

THESE

pour le

DIPLÔME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Caroline SABOURIN

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2004

**LES APPLICATIONS CLINIQUES DE
L'IMMUNOSUPPRESSION :**

**ETAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES D'AVENIR, A PROPOS DE LA
SYNTHESE ET DE L'EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DE
NOUVELLES MOLECULES A STRUCTURE IMIDAZOLIDIN-2-ONE.**

Président : M. François LANG, Professeur de Pharmacologie
Membres du Jury : M. Jean-Michel ROBERT, Professeur de Chimie Thérapeutique
Mme Gwenaëlle VEYRAC, Docteur en Médecine

Je remercie le Pr. François LANG,

Professeur de Pharmacologie et de Pharmacocinétique à la Faculté de
Pharmacie de Nantes,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la Présidence de cette Thèse,

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je remercie mon Directeur de Thèse,
Le Pr. Jean-Michel ROBERT,

Professeur de Pharmacochimie à la Faculté de Pharmacie de Nantes,

Avec mes sincères remerciements pour son attention et ses conseils ainsi
que pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Avec toute ma reconnaissance.

Je remercie le Dr Gwenaëlle VEYRAC,

Médecin du Service de Pharmacovigilance du CHU de Nantes,

Avec mes sincères remerciements pour avoir gentiment accepté de faire
partie de ce jury,

Avec toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier, également, le Dr Delphine Carbonnelle, Maître de Conférences dans le service de Physiologie, pour la réalisation des tests d'évaluation de l'activité immunosuppressive ainsi que pour sa disponibilité, son aide et sa gentillesse.

Enfin, je témoigne toute ma gratitude au personnel du laboratoire de Chimie Thérapeutique ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ces travaux.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	18
I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :	21
INTRODUCTION	22
1.1- RAPPELS SUR LES REPONSES IMMUNITAIRES NORMALES	24
1.1.1- Généralités :	25
1.1.2- L'immunité naturelle :	25
1.1.3- L'immunité acquise :	27
1.1.3.1- Généralités :	27
1.1.3.2- Le rôle des cellules présentatrices d'antigène (CPA) :	27
1.1.3.3- L'activation des lymphocytes auxiliaires Th CD4+ (cf.1.2.2.2.1.2) :	28
1.1.3.4- Les lymphocytes Th1 et Th2 :	28
1.1.3.5- L'immunité à médiation humorale :	30
1.1.3.6- L'immunité à médiation cellulaire :	31
1.2- INDICATIONS DES IMMUNOSUPPRESSEURS	32
1.2.1- Généralités :	33
1.2.2- L'allogreffe : l'application principale	34
1.2.2.1- Définition :	34
1.2.2.2- Bases immunologiques du rejet d'allogreffe :	34
1.2.2.2.1- La phase de sensibilisation :	35
1.2.2.2.1.1- Les mécanismes de la reconnaissance allogénique :	35
1.2.2.2.1.2- L'activation lymphocytaire T :	38
1.2.2.2.2- La phase effectrice :	43
1.2.3- La "Graft Versus Host Disease" (GVHD) :	48
1.2.3.1- Définition :	48
1.2.3.2- Bases immunologiques de la réaction de GVH :	48
1.2.4- Les maladies auto-immunes :	50
1.2.4.1- Définition :	50
1.2.4.2- Les maladies auto-immunes spécifiques d'organes :	50
1.2.4.2.1- Les maladies provoquées par une lésion cellulaire directe :	50
1.2.4.2.1.1- La thyroïdite d'Hashimoto :	51
1.2.4.2.1.2- Les anémies auto-immunes :	51
1.2.4.2.1.3- Le diabète sucré insulino-dépendant (DID) :	52

1.2.4.2.2- Les maladies provoquées par une stimulation ou un blocage d'un récepteur par un auto-anticorps :	52
1.2.4.2.2.1- La maladie de Graves ou de Basedow :	53
1.2.4.2.2.2- La myasthénie :	53
1.2.4.3- Les maladies auto-immunes systémiques :	55
1.2.4.3.1- Le lupus érythémateux disséminé (LED) :	55
1.2.4.3.2- La sclérose en plaque (SEP) :	56
1.2.4.3.3- La polyarthrite rhumatoïde :	56
1.3- IMMUNOSUPPRESSEURS UTILISES EN THERAPEUTIQUE	57
1.3.1- Généralités :	58
1.3.2- Les régulateurs de l'expression des gènes :	59
1.3.2.1- Structure et métabolisme des principaux corticoïdes utilisés en transplantation et dans les maladies auto-immunes :	59
1.3.2.2- Mécanisme d'action :	60
1.3.2.3- Indications en transplantation :	62
1.3.3- Les alkylants :	63
1.3.3.1- Structure :	63
1.3.3.2- Mécanisme d'action :	63
1.3.3.3- Indications :	67
1.3.4- Les inhibiteurs de kinases et/ou de phosphatases :	68
1.3.4.1- La ciclosporine A (CsA) et le tacrolimus (FK506) : "les anti-calcineurine" :	68
1.3.4.1.1- Structure et métabolisme :	68
1.3.4.1.2- Mécanisme d'action :	70
1.3.4.1.3- Indications :	71
1.3.4.1.3.1- La ciclosporine A :	71
1.3.4.1.3.2- Le tacrolimus :	72
1.3.4.2- La rapamycine (RAPA) ou sirolimus :	73
1.3.4.2.1- Structure et métabolisme :	73
1.3.4.2.2- Mécanisme d'action :	73
1.3.4.2.3- Indications :	75
1.3.5- Les inhibiteurs de la synthèse de novo des purines :	77
1.3.5.1- Généralités :	77
1.3.5.2- Les molécules de première génération : la 6-mercaptopurine et l'azathioprine :	79
1.3.5.2.1- Structure et métabolisme :	79
1.3.5.2.2- Mécanisme d'action :	79
1.3.5.2.3- Indications :	80
1.3.5.3- Les molécules de seconde génération : le mycophénolate mofétil et la mizoribine :	81
1.3.5.3.1- Le mycophénolate mofétil :	81
1.3.5.3.1.1- Structure et métabolisme :	81
1.3.5.3.1.2- Mécanisme d'action :	83
1.3.5.3.1.3- Indications :	85

1.3.5.3.2- La mizoribine :	86
1.3.5.3.2.1- Structure :	86
1.3.5.3.2.2- Mécanisme d'action :	86
1.3.5.3.2.3- Indications :	86
1.3.6- les inhibiteurs de la synthèse de novo des pyrimidines :	87
1.3.6.1- Généralités :	87
1.3.6.2- Le léflunomide :	88
1.3.6.2.1- Structure et métabolisme :	88
1.3.6.2.2- Mécanisme d'action :	88
1.3.6.2.3- Indications :	90
1.3.6.3- Le bréquinar sodique :	91
1.3.6.3.1- Structure :	91
1.3.6.3.2- Mécanisme d'action :	91
1.3.6.3.3- Indications :	91
1.3.6.4- Le cas particulier du méthotrexate (MTX) :	92
1.3.6.4.1- Structure et métabolisme :	92
1.3.6.4.2- Mécanisme d'action :	94
1.3.6.4.3- Indications :	95
1.3.7- Les bioréactifs :	97
1.3.7.1- Les sérums anti-lymphocytaires :	97
1.3.7.1.1- Composition et production :	97
1.3.7.1.2- Les différentes spécialités :	97
1.3.7.1.3- Indications :	98
1.3.7.2- Les anticorps monoclonaux :	98
1.3.7.2.1- Composition et production :	98
1.3.7.2.2- Les différentes spécialités :	99
1.3.7.2.2.1- Muromonab-CD3 ou OKT3 (Orthoclone®) :	99
1.3.7.2.2.2- Basiliximab (Simulect®) :	99
1.3.7.2.2.3- Daclizumab (Zenapax®) :	100
1.3.7.2.3- Indications :	100
1.4- INCONVENIENTS DES TRAITEMENTS ACTUELS	101
1.4.1- Généralités :	102
1.4.2- Effets indésirables dus à la sur-immunosuppression :	103
1.4.2.1- Les complications infectieuses :	103
1.4.2.1.1- Généralités :	103
1.4.2.1.2- Les infections bactériennes :	104
1.4.2.1.3- Les infections à protozoaires :	104
1.4.2.1.4- Les infections fongiques :	105
1.4.2.1.5- Les infections virales :	105
1.4.2.2- Les complications néoplasiques :	106
1.4.2.2.1- Les complications néoplasiques précoces :	106
1.4.2.2.2- Les complications néoplasiques tardives :	106

1.4.3- Effets indésirables dus à la toxicité de la molécule :	107
1.4.3.1- Généralités :	107
1.4.3.2- Les corticoïdes :	107
1.4.3.3- Le cyclophosphamide :	108
1.4.3.4- Les anticalcineurines :	108
1.4.3.4.1- La ciclosporine :	108
1.4.3.4.2- Le tacrolimus :	109
1.4.3.5- La rapamycine :	110
1.4.3.6- L'azathioprine :	110
1.4.3.7- Le mycophénolate mofétil :	110
1.4.3.8- Le méthotrexate :	111
1.4.3.9- Le léflunomide :	111
1.4.3.10- Les bioréactifs :	112
1.4.3.10.1- Les sérums anti-lymphocytaires :	112
1.4.3.10.2- Les anticorps monoclonaux :	112
1.5- LES NOUVELLES VOIES DE RECHERCHE	114
1.5.1- Généralités :	115
1.5.2- Analogues de la vitamine D :	115
1.5.3- L'Azodicarbonamide :	116
1.5.4- Les dérivés du bisindolylmaleimide VIII :	116
1.5.5- Le FTY720 :	116
1.5.6- Les agents bloquant les signaux de co-stimulation des cellules T :	118
1.5.7- Les agents bloquant les molécules d'adhésion ou accessoires des cellules T : ...	118
1.5.8- Les anticorps dirigés contre des cytokines :	119
1.5.9- Immunosuppression médiée par des peptides :	120
1.5.10- Thérapie génique :	120
1.5.11- L'induction de la tolérance en transplantation :	122
II- TRAVAUX REALISES	124
INTRODUCTION	125
2.1- ETUDE CHIMIQUE :	128
2.1.1- Voies d'accès envisagées :	129
2.1.2- Partie expérimentale :	131
2.1.2.1- Matériels, méthodes et produits utilisés :	131
2.1.2.2- Description des différentes procédures expérimentales :	133
2.2- ETUDE SPECTRALE :	142
2.2.1. Propriétés IR et RMN des produits synthétisés :	143

2.3-. ETUDE PHARMACOLOGIQUE :	151
2.3.1- <i>Tests in vitro</i> :	152
2.3.1.1- Test sur splénocytes de souris en présence de concanavaline A (Con A) : ..	152
2.3.1.1.1- Principe :	152
2.3.1.1.2- Mode opératoire :	152
2.3.1.2- Inhibition de la prolifération des lymphocytes T induite par la phytohémagglutinine (PHA) :	153
2.3.1.2.1- Principe :	153
2.3.1.2.2- Mode opératoire :	153
2.3.1.3- Résultats :	154
2.3.2- <i>Tests in vivo</i> :	156
2.3.2.1- Principe :	156
2.3.2.2- Mode opératoire :	156
2.3.2.3- Résultats :	157
2.3.3- <i>Analyse des résultats</i> :	158
CONCLUSION.....	160
BIBLIOGRAPHIE	162

TABLE DES ILLUSTRATIONS

SCHEMA 1 :	Leucocyte passager du donneur	37
SCHEMA 2 :	Mécanisme de reconnaissance directe	37
SCHEMA 3 :	Mécanismes de reconnaissance indirecte	38
SCHEMA 4 :	L'activation lymphocytaire	40
SCHEMA 5 :	Mécanisme de transduction du signal lors de l'activation du lymphocyte T	43
SCHEMA 6 :	Mécanismes de l'hypersensibilité de type IV	45
SCHEMA 7 :	Apoptose induite par le système Fas/ Fas-L	46
SCHEMA 8 :	Mécanisme du phénomène d'ADCC	47
SCHEMA 9 :	Mécanismes effecteurs impliqués dans le rejet aigu d'allogreffe	48
SCHEMA 10 :	Structure du récepteur intra-cytoplasmique des corticoïdes	61
SCHEMA 11 :	Métabolisme du cyclophosphamide	66
SCHEMA 12 :	Mécanisme d'action d'un agent alkylant bifonctionnel	67
SCHEMA 13 :	Mécanismes d'action des inhibiteurs de kinases et/ou de phosphatases	77
SCHEMA 14 :	Les différentes voies biosynthétiques des bases puriques	79
SCHEMA 15 :	Métabolisme du mycophénolate mofétil	83
SCHEMA 16 :	Mécanisme d'action du léflunomide via son métabolite actif (le A77 1726)	91
SCHEMA 17 :	Métabolisme intracellulaire de méthotrexate	94
SCHEMA 18 :	Cycle des folates et voie de synthèse <i>de novo</i> des purines	97
SCHEMA 19 :	Chronologie de la survenue des infections après transplantation d'organe	105
SCHEMA 20 :	Mécanisme d'action du FTY720	118
SCHEMA 21 :	Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens spécifiques de ICAM-1	122
SCHEMA 22 :	Les différentes étapes de la maturation des CPA	127
SCHEMA 23 :	Pharmacomodulations envisagées	128
SCHEMA 24 :	Méthodes de synthèse pour la préparation des imidazolidin-2-ones 17-36	131
SCHEMA 25 :	Méthodes de synthèse pour la préparation des amines 4-6	131

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Exemples de maladies auto-immunes spécifiques d'organes chez l'homme	55
TABLEAU 2 : Exemples de maladies auto-immunes systémiques chez l'homme	57
TABLEAU 3 : Les différentes spécialités de sérums anti-lymphocytaires	99
TABLEAU 4 : Propriétés physico-chimiques des dérivés nitrés 1-3	137
TABLEAU 5 : Propriétés physico-chimiques des amines 4-6	138
TABLEAU 6 : Propriétés physico-chimiques des urées 7-16	139
TABLEAU 7 : Propriétés physico-chimiques des imidazolidin-2-ones 17-27	140
TABLEAU 8 : Propriétés physico-chimiques des imidazolidin-2-ones N^1 - et N^3 - disubstituées 28-36	142
TABLEAU 9 : Données spectrales des dérivés nitrés 1-3	144
TABLEAU 10 : Données spectrales des amines 4-6	145
TABLEAU 11 : Données spectrales des urées 7-16	146
TABLEAU 12 : Données spectrales des imidazolidin-2-ones 17-27	148
TABLEAU 13 : Données spectrales des imidazolidin-2-ones N^1 - et N^3 - disubstituées 28-36	150
TABLEAU 14 : Effets des molécules évaluées dans les deux tests en comparaison avec la ciclosporine A (CsA) et JM03023 (17)	155
TABLEAU 15 : Graphique récapitulatif des résultats pharmacologiques des molécules les plus actives	156
TABLEAU 16 : Résultats des tests de détermination de la DTH	158

ABBREVIATIONS

ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN : Acide desoxyribonucléique
AICAR Tase : 5-amino-4-carboxamide ribonucléotide transformylase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
CAM : Complexe d'Attaque Membranaire
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CD : Cluster de Différenciation
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
Con A : Concanavaline A
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène
CsA : Ciclosporine A
CSFs : Facteurs Stimulant la formation des Colonies
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte
CTP : Cytidine triphosphate
 δ : Déplacement chimique exprimé en parties par million (ppm)
DAG : Diacylglycérol
d : Doublet
dd : Doublet dédoublé
ddd : doublet de doublets dédoublé
dGTP : Desoxyguanosine triphosphate
dTMP : Desoxythymidine monophosphate
dTTP : Desoxythymidine triphosphate
dUMP : Desoxyuridine monophosphate
DHFR : Dihydrofolate réductase
DHODH : dehydroorotate dehydrogénase
DID : Diabète insulino-dépendant
DMF : Diméthylformamide
DTH : Delayed Type Hypersensitivity
EBV : Epstein Barr Virus
5'EN: 5'-ectonucléotidase

