on observe une augmentation de l'expression du CD25 parmi les CD4 dépendante de l'OKT3 après ajout de l'IL-2 (40 UI/mL) au début de la culture sur 4/8 prélèvements (de 4 patients différents), particulièrement importante chez deux d'entre eux (figure 9 C).

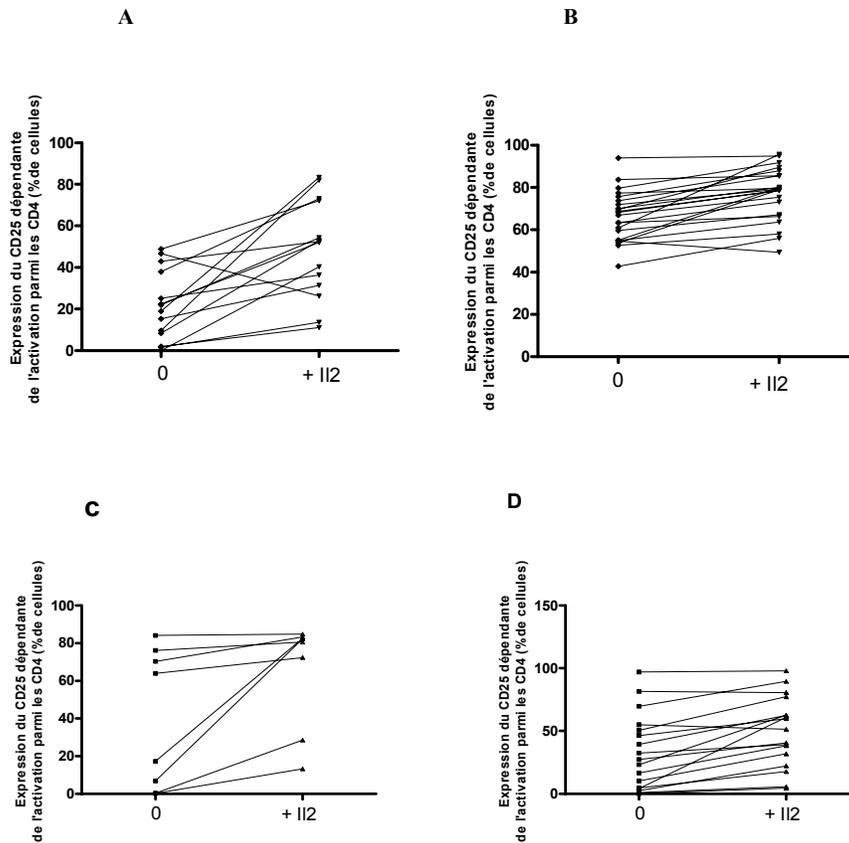
L'expression du CD25 parmi les CD4 dépendante de l'OKT3 est supérieur à 60% dans les 4 prélèvements (2 patients) dans lesquels l'effet de l'IL-2 n'est pas observé.

Pour se convaincre de l'effet spécifique de l'IL-2 sur l'immunosuppression induite par le TAC, nous avons cherché à démontrer l'absence de cet effet chez des patients contrôles traités par du mycophénolate seul.

On note qu'un effet de l'IL-2 est également observé chez 9/21 patients en monothérapie par mycophénolate (figure 9 D).

Figure 9. Etude ex vivo de l'effet de l'IL-2 sur de l'acquisition dépendante de l'OKT3 du CD25 par les lymphocytes T CD4 sur les échantillons sanguins prélevés chez les patients traités par bithérapie (TAC et mycophénolate) et chez les sujets contrôles traités par mycophénolate en monothérapie.

- A. Patients traités par bithérapie du groupe fortement immunosupprimé (n=14)
 - B. Patients traités par bithérapie du groupe faiblement immunosupprimé (n=22)
 - C. Patients traités par TAC en monothérapie (n=8)
 - D. Patients traités par mycophénolate en monothérapie (n= 21)
- n=nombre d'échantillons sanguins étudiés



Le sang total des sujets est dilué au 1/10 et mis en culture en présence d'OKT3 pendant 4 jours sans ou avec IL-2 (40 UI/mL) rajouté au début de la culture.

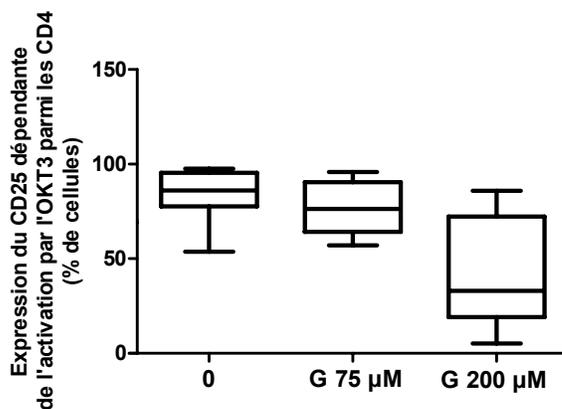
3.4.2 Etude de la restauration par la guanosine et la xanthosine

3.4.2.1 Etude de l'effet de la guanosine *ex vivo*

Chez les sujets volontaires sains (n=14):

L'ajout de guanosine à une concentration de 200 μM a conduit à une diminution de l'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3 faisant suspecter un effet toxique de la guanosine à cette concentration (figure 10). Une concentration de 75 μM sera donc utilisée pour tester les patients en bithérapie ainsi que les sujets contrôles en monothérapie.

Figure 10. Etude ex vivo de l'effet de la guanosine (G) à différentes concentrations sur l'activation des lymphocytes T CD4 dépendante de l'OKT3 chez 14 témoins.



Le sang total des sujets est dilué au 1/10 et mis en culture en présence d'OKT3 pendant 4 jours sans ou avec guanosine rajoutée au début de la culture à des concentrations croissantes.

Chez les patients traités par TAC et mycophénolate :

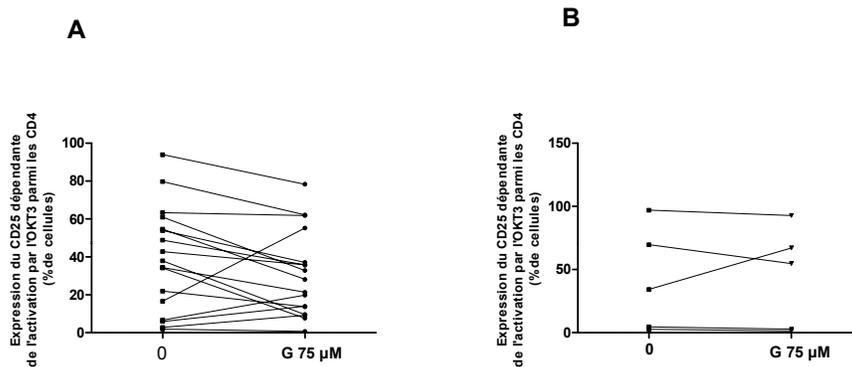
Sur 17 prélèvements effectués chez des patients en bithérapie, on n'observe pas de restauration significative de l'expression du CD25 dans les CD4 stimulés par l'OKT3

après ajout de guanosine au milieu de culture. En effet, le taux médian d'expression du CD25 dans les CD4 après stimulation par l'OKT3, est respectivement de 38 % (2-94) sans guanosine et de 28.1 % (0.7-78.3) avec guanosine ($p = 0.44$). Cependant, on note une augmentation de cette expression sur 4/17 prélèvements (figure 11 A), particulièrement importante pour l'un d'entre eux.