F°C : Points de fusion exprimés en degrés Celsius
 FH2 : Dihydrofolate
 FH4 : Tétrahydrofolate
 FKBP : FK-Binding Protein
 GAR : Glycinamide ribonucléotide
 GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
 GMP : Guanosine monophosphate
 GRE : Glucocorticoïd Response Element
 GTP : Guanosine triphosphate
 GVH : Graft Versus Host
 GVHD : Graft Versus Host Disease
 HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
 HBV : Virus de l'Hépatite B
 HCV : Virus de l'Hépatite C
 HGPRTase : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
 HHV : Herpes Virus Humain
 HLA : Human Leucocyte Antigen
 hsp90 : Heat shock protein 90
 HSR : Hypersensibilité retardée
 HSV : Herpes Simplex Virus
 HTLV : Human T Lymphotropic Virus
 ICAM : Intercellular Adhesion Molecule
 IFN γ : Interféron- γ
 Ig : Immunoglobuline
 I- κ B : Inhibitor of NF- κ B
 IL : Interleukine
 IMP : Inosine monophosphate
 IMPDH : Inosine monophosphate dehydrogénase
 IP3 : Inositol triphosphate
 IR : Infra-Rouge
 I.V. : Intraveineux (se)
 J : Jour
 Jak : Janus Kinase
 J H^xH^y : Constante de couplage (exprimée en Hertz) entre les protons H^x et H^y

JNK : Jun Kinase
LAK : Lymphokine Activated Killer
LATS : Long-Active Thyroïd-Stimulating
LED : Lupus Erythémateux Disséminé
m : Multiplet
MLR : Mixed Lymphocytes reaction
MMF : Mycophénolate Mofétil
MPA : Acide Mycophénolique
Mr : Masse molaire
MS : Méthionine Synthétase
MTHFR : Méthylène Tétrahydrofolate Réductase
mTOR : mammalian Target Of Rapamycine
MTT : Méthyltétrazolium
MTX : Méthotrexate
NF-AT : Nuclear Factor of Activated T cells
NF- κ B : Nuclear Factor κ B
NK : Natural Killer
PAF-acether : Platelet Aggregating Factor
PBL : Peripheral Blood Lymphocytes
Pd/C : Palladium sur charbon
PHA : Phytohémagglutinine
PI3K : Phosphoinositol-3-Kinase
PIP2 : Phosphoinositol diphosphate
PKC : Protéine Kinase C
PLA-2 : Phospholipase A2
PLC γ 1 : Phospholipase C γ 1
PRPP synthase : Phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthase
RAPA : Rapamycine
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RNase H : Ribonucléase H
s : Singulet
SCF : Sérum de Cheval Fœtal
SEP : Sclérose En Plaque
Sol. Rec. : Solvant de Recristallisation

t : Triplet

TA : Température Ambiante

TCR : T Cell antigen Receptor

TNF- β (ou - α) : Tumor Necrosis Factor- β (ou - α)

TS : Thymidylate Synthase

TSH : Thyroïd Stimulating Hormone

UTP : Uridine triphosphate

UV : Ultra-Violet

$\bar{\nu}$: Fréquence de vibration en cm^{-1}

$\bar{\nu}_{\text{as}}$: Fréquence de vibration asymétrique en cm^{-1}

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

VLA : Very Late Antigen

$\bar{\nu}_{\text{s}}$: Fréquence de vibration symétrique en cm^{-1}

VZV : Varicelle-Zona Virus

INTRODUCTION

Le XX^{ème} siècle a été une période d'avancées fondamentales dans de nombreux domaines et notamment dans celui de la Médecine.

En effet, l'évolution des technologies d'analyse, le développement de la biologie moléculaire ou encore l'étude du génome humain, ont permis d'augmenter considérablement l'étendue de nos connaissances, notamment en immunologie, permettant de mieux comprendre de nombreuses pathologies.

L'évolution des techniques et des connaissances se fait toujours en parallèle avec le développement de nouvelles voies thérapeutiques.

L'exemple du développement des **greffes** en est une illustration intéressante.

En effet, avant l'existence des transplantations, de nombreuses pathologies aboutissant à une insuffisance fonctionnelle chronique de tissus ou de cellules, entraînaient inéluctablement la mort du patient.

L'idée de remplacer l'organe ou le tissu défaillant par un autre organe ou tissu étranger existait depuis longtemps mais les diverses tentatives réalisées, au début du siècle dernier, se soldaient toutes par le rejet du greffon puis la mort du sujet greffé.

L'évolution des connaissances sur les notions de compatibilité entre donneur et receveur et la meilleure compréhension des mécanismes intervenant dans le phénomène de rejet ont permis de faire avancer les choses et de comprendre qu'une allogreffe ne peut pas réussir si l'on n'intervient pas, par un traitement adéquat, pour combattre les réactions immunitaires qui se mettent en place contre le greffon qui est considéré par l'organisme greffé comme un élément étranger.

Il s'est donc avéré nécessaire de développer des agents capables de lutter contre des réactions immunitaires indésirables.

Une nouvelle catégorie de produits nommés **immunosuppresseurs** a ainsi vu le jour.

Par la suite, ces molécules se sont montrées intéressantes dans le traitement de certaines maladies auto-immunes pour lutter contre les réactions immunitaires anormales dirigées contre des éléments du "soi".

Les immunodépresseurs de 1^{ère} génération, tels que l'azathioprine, présentaient une activité intéressante mais un manque de spécificité.

L'avancée majeure dans le domaine de l'immunosuppression s'est faite avec le découverte de la ciclosporine A (CsA) qui présente une activité immunosuppressive remarquable et a permis d'augmenter considérablement la survie des greffons.

A partir de là, de nombreuses classes de molécules immunosuppressives se sont développées, présentant des mécanismes d'action divers, parfois pas encore totalement élucidés.

Les protocoles actuellement utilisés en clinique font intervenir une polychimiothérapie et ont permis d'augmenter la survie des greffes.

Néanmoins, ces traitements ont de nombreux inconvénients. En effet, ils sont tous très toxiques et inactifs, pour la plupart, sur les rejets chroniques, responsables de la perte du greffon à long terme.

Il y a donc actuellement un besoin de nouvelles voies thérapeutiques.

Dans la première partie de cet exposé, nous nous attarderons, dans un premier temps, sur les mécanismes à l'origine des rejets de greffe et des maladies auto-immunes.

Puis, nous décrirons les différentes classes d'immunosuppresseurs ainsi que leurs inconvénients.

Enfin, nous essayerons de réaliser un aperçu des différentes voies de recherche actuelles.

La deuxième partie décrira les travaux réalisés, dans notre groupe de recherche, sur la synthèse et l'évaluation pharmacologique d'une série de molécules à structure imidazolidin-2-one présentant des potentialités immunosuppressives.

I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

INTRODUCTION

Le système immunitaire est une organisation complexe nécessaire à la survie des êtres vivants. Il a pour fonction de protéger l'individu des agressions menées par des agents pathogènes de toutes sortes et participe activement à la lutte contre les processus de cancérisation.

La base du fonctionnement du système immunitaire repose sur sa capacité à différencier les antigènes de l'organisme, dits du "**soi**", des antigènes étrangers, dits du "**non soi**" provenant d'un pathogène (ex : bactérie ou champignon) ou d'une cellule modifiée par un virus ou par un processus cancéreux.

Bien que ce système soit régulé de manière extrêmement fine, il arrive parfois qu'il y ait des dérèglements importants conduisant à des situations cliniques pathologiques.

Ainsi, la réactivité du système immunitaire peut être diminuée de façon congénitale ou acquise entraînant un état d'**immunodéficience**.

Ces dysfonctionnements peuvent, dans d'autres cas, se caractériser par une réponse inappropriée du système immunitaire dirigée contre un ou plusieurs antigène(s). C'est le cas des **réactions d'hypersensibilité**.

Sous l'effet de certains facteurs encore mal déterminés, le système immunitaire peut également devenir réactif à l'égard d'un ou de plusieurs élément(s) du "soi" entraînant, par ce fait, la survenue de **maladies auto-immunes**.

Le système immunitaire est donc nécessaire à la survie et ses dérèglements aboutissent à de nombreuses pathologies.

Il existe néanmoins une situation clinique nécessitant de lutter contre le système immunitaire : il s'agit du cas particulier de l'**allogreffe** (greffe entre individus de même espèce).

En effet, en l'absence de traitement adéquat, le système immunitaire du transplanté entraîne inévitablement le rejet de la greffe qu'il considère comme un élément étranger (sauf dans le cas particulier des greffes en site immunologiquement privilégié : cf. 1.5.11).

Dans certaines greffes, c'est le système immunitaire du donneur qui réagit contre les antigènes de l'hôte.

Lorsque l'organisme engage des réponses immunitaires considérées comme néfastes telles que les réactions auto-immunes ou les réactions allogéniques observées dans l'allogreffe, il s'avère nécessaire d'utiliser des médicaments capables de lutter contre ces réponses pathologiques de manière spécifique.

De tels médicaments sont généralement regroupés sous le nom d'**immunosuppresseurs**. Le terme d'**immunodépresseur** est néanmoins plus approprié étant donné que le but de ces molécules n'est pas d'entraîner une suppression totale des fonctions immunitaires mais plutôt de cibler les réactions pathologiques ou indésirables pour les inhiber, les supprimer ou les réguler, tout en maintenant intactes les fonctions normales du système immunitaire nécessaires à la protection de l'organisme.

1.1- RAPPELS SUR LES REPONSES IMMUNITAIRES NORMALES

1.1.1- Généralités :

Pour commencer cet exposé, il est important, de faire un bref rappel sur les éléments et mécanismes intervenant dans les réponses immunitaires normales.

Il existe deux formes majeures d'immunité composant le système immunitaire : **l'immunité naturelle** et **l'immunité acquise**.

1.1.2- L'immunité naturelle : [1], [2] et [3]

L'immunité naturelle ou innée constitue la première ligne de défense contre les agressions. Cette immunité a la particularité de ne pas être spécifique du pathogène mis en cause dans l'agression.

Cette immunité comporte, tout d'abord, des **composants physiques** tels que la peau et les muqueuses, qui, lorsqu'elles sont intactes, constituent les premières barrières aux infections.

Ces barrières peuvent parfois être rompues, permettant ainsi aux pathogènes de pénétrer dans l'organisme.

Des **composants cellulaires et biologiques** peuvent alors intervenir.

Les composants cellulaires sont représentés par les **monocytes sanguins**, les **macrophages** et les **neutrophiles**. Ces cellules sont des phagocytes c'est à dire qu'elles possèdent la faculté de capter les agents pathogènes de façon non spécifique afin de les dégrader.

Les composants biologiques sont principalement le lysozyme et le système du complément.

Le **lysozyme** (ou muraminidase) est une enzyme qui découpe une liaison du peptidoglycane qui constitue la paroi de certaines bactéries (Gram+). Il est produit de façon constitutive par les neutrophiles et certains macrophages, et, est présent dans la plupart des sécrétions.

Le **complément** est un des systèmes enzymatiques du sérum qui intervient dans la destruction des pathogènes, les réactions inflammatoires et dans l'opsonisation des particules antigéniques.

Ce système est composé de molécules sériques pouvant être activées selon plusieurs voies, activées elles-mêmes par des complexes immuns (ex : anticorps fixant une bactérie), des produits d'origine bactérienne ou la bactérie en elle-même.

Cette activation aboutit à des produits de scission du complément aux propriétés variées.

Parmi ceux-ci, on peut citer le C5b, qui se fixe sur la membrane de la bactérie ou de la cellule cible et s'associe aux fragments C6, C7, C8 et C9 polymérisé pour former un complexe d'attaque membranaire (CAM) qui traverse la membrane de la cible et forme ainsi un canal lytique provoquant sa mort.

Le C3a et le C5a sont également des produits de scission mais possèdent des propriétés anaphylactiques. En effet, ils sont capables d'entraîner la dégranulation des mastocytes, la contraction des muscles lisses et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux capillaires facilitant le passage des neutrophiles et des monocytes à travers l'endothélium pour rejoindre le site inflammatoire où se situe le pathogène. De plus, le C5a possède aussi des propriétés chimiotactiques à l'égard des neutrophiles et des monocytes ce qui favorise leur attrait au site de l'inflammation généré par le pathogène.

Le C3b, quant à lui, se comporte comme une opsonine, c'est à dire qu'il est capable de se fixer à la surface des micro-organismes ce qui facilite ensuite leur captation par les phagocytes qui possèdent sur leur membrane des récepteurs spécifiques du C3b.

L'immunité naturelle intervient donc en premier lieu lors d'une infection par un pathogène et peut s'avérer très efficace en prévenant la maladie ou en limitant sa durée.

1.1.3- L'immunité acquise :

1.1.3.1- Généralités : [1]

Lorsque la réponse immune innée ne parvient pas à juguler l'infection, l'immunité acquise est mise en œuvre.

Cette immunité est très efficace pour les raisons suivantes :

- elle permet de réagir contre un **très grand nombre d'antigènes** de manière **spécifique** ;
- elle possède la capacité de faire la distinction entre les antigènes du "soi" et ceux du "non-soi" ;
- la réponse à un antigène déjà rencontré est beaucoup plus rapide et efficace que lors du premier contact grâce à la mise en place d'une réponse mémorisée.

Cette immunité comporte deux grands types d'effecteurs : ceux de **l'immunité à médiation humorale** et ceux de **l'immunité à médiation cellulaire**.

1.1.3.2- Le rôle des cellules présentatrices d'antigène (CPA) : [1]

Les CPA sont indispensables à l'établissement d'une immunité spécifique et jouent un rôle central dans cette immunité.

Les cellules capables de se comporter comme des CPA sont les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langherans et les lymphocytes B.

Les CPA sont capables d'internaliser des antigènes étrangers ou des bactéries et de les digérer enzymatiquement. Les peptides résultant de la digestion de l'antigène peuvent alors être exposés au niveau membranaire par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

1.1.3.3- L'activation des lymphocytes auxiliaires Th CD4⁺ : cf. 1.2.2.2.1.2

Les lymphocytes Th (helper ou auxiliaire), spécifiques de l'antigène exposé par la CPA, vont reconnaître le peptide antigénique associé à la molécule de classe II du CMH par le biais de leur récepteur pour l'antigène (ou TCR). Cette reconnaissance constitue le premier signal d'activation.

Pour que l'activation soit complète, il faut qu'il y ait un second signal qui est l'engagement de molécules de co-stimulation (cf. 1.2.2.2.1.2) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques situés sur la CPA. Des molécules accessoires, telles que le cluster de différenciation CD4 sur les cellules auxiliaires et le CD8 sur les cellules T cytotoxiques, interviennent aussi en renforçant l'interaction entre la CPA et le lymphocyte. Parmi ces molécules, il y a également les molécules d'adhésion (cf. 1.2.2.2.1.2).

La cellule Th ainsi activée se met à produire des cytokines et notamment de l'interleukine-2 (IL-2) ce qui constitue un 3^{ème} signal. L'IL-2 va alors se fixer de manière autocrine ou paracrine sur son récepteur spécifique situé sur les cellules Th et induire leur prolifération ainsi que leur différenciation.

1.1.3.4- Les lymphocytes Th1 et Th2 : [1]

On distingue deux sous-populations de cellules Th en fonction du profil de cytokines sécrétées après leur activation : les Th1 et les Th2.

Les cellules Th2 reconnaissent les peptides d'origine étrangère associés aux molécules du CMH à la surface des CPA. Elles se mettent alors à produire de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-6 entraînant la prolifération des cellules B, la formation de cellules mémoire, ainsi que la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes capables de sécréter des anticorps.

Les cellules Th2 induisent donc une immunité à médiation humorale.

Les cellules Th1 sont caractérisées par leur production d'interféron- γ (IFN γ), d'IL-2 et de Tumor Necrosis Factor- β (TNF- β) et sont à l'origine de l'immunité à médiation cellulaire en activant les macrophages, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules tueuses naturelles ou Natural Killer (NK).

Les cellules Th1 et Th2 s'autorégulent par la sécrétion de cytokines. L'IFN γ produit par les Th1 inhibe la réponse Th2 et l'IL-10 sécrétée par les Th2 inhibe la réponse Th1.

1.1.3.5- L'immunité à médiation humorale :

L'acteur de cette immunité est le lymphocyte B.

L'ontogenèse des lymphocytes B se fait dans le foie fœtal ou, après la naissance, dans la moelle osseuse.