Chez les sujets contrôles sous monothérapie par mycophénolate :

Chez 5 sujets contrôles traités en monothérapie par mycophénolate, la guanosine ne permet pas de corriger l'inhibition de l'expression des CD25 par les lymphocytes T CD4 induite par le mycophénolate (figure 11 B).

Figure 11. Etude ex vivo de l'effet de la guanosine (G) sur l'acquisition dépendante de l'OKT3 du CD25 par les lymphocytes T CD4 chez 17 patients traités par bithérapie (10A) et 5 contrôles traités par mycophénolate en monothérapie (10B)



Le sang total des sujets est dilué au 1/10 et mis en culture en présence d'OKT3 pendant 4 jours sans ou avec guanosine (75 µM) rajoutée au début de la culture.

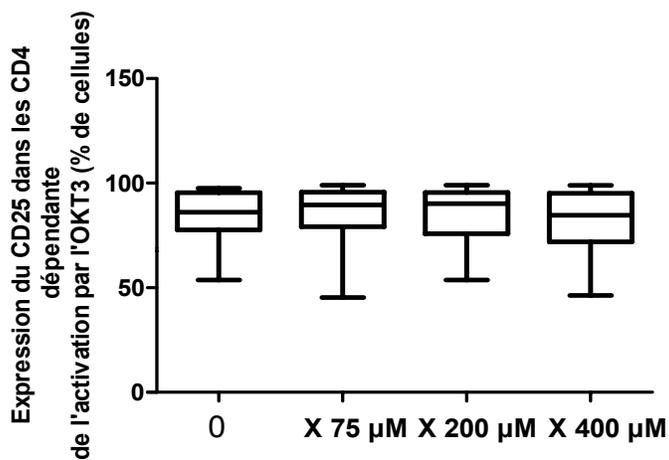
3.4.2.2 Etude de l'effet de la xanthosine *ex vivo*

Compte tenu de l'effet potentiellement toxique de la guanosine observée *ex vivo*, nous avons donc cherché à reproduire cet effet de restauration avec la xanthosine, une base plus spécifique de l'inhibition de l'IMPDH, à des concentrations de 75, 200 et 400 μM .

Chez des sujets contrôles volontaires sains (n=12) :

Comme illustré dans la figure 12, l'ajout de xanthosine dans le milieu de culture n'a pas d'impact sur la capacité des lymphocytes T CD4 à s'activer en réponse à l'OKT3, y compris à des concentrations élevées. La xanthosine semble donc peu toxique.

Figure 12. Etude *ex vivo* de l'effet de la xanthosine (X) à différentes concentrations sur l'activation des lymphocytes T CD4 dépendante de l'OKT3 chez 12 témoins.



Le sang total des sujets est dilué au 1/10 et mis en culture en présence d'OKT3 pendant 4 jours sans ou avec xanthosine rajoutée au début de la culture à des concentrations croissantes.

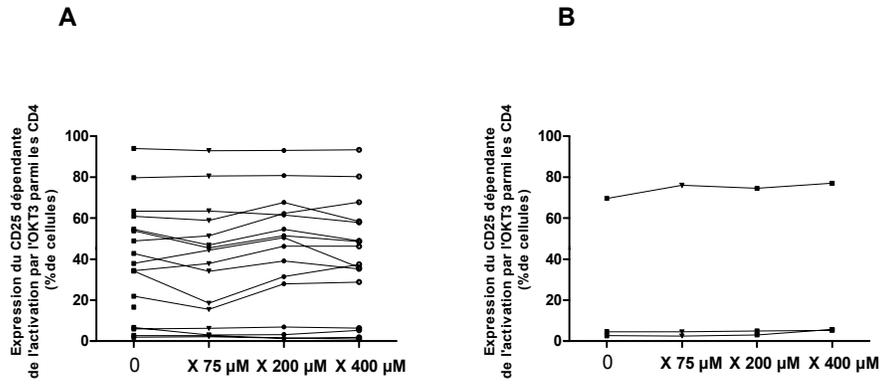
Chez les patients traités par TAC et mycophénolate :

Sur les 16 prélèvements de patients traités par TAC et mycophénolate, on n'observe pas d'effet de la xanthosine sur l'expression du CD25 par les lymphocytes T CD4 dépendante de la stimulation par l'OKT3 quelle que soit la concentration de xanthosine utilisée (figure 13 A). En effet, le pourcentage médian d'expression du CD25 dans les CD4 après stimulation par l'OKT3, est de 38 % (1.9-94) sans xanthosine et respectivement de 41.1 % (2.1-92.9), 48.4 % (1.4-93) et 41.8% (1.1-93.4) avec xanthosine aux concentrations de 75, 200 et 400 μ M.

Chez les sujets contrôles sous monothérapie par mycophénolate :

L'effet de la xanthosine a été testé chez 3 patients traités par mycophénolate seul (figure 13 B). Chez ces patients également on ne retrouve aucune correction par la xanthosine de l'inhibition de l'expression du CD25 parmi les CD4 dépendante de la stimulation par l'OKT3 secondaire à la prise de mycophénolate même chez les sujets fortement immunosupprimés.

Figure 13. Etude *ex vivo* de l'effet de la xanthosine (X) sur l'acquisition dépendante de l'OKT3 du CD25 par les lymphocytes T CD4 chez 16 patients traités par bithérapie (12A) et 3 sujets contrôles traités par mycophénolate en monothérapie (12B)



Le sang total des sujets est dilué au 1/10 et mis en culture en présence d'OKT3 pendant 4 jours sans ou avec xanthosine rajoutée au début de la culture à des concentrations croissantes.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Le développement de nouvelles molécules immunosuppressives a permis de diminuer drastiquement le nombre de rejets aigus après greffe d'organe. Du fait d'effets adverses importants, l'immunosuppression optimale est une balance délicate entre le risque de rejet et les risques liés à une surexposition au traitement immunosuppresseur. Le point d'équilibre entre ces deux types de risques correspond à un effet donné des médicaments immunosuppresseurs sur leur cible thérapeutique soit les lymphocytes sanguins, principaux partenaires de la réaction allogénique. Cet effet précis peut être très variable d'un patient à l'autre et même chez un même patient au cours du temps. Cette variabilité découle de nombreux facteurs présents à toutes les étapes franchies par le principe actif, de son administration à son effet direct sur la cible. Des tests de pharmacodynamie ont donc été proposés pour mesurer directement l'effet des médicaments immunosuppresseurs sur leur cible chez chaque patient à un temps donné. Cette mesure serait alors un meilleur guide pour ajuster les doses d'immunosuppresseurs chez un patient donné et trouver le point d'équilibre entre les risques de sur et de sous-immunosuppression.

Les tests proposés actuellement ont été validés dans des populations adultes, sur de petits nombres de patients. Ils ont donné des résultats intéressants mais parfois contradictoires. De plus, leur technique parfois complexe rend leur utilisation en clinique de greffe impossible (nécessité de résultats en temps réel).

Le but de notre travail était donc de développer des outils de pharmacodynamie adaptés à la population pédiatrique, reproductibles et utilisables en clinique de greffe de routine.

4.1 Type de prélèvement utilisé :

Nous avons choisi de travailler sur des échantillons de sang total. Cette approche présente certains avantages par rapport à l'utilisation de lymphocytes isolés. En effet, la quantité de sang est faible et compatible avec le milieu pédiatrique. De plus cette approche permet de conserver la totalité des lymphocytes T de l'échantillon et les composés plasmatiques et globules rouges qui peuvent influencer sur la biodisponibilité des médicaments [111]. Enfin, l'isolement des lymphocytes entraîne la dissociation du médicament de son récepteur et cet effet pourrait entraîner des variabilités dans les résultats obtenus. Cependant, pour des raisons techniques cette étude ainsi que d'autres [87, 89, 112] est faite sur du sang dilué au 1/10 sans que l'effet de cette dilution sur la biodisponibilité du médicament et sa liaison à son récepteur ne soient maîtrisés.

4.2. Choix du mitogène

Dans leurs études de pharmacodynamie Barten et col ont utilisé différents mitogènes (ConA, PHA et PMA-ionomycine) pour étudier la fonction des lymphocytes T. Ils ont ainsi montré que l'association PMA-ionomycine est plus efficace pour quantifier l'activation des lymphocytes T alors que la ConA est préférable pour étudier la prolifération lymphocytaire [113]. La majorité des études de pharmacodynamie visant à évaluer *ex vivo* la fonction lymphocytaire T utilisent la ConA [87, 89, 112]. Ce mitogène a une action complexe puisqu'elle se lie aux résidus glycosylés des récepteurs membranaires du lymphocyte T.

L'OKT3 (anticorps monoclonal anti-CD3) nous paraît plus approprié car sa cible est plus spécifique et directement impliquée dans la synapse immunologique. En effet, le CD3 est un complexe moléculaire responsable de la transmission du signal 1.

Nous avons donc cherché à comparer les résultats obtenus en terme d'activation et de prolifération des lymphocytes T après stimulation avec la ConA et l'OKT3. Nous démontrons dans ce travail que l'OKT3 est un mitogène plus pertinent car l'activation et la prolifération des lymphocytes T chez les témoins sont plus importantes et moins variables après stimulation par l'OKT3 qu'après stimulation par la ConA.

L'OKT3 a été utilisé par Hartel C et col en association avec un Ac anti-CD28 pour mesurer *ex vivo* l'effet des inhibiteurs des calcineurines sur les lymphocytes T de patients sous CsA (n=4) et sous TAC (n=4) en monothérapie avant greffe de rein de donneur vivant mais n'a pas été utilisé comme seul activateur dans les études rapportées à ce jour [114].

Toutefois, ces mitogènes ne font pas état de l'allogénicité du donneur et induisent ainsi une réaction immunologique non spécifique. Une stimulation des lymphocytes T du receveur par des splénocytes ou des lymphocytes B du donneur a donc été suggérée mais l'obtention de telles cellules est souvent difficile [115].

4.3. Identification du test optimal pour quantifier la fonction lymphocytaire résiduelle des patients sous immunosuppresseurs :

Dans notre travail, les paramètres de fonction lymphocytaire choisis sont l'activation et la prolifération des lymphocytes T. L'activation est quantifiée par l'expression par les lymphocytes T CD4 et CD8 d'antigènes membranaires dépendante de l'activation (CD25 et CD71). La prolifération est évaluée par étude du cycle cellulaire mesuré par

incorporation après perméabilisation, dans le noyau des lymphocytes T CD4 et CD8, d'iodure de propidium. Nous observons après stimulation par l'OKT3, que les paramètres de la fonction lymphocytaire sont reproductibles chez un même témoin et leur variabilité d'un témoin à l'autre est faible, notamment pour les tests mesurant l'activation lymphocytaire (CV de 15 à 24%), que tous les tests utilisés sont significativement différents chez les patients et chez les témoins, et que les résultats des différents tests réalisés sont corrélés entre eux pour un même prélèvement.

L'évaluation de la fonction lymphocytaire résiduelle durant le traitement par les immunosuppresseurs est utilisée comme test de pharmacodynamie dite pharmacodynamie effective depuis le début des années 2000. Ces tests sont particulièrement intéressants car ils permettent de quantifier l'effet des immunosuppresseurs sur leur cible, sans être dépendant de leur mécanisme d'action, et de mesurer l'effet global des IS et non l'effet lié à chaque molécule. Il prend donc en compte les interactions possibles au niveau de la cible (effets synergique, additif, ou antagoniste).

La fonction lymphocytaire peut être mesurée, tel que fait dans notre travail, par l'analyse de l'expression de marqueur d'activation à la surface des lymphocytes T et par la quantification de la prolifération cellulaire. Des résultats différents ont été rapportés en fonction de l'échantillon étudié, du type de marqueur quantifié et du mitogène utilisé.

Différentes méthodes sont proposées pour étudier la prolifération cellulaire : la détection de la synthèse de DNA par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée ou de 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ou par la quantification de l'expression d'antigènes nucléaires de cellules en prolifération (PCNA) et/ou du contenu en DNA par cytométrie de flux (mesure de l'incorporation de Iodure de Propidium). Nous avons choisie cette

dernière technique car elle est plus performante que la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (qui mesure la prolifération globale car elle permet de distinguer la prolifération des sous-populations lymphocytaires CD4 et CD8 [116]. L'activation des lymphocytes est quantifiée par la mesure de l'expression de différents antigènes membranaires dépendants de l'activation et impliqués dans l'expansion clonal des lymphocytes (CD25, CD71, Cd11a, CD134, CD95, et CD154) [93].

Stadler et col ont comparé la prolifération des lymphocytes et l'expression de ces antigènes chez 8 receveurs de rein adultes et greffés depuis 6 mois traités par l'association CsA-mycophénolate mofétil-prednisone et chez des sujets contrôles [92]. Le test permettant de mieux discriminer les patients par rapport aux sujets témoins était l'étude de la prolifération lymphocytaire. Les antigènes membranaires dont l'expression était la plus diminuée chez les patients étaient le CD11a et le CD154. Le CD25 et le CD71 avaient une expression diminuée d'environ 50%. Dans notre étude, la différence entre les patients et les témoins était également plus importante lors de la quantification de la prolifération cellulaire (38 et 27 % respectivement dans les CD4 et les CD8) que lors de la mesure de l'activation cellulaire par mesure de l'expression du CD25 (53 et 34% respectivement dans les CD4 et les CD8) ou du CD71 (73 et 63% respectivement dans les CD4 et les CD8). En revanche, la variabilité observée dans ces tests mesurant la prolifération des lymphocytes T était nettement plus importante que celle observée dans les tests mesurant leur activation. Ainsi, dans notre travail, la mesure de l'expression du CD25 parmi les CD4 nous semble le test le plus sensible et le plus fiable. En effet, cette mesure présente les avantages suivants : elle est toujours supérieure à 50% chez les témoins, elle présente la moindre variabilité et une très bonne corrélation avec les autres

tests mesurant l'activation et la prolifération lymphocytaire, et elle n'est pas corrélée au nombre total de lymphocytes T CD4 et CD3/mm³.