Chaque lymphocyte B exprime à sa surface et produit des immunoglobulines d'une même et unique spécificité pour un antigène.

Lorsqu'une cellule B reconnaît un antigène de manière spécifique, celui-ci se fixe à l'immunoglobuline de surface (IgM ou IgD).

Les cellules Th2 activées produisent de l'IL-4 et de l'IL-5. Ces cytokines stimulent la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation en cellule mémoire et en plasmocytes capables de produire des anticorps (immunoglobulines sécrétées spécifiques de l'antigène reconnu).

La réponse anticorps primaire est déclenchée lors du premier contact avec l'antigène et est essentiellement constituée d'IgM.

Une réponse secondaire renforcée est mise en œuvre lors d'un contact ultérieur avec le même antigène. Cette réponse est accompagnée d'une commutation de l'isotype des Ig vers des anticorps de type IgG, IgA et IgE possédant des fonctions effectrices. Ces anticorps ont une affinité augmentée à l'égard de l'antigène leur permettant de se lier à l'antigène de façon plus efficace. Ceci est dû aux mutations somatiques.

Les anticorps possédant des fonctions effectrices peuvent se comporter comme des opsonines en fixant le pathogène et en se liant par leur fragment Fc à la membrane des phagocytes qui ont à leur surface des récepteurs spécifiques de la région Fc des Ig. Ce processus facilite l'internalisation du pathogène (ex : une bactérie) et donc sa digestion par le phagocyte. Les anticorps peuvent également fixer des cellules et faciliter ainsi le phénomène de cytotoxicité cellulaire.

Ils peuvent également activer le complément lorsqu'ils sont fixés à un antigène ce qui déclenche une réaction inflammatoire et peut provoquer la lyse de la bactérie qu'ils fixent.

1.1.3.6- L'immunité à médiation cellulaire : [1]

L'immunité à médiation cellulaire est médiée par les lymphocytes T, les macrophages et les cellules NK.

Durant le développement fœtal, les thymocytes (précurseurs des lymphocytes T) subissent une première sélection dans la corticale thymique qui implique une interaction entre le récepteur T exprimé par le thymocyte, en cours de développement, et les molécules d'histocompatibilité exprimées par les cellules de l'épithélium thymique situées dans la corticale. Seuls les thymocytes dont le récepteur T peut reconnaître des peptides dans le contexte du CMH du "soi" survivent et prolifèrent. C'est la sélection positive.

Puis, le thymocyte subit une sélection négative, au niveau de la jonction cortico-médullaire du thymus, qui consiste en l'élimination par apoptose des thymocytes immatures, dont les récepteurs T reconnaissent avec une forte affinité les peptides du "soi", c'est à dire les cellules T auto-réactives. Seuls 5 % environ des thymocytes seront exportés vers la périphérie.

Les cellules Th1 activées vont stimuler les lymphocytes T cytotoxiques qui sont majoritairement des CD8⁺ qui reconnaissent des peptides étrangers exposés par les molécules de classe I du CMH des cellules infectées par un virus ou des cellules tumorales.

En immunologie de transplantation, l'alloantigène étranger reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ est la molécule de classe I (ou de classe II) du CMH des cellules du donneur.

Il existe également des lymphocytes T CD4⁺ qui fonctionnent comme les CD8⁺ mais reconnaissent des peptides étrangers présentés par des molécules de classe II du CMH ou la molécule de classe II du CMH elle-même, dans le cas des transplantations.

Il faut signaler que les molécules de classe I du CMH présentent principalement des fragments peptidiques d'antigènes cellulaires endogènes (tels que des antigènes viraux ou tumoraux) préparés dans l'appareil du Golgi, tandis que les molécules de classe II présentent les fragments antigéniques exogènes provenant de la phagocytose.

Les cellules T cytotoxiques ayant reconnu un peptide ou une molécule de CMH étranger à la surface d'une cellule induisent la mort de cette cellule cible par différents mécanismes (cf. : 1.2.2.2.2.).

Les cellules Th1 vont également activer des cellules NK en sécrétant de l'IFN γ . Ces cellules sont capables de tuer les cellules infectées par un virus ainsi que les cellules tumorales. De plus, ce sont les principaux précurseurs des cellules dites "tueuses de proximité" ou Lymphokine Activated Killer (LAK) qui sont des cellules capables de tuer à travers les barrières du CMH. Elles peuvent également tuer des cellules qui n'expriment pas le CMH à leur surface.

Enfin, les cellules Th1 peuvent activer des macrophages par la sécrétion d'IFN γ et de TNF, et les macrophages activés peuvent exercer une activité lytique directe sur des bactéries ou un tissu.

Les macrophages et les cellules NK participent aussi au phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) qui sera décrit plus loin (cf. 1.2.2.2.2.)

1.2- INDICATIONS DES IMMUNOSUPPRESSEURS

1.2.1- Généralités :

Les immunosuppresseurs, parfois plus à propos appelés immunodépresseurs, sont définis comme des produits déprimant les réponses immunitaires lorsque celles-ci s'avèrent exagérées ou pathologiques.

Leur champ d'action est de ce fait très large car de nombreuses pathologies ont une composante immunitaire importante.

Certaines maladies dites inflammatoires peuvent aussi être traitées par des immunosuppresseurs car les processus inflammatoires et immunologiques sont intimement imbriqués.

L'objectif de ce chapitre n'est donc pas de faire une liste exhaustive des différentes indications thérapeutiques des immunodépresseurs mais de décrire les mécanismes des principales pathologies dans lesquelles ils sont utilisés afin de mieux comprendre leurs modes d'action.

Ainsi, ils sont principalement utilisés dans le cadre des **allogreffes** pour éviter le phénomène de rejet et la "graft versus host disease" (GVHD), réaction de la greffe contre l'hôte. Pour certains, ils interviennent également dans le contrôle de **maladies auto-immunes** incluant le diabète de type I, l'uvéïte, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, le lupus érythémateux disséminé (LED), ou encore la glomérulonéphrite.

1.2.2- L'allogreffe : l'application principale

1.2.2.1- Définition : [4] et [5]

Une allogreffe est un don d'organe (s), de peau ou de moelle osseuse entre deux individus de même espèce. C'est la situation la plus fréquente en clinique.

Il existe deux types de transplantation : la transplantation cadavérique et la transplantation de donneur vivant.

La transplantation cadavérique est la plus pratiquée actuellement. Le don doit être volontaire, anonyme et gratuit. Le donneur doit être âgé de moins de soixante-dix ans, dans un coma de stade IV et doit présenter deux encéphalogrammes plats à quatre heures d'intervalle sur un enregistrement d'au moins trente minutes, en l'absence de drogues sédatives.

La transplantation de donneur vivant ne concerne que la transplantation rénale, mais est également envisageable en transplantation hépatique ou pulmonaire. Elle reste encore peu pratiquée en France (moins de 4 % du nombre total des transplantations) par rapport aux Etats-Unis ou à d'autres pays d'Europe tels que la Norvège, par exemple. Dans ce cas, le donneur doit être un parent proche (parents, enfants, frères et sœurs). Le (ou la) conjoint (e) peut également être donneur en cas d'urgence.

1.2.2.2- Bases immunologiques du rejet d'allogreffe :

Dans la majorité des cas, les greffes se font entre un donneur et un receveur génétiquement différents. Dans ce cas, en l'absence d'une thérapeutique immunosuppressive adéquate, l'organe greffé, reconnu comme faisant partie du "non soi" par le système immunitaire du receveur, est inéluctablement rejeté.

Les lymphocytes T du receveur jouent un rôle majeur dans la survenue des rejets aigu et chronique. Le rejet suraigu qui intervient dans les minutes qui suivent l'implantation du greffon, est, quant à lui, du à l'existence, chez le receveur, d'anticorps préexistants dirigés contre le greffon, et possède un mécanisme à part [5].

Les événements immunologiques aboutissant aux rejets aigu et chronique de l'allogreffe peuvent se diviser en deux phases : la **phase de sensibilisation** et la **phase effectrice**.

1.2.2.2.1- La phase de sensibilisation : [4], [5] et [6]

A l'issue de cette phase, les cellules T, ayant reconnu l'allo-antigène, prolifèrent et se différencient.

1.2.2.2.1.1- Les mécanismes de la reconnaissance allogénique :

La reconnaissance par les cellules T d'un allo-antigène est la première étape dans le processus amenant au rejet de l'organe greffé.

Les antigènes du greffon reconnus par les lymphocytes T sont de deux types : les antigènes codés par les molécules du CMH et les antigènes mineurs d'histocompatibilité.

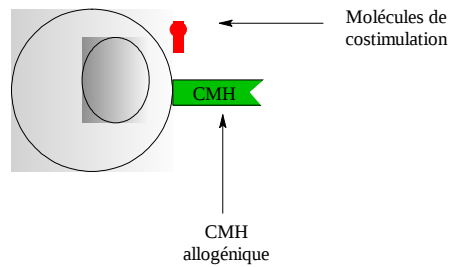
Les antigènes mineurs sont des peptides dérivés du greffon.

La reconnaissance peut se faire de façon directe ou indirecte.

- La reconnaissance directe :

Lors de la greffe de certains organes ou tissus, les cellules dendritiques du donneur résidant dans le greffon (leucocytes passagers : cf. schéma 1), migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur. Au cours de cette migration, ces cellules deviennent matures et se mettent ainsi à exprimer à leur surface de nombreuses molécules de classe II du CMH qui vont être reconnues comme du "non soi" par le récepteur pour l'antigène (ou TCR, T Cell antigen Receptor) des lymphocytes Th du receveur présents au niveau des tissus lymphoïdes (cf. schéma 2).

Schéma 1 : Leucocyte passager du donneur [6]

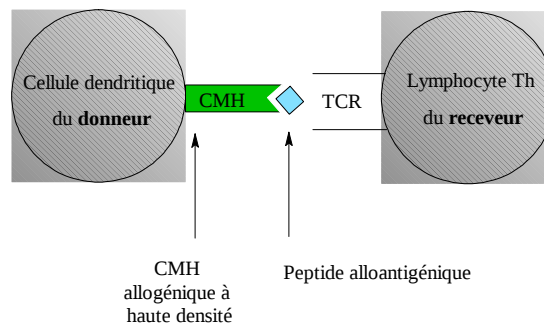


La réaction allogénique qui en découle est violente car elle met en jeu un très grand nombre de lymphocytes T par rapport à la réaction obtenue en réponse à un antigène environnemental.

Cette forme de reconnaissance est **spécifique de la réaction allogénique** et représente la principale voie de présentation de l'antigène lors des premières semaines de la greffe.

C'est ce mécanisme qui est responsable de la survenue des **rejets aigus cellulaires précoces**.

Schéma 2 : Mécanisme de reconnaissance directe [4]



Les leucocytes passagers ne sont pas les seules cellules impliquées dans la stimulation immunitaire lors du rejet aigu de greffe et ne semblent, par exemple, jouer aucun rôle dans le rejet de greffe de peau. En effet, il a été démontré que, dans certains cas, ce sont les cellules de Langherans et les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins qui assurent le rôle de présentation des allo-antigènes au système immunitaire car elles possèdent à leur surface des antigènes de classe I et de classe II du CMH [7].

Dans ces situations, les lymphocytes de l'hôte sont apportés au greffon par voie sanguine ou lymphatique et peuvent ainsi rencontrer les antigènes étrangers. Ils migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques ou la rate.

- La reconnaissance indirecte :

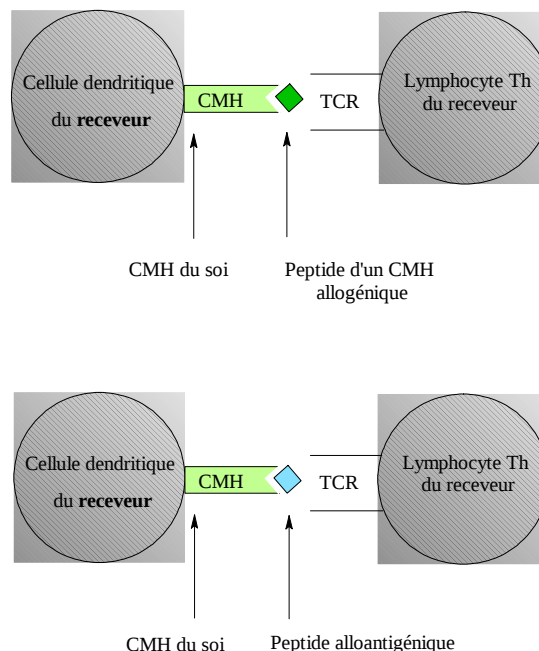
Avec le temps, les cellules dendritiques du donneur vont progressivement disparaître. Les cellules dendritiques du receveur vont alors intervenir. Ces dernières migrent au niveau du greffon où elles captent des molécules HLA du donneur ou des peptides dérivés du greffon qu'elles présentent ensuite sous forme de peptide par l'intermédiaire de leurs molécules de classe II du CMH aux lymphocytes Th CD4⁺ (cf. : schéma 3).

Ces cellules Th CD4⁺ alloréactives participent à la réaction d'hypersensibilité retardée en produisant des cytokines et permettent l'activation des lymphocytes B induisant la production d'allo-anticorps.

Ce mode classique de présentation de l'antigène implique, contrairement au mode précédemment décrit, un grand nombre de peptides allogéniques et une fréquence beaucoup plus faible de précurseurs T dirigés contre ces peptides.

Ce mécanisme de reconnaissance classique peut être responsable de rejets aigus, mais surtout, joue probablement un rôle majeur au cours du processus de **rejet chronique**.

Schéma 3 : Mécanismes de reconnaissance indirecte [4] et [6]



1.2.2.2.1.2- L'activation lymphocytaire T : [4], [8], [9] et [10]

Lorsque le lymphocyte T a reconnu un allo-antigène, il est activé par 3 types de signaux. Cette phase d'activation est une étape nécessaire à la réaction de rejet.

- Le 1^{er} signal est dû à l'interaction entre le récepteur du lymphocyte T et le complexe CMH-peptide de la CPA :

Le récepteur membranaire pour l'antigène des lymphocytes T est un complexe multimoléculaire composé de deux éléments : le TCR et le marqueur de membrane CD3.

Le TCR est impliqué dans la reconnaissance de l'antigène alors que le CD3 est à l'origine de l'activation du lymphocyte T.

Lorsqu'il y a interaction entre un allo-antigène de nature peptidique, présenté par une molécule de CMH de classe II, et le TCR, il s'ensuit une cascade d'activation de systèmes enzymatiques intracellulaires (cf. schéma 5) à l'origine d'un afflux de calcium ionisé (Ca^{2+}) dans le cytoplasme et de l'activation d'une kinase, la protéine kinase C (PKC).

En effet, la reconnaissance d'un allo-antigène par le TCR entraîne l'activation et l'association, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, de tyrosine-kinases telles que p59 fyn et p56 lck ainsi que la phosphorylation de ZAP-70 à l'origine de l'activation d'une phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$). Cette phospholipase va alors hydrolyser des phospholipides membranaires contenant de l'inositol (PIP_2) pour libérer du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP_3). Le DAG active la PKC et l' IP_3 se fixe sur ses récepteurs spécifiques au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique entraînant une libération du calcium présent à ce niveau.

La fixation du calcium sur la calmoduline, une protéine cytoplasmique inactive, entraîne un changement de conformation de celle-ci à l'origine de son activation. Une fois activée, la calmoduline se fixe sur une protéine phosphatase cytoplasmique, nommée calcineurine, pour l'activer. La calcineurine activée va alors déphosphoryler un facteur de transcription, le NF-AT, ce qui va induire sa migration du cytoplasme vers le noyau.

La PKC activée phosphoryle, quant à elle, la protéine I- κ B (Inhibitor of NF- κ B). Cette protéine forme, dans des conditions normales, un complexe avec un autre facteur de transcription, le NF- κ B, ce qui le retient dans le cytoplasme. Après phosphorylation, le I- κ B libère le NF- κ B qui est alors exporté jusque dans le noyau.

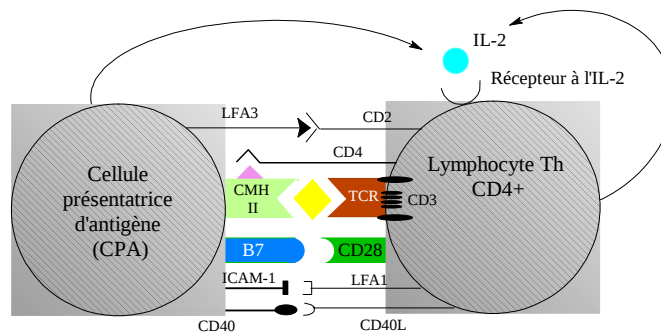
Une fois dans le noyau, ces deux facteurs de transcription induisent l'expression de différents gènes. Parmi ceux-ci figurent des gènes de cytokines dont celui de l'interleukine 2 (IL-2), facteur de croissance majeur des lymphocytes T, et le gène de la chaîne inductible α du récepteur à l'IL-2.

Ce premier signal permet également le passage de la cellule de la phase G_0 à la phase G_1 du cycle cellulaire.

- Le 2^{ème} signal est réalisé par les molécules de co-stimulation :

Le premier signal ne suffit pas à entraîner l'activation du lymphocyte T. En effet, pour cela, un signal de co-stimulation est nécessaire (cf. schéma 4).

Schéma 4 : L'activation lymphocytaire [4]



Ce signal est dû à la liaison entre des molécules de co-stimulation présentes sur le lymphocyte T et leur ligand sur la CPA. Les couples de molécules les mieux caractérisés, à l'heure actuelle, sont l'association CD28/B7 et le couple CD40/CD40-Ligand.

Il est important de signaler que le CD28 est régulé de façon négative par l'activation. A l'opposé, le CTLA-4, un autre ligand du B7, qui n'est pas exprimé sur les cellules au repos, est induit par l'activation de la cellule T.

En l'absence de ce signal de co-stimulation, la cellule, qui ne reçoit pas l'ensemble complet des signaux, ne se divise pas et tend même à devenir anergique c'est à dire qu'elle rentre dans une sorte d'état réfractaire.

Ces molécules représentent donc actuellement des cibles intéressantes pour de nouveaux traitements immunosuppresseurs capables d'induire un état de tolérance.

La liaison du B7-1 (ou CD80) ou du B7-2 (ou CD86) avec le CD28 au niveau de la synapse immunologique, entraîne l'activation d'une phospho-inositol-3-kinase (PI3K) à l'origine d'une cascade enzymatique agissant en synergie avec l'activation de P21ras par ZAP 70. Ces cascades enzymatiques, appelées cascades des MAP-kinases, aboutissent à la phosphorylation de jun kinases et de MAP-kinases (dont ERK1 et ERK2). Les jun kinases phosphorylées favorisent la phosphorylation et la régulation de l'expression nucléaire de c-jun. Les ERK kinases agissent en régulant l'expression de c-fos. C-jun et c-fos sont les deux composants du facteur de transcription AP-1 qui collabore avec d'autres facteurs de transcription tels que NFAT et OCT-1.

Enfin, il faut noter que l'activation des molécules de co-stimulation est optimisée par d'autres interactions entre des molécules accessoires d'adhésion (ou de co-stimulation) à la surface des CPA et leur ligand sur le lymphocyte T. Parmi ces couples de molécules on trouve ICAM-1/LFA-1 et LFA-3/CD2 qui interviennent dans l'adhésion entre les cellules et dans l'activation lymphocytaire. Le couple VCAM-1/VLA-4 intervient, quant à lui, principalement dans l'adhésion cellulaire.

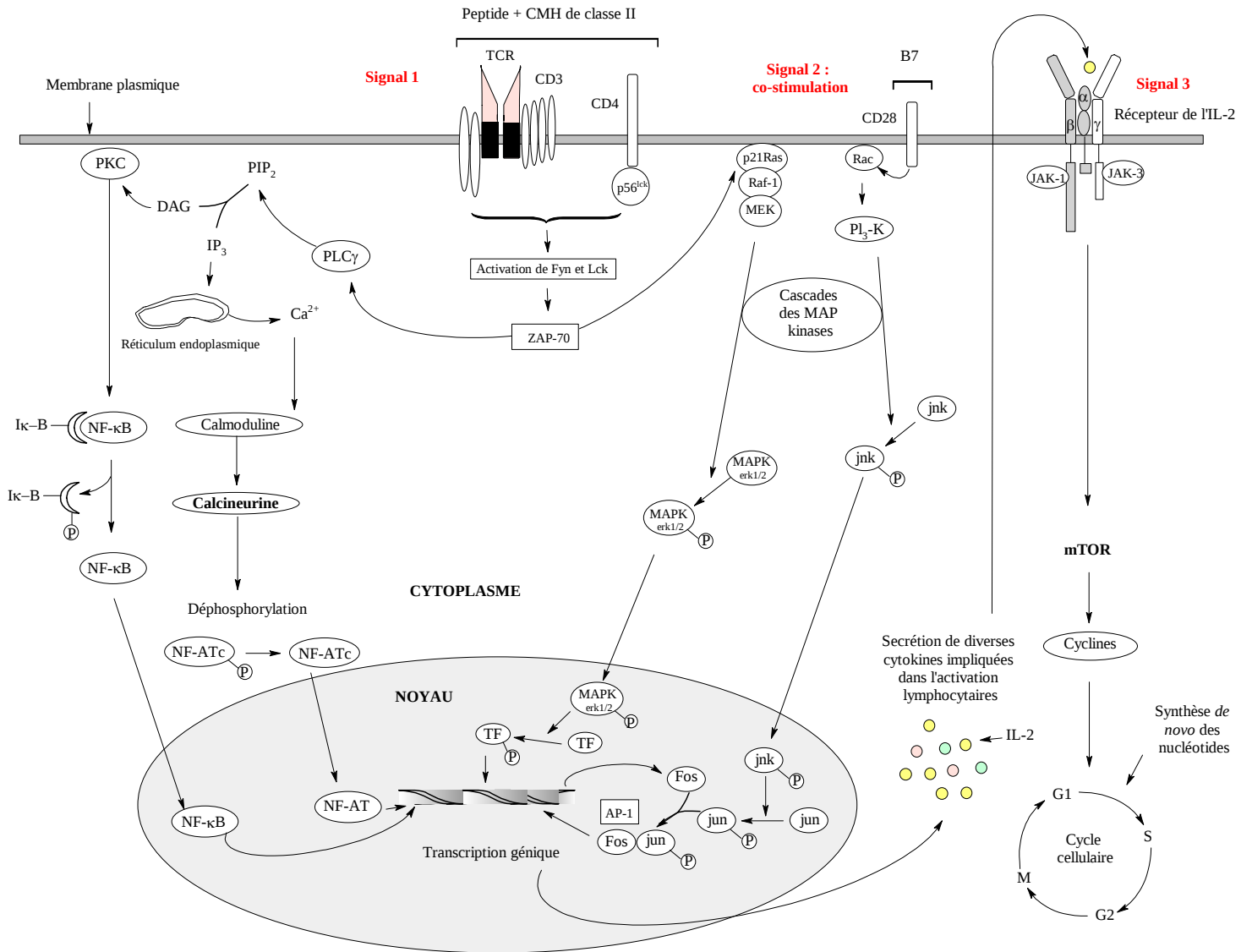
- Un 3^{ème} signal est réalisé par la production de cytokines :

Les deux premiers signaux aboutissent à la production de cytokines par le lymphocyte T, dont l'IL-2, et à l'expression de son récepteur membranaire spécifique sur la cellule T, le CD25. La fixation de l'IL-2 sur son récepteur spécifique de façon autocrine ou paracrine induit la phosphorylation de Janus kinases (Jak-1 et Jak-3) associées aux régions intracytoplasmiques des chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2. Ceci est à l'origine de la phosphorylation d'une phospho-inositol-3-kinase (PI3K) et de l'activation d'une kinase dénommée "mammalian Target Of Rapamycine" (mTOR). La mTOR induit la synthèse de protéines de progression du cycle cellulaire nommées "Cyclin Dependent Kinases" (CDK) entraînant la progression des lymphocytes T dans le cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et donc leur prolifération.

Ce signal peut être également induit par l'interleukine 15 (IL-15) qui n'est pas synthétisée par les lymphocytes T activés mais par d'autres cellules intervenant dans la réaction allogénique tels que les macrophages, les cellules parenchymateuses, les cellules musculaires lisses et surtout les cellules endothéliales. L'IL-15 se fixe alors sur son récepteur spécifique présent à la surface du lymphocyte T. Ce récepteur possède des chaînes β et γ identiques à celles du récepteur à l'IL-2 et qui entraînent donc les mêmes réactions intracellulaires.

La progression du cycle cellulaire conduit donc à la mitose (phase M du cycle cellulaire). La mitose nécessite une duplication et une synthèse d'acides nucléiques à partir de bases puriques et pyrimidiques. Cette synthèse est régulée par différents signaux qui peuvent éventuellement constituer un 4^{ème} signal.

Schéma 5 : Mécanisme de transduction du signal lors de l'activation du lymphocyte T [8], [10] et [11]



1.2.2.2.2- La phase effectrice : [1], [4], [5], [7], [12] et [13]

- Migration de lymphocytes sensibilisés :

Lors du processus de rejet aigu, les lymphocytes alloréactifs Th activés, présents au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques, prolifèrent et sécrètent des cytokines qui vont être responsables de l'activation et de la différenciation de diverses cellules effectrices alloréactives (Cellules T_{DTH}, lymphocytes T cytotoxiques, et lymphocytes B). Toutes ces cellules regagnent le greffon par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et l'infiltrant. Il faut noter que ce sont les cellules spécifiques de l'allo-antigène qui vont migrer de manière préférentielle au niveau du site de l'antigène. Ceci s'explique par des modifications phénotypiques de la cellule endothéliale, en particulier, au niveau de ses molécules d'adhésion qui jouent un rôle primordial dans le processus d'ancrage du lymphocyte T sur l'endothélium avant de le traverser pour atteindre le tissu cible.

- Phase d'agression du greffon :

Les mécanismes effecteurs à l'origine de la destruction du greffon lors d'un rejet chronique sont encore mal connus.

En revanche, l'agression du greffon au cours du rejet aigu est assurée par de multiples types cellulaires agissant par des voies différentes (cf. schéma 9).

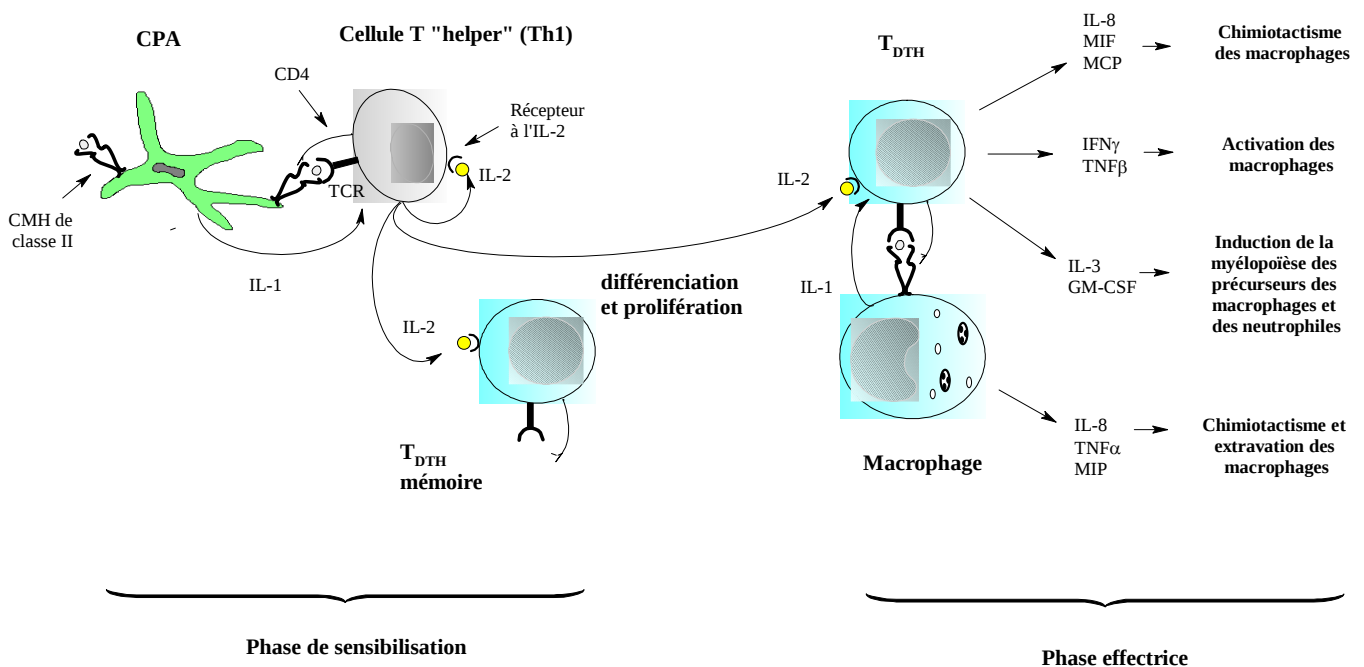
Les cellules capables d'entraîner la lésion de l'organe greffé peuvent être spécifiques ou non.

L'infiltrat cellulaire d'un greffon en rejet aigu est composé d'environ 60 % de cellules T, en majorité des CD8⁺ cytotoxiques, de 30 % de monocytes-macrophages, et de 10 % de cellules B, NK ou LAK.

Les mécanismes effecteurs les plus impliqués dans le rejet aigu du greffon sont les réactions à médiation cellulaire comprenant l'hypersensibilité retardée (HSR) assurée par les cellules T_{DTH} , cellules Th intervenant dans l'HSR ou "delayed type hypersensitivity" (DTH), et la cytotoxicité médiée par les CTL.

L'hypersensibilité retardée ou de type IV comporte deux phases : une phase de sensibilisation et une phase effectrice. Lors de la phase de sensibilisation, l'antigène (dans le cas de la transplantation, l'allo-antigène) est présenté aux cellules $CD4^+$ Th (Th1) par les CPA via les molécules de classe II du CMH, comme décrit précédemment. Les cellules Th $CD4^+$ ainsi activées vont alors proliférer et se différencier en cellules T effectrices de l'HSR mémoire (T_{DTH} mémoire). La phase effectrice est déclenchée lorsque la cellule T_{DTH} réalise un second contact avec l'antigène. Elle sécrète alors de nombreuses cytokines qui attirent et activent les macrophages et les neutrophiles inflammatoires non spécifiques. Ces cellules présentent une activité phagocytaire augmentée et libèrent une grande quantité d'enzymes lytiques provoquant une réponse inflammatoire locale ainsi que des dommages tissulaires importants au niveau du greffon.

Schéma 6 : Mécanismes de l'hypersensibilité de type IV [1]



En outre, parmi les cytokines sécrétées pendant la phase effectrice, on retrouve le TNF- β et l'IFN γ . Le TNF- β a un effet cytotoxique direct sur les cellules d'une greffe. De plus, ces deux cytokines favorisent le rejet du greffon en induisant une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I (pour le TNF- β) et de classe II (pour l'IFN γ) à la surface des cellules du greffon favorisant ainsi l'attaque de celles-ci par les lymphocytes cytotoxiques (CTL).

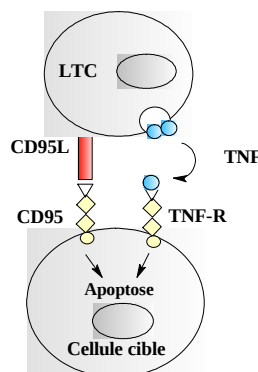
La reconnaissance des allo-antigènes à la surface du greffon par les CTL peut conduire à une mort médiée par les CTL. Cette cytotoxicité est réalisée par plusieurs mécanismes.

Une première possibilité est le système perforine/granzyme. Le CTL libère le contenu de ses granules comprenant la perforine et le granzyme en direction de la cellule cible. La perforine est une molécule capable de se polymériser dans la membrane de la cellule cible pour former un canal permettant à une protéase nommée granzyme de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Le granzyme va alors activer des enzymes nommées caspases impliquées dans l'apoptose.

La lymphotoxine α sécrétée par les cellules T peut également être à l'origine de l'induction de la mort cellulaire.