4.4. Variabilité intra et interindividuelle :

Tel qu'illustré dans la figure 3, la fonction lymphocytaire résiduelle mesurée par l'expression du CD25 parmi les CD4, mais aussi par l'étude des autres paramètres, est très variable d'un patient à l'autre. Cette variabilité peut être secondaire à une différence dans le régime immunosuppresseur mais aussi dans la sensibilité de chaque individu à un même régime immunosuppresseur. En effet, le pourcentage de CD4 exprimant le CD25 après stimulation par l'OKT3 n'est pas corrélé aux taux sanguins de TAC ou de MPA faisant suggérer que pour une concentration sanguine et plasmatique donnée de TAC et/ou de MPA, la fonction résiduelle des lymphocytes T est différente d'un sujet à l'autre. Cette différence pourrait être en partie secondaire à des polymorphismes génétiques sur les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'effet immunosuppresseur de ces molécules.

Cette variabilité est également observée au cours du temps pour un même patient. On note dans la figure 4 que le pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 est constamment inférieur à 50% chez deux patients (patient 6 et 12) alors qu'il est très variable dans le temps chez 5 autres sans relation avec la variation des C₀ de TAC et de MPA. Cette variabilité reflète une variabilité au cours du temps de la sensibilité à une concentration donnée de médicament immunosuppresseur. Une explication possible serait la survenue de modifications de la fonction lymphocytaire de base (dans un contexte d'état inflammatoire par exemple) au cours du temps chez ces patients.

4.5. Variabilité au cours de la journée :

Comme illustré dans la figure 5, l'expression des CD25 parmi les lymphocytes T CD4 est variable dans le temps compris entre deux prises de l'immunosuppresseur chez deux sujets traités par du mycophénolate seul. Cette variabilité de fonction résiduelle des lymphocytes T au cours du temps entre deux prises du traitement immunosuppresseur évolue inversement avec la concentration sanguine ou plasmatique de MPA mais sans une corrélation inverse parfaite, signifiant là encore que d'autres facteurs que l'exposition sanguine ou plasmatique au médicament peuvent induire une variabilité de l'effet du traitement immunosuppresseur sur sa cible y compris au cours d'une même journée. Fortier EE et al ont démontré que la fonction lymphocytaire T variait au cours des 24 heures selon un rythme circadien mais aussi au cours du jour [117]. Cette habileté des LT à répondre différemment à un activateur donné en fonction du moment du jour pourrait expliquer l'absence de corrélation parfaite entre les paramètres de pharmacodynamie et les paramètres de pharmacocinétique observée.

Barten MJ et col ont retrouvé cette variabilité chez 14 receveurs adultes de greffe cardiaque recevant de la CsA seule (n=14) ou en association avec de l'azathioprine et/ou de la prednisone [112]. La diminution de la prolifération cellulaire et de l'expression de marqueurs d'activation après stimulation par la ConA était plus accentuée 2 heures après la prise de CsA (C_2), au moment même du pic de concentration sanguine en CsA, que juste avant la prise (prédose ou C_0).

Kamar N et col ont également retrouvé cette variabilité chez 24 receveurs de greffe de reins de donneurs vivants traités par mycophénolate mofétil en monothérapie avant leur greffe [118]. La prolifération et l'activation des lymphocytes T étaient très diminuées 1 heure après la prise de mycophénolate et revenaient aux valeurs observées avant

traitement 4 heures après. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l' AUC_{0-4h} de la concentration de MPA et l' AUC_{0-4h} des paramètres pharmacodynamiques utilisés. Ces résultats et notamment l'absence de corrélation étroite entre ces tests et les concentrations sanguine/plasmatiques des médicaments immunosuppresseurs soulignent l'intérêt de ces techniques de pharmacodynamie qui permettent d'évaluer l'effet du médicament sur sa cible, paramètre le plus fiable de l'exposition réelle à l'immunosuppresseur.

4.6. Détermination de deux groupes de patients selon leur fonction lymphocytaire

résiduelle : l'activation par l'OKT3 nous permet de distinguer chez les patients traités par bithérapie une distribution bimodale de l'acquisition du CD25 par les lymphocytes T CD4 (figure 6). Cette distribution bimodale nous permet de distinguer deux groupes de patients, un groupe de patients très immunosupprimés (expression de CD25 par les CD4 < 50%), et un groupe de patients peu immunosupprimés (expression de CD25 par les CD4 \geq 50%) mais significativement différents du groupe de sujets contrôles. Il est important de noter que l'activation par la ConA ne permet pas de distinguer ces deux groupes.

L'âge et le poids du patient au moment du prélèvement ainsi que la concentration prédose (C_0) et la posologie quotidienne de mycophénolate (rapportée au poids) sont les seuls paramètres significativement différents entre les deux groupes de patients. Une analyse multivariée permettrait de valider que l'âge est un facteur indépendant de variabilité de la sensibilité aux immunosuppresseurs. Dans cette hypothèse, les jeunes enfants auraient des fonctions lymphocytaires résiduelles plus basses et donc seraient

plus immunosupprimés pour une même exposition en immunosuppresseur que les plus vieux enfants ou jeunes adultes. Ceci pourrait avoir de lourdes conséquences du fait du risque de primo-infection à l'Ebstein Barr Virus (EBV) chez les jeunes enfants n'ayant pas rencontré ce virus avant leur greffe et du risque de survenue de syndrome lymphoprolifératif induit par l'infection à EBV en cas de surimmunosuppression.

D'autres équipes ont démontré une relation étroite entre les résultats des tests de pharmacodynamie et les concentrations sanguines en immunosuppresseur. Barten MJ et al ont démontré, chez 14 receveurs de greffe cardiaque traités par CsA, une corrélation étroite ($r^2 > 0.8$) entre la mesure de l'expression des PCNA et des antigènes membranaires de surface (CD25, CD71, CD134) et les concentrations sanguines de CsA [112]. Dans notre étude, seule la concentration en MPA est significativement différente entre les deux groupes de patients nous faisant suggérer que l'impact du mycophénolate sur la fonction lymphocytaire résiduelle sous bithérapie TAC-mycophénolate est majoritaire.