Enfin, un autre système intervient : le Fas/Fas ligand. Le Fas (ou CD95) est exprimé à la surface de nombreuses cellules. Sa liaison avec son récepteur spécifique (le CD95L) situé au niveau de la membrane des lymphocytes T induit la mort de la cellule cible par apoptose (cf. schéma 7).

Schéma 7 : Apoptose induite par le système Fas/ Fas-L [12]



D'autres réactions interviennent également de manière minoritaire : la lyse par un anticorps associé au complément et la destruction par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

Certaines cellules possèdent des récepteurs capables de fixer le fragment Fc des immunoglobulines. Parmi ces cellules, on peut citer les cellules NK ou encore les macrophages. Lorsqu'un anticorps reconnaît un antigène à la surface d'une cellule, il peut être fixé par une cellule NK ou un macrophage qui va entrer en interaction par le biais de son récepteur spécifique du fragment Fc. Ceci est à l'origine d'une activation de la cellule NK ou du macrophage qui libère alors le contenu de ses granules contenant des enzymes lytiques et de la perforine qui vont entraîner la lyse de la cellule. C'est le phénomène d'ADCC (cf. schéma 8)

Schéma 8 : Mécanisme du phénomène d'ADCC [13]

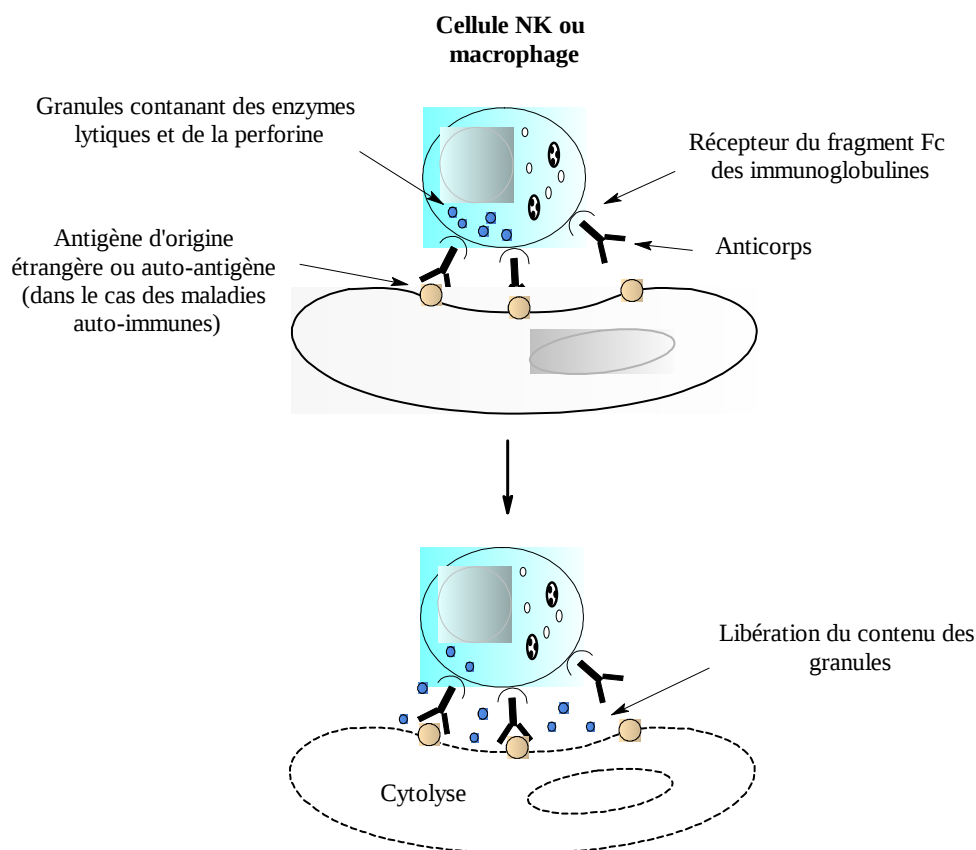
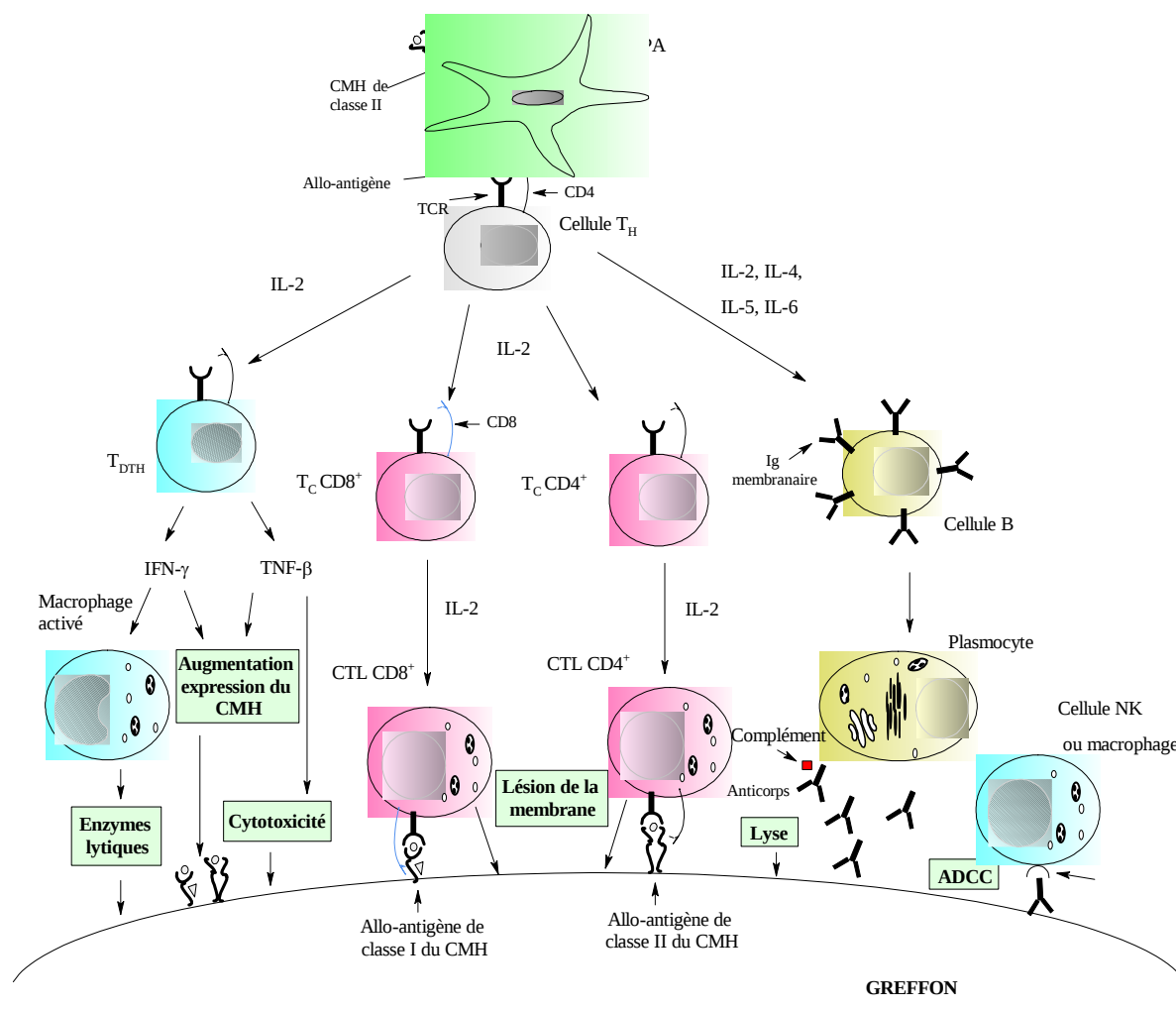


Schéma 9 : Mécanismes effecteurs impliqués dans le rejet aigu d'allogreffe [7]



ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ; CPA : cellule présentatrice d'antigène

En conclusion, en l'absence d'une thérapeutique immunodépressive adéquate et contrôlée, il y a un risque extrêmement élevé d'observer un rejet de greffe même si les donneurs sont dits " compatibles ".

1.2.3- La "Graft Versus Host Disease" (GVHD) :

1.2.3.1- Définition : [7]

La réaction de GVH s'observe dans le cas particulier des greffes de moelle osseuse ou des transplantations hépatiques. En effet, la moelle osseuse ou le foie du donneur contiennent des cellules immunocompétentes, capables de reconnaître les allo-antigènes des tissus de l'hôte, qui vont provoquer le rejet de l'hôte par la greffe car le receveur est dans un état d'immunodépression très important. Les troubles générés par cette réaction sont à l'origine de la maladie du greffon contre l'hôte.

Cette maladie est très fréquente chez les patients recevant une greffe de moelle osseuse puisqu'elle survient dans 50 à 70 % des cas.

1.2.3.2- Bases immunologiques de la réaction de GVH : [7]

Comme dans le rejet de greffe par l'hôte, la GVHD se divise en une phase d'activation suivie d'une phase effectrice.

- Phase d'activation :

Durant la phase d'activation, les cellules Th de la moelle osseuse ou du foie du donneur vont reconnaître les allo-antigènes de l'hôte présentés par les molécules de classe II du CMH présentes à la surface des cellules présentatrices de l'antigène de l'hôte. Cette reconnaissance constitue le premier signal de l'activation.

Pour que l'activation soit efficace, il faut que ce signal soit accompagné d'un signal de co-stimulation, comme décrit dans le paragraphe ci-dessus. La cellule Th ainsi activée produit des cytokines et notamment de l'IL-2 qui est nécessaire à sa prolifération et à sa différenciation.

- Phase effectrice :

Les cytokines produites par la cellule Th activée vont induire la phase effectrice de la GVHD en activant toute une série de cellules effectrices secondaires comme ce que l'on peut observer lors d'un rejet aigu de greffe classique. Ainsi, de nombreux types cellulaires peuvent être activés tels que les cellules NK, les macrophages et les lymphocytes T cytotoxiques.

Ces cellules vont entraîner des lésions au niveau des tissus de l'hôte par des mécanismes divers décrits dans le paragraphe précédent.

Néanmoins, il faut insister sur le rôle important joué par les cytokines dans cette réaction de GVH.

En effet, lors d'une greffe de moelle osseuse, elles sont responsables de l'établissement d'une réaction inflammatoire au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal et du foie.

De plus, certaines cytokines, telles que le TNF- β , produit par de nombreuses cellules (NK, CTL, Th et macrophages), ont un rôle primordial dans la GVHD. Le TNF- β possède, en effet, la capacité de générer des lésions cytolytiques directes des cellules du receveur et semble être au centre de la GVHD.

Les immunosuppresseurs font donc partie de la thérapeutique de cette maladie. Ils peuvent être administrés au receveur de la greffe dans le but d'inhiber les réponses immunitaires éventuelles des cellules du donneur.

Dans le cas d'une greffe de moelle osseuse, la moelle du donneur peut également être traitée avant la greffe par des bioréactifs (sérums anti-lymphocytaires ou anticorps monoclonaux) dirigés contre les lymphocytes T diminuant ainsi les cellules susceptibles de réagir contre l'hôte.

1.2.4- Les maladies auto-immunes :

1.2.4.1- Définition : [14]

L'auto-immunité peut se définir comme une réponse inappropriée du système immunitaire contre des composants du Soi.

Cela se manifeste par une activation anormale de cellules B ou T auto-réactives, c'est à dire qui reconnaissent des éléments du Soi appelés **auto-antigènes**, entraînant des réponses à **médiation cellulaire** ou **humorale** dirigées contre ces composants du Soi.

Les maladies auto-immunes qui résultent de cet état d'auto-immunité peuvent être classées en deux grandes catégories : les maladies auto-immunes **spécifiques d'organes** et les maladies auto-immunes **systemiques**.

1.2.4.2- Les maladies auto-immunes spécifiques d'organes : [14]

Ces maladies sont générées par une réponse inappropriée du système immunitaire envers un auto-antigène cible spécifique d'un seul organe ou d'une seule glande limitant ainsi les effets délétères à ces niveaux uniquement.

Différents cas de figure sont tout de même à envisager. En effet, dans certains cas, les cellules cible de l'organe concerné peuvent être lésées par des mécanismes humoraux ou à médiation cellulaire. Dans d'autres maladies, caractérisées par la présence d'auto-anticorps dirigés contre des récepteurs spécifiques d'une hormone, une hyperstimulation ou, au contraire, un blocage de la fonction normale de l'organe cible est observé.

1.2.4.2.1- Les maladies provoquées par une lésion cellulaire directe :

Dans ces maladies, des lymphocytes ou des anticorps se lient de manière spécifique à des auto-antigènes cellulaires caractéristiques d'un organe et situés au niveau de la membrane. Consécutivement à cette reconnaissance, la cellule cible est lysée par différents mécanismes. Une réaction inflammatoire peut également être observée. Les cellules ainsi détruites sont alors progressivement remplacées par du tissu conjonctif incapable d'assurer les fonctions de l'organe concerné. Il s'ensuit donc, à terme, une diminution de la fonction de l'organe.

Cette catégorie de maladies auto-immunes renferme de très nombreux exemples qui ne seront pas détaillés dans cet exposé (cf. tableau 1 p 55). Seules quelques pathologies, parmi les plus courantes, seront décrites.

1.2.4.2.1.1- La thyroïdite d'Hashimoto :

Les individus atteints de cette pathologie produisent des auto-anticorps spécifiques d'un grand nombre de protéines thyroïdiennes comprenant la thyroglobuline et la thyroïde peroxydase qui sont impliquées dans la fixation de l'iode. L'interférence engendrée dans la fixation de l'iode est à l'origine d'une production diminuée d'hormones thyroïdiennes. Parallèlement à cet effet, les malades possèdent également des cellules T_{DTH} dirigées contre des antigènes thyroïdiens entraînant une réponse inflammatoire importante à l'origine d'un goitre ou d'un élargissement visible de la thyroïde.

1.2.4.2.1.2- Les anémies auto-immunes :

Il faut distinguer trois types d'anémies auto-immunes différentes :

- l'anémie pernicieuse : est due à la présence d'auto-anticorps dirigés contre le facteur intrinsèque, glycoprotéine sécrétée par des cellules du fundus et du corps de l'estomac qui fixe la vitamine B12 et favorise son absorption au niveau de l'intestin grêle. Les auto-anticorps vont donc bloquer l'absorption de la vitamine B12 qui est indispensable à l'hématopoïèse et donc entraîner une anémie.

- l'anémie hémolytique auto-immune : est induite par des auto-anticorps dirigés contre des antigènes de globules rouges entraînant une lyse par le complément ou une opsonisation favorisant la phagocytose des cellules rouges du sang.

- anémie auto-immune induite par les médicaments : certains médicaments tels que la pénicilline ou la méthylidopa peuvent rendre les globules rouges immunogènes.

1.2.4.2.1.3- Le diabète sucré insulino-dépendant (DID) :

L'une de ces maladies les plus fréquentes est **le diabète sucré insulino-dépendant (DID)**.

Cette pathologie est due à une attaque auto-immune des cellules spécialisées dans la production d'insuline (cellules β) situées au niveau d'amas sphériques disséminés dans tout le pancréas et nommés îlots de Langerhans. La destruction des cellules β est médiée par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques activés qui infiltrent les îlots de Langerhans. Il s'ensuit une libération de diverses cytokines entraînant l'activation des macrophages à ce niveau. Cette première infiltration est souvent appelée insulite. En réponse à cela de nombreuses cytokines sont produites et des auto-anticorps apparaissent. Les cytokines libérées ainsi que les enzymes lytiques sécrétées par les macrophages activés interviennent dans la destruction des cellules β . Les auto-anticorps peuvent également œuvrer dans ce sens par le biais d'une lyse par le complément ou par le mécanisme d'ADCC décrit plus haut.

La destruction des cellules β est à l'origine d'une diminution de la production d'insuline et donc d'une augmentation de la glycémie entraînant de graves problèmes métaboliques en l'absence de traitement adéquat c'est à dire de l'injection quotidienne d'insuline. A terme, les complications de cette maladie peuvent entraîner la mort.

Il est important de détecter cette pathologie le plus tôt possible, avant l'arrivée des premiers troubles qui apparaissent lorsque le tissu pancréatique est déjà très endommagé. Pour cela, il est important de rechercher les antécédents familiaux.