Plusieurs groupes ont retrouvés une association entre la fonction lymphocytaire résiduelle mesurée par ces méthodes et le devenir clinique des patients ou histopathologique des organes greffés [96, 97]. Ainsi, une fonction lymphocytaire résiduelle abaissée a été corrélée au risque d'infections et de leucopénie [101] alors qu'une fonction lymphocytaire résiduelle normale a été corrélée à l'importance des rejets [119]. Wieland et col dans une étude pilote sur 35 receveurs de greffe de rein adultes traités par l'association basiliximab (Ac anti-R-IL-2)-mycophénolate de sodium-prednisone-TAC ont démontré que la prolifération lymphocytaire était plus réduite chez les patients présentant une leucopénie ($p < 0.05$) et l'activation plus réduite chez les patients présentant une infection ($p < 0.05$) [101]. Cette équipe a également retrouvé une

association entre une expression diminuée du CD26 sur les lymphocytes T non activés prélevés 7 jours après la greffe des patients et l'absence de survenue de rejet 3 mois après la greffe. Chang et al ont observé que le pourcentage d'expression du CD25 parmi les CD4 était associé à l'importance des rejets observés chez des receveurs de transplantation cardiaque [119]. Ces travaux soulignent l'intérêt clinique potentiel de ces tests de pharmacodynamie effective. Dans notre étude, le nombre très faible de rejet et d'infections n'a pas permis de faire d'association avec la mesure de l'expression du CD25 parmi les CD4 ou les autres paramètres étudiés chez les patients.

Cependant, la plupart des tests rapportés ont été validés pour leur performance analytique mais l'effet de la composition des échantillons sur les mesures effectuées et sur la liaison de l'immunosuppresseur à son récepteur n'ont pas été étudiés. Une prochaine étape serait de quantifier la réponse immunologique à l'intérieur des lymphocytes T évitant ainsi les variabilités liées à la composition de l'échantillon étudié.

4.7. Etude de la synthèse d'interleukines par les lymphocytes T activés

Des polymorphismes dans les gènes codant pour les interleukines pourraient en partie expliquer la différence de sensibilité aux immunosuppresseurs observée entre les individus.

Hoffmann et col ont démontré qu'après stimulation par un Ac-anti-CD3/CD28, les profils de sécrétion des interleukines (IL-2, IL6, IL-10, IFN γ) par les lymphocytes T de sujets témoins étaient différents en fonction de l'existence de polymorphismes sur les gènes codant pour ces protéines [60], excepté pour le TNF α et le TGF β .

Dans notre travail, chez les patients, après stimulation par l'OKT3, les concentrations d'interleukines augmentent (excepté le TGF β) mais restent très inférieure à celle observée chez les sujets témoins pour la plupart des prélèvements. La mesure de la sécrétion de TGF β présente une importante variabilité interindividuelle indépendante de l'OKT3, qu'il soit associé ou non au PMA.

Parmi les interleukines étudiées, seuls les niveaux de synthèse d'IL-10 et de TNF α corrélaient avec le pourcentage d'expression du CD25 parmi les lymphocytes T CD4 après stimulation par l'OKT3. Cette corrélation est plus forte avec l'IL-10 et les concentrations d'IL-10 sont statistiquement différentes entre les deux groupes de patients décrits ci-dessus, le groupe fortement immunosupprimé ayant des taux significativement plus bas que le groupe faiblement immunosupprimé.

Les différences interindividuelles observées pour les différentes interleukines pourraient en partie s'expliquer par l'existence de polymorphismes sur les gènes codant pour ces protéines. Dans une étude chez 21 receveurs de greffe de foie, Boleslawski et col ont montré une association entre un pourcentage élevé de cellules qui synthétisent l'IL-2 avant la greffe et la survenue de rejets aigus suggérant que les variabilités interindividuelles de sécrétion des IL-2 observées post greffe pourraient être constitutionnelles [94].

Plusieurs groupes de recherche ont évalué la production de interleukines pour quantifier la fonction lymphocytaire [112]. Chez des receveurs de transplantation cardiaque traités par CsA et mycophénolate mofétil, les concentrations d'IL-2 et d'IL4, synthétisés dans la phase très précoce de l'activation lymphocytaire, étaient diminués alors que les concentrations de TNF α et d'IL6, qui régulent l'expansion clonale des lymphocytes T,

étaient augmentées par le traitement immunosuppresseur [112]. Aucune différence avant et après traitement n'a été retrouvée pour les mesures d'IL-10 et d'INF γ .

Dans une publication récente, Brunet M et col ont retrouvé qu'une diminution plus importante de la sécrétion d'IL-10 était associée au risque d'infection chez des receveurs de rein adultes traités par sirolimus [76].

Ces résultats contradictoires confirment que les médicaments immunosuppresseurs peuvent produire des effets différents chez des patients différents même si les concentrations sanguines ou plasmatiques et les posologies (en mg/kg/jour) sont les mêmes.

4.8. Etude des lymphocytes T régulateurs (CD4CD25Foxp3) et des lymphocytes T naïfs (CD31CD45RA)

Les Trég sont capables de supprimer la réponse immunitaire [47]. Leur développement intrathymique est indépendant de l'IL-2 mais leur survie dépend de cette interleukine. Ainsi, Demirkiran et col ont démontré que le pourcentage de Trég augmente après conversion de la CsA pour le mycophénolate mofétil chez des receveurs de greffe rénale faisant supposer que la CsA a un effet répressif sur les Trég et donc sur un des mécanismes d'induction de tolérance [48]. Dans notre étude, le pourcentage de Trég et de Tnaïf a été étudié chez 9 patients. Les Trég et les Tnaïfs représentent respectivement 2 à 8% et 20 à 52% des CD4. Aucune différence n'a été observée entre les groupes de patients faiblement et fortement immunosupprimés. Bien que ces résultats soient obtenus avec un nombre limité de prélèvements, ils suggèrent que le degré de réponse résiduelle des lymphocytes T de patients sous immunosuppresseur n'est pas influencé par les Trég

ou le phénotype des lymphocytes T CD4 (naïfs versus mémoires). Des données contradictoires étaient retrouvées dans littérature : Schwitzer R et col ont montré *in vitro* que les lymphocytes T mémoires CD4CD45RO étaient moins sensibles à la CsA et moins dépendant du niveau de calcium que les lymphocytes T naïfs CD4CD45RA [120].

4.9. Détermination du rôle respectif des immunosuppresseurs dans l'immunosuppression observée chez les patients.

Afin de comprendre les mécanismes qui conduisent à des degrés différents d'immunosuppression induite par l'association TAC et mycophénolate observés dans les deux groupes de patients, nous avons cherché à distinguer le rôle respectif de chaque immunosuppresseur dans la suppression de la fonction lymphocytaire.

Etude *ex vivo* de la restauration par l'IL-2

Nous avons testé *ex vivo* la correction de la fonction immunitaire par l'IL-2 chez les patients sous bithérapie mycophénolate-TAC et chez des sujets contrôles sous monothérapie par TAC ou par mycophénolate. Nous avons observé que l'ajout d'IL-2 au milieu de culture permettait de restaurer l'expression du CD25 dans les lymphocytes T CD4 chez les patients sous bithérapie et notamment ceux du groupe fortement immunosupprimés mais aussi chez certains patients en monothérapie par TAC ou mycophénolate. Il est important de noter que cet effet de restauration n'est pas observé lors de la stimulation par la ConA, confirmant que l'OKT3 est un activateur plus spécifique et donc plus pertinent que la ConA.

Une restauration partielle de la fonction lymphocytaire des patients traités par bithérapie et complète des sujets traités par TAC étaient attendue puisque la restauration de

l'expression du CD25 et de la prolifération des lymphocytes T par de l'IL-2 exogène chez des patients atteints d'un déficit immunitaire héréditaire lié à un défaut de translocation de NFAT suggère que l'IL-2 est capable de compenser les effets du TAC [34]. Tel qu'observé dans notre travail et dans d'autres études [40, 116, 118] le MPA inhibe le cycle cellulaire comme attendu mais aussi l'expression par les lymphocytes T stimulés des marqueurs dépendants de l'activation (CD25 et CD71). L'inhibition de la synthèse nucléotidique par le MPA affecterait donc la transcription de gènes impliqués dans l'activation comme l'IL-2 et le CD25. La restauration par l'IL-2 de l'effet immunosuppresseur du MPA observée dans notre travail chez les patients en bithérapie (restauration complète par l'IL-2) et chez les sujets traité par mycophénolate en monothérapie souligne l'importance de ce mécanisme d'action du MPA.

Etude de l'effet de la guanosine et de la xanthosine *ex vivo*

Dans des travaux *in vitro* sur des lymphocytes T humains incubés avec du MPA, le pool en GTP et en desoxy GTP est diminué puis restauré après l'ajout supplémentaire de guanine ou de guanosine [121]. La guanosine et guanine seraient capables de compenser les principales conséquences de la déplétion en guanosine secondaire à l'action du MPA. Nous avons donc tenté de restaurer l'effet du mycophénolate par l'ajout de guanosine au milieu de culture sur les prélèvements des patients en bithérapie ainsi que des contrôles traités par mycophénolate en monothérapie. Nous n'avons pas observé d'effet significatif de l'ajout de guanosine au milieu de culture dans ces deux groupes. La guanosine a par contre entraîné une diminution significative de l'expression du CD25 parmi les CD4 après stimulation par l'OKT3 chez des sujets contrôles. Cet effet pourrait être lié au rétrocontrôle négatif exercé par la guanosine sur l'activité IMPDH (Figure 2).

Pour pallier à cet effet « toxique » de la guanosine, nous avons essayé de parvenir à cette restauration en ajoutant de la xanthosine au milieu de culture. Cette base est le précurseur de la guanosine et le produit immédiat de l'action de l'IMPDH.

Nous avons observé que la xanthosine ne diminue pas l'expression du CD25 parmi les CD4 chez les sujets contrôles. Par contre, aucun effet de restauration n'a été observé après ajout de cette base au milieu de culture chez les patients en bithérapie mais aussi chez les patients traités par mycophénolate en monothérapie.

L'ajout d'IL-2, ou de bases telles que la guanosine et la xanthosine au milieu de culture ne permet donc pas de différencier l'effet de chaque immunosuppresseur dans notre travail.

4.10. Conclusions

Les outils de pharmacodynamie effective proposés dans ce travail, et notamment l'expression du CD25 parmi les CD4 par les lymphocytes T stimulés par l'OKT3, sont adaptés au milieu pédiatrique et à une réalisation en temps réel. Ils confirment que la sensibilité aux immunosuppresseurs des patients pédiatriques receveurs d'organes est très variable d'un patient à l'autre mais aussi chez le même patient au cours du temps, sans corrélation retrouvée avec les concentrations sanguines ou plasmatiques de ces médicaments. Ceci souligne la pertinence de cette approche de pharmacodynamie effective pour optimiser le traitement immunosuppresseur.

L'activation par l'OKT3 permet de différencier deux groupes de patients en fonction de l'importance de leur immunosuppression effective selon les paramètres proposés. L'âge médian ainsi que la concentration plasmatique en MPA est significativement différent entre les deux groupes de patients indiquant que les plus jeunes patients seraient plus

fortement immunosupprimés et auraient des concentrations plasmatiques en MPA plus élevées.

L'étude des paramètres pouvant influencer la réponse ainsi que l'étude du pouvoir de restauration par l'Il-2, la guanosine ou la xanthosine de la fonction lymphocytaire ne permet pas de mieux comprendre les variabilités interindividuelles observées.

L'intérêt clinique de ces tests de pharmacodynamie effective (incidence sur le devenir clinique des patients et histopathologique des organes greffés) devra être confirmé sur une cohorte plus grande de patients.

Enfin, l'amélioration des stratégies de pharmacodynamie et des études de pharmacogénétique et leur intégration aux stratégies de pharmacocinétique actuellement utilisées pour le suivi des patients traités par immunosuppresseurs permettra d'optimiser ces traitements pour chaque patient à chaque moment après la greffe et ainsi d'améliorer le taux de survie des greffons et des patients.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bloom, R.D., et al., *An overview of solid organ transplantation*. Clin Chest Med, 2005. **26**(4): p. 529-43, v.
2. Suthanthiran, M. and T.B. Strom, *Renal transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(6): p. 365-76.
3. Wolfe, R.A., et al., *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. N Engl J Med, 1999. **341**(23): p. 1725-30.
4. Hariharan, S., et al., *Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996*. N Engl J Med, 2000. **342**(9): p. 605-12.
5. Xue, J.L., et al., *Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(12): p. 2753-8.
6. Hou, S., *Expanding the kidney donor pool: ethical and medical considerations*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1820-36.
7. Sever, M.S., et al., *Outcome of living unrelated (commercial) renal transplantation*. Kidney Int, 2001. **60**(4): p. 1477-83.
8. Whittington, P.F., *Living donor liver transplantation: ethical considerations*. J Hepatol, 1996. **24**(5): p. 625-7.
9. Friedman, S.A., *Series on the quality of health care*. N Engl J Med, 1997. **336**(11): p. 805; author reply 807.
10. Engels, E.A., et al., *Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients*. JAMA, 2011. **306**(17): p. 1891-901.
11. Fishman, J.A., *Infection in solid-organ transplant recipients*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2601-14.
12. Dausset, J., *[Iso-leuko-antibodies]*. Acta Haematol, 1958. **20**(1-4): p. 156-66.
13. Sebзда, E., et al., *Selection of the T cell repertoire*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 829-74.
14. Rammensee, H.G. and M.J. Bevan, *Evidence from in vitro studies that tolerance to self antigens is MHC-restricted*. Nature, 1984. **308**(5961): p. 741-4.
15. van Meerwijk, J.P., et al., *Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 377-83.
16. Gratwohl, A., et al., *H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: a retrospective cohort study*. Lancet, 2008. **372**(9632): p. 49-53.
17. Opelz, G., et al., *HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study*. Rev Immunogenet, 1999. **1**(3): p. 334-42.
18. Roufousse, C.A., et al., *Peritubular Capillary Basement Membrane Multilayering on Electron Microscopy: A Useful Marker of Early Chronic Antibody-Mediated Damage*. Transplantation, 2012. **94**(3): p. 269-274.
19. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2715-29.
20. Kahan, B.D., *Concepts and challenges in solid organ transplantation*, in *Clinical immunology: principles and practice*, R.R. Rich, Editor 2001, Mosby: London, , United Kingdom. p. 89.1-89-15.
21. Bradley, J.A., E.M. Bolton, and G. Pettigrew, *Monitoring T cell alloreactivity after organ transplantation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(2): p. 229-32.
22. Wang, D., et al., *CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase*