1.2.4.2.2- Les maladies provoquées par une stimulation ou un blocage d'un récepteur par un auto-anticorps :

Dans cette catégorie de maladies auto-immunes, les auto-anticorps produits agissent comme des agonistes ou des antagonistes vis à vis de certains récepteurs des hormones.

1.2.4.2.2.1- La maladie de Graves ou de Basedow :

Pour mieux comprendre le mécanisme de cette maladie qui affecte la production d'hormones thyroïdiennes, il faut rappeler que la sécrétion d'hormones par la glande thyroïde est régulée par une hormone libérée par l'hypophyse nommée Thyroïd Stimulating Hormone (TSH).

La liaison de la TSH sur son récepteur spécifique au niveau des cellules de la thyroïde conduit à une activation de l'adénylcyclase entraînant, par une cascade de réactions, la stimulation de la synthèse de deux hormones : la thyroxine et la triiodothyronine.

Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur la libération de TSH par l'hypophyse c'est à dire que, lorsqu'elles sont produites en trop grande quantité, elles agissent au niveau de l'hypophyse en diminuant la production de TSH qui favorise leur synthèse.

Dans la maladie de Basedow, l'organisme produit des anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH qui agissent comme agonistes, reproduisant donc les effets de la TSH. La thyroïde est, par conséquent, hyperstimulée ce qui entraîne une production excessive, non régulée, d'hormones thyroïdiennes. En effet, les auto-anticorps prennent la place de la TSH au niveau des récepteurs spécifiques ce qui provoque une suppression de l'effet de rétrocontrôle négatif des hormones thyroïdiennes sur leur propre production. Ces anticorps sont donc appelés auto-anticorps de stimulation de longue durée de la thyroïde (LATS : "Long-active thyroïd-stimulating")

Cette maladie est donc une cause d'**hyperthyroïdie**.

1.2.4.2.2.2- La myasthénie :

Cette maladie est due à la production d'auto-anticorps bloquants dirigés contre les récepteurs à l'acétylcholine situés au niveau de la plaque motrice. L'acétylcholine est un neuromédiateur libéré par un nerf dans la fente synaptique au niveau de la plaque motrice. Elle va alors se fixer sur les récepteurs nicotiniques N_2 situés sur le muscle au niveau post-synaptique ce qui entraîne une activation du muscle.

La fixation de ces anticorps sur ces récepteurs a un effet antagoniste en bloquant la fixation normale de l'acétylcholine et induit une dégradation des récepteurs médiée par le complément ce qui entraîne une faiblesse musculaire, dans un premier temps, suivie, à terme, d'une paralysie.

Tableau 1 : Exemples de maladies auto-immunes spécifiques d'organes chez l'homme [14]

Maladie	Auto-antigène	Réponse immunitaire
Maladie d'Addison	Cellules de la surrénale	Auto-anticorps
Anémie hémolytique auto-immune	Protéines de la membrane des cellules rouges du sang	Auto-anticorps
Syndrome de Goodpasture	Membrane basale du rein et du poumon	Auto-anticorps
Maladie de Graves (ou Basedow)	Récepteur de la TSH	Auto-anticorps (stimulant) Cellules T _{DTH} ,
Thyroïdite d'Hashimoto	Protéines et cellules de la thyroïde	Auto-anticorps
Purpura thrombocytopénique idiopathique	Protéines membranaires des plaquettes	Auto-anticorps
Diabète sucré insulino-dépendant (DID)	Cellules β des îlots de Langerhans du pancréas	Cellules T _{DTH} , Auto-anticorps
Myasthénie grave	Récepteurs de l'acétylcholine	Auto-anticorps (bloquant)
Infarctus du myocarde	Cœur	Auto-anticorps
Anémie pernicieuse	Cellules pariétales gastriques ; facteur intrinsèque	Auto-anticorps
Glomérulonéphrite post-streptococcique	Rein	Complexes antigène-anticorps
Stérilité spontanée	spermatozoïdes	Auto-anticorps

1.2.4.3- Les maladies auto-immunes systémiques : [14]

Dans cette catégorie de maladies, l'attaque auto-immune est dirigée contre une grande variété d'antigènes. Le nombre d'organes ou de tissus touchés est donc très important.

Les réponses immunitaires en cause peuvent être à médiation cellulaire ou humorale (auto-anticorps ou complexes immuns).

Quatre exemples de ce type de pathologies systémiques seront détaillés ici.

1.2.4.3.1- Le lupus érythémateux disséminé (LED) :

Le LED se caractérise par des signes divers : fièvre, faiblesse générale, pleurésie, éruptions cutanées et dysfonctionnement rénal.

La cause de cette pathologie est la production d'auto-anticorps contre un très vaste réseau d'antigènes tissulaires tels que l'ADN, les histones, les globules rouges, les plaquettes, les leucocytes et les facteurs de la coagulation. La diversité des antigènes mis en cause explique le grand nombre de symptômes différents observés au cours de cette maladie.

Par exemple, les auto-anticorps dirigés contre les globules rouges ou les plaquettes peuvent entraîner, par phénomène de lyse par le complément, respectivement, une anémie hémorragique et une thrombocytopénie.

De plus, des complexes immuns d'auto-anticorps et d'antigènes nucléaires peuvent se déposer le long des petits vaisseaux sanguins et provoquer une réaction d'**hypersensibilité de type III** en activant le complément entraînant la formation de composants (produits de clivage) ayant des activités anaphylatoxiques et chimiotactiques (C5a, C3a, C4a). Il se produit alors une augmentation de la perméabilité vasculaire et le recrutement de neutrophiles au site de dépôt des complexes. Les produits de clivage du complément présents au niveau de l'endothélium vasculaire endommagent la paroi de ces vaisseaux. Les neutrophiles, qui possèdent un récepteur pour le complément, vont se fixer à ces produits de clivage et donc à l'endothélium vasculaire. Ceci est à l'origine d'une neutropénie et de diverses occlusions des petits vaisseaux sanguins entraînant une vascularite, et, donc, des dommages tissulaires disséminés.

Selon le site, le dépôt et la libération d'enzymes lytiques par les neutrophiles, peuvent provoquer une éruption cutanée, une glomérulonéphrite ou encore une arthrite.

1.2.4.3.2- La sclérose en plaque (SEP) :

Cette maladie auto-immune qui affecte le système nerveux central est due à la production de lymphocytes T autoréactifs dirigés contre des composants de la gaine de myéline des neurones entraînant des lésions inflammatoires tout le long de la fibre nerveuse au niveau de la myéline. La myéline étant nécessaire pour une transmission rapide et efficace de l'influx nerveux ainsi que pour l'isolement de la fibre nerveuse, sa destruction entraîne des dysfonctionnements neurologiques nombreux à l'origine de troubles végétatifs et centraux.

1.2.4.3.3- La polyarthrite rhumatoïde :

Un grand nombre de personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde produisent une famille d'auto-anticorps regroupés sous l'appellation de facteurs rhumatoïdes. Ces anticorps de type IgM possèdent la particularité de réagir avec le fragment constant (Fc) des immunoglobulines de type G (IgG) pour former des complexes IgM-IgG qui vont se déposer dans les articulations et activer la cascade du complément entraînant une réaction d'hypersensibilité de type III. Il en résulte une inflammation chronique des articulations.

Tableau 2 : Exemples de maladies auto-immunes systémiques chez l'homme [14]

Maladie	Auto-antigène	Réponse immunitaire
Spondylarthrite ankylosante	Vertèbres	Complexes immuns
Sclérose en plaque	Cerveau ou matière blanche	Cellules T _{DTH} , cellules T _C , auto-anticorps
Polyarthrite rhumatoïde	Tissu conjonctif, IgG	Auto-anticorps, complexes immuns
Sclérodermie	Noyau, cœur, poumon, tractus gastro-intestinal, rein	Auto-anticorps
Syndrome de Sjörgen	Glandes salivaires, foie, rein, thyroïde	Auto-anticorps
Lupus érythémateux disséminé	ADN, protéines nucléaires, membranes des cellules rouges du sang et des plaquettes	Auto-anticorps, complexes immuns

1.3- IMMUNOSUPPRESSEURS UTILISES EN THERAPEUTIQUE

1.3.1- Généralités :

La principale difficulté rencontrée lorsque l'on désire induire une immunosuppression à l'égard d'un phénomène immunitaire exagéré ou indésirable repose sur la sélectivité d'action du traitement immunodépresseur.

L'idéal serait d'inhiber les réactions pathologiques ou indésirables de manière spécifique sans altérer les fonctions normales du système immunitaire. Cela semble néanmoins difficile à réaliser.

Une solution envisageable serait de cibler uniquement les lymphocytes activés et d'épargner les lymphocytes au repos.

A l'heure actuelle, aucun traitement immunosuppresseur utilisé en thérapeutique ne peut garantir l'absence de survenue de complications infectieuses ou néoplasiques, même si les protocoles actuels visent à limiter leur survenue en adaptant les doses, modifiant les associations de molécules et les durées d'administration de certaines, tout en mettant en place une prophylaxie adéquate.

Il est difficile d'établir une classification des immunosuppresseurs car ces molécules se caractérisent par une grande diversité structurale. De plus, ces composés ont des cibles très variées et exercent souvent leur activité par le biais de plusieurs mécanismes.

Il existe diverses classifications envisageables : suivant leur processus de fabrication (ex : fermentation microbienne, synthèse organique, hémi-synthèse à partir de produits naturels) ou suivant leur mécanisme d'action.

La classification choisie ici repose sur le type de mécanisme d'action principal et permet de définir cinq grands groupes de molécules : les régulateurs de l'expression des gènes, les alkylants, les inhibiteurs de kinases et/ou de phosphatases, les inhibiteurs de la synthèse *de novo* des purines et les inhibiteurs de la synthèse *de novo* des pyrimidines.

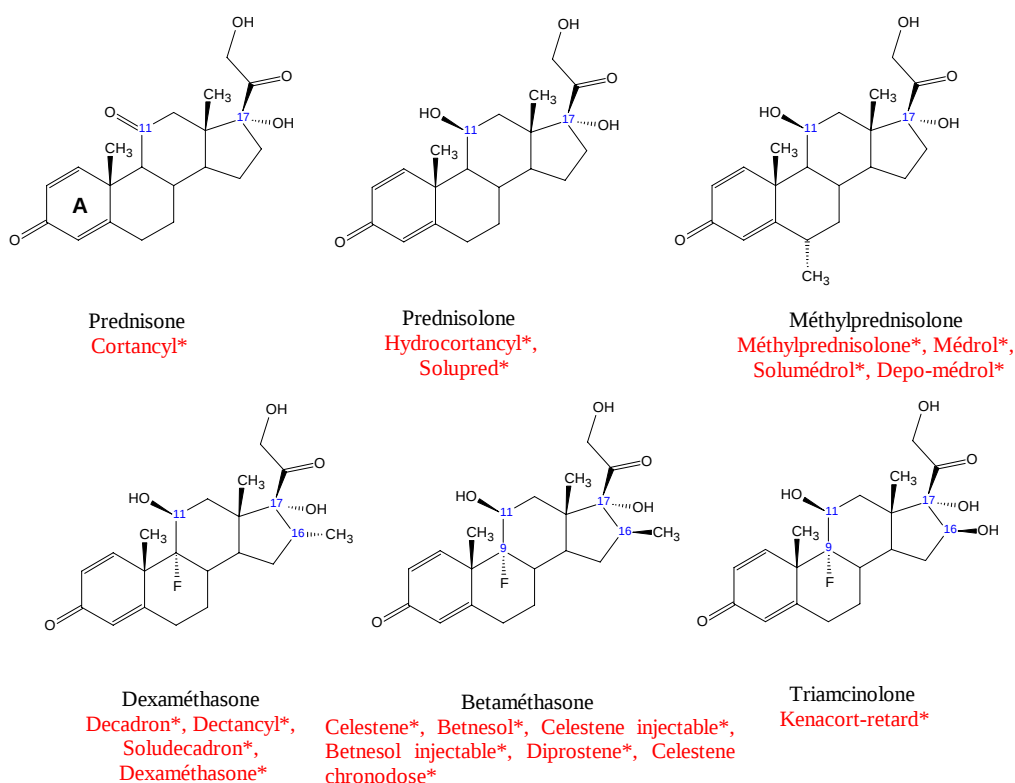
De plus, l'arsenal thérapeutique comprend, également, à côté des médicaments cités précédemment, des bioréactifs tels que les sérums anti-lymphocytaires et les anticorps monoclonaux très utilisés au moment d'une transplantation.

1.3.2- Les régulateurs de l'expression des gènes :

Cette classe regroupe principalement les **glucocorticoïdes**. Au sein de cette famille, les molécules les plus utilisées en transplantation sont la prednisone, la prednisolone et la méthyl-prednisolone. Ce sont des dérivés de synthèse possédant une double liaison en position 1-2 du cycle A (cf. structure de la prednisone) ce qui augmente leur activité anti-inflammatoire.

Le bénéfice thérapeutique qu'ils apportent n'est pas nécessairement la conséquence d'une immunosuppression et s'expliquerait, dans certains cas, uniquement par leur activité anti-inflammatoire puissante.

1.3.2.1- Structure et métabolisme des principaux corticoïdes utilisés en transplantation et dans les maladies auto-immunes : [15] et [16]

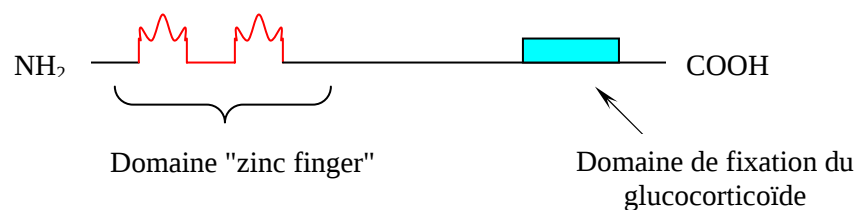


Leur métabolisme est principalement hépatique. Ils sont éliminés par voie rénale sous la forme de 17-cétostéroïdes conjugués stables.

1.3.2.2- Mécanisme d'action : [1], [9] et [11]

Ces molécules agissent en se fixant sur leur récepteur spécifique intra-cytoplasmique. Ces récepteurs existent sous deux formes : activée et non activée. La forme non activée ou de repos est un complexe moléculaire associant le récepteur des corticoïdes et des protéines intracellulaires dont la protéine hsp90 ("heat shock protein 90") et une immunophiline, situées au niveau du site de fixation des corticoïdes ce qui le bloque. Lorsque le corticoïde pénètre dans la cellule, il se fixe au récepteur sur son domaine de fixation entraînant ainsi la libération du complexe moléculaire constitué par hsp90 et l'immunophiline. Puis, le récepteur se dimérise et est phosphorylé ce qui entraîne sa translocation vers le noyau où il va exercer son action sur l'ADN. En effet, les récepteurs des corticoïdes possèdent dans leur structure un domaine "zinc finger" (cf. schéma 10) qui lui permet de reconnaître certaines séquences localisées au niveau des promoteurs de certains gènes appelées "Glucocorticoid response element" (GRE) et de s'y fixer en s'intercalant ce qui entraîne une modification de configuration de la molécule d'ADN à l'origine d'une modulation positive ou négative de la transcription de ces gènes. Ces récepteurs agissent donc comme des facteurs cytoplasmiques de régulation de la transcription.

Schéma 10 : Structure du récepteur intra-cytoplasmique des corticoïdes



Parmi les gènes dont la transcription est induite par les corticoïdes, on retrouve celui codant pour la protéine I κ -B qui fixe le facteur de transcription NF κ B et le maintient dans le cytoplasme l'empêchant ainsi d'exercer son activité au niveau du noyau. Cette inactivation du NF κ B est à l'origine de nombreux effets des corticoïdes puisqu'il favorise la transcription d'un grand nombre de molécules telles que de nombreuses cytokines, la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la Phospholipase A2 (PLA-2).

Les corticoïdes induisent également la synthèse d'une autre protéine régulatrice, la lipocortine 1, qui va bloquer l'action de la PLA-2 au niveau de la membrane plasmique en protégeant les phospholipides membranaires de son action. Ce dernier effet est à l'origine du blocage de la production de médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, les leucotriènes et le PAF-acether ("Platelet Aggregating Factor") à partir de l'acide arachidonique provoquant un effet anti-inflammatoire marqué.