- beta to the immunological synapse through CARMA1*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 164-71.
23. Perola, O., A. Ripatti, and J. Pelkonen, *T-lymphocyte subpopulations do not express identical combinations of interleukin-2 receptor chains in the early phase of their activation and proliferation*. Scand J Immunol, 2000. **52**(2): p. 123-30.
 24. Halloran, P.F., et al., *The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection*. Transplantation, 1990. **49**(1): p. 85-91.
 25. Trpkov, K., et al., *Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema*. Transplantation, 1996. **61**(11): p. 1586-92.
 26. Rhen, T. and J.A. Cidlowski, *Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1711-23.
 27. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
 28. Huai, Q., et al., *Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12037-42.
 29. Xu, X., et al., *FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506*. Transplantation, 2002. **73**(11): p. 1835-8.
 30. Weiwad, M., et al., *Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins*. Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15776-84.
 31. Ahn, H.S., et al., *Calcineurin-independent inhibition of KV1.3 by FK-506 (tacrolimus): a novel pharmacological property*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1714-22.
 32. Feske, S., *Calcium signalling in lymphocyte activation and disease*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 690-702.
 33. Gallo, E.M., et al., *Selective role of calcineurin in haematopoiesis and lymphopoiesis*. EMBO Rep, 2008. **9**(11): p. 1141-8.
 34. Le Deist, F., et al., *A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx*. Blood, 1995. **85**(4): p. 1053-62.
 35. Jain, J., et al., *Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(4): p. 767-76.
 36. Carr, S.F., et al., *Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27286-90.
 37. Laliberte, J., et al., *Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2896-904.
 38. Allison, A.C. and E.M. Eugui, *Preferential suppression of lymphocyte proliferation by mycophenolic acid and predicted long-term effects of mycophenolate mofetil in transplantation*. Transplant Proc, 1994. **26**(6): p. 3205-10.
 39. Allison, A.C., *Mechanisms of action of mycophenolate mofetil*. Lupus, 2005. **14** Suppl 1: p. s2-8.

40. Barten, M.J., et al., *Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil after heart transplantation: new mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection*. Am J Transplant, 2002. **2**(8): p. 719-32.
41. Kershner, R.P. and W.E. Fitzsimmons, *Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation*. Transplantation, 1996. **62**(7): p. 920-6.
42. Liu, Z., et al., *Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood*. Cytokine, 2009. **45**(2): p. 141-7.
43. Sawitzki, B., et al., *Can we use biomarkers and functional assays to implement personalized therapies in transplantation?* Transplantation, 2009. **87**(11): p. 1595-601.
44. Baker, R.J., et al., *The role of the allograft in the induction of donor-specific T cell hyporesponsiveness*. Transplantation, 2001. **72**(3): p. 480-5.
45. Nelson, J.L., *Microchimerism in human health and disease*. Autoimmunity, 2003. **36**(1): p. 5-9.
46. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
47. Jung, Y.J. and J.Y. Seoh, *Feedback loop of immune regulation by CD4+CD25+ Treg*. Immunobiology, 2009. **214**(4): p. 291-302.
48. Demirkiran, A., et al., *Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells*. Transplantation, 2009. **87**(7): p. 1062-8.
49. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1071-2.
50. Kawai, T., et al., *HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression*. N Engl J Med, 2008. **358**(4): p. 353-61.
51. Chapman, J.R. and B.J. Nankivell, *Nephrotoxicity of ciclosporin A: short-term gain, long-term pain?* . Nephrol. Dial. Transplant. , 2006. **21**(8): p. 2060-63.
52. Undre, N.A., et al., *Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection*. Transplant Proc, 1999. **31**(1-2): p. 296-8.
53. Schwartz, M., et al., *FK 506 in liver transplantation: correlation of whole blood levels with efficacy and toxicity. The US Multicenter FK 506 Dose Optimization*. Transplant Proc, 1995. **27**(1): p. 1107.
54. Wallemacq, P., et al., *Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference*. Ther Drug Monit, 2009. **31**(2): p. 139-52.
55. Kuypers, D.R., et al., *Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(2): p. 341-58.
56. Glander, P., et al., *Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation*. Am J Transplant, 2004. **4**(12): p. 2045-51.
57. Wang, J., et al., *IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(5): p. 711-7.

58. Grinyo, J., et al., *Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation*. *Transpl Int*, 2008. **21**(9): p. 879-91.
59. Kaminski, E.R., et al., *In vitro cytokine profiles and their relevance to rejection following renal transplantation*. *Transplantation*, 1995. **60**(7): p. 703-6.
60. Hoffmann, S.C., et al., *Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes*. *Transplantation*, 2001. **72**(8): p. 1444-50.
61. Warle, M.C., et al., *Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection*. *Liver Transpl*, 2002. **8**(7): p. 603-11.
62. Viel, D.O., et al., *IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. *Scand J Immunol*, 2007. **66**(6): p. 703-10.
63. Qu, H.Q., et al., *Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 1174-6.
64. Maier, L.M., et al., *IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(1): p. e1000322.
65. Kawasaki, E., et al., *Genetic association between the interleukin-2 receptor-alpha gene and mode of onset of type 1 diabetes in the Japanese population*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(3): p. 947-52.
66. Weber, F., et al., *IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations*. *Genes Immun*, 2008. **9**(3): p. 259-63.
67. Hinks, A., et al., *Association of the IL2RA/CD25 gene with juvenile idiopathic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(1): p. 251-7.
68. Girnita, D.M., et al., *Genetic polymorphisms impact the risk of acute rejection in pediatric heart transplantation: a multi-institutional study*. *Transplantation*, 2008. **85**(11): p. 1632-9.
69. Thakkinstian, A., et al., *Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. **23**(9): p. 3017-23.
70. Tinckam, K., et al., *The relative importance of cytokine gene polymorphisms in the development of early and late acute rejection and six-month renal allograft pathology*. *Transplantation*, 2005. **79**(7): p. 836-41.
71. Awad, M.R., et al., *The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome*. *J Heart Lung Transplant*, 2001. **20**(6): p. 625-30.
72. Millan, O., et al., *Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil*. *Clin Chem*, 2003. **49**(11): p. 1891-9.
73. Mortensen, D.M., P.B. Koefoed-Nielsen, and K.A. Jorgensen, *Calcineurin activity in tacrolimus-treated renal transplant patients early after and 5 years after transplantation*. *Transplant Proc*, 2006. **38**(8): p. 2651-3.
74. Koefoed-Nielsen, P.B., et al., *The calcineurin activity profiles of cyclosporin and tacrolimus are different in stable renal transplant patients*. *Transpl Int*, 2006. **19**(10): p. 821-7.