Les mécanismes par lesquels les corticoïdes exercent un effet immunodépresseur restent encore incertains. Mais certaines de leurs actions peuvent apporter des éléments de réponse.

Par exemple, ils inhibent la production de nombreuses cytokines et notamment des interleukines qui participent directement à la réaction inflammatoire (IL-1, IL-6, IL-8 et TNF α) et de l'IL-2 nécessaire à la prolifération lymphocytaire qui intervient lors du rejet de greffe. Ils diminuent également la production d'interféron γ (IFN γ).

Les cellules immunitaires cibles des corticoïdes ne sont pas encore bien définies mais l'on sait avec certitude qu'ils agissent sur les macrophages et les monocytes. En effet, ils entraînent une monocytopenie très importante et inhibent de nombreuses fonctions des macrophages (notamment la production de cytokines telles que IL-1, IL-6 et le TNF), des monocytes et des neutrophiles (diminution de leur réponse chimiotactique et de leurs activités bactéricide et fongicide sans altérer leur activité phagocytaire). Mais, le lien entre ces actions et l'effet immunosuppresseur reste difficile à établir. Quoiqu'il en soit ces actions sont mises à profit dans le traitement du rejet de greffe et de celui des maladies auto-immunes.

Les corticoïdes agissent également sur les lymphocytes. Ils interfèrent avec le cycle cellulaire des cellules lymphoïdes activées et sont cytotoxiques pour certaines sous-populations de cellules T mais leurs effets immunologiques sont probablement dus à leur capacité de modifier les fonctions immunitaires plutôt qu'à une cytotoxicité directe. Parmi les lymphocytes activés engagés dans la réponse immunitaire, les lymphocytes cytotoxiques et les lymphocytes producteurs d'IL-2 sont particulièrement sensibles aux corticoïdes expliquant en partie l'efficacité importante de ces molécules dans le rejet de greffe. Les lymphocytes T quiescents ou non activés, à l'exception de ceux du cortex thymique, ne sont pas sensibles aux corticoïdes.

Les stéroïdes entraînent de plus une lymphocytopénie portant surtout sur les cellules T et qui résulte de deux mécanismes. D'une part ils génèrent l'apoptose de ces cellules et de l'autre, ils entraînent une redistribution des lymphocytes circulants vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette diminution des lymphocytes circulants, important dans l'initiation de la réaction immunitaire, explique également l'effet immunosuppresseur de ces molécules.

Même si les stéroïdes agissent de manière plus importante sur la réponse à médiation cellulaire, ils ont également une action sur la réponse à médiation humorale. En effet, la réponse anticorps primaire est diminuée et lors d'une utilisation prolongée, les réponses anticorps déjà existantes diminuent et le catabolisme des IgG (Immunoglobulines anticorps) est augmenté (avec la prednisone).

De plus, l'hypersensibilité retardée de type IV cutanée est normalement abolie avec l'utilisation de corticoïdes.

1.3.2.3- Indications en transplantation : [4], [15] et [17]

Les corticoïdes ont l'avantage de posséder de nombreux sites d'action.

Ils sont utilisés dans le traitement d'entretien post-greffe, à faible dose, pour éviter la survenue de rejet.

Ils sont également indiqués dans le traitement du rejet aigu, en première intention, en perfusion, à forte dose, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires qui se surajoutent à leur action immunosuppressive.

Leur efficacité est néanmoins relative et leur tolérance, à court et long terme, moyenne.

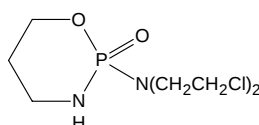
La tendance actuelle est donc de diminuer les doses cumulatives de corticoïdes.

De plus, des protocoles sans corticoïdes sont en cours d'évaluation.

1.3.3- Les alkylants :

Dans cette catégorie, une seule molécule est encore utilisée en tant qu'immunodépresseur : **le cyclophosphamide**. C'est un des immunodépresseurs les plus puissants qui ait été synthétisé.

1.3.3.1- Structure : [16]



Cyclophosphamide
Endoxan*

1.3.3.2- Mécanisme d'action : [1], [11], [18a] et [18b]

Le cyclophosphamide est inactif sous la forme sous laquelle il est administré. Il exerce son action après avoir subi une **métabolisation activatrice** au niveau hépatique (cf. schéma 11 p 66). Le métabolite responsable de l'activité est une moutarde phosphoramidée. Son mécanisme d'action est celui d'un alkylant bifonctionnel (cf. schéma 12 p 67). En effet, ses deux chaînes chloroéthylamines forment *in vivo*, par cyclisation, des ions éthylène ammonium qui se transforment spontanément en ions carbonium très électrophiles qui vont se fixer de manière covalente à des sites nucléophiles au niveau de l'ADN et plus particulièrement sur l'azote en 7 de la guanine entraînant ainsi l'alkylation de l'ADN. La molécule possédant deux chaînes capables de se cycliser, elle peut alkyler deux guanines situées chacune sur un des deux brins de l'hélice d'ADN (d'où le terme d'alkylant bifonctionnel) permettant ainsi la formation de ponts inter-brins très stables à l'origine de l'effet cytotoxique de ces molécules par suppression de la division cellulaire. Elle peut également alkyler deux guanines situées sur le même brin réalisant ainsi un pont intra-brin.

Le cyclophosphamide semble donc exercer son action immunosuppressive par la destruction des cellules en prolifération.

Il est plus actif sur les lymphocytes B que sur les cellules T. Ainsi, sous traitement par le cyclophosphamide, on observe une suppression de la formation d'anticorps.

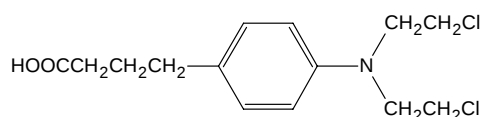
L'action sur l'immunité à médiation cellulaire est moins spectaculaire et dépend de la dose ainsi que de la fréquence d'administration. En effet, à forte dose, le cyclophosphamide augmente les réponses cellulaires cytotoxiques ce qui permet d'expliquer son utilisation pour prolonger la survie des greffes. Un effet sur les cellules T régulatrices est également observé à des doses inférieures à celles induisant la suppression de la production d'anticorps.

Certaines populations lymphocytaires sont donc plus sensibles à l'action lytique du produit que d'autres.

Même si le cyclophosphamide agit de manière préférentielle sur les cellules lymphoïdes en cours de prolifération, il semble qu'il alkyle également certaines cellules saines au repos. Ce produit est donc potentiellement mutagène et accroît le risque de développer un cancer.

Un de ses effets particuliers est sa capacité à induire une tolérance spécifique à l'égard de nombreux antigènes s'il est administré simultanément ou peu de temps après l'antigène.

Le cyclophosphamide est parfois remplacé par le **chlorambucil** par les cliniciens du fait de sa moins grande toxicité. Cette molécule est un alkylant bifonctionnel appartenant à la famille des moutardes azotées. Cependant, il semble que sa faible toxicité soit corrélée à une plus faible activité.



Chlorambucil
Chloraminophene*

Schéma 11: Métabolisme du cyclophosphamide [18a]

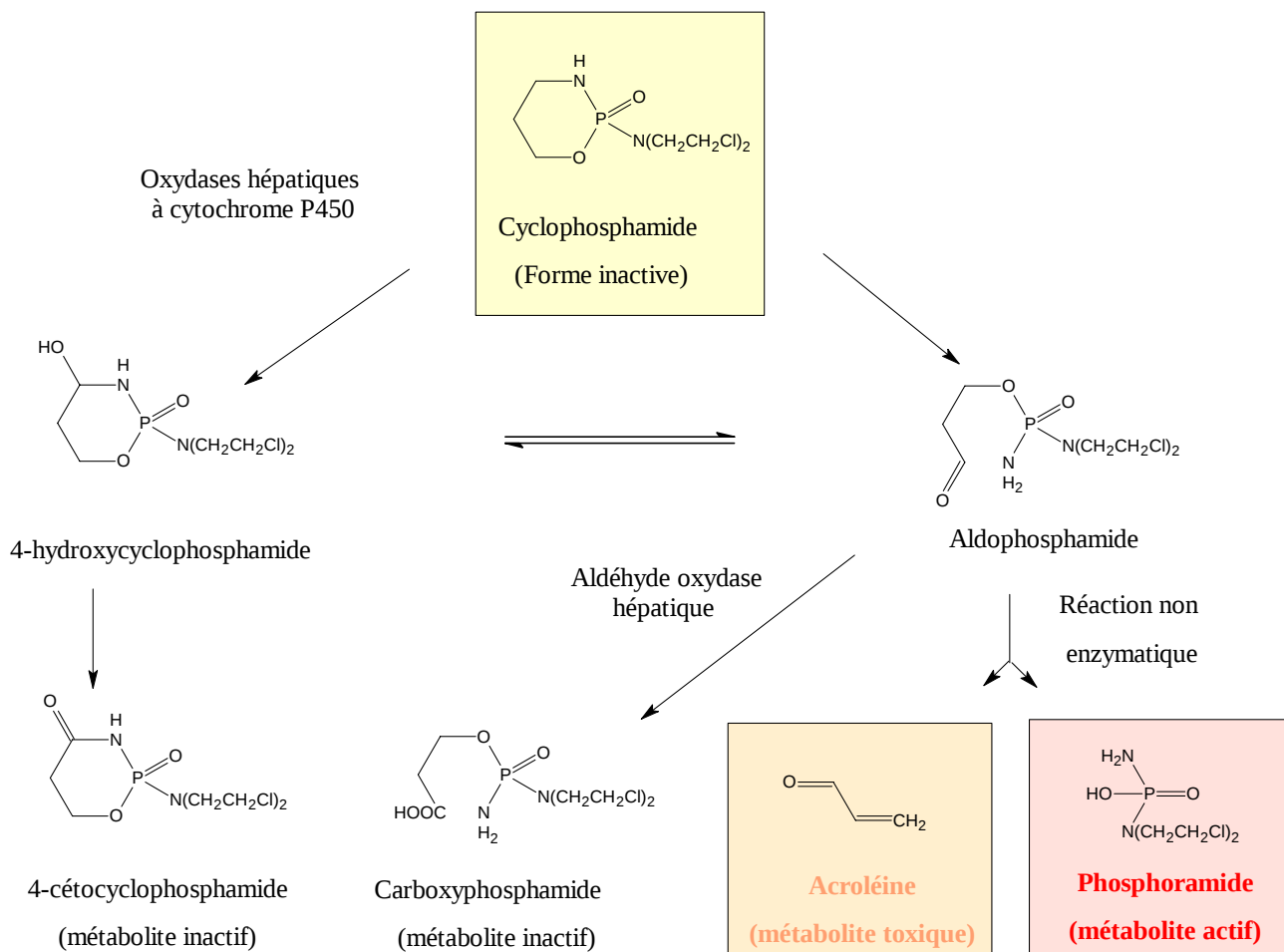
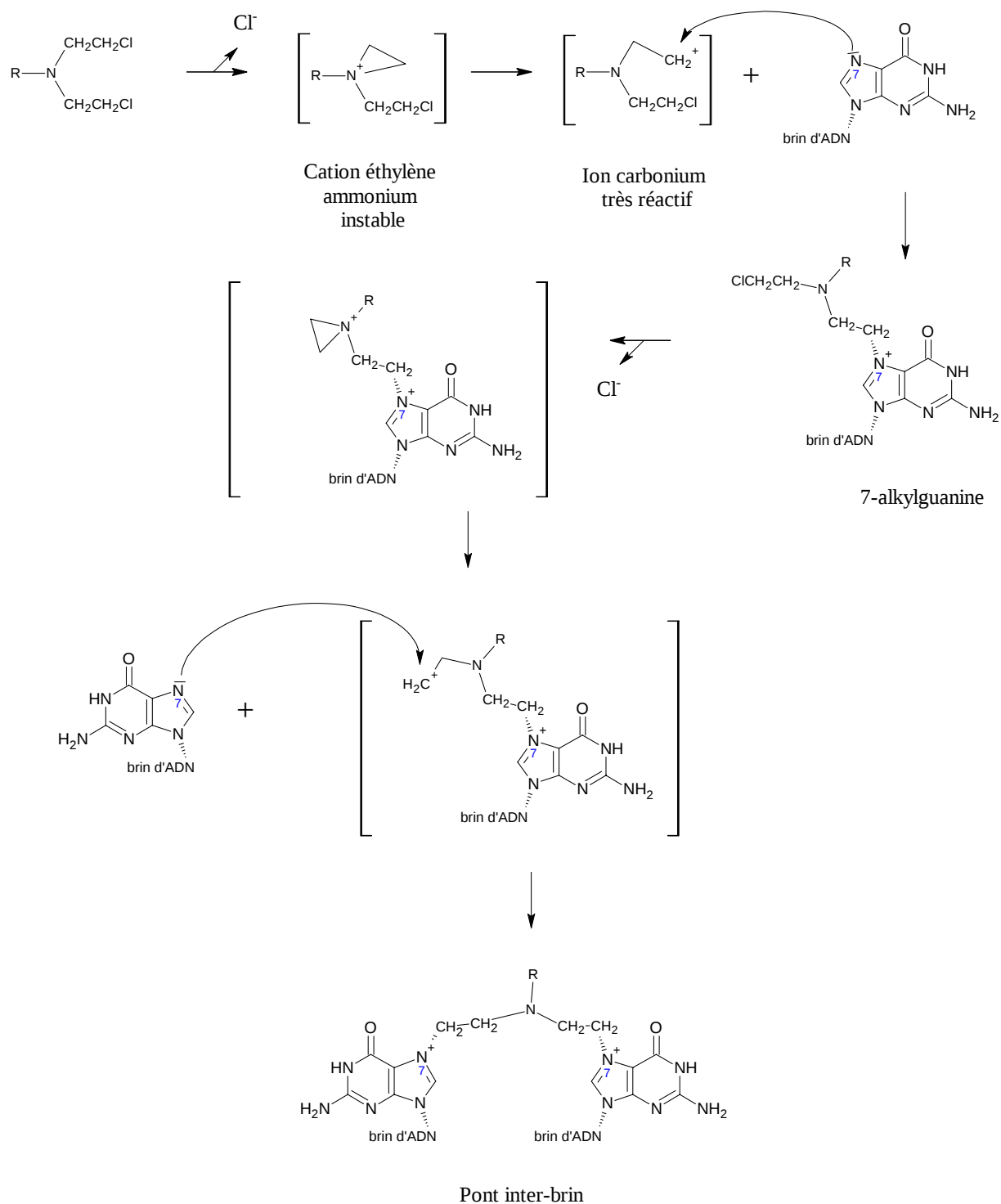


Schéma 12 : Mécanisme d'action d'un agent alkylant bifonctionnel [18b]



1.3.3.3- Indications : [17]

Le cyclophosphamide est principalement utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse pour ses propriétés antiprolifératives.

Il possède néanmoins quelques applications dans le domaine de l'immunosuppression.

En effet, il est indiqué, **à forte dose**, pour le conditionnement des allo- et autogreffes médullaires.

A plus faible dose, il peut intervenir dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de certaines formes sévères de lupus érythémateux aigus disséminés.

Il est également indiqué en cas de néphropathies auto-immunes corticorésistantes.

1.3.4- Les inhibiteurs de kinases et/ou de phosphatases :

Cette famille de composés comporte trois molécules actuellement utilisées en clinique pour leurs propriétés immunodépressives : la ciclosporine A, le tacrolimus ou FK506 et la rapamycine. Ces molécules sont toutes des ligands des immunophilines.