75. Kramer, B.K., et al., *Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin A microemulsion in renal transplantation: 2 year follow-up results.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(5): p. 968-73.
76. Brunet, M., et al., *Sequential determination of pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in liver transplant patients treated with mycophenolate mofetil.* Transplantation, 2006. **81**(4): p. 541-6.
77. Sommerer, C., et al., *Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies.* Transplantation, 2006. **82**(10): p. 1280-5.
78. Sommerer, C., et al., *Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibitor therapy: is there a clinical benefit?* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(1): p. 21-7.
79. Sommerer, C., et al., *Ciclosporin A tapering monitored by NFAT-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression.* Transplantation, 2008. **85**(1): p. 15-21.
80. Budde, K., et al., *Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil.* Clin Chem Lab Med, 2000. **38**(11): p. 1213-6.
81. Devyatko, E., et al., *Activation of the purine salvage pathway in mononuclear cells of cardiac recipients treated with mycophenolate mofetil.* Transplantation, 2006. **82**(1): p. 113-8.
82. Glander, P., et al., *Effect of mycophenolate mofetil on IMP dehydrogenase after the first dose and after long-term treatment in renal transplant recipients.* Int J Clin Pharmacol Ther, 2003. **41**(10): p. 470-6.
83. Sanquer, S., et al., *Expression of Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type I and Type II After Mycophenolate Mofetil Treatment: A 2-year Follow-up in Kidney Transplantation.* Mol Ther, 2008. **83**(2): p. 328-35.
84. Venkataramanan, R. and L.M. Shaw, *Therapeutic monitoring of mycophenolic acid in liver transplant patients.* Liver Transpl, 2004. **10**(4): p. 503-5.
85. Schutz, E., et al., *Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil.* Clin Chem, 1999. **45**(3): p. 419-22.
86. Millan, O., et al., *Assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression: a new approach.* Clin Chem, 2000. **46**(9): p. 1376-83.
87. Barten, M.J., et al., *Assessment of immunosuppressive drug interactions: inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood.* J Immunol Methods, 2003. **283**(1-2): p. 99-114.
88. Oellerich, M., M.J. Barten, and V.W. Armstrong, *Biomarkers: the link between therapeutic drug monitoring and pharmacodynamics.* Ther Drug Monit, 2006. **28**(1): p. 35-8.
89. Bohler, T., et al., *Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans.* Ther Drug Monit, 2007. **29**(1): p. 77-86.
90. Barten, M.J., et al., *Pharmacodynamic monitoring of the conversion of cyclosporine to tacrolimus in heart and lung transplant recipients.* Transplant Proc, 2005. **37**(10): p. 4532-4.

91. Chatila, T., et al., *Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin*. J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1283-9.
92. Stalder, M., et al., *Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients*. Ther Drug Monit, 2003. **25**(1): p. 22-7.
93. Shipkova, M. and E. Wieland, *Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(17-18): p. 1338-49.
94. Boleslawski, E., et al., *Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection*. Transplantation, 2004. **77**(12): p. 1815-20.
95. Hodge, G., et al., *Intracellular cytokines in blood T cells in lung transplant patients--a more relevant indicator of immunosuppression than drug levels*. Clin Exp Immunol, 2005. **139**(1): p. 159-64.
96. Barten, M.J., et al., *Mycophenolic acid interaction with cyclosporine and tacrolimus in vitro and in vivo: evaluation of additive effects on rat blood lymphocyte function*. Ther Drug Monit, 2005. **27**(2): p. 123-31.
97. Barten, M.J., et al., *C0h/C2h monitoring of the pharmacodynamics of cyclosporin plus mycophenolate mofetil in human heart transplant recipients*. Transplant Proc, 2005. **37**(2): p. 1360-1.
98. Gummert, J.F., T. Ikonen, and R.E. Morris, *Newer immunosuppressive drugs: a review*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(6): p. 1366-80.
99. Grinyo, J.M., et al., *Low-dose cyclosporine with mycophenolate mofetil induces similar calcineurin activity and cytokine inhibition as does standard-dose cyclosporine in stable renal allografts*. Transplantation, 2004. **78**(9): p. 1400-3.
100. Barten, M.J., et al., *Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression*. Cell Prolif, 2007. **40**(1): p. 50-63.
101. Wieland, E., et al., *Association between pharmacodynamic biomarkers and clinical events in the early phase after kidney transplantation: a single-center pilot study*. Ther Drug Monit, 2011. **33**(3): p. 341-9.
102. Stein, C.M., J.J. Murray, and A.J. Wood, *Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect*. Clin Chem, 1999. **45**(9): p. 1477-84.
103. Susal, C., et al., *Identification of highly responsive kidney transplant recipients using pretransplant soluble CD30*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(6): p. 1650-6.
104. Pelzl, S., et al., *Evaluation of posttransplantation soluble CD30 for diagnosis of acute renal allograft rejection*. Transplantation, 2003. **75**(3): p. 421-3.
105. Spiridon, C., et al., *CD30, a marker to detect the high-risk kidney transplant recipients*. Clin Transplant, 2008. **22**(6): p. 765-9.
106. Sottong, P.R., et al., *Measurement of T-lymphocyte responses in whole-blood cultures using newly synthesized DNA and ATP*. Clin Diagn Lab Immunol, 2000. **7**(2): p. 307-11.
107. Kowalski, R., et al., *Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management*. Clin Transplant, 2003. **17**(2): p. 77-88.
108. Huskey, J., J. Gralla, and A.C. Wiseman, *Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(2): p. 423-9.

109. Kowalski, R.J., et al., *Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay*. Transplantation, 2006. **82**(5): p. 663-8.
110. Zeiser, R., et al., *Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production*. Blood, 2006. **108**(1): p. 390-9.
111. Gummert, J.F., et al., *Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(3): p. 1100-12.
112. Barten, M.J., et al., *Pharmacodynamic monitoring of the immunosuppressive therapy in patients after heart transplantation: Whole blood flow cytometric analysis of lymphocyte function*. Comput Biol Med, 2006.
113. Barten, M.J., et al., *Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro*. J Immunol Methods, 2001. **253**(1-2): p. 95-112.
114. Hartel, C., et al., *The clinical outcomes of neonatal and childhood stroke: review of the literature and implications for future research*. Eur J Neurol, 2004. **11**(7): p. 431-8.
115. Millan, O., N. Urtasun, and M. Brunet, *Biomarkers of the immunomodulatory effect of immunosuppressive drugs in transplant recipients*. Transplant Rev (Orlando), 2009. **23**(2): p. 120-8.
116. Gummert, J.F., et al., *Pharmacodynamics of mycophenolic acid in heart allograft recipients: correlation of lymphocyte proliferation and activation with pharmacokinetics and graft histology*. Transplantation, 2000. **70**(7): p. 1038-49.
117. Fortier, E.E., et al., *Circadian variation of the response of T cells to antigen*. J Immunol, 2011. **187**(12): p. 6291-300.
118. Kamar, N., et al., *Pharmacodynamic evaluation of the first dose of mycophenolate mofetil before kidney transplantation*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(5): p. 936-42.
119. Chang, C.C., et al., *Brequinar sodium, mycophenolic acid, and cyclosporin A inhibit different stages of IL-4- or IL-13-induced human IgG4 and IgE production in vitro*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **696**: p. 108-22.
120. Schwinger, R. and R. Siefken, *CD45RA+ and CD45RO+ T cells differ in susceptibility to cyclosporin A mediated inhibition of interleukin-2 production*. Transpl Immunol, 1996. **4**(1): p. 61-3.
121. Allison, A.C. and E.M. Eugui, *Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action*. Immunopharmacology, 2000. **47**(2-3): p. 85-118.