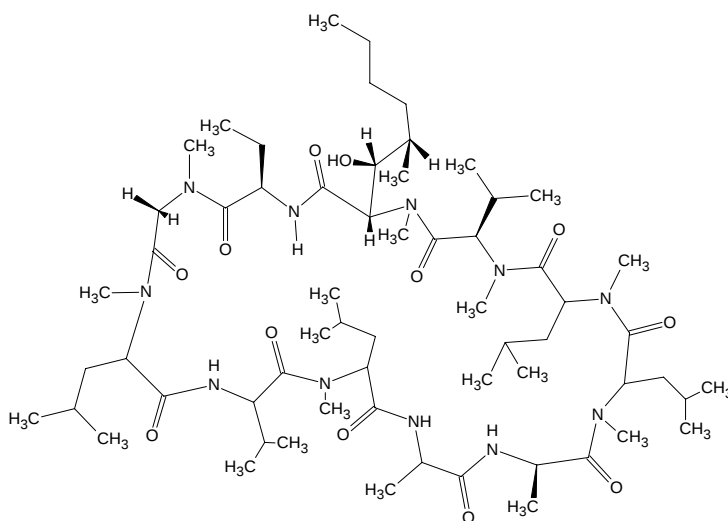
La ciclosporine et le tacrolimus, bien que chimiquement non apparentés, ont des mécanismes d'action très proches et sont souvent regroupés sous le terme d'**anti-calcineurine**. La rapamycine, quant à elle, malgré son analogie structurale avec le tacrolimus, exerce son activité par un mécanisme différent.

1.3.4.1- La ciclosporine A (CsA) et le tacrolimus (FK506) : "les anti-calcineurine" :

1.3.4.1.1- Structure et métabolisme : [1], [11] et [19]

La ciclosporine A est un polypeptide antibiotique de 11 acides aminés, liposoluble et extrait du champignon *Tolypocladium inflatum*.

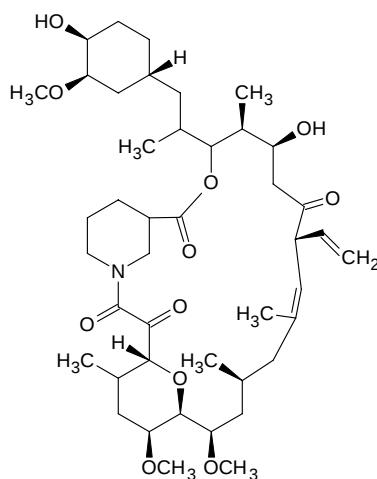
La CsA est fortement métabolisée par le foie donnant naissance à plus de 30 métabolites essentiellement par la voie du CYP3A. Il existe d'importantes variabilités interindividuelles.



Cyclosporine A
Sandimmun*
Néoral*

Le FK506 ou tacrolimus est également un métabolite d'origine fongique, de structure macrolide, isolé à partir de *Streptomyces tsukubaensis*.

Le tacrolimus subit un métabolisme hépatique important (moins de 1 % est retrouvé inchangé dans les urines).



Tacrolimus (FK506)
Prograf*, Protopic*

1.3.4.1.2- Mécanisme d'action : [1], [7], [11], [19], [20] et [21]

Les deux molécules exercent leur activité immunosuppressive par des mécanismes d'action similaires. Elles agissent au niveau des lymphocytes Th. Elles sont lipophiles et se lient donc à la membrane des cellules Th par des liaisons hydrophobes non spécifiques.

Elles se fixent ensuite toutes les deux à des immunophilines cytoplasmiques qui sont des peptidyl-prolyl-cis-transisomérases (ou rotamase) ubiquitaires et abondantes impliquées dans la stabilisation de la configuration tertiaire des protéines. La ciclosporine se lie de manière spécifique à la cyclophiline et le tacrolimus à une protéine nommée "FK-Binding Protein" (FKBP).

Par leur fixation à ces immunophilines, la ciclosporine et le tacrolimus inhibent leur activité rotamase.

L'inhibition de l'activité rotamase n'explique pas à elle seule l'activité immunodépressive de ces molécules. En effet, les complexes ciclosporine/cyclophiline et FK506/FKBP formés vont se fixer de manière spécifique à trois polypeptides intracellulaires : la calmoduline et les deux sous-unités d'une sérine-thréonine phosphatase calcium-dépendante cytoplasmique nommée **calcineurine**. An sein de ces complexes, la cyclophiline va agir en bloquant l'activité phosphatase de la calcineurine.

La calcineurine est nécessaire à l'activation d'un facteur de transcription nommé NF-AT. En effet, suite à l'activation d'une cellule T, l'augmentation du calcium cytosolique observée va activer la calcineurine qui se fixe alors à une protéine cytoplasmique appelée calmoduline. Le complexe ainsi formé va déphosphoryler le NF-AT phosphorylé (NF-AT-P) ce qui est à l'origine de la translocation de celui-ci vers le noyau où il se fixe sur certaines régions des gènes entraînant ainsi la transcription de nombreux gènes codant pour de nombreuses molécules importantes pour l'activation du lymphocyte.

En bloquant l'activité phosphatasique de la calcineurine, la ciclosporine et le FK506 inhibent donc la transcription de nombreuses cytokines intervenant dans l'activation lymphocytaire, notamment l'IL-2, qui est nécessaire à la prolifération et à la différenciation des cellules T, mais également l'IL-4 et le CD40L.

Récemment, des recherches ont montré que la ciclosporine et le FK506 exerçaient également leur action en inhibant les voies de signalisation des Jun kinase (**JNK**) et de la **p38 kinase**. Ces deux enzymes sont impliquées dans les voies de transduction du signal déclenché par la reconnaissance d'un antigène par le lymphocyte T.

L'existence de ces différentes cibles au niveau des voies de transduction du signal médiées par le TCR du lymphocyte T explique la grande spécificité de ces molécules pour les cellules T même si des effets sur d'autres types cellulaires sont également observés.

Ces produits agissent donc en interférant avec l'étape précoce d'activation du lymphocyte T en inhibant la transcription de gènes codant pour de nombreuses cytokines qui jouent un rôle dans l'activation précoce du lymphocyte T (IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ).

La conséquence de leur action est l'inhibition de la prolifération des cellules Th CD4⁺ et donc de la sécrétion de cytokines activatrices par ces cellules. Il s'ensuit la diminution de l'activation des cellules effectrices impliquées dans le rejet aigu de greffe incluant les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules T_{DTH}, les cellules NK, les macrophages et les lymphocytes B. De plus, une diminution de la production d'IFN- γ est observée.

Enfin, l'action moléculaire de ces produits est spécifique et réversible.

Il est à noter, pour finir, que ces molécules ont peu d'effet une fois la production d'IL-2 commencée et donc, lorsque la réaction immunitaire est en cours.

1.3.4.1.3- Indications : [17]

1.3.4.1.3.1- La ciclosporine A :

La CsA est la molécule la plus ancienne de sa catégorie et présente donc de ce fait de plus nombreuses indications par rapport au tacrolimus qui est toujours l'objet d'études variées et d'essais cliniques.

La ciclosporine est tout d'abord la molécule de choix pour la prévention et le traitement du rejet de greffon dans les greffes d'organes et de tissus.

Elle est utilisée pour traiter un rejet chez les patients dont le protocole immunosuppresseur initial ne comportait pas de CsA pour éviter d'entraîner une trop forte immunosuppression.

Elle est également indiquée dans la prévention du rejet après une greffe de moelle osseuse ainsi que pour le traitement préventif ou curatif de la GVHD.

Elle est, de plus, utilisée en seconde intention dans le traitement des syndromes néphrotiques corticodépendants ou corticorésistants.

La ciclosporine est également indiquée en seconde intention dans les formes sévères de psoriasis, de dermatite atopique et de polyarthrite rhumatoïde en cas d'inefficacité, d'intolérance ou de contre-indications des traitements classiques.

Sa prescription en seconde intention est aussi réalisée dans les uvéites intermédiaires ou postérieures non infectieuses sévères menaçant la vision en cas d'échec de la corticothérapie.

Enfin, la CsA est recommandée pour le traitement des aplasies médullaires acquises sévères ne pouvant bénéficier d'une greffe de moelle osseuse allogénique.

1.3.4.1.3.2- Le tacrolimus :

Le tacrolimus a donné naissance à deux spécialités : le Prograf[®] et le Protopic[®].

Le Prograf[®] est indiqué uniquement dans la prévention du rejet de greffe lors de transplantations rénales ou hépatiques et le traitement du rejet rebelle cortico-résistant après une transplantation d'organe.

La voie intraveineuse n'est utilisée qu'en dernier lieu.

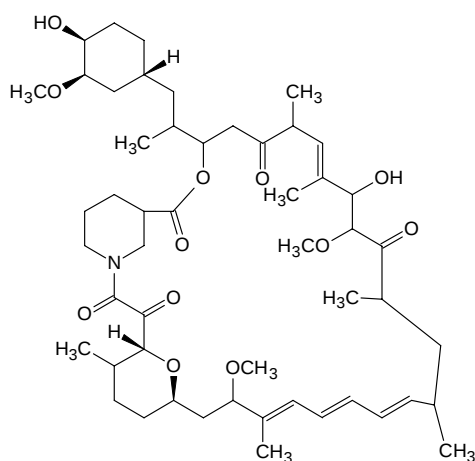
Le Protopic[®] est une forme pommade préconisée dans le traitement de la dermatite atopique modérée à sévère de l'adulte et de l'enfant en cas de réponse inadéquate ou d'intolérance aux traitements conventionnels.

1.3.4.2- La rapamycine (RAPA) ou sirolimus :

1.3.4.2.1- Structure et métabolisme: [1], [11], [19] et [21]

La rapamycine ou sirolimus est un macrolide antibiotique d'origine fongique de structure très proche de celle du FK506. Elle a été isolée en 1975 dans les bouillons de culture de *Streptomyces hygroscopicus* lors d'un screening visant à découvrir une activité antifongique et reconnue pour ses propriétés immunosuppressives en 1977. L'intérêt de son utilisation pour prévenir le rejet de greffe ou dans le traitement du diabète chez la souris s'est manifesté dans le début des années 90.

La RAPA est fortement métabolisée principalement par le CYP3A4. L'activité immunosuppressive des métabolites représente moins de 30% de l'activité du sirolimus.



Rapamycine ou sirolimus

Rapamune*

1.3.4.2.2- Mécanisme d'action : [1], [9], [11], [19] et [20]

La rapamycine ayant une très grande analogie structurale avec le FK506, elle se fixe sur la même immunophiline (le FKBP) au niveau du cytoplasme du lymphocyte T. Mais le complexe formé (RAPA/FKBP) n'interagit pas avec la calmoduline et la calcineurine expliquant la différence de mode d'action et d'activité immunosuppressive entre les deux molécules.

Le complexe RAPA/FKBP va interagir avec des kinases intracellulaires nommées "Target of Rapamycin" (TOR) et notamment la mTOR impliquée dans la progression des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.

La mTOR est une enzyme qui intervient dans les voies de transduction découlant des récepteurs aux cytokines et notamment du récepteur à l'IL-2 (cf. schéma 13 et 1.2.2.2.1.2). Cette enzyme contrôle le cycle cellulaire en activant les CDK qui contrôlent le passage des cellules d'une phase à une autre du cycle cellulaire. Elle contrôle également le déclenchement de la traduction des ARNm en protéine.

La fixation, au niveau du cytoplasme des lymphocytes Th, du complexe RAPA/FKBP à la mTOR entraîne son inhibition et donc le blocage de la prolifération et de la différenciation des cellules Th activées dans la phase G1 du cycle cellulaire en empêchant l'entrée de ces cellules en phase S.

La rapamycine agit donc sur les lymphocytes Th activés à une étape plus tardive que les molécules précédentes. En effet, elle est active lorsque l'IL-2 est sécrétée puisqu'elle inhibe la transduction du signal résultant de la fixation de l'IL-2 sur son récepteur membranaire spécifique. Contrairement aux molécules précédentes, elle n'empêche pas la synthèse de l'IL-2 mais bloque ses effets.

Elle inhibe donc la réponse proliférative à l'IL-2 des lymphocytes Th activés et, par conséquent, entraîne une diminution de l'activation des cellules effectrices impliquées dans le rejet de greffe.

De plus, c'est un puissant inhibiteur de la prolifération des lymphocytes B et de la production d'immunoglobulines.

Enfin, elle empêche également la réponse proliférative des cellules mononucléées au facteur stimulant la formation des colonies (CSFs).

Un nouveau dérivé de la rapamycine, le **SDZ-RAD**, est actuellement en cours d'étude. Ses propriétés immunosuppressives seraient superposables à celles du sirolimus.

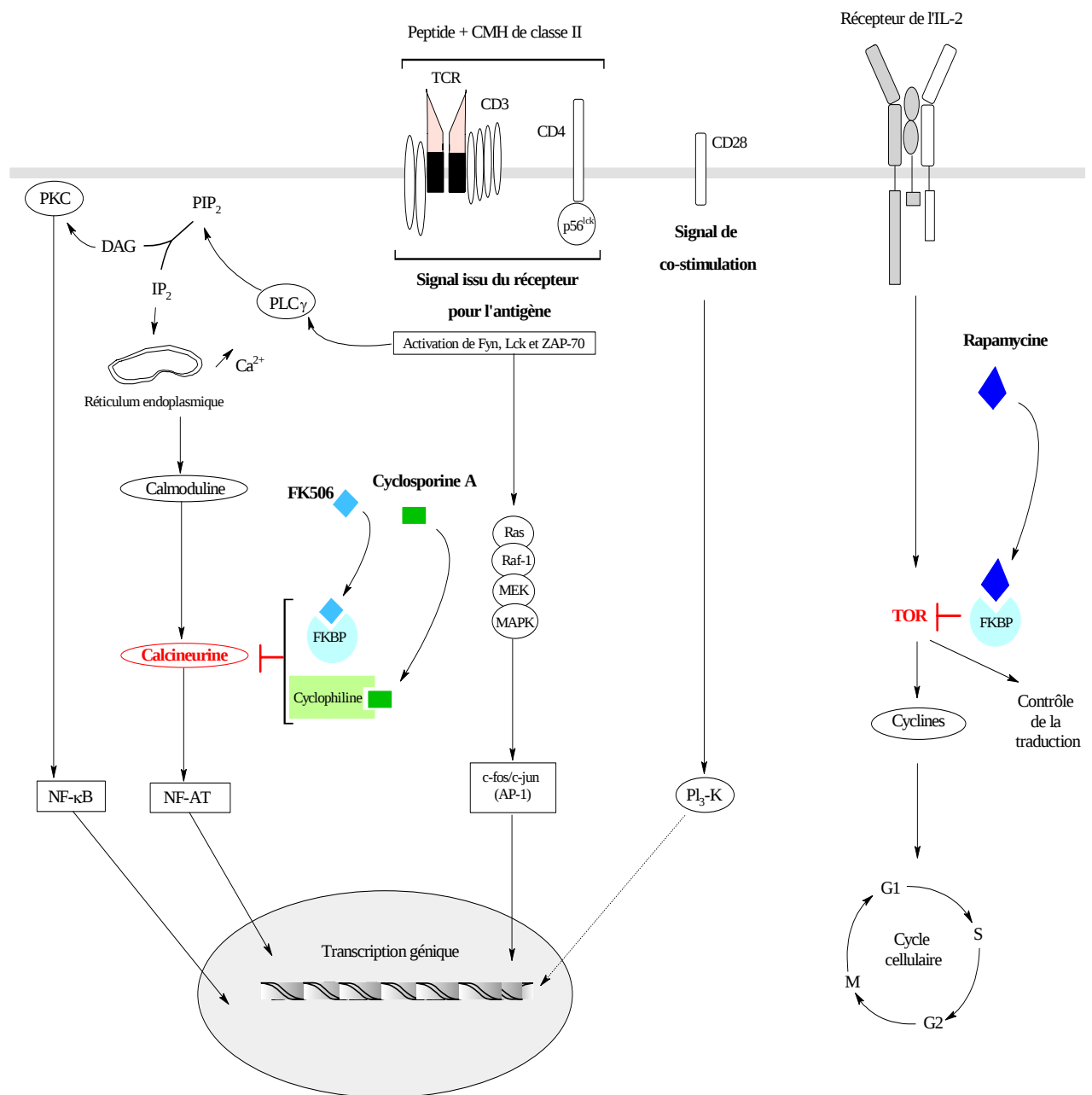
1.3.4.2.3- Indications : [17]

A l'heure actuelle, la rapamycine ne possède qu'une seule indication. Elle est indiquée dans la prévention du rejet de greffe d'organe chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré et recevant une **transplantation rénale**.

Son utilisation est recommandée en association avec la ciclosporine A et les corticoïdes pendant 2 à 3 mois.

Elle peut ensuite être utilisée en traitement d'entretien avec des corticoïdes seulement si l'on a la possibilité d'arrêter progressivement la CsA.

Schéma 13 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de kinases et/ou de phosphatases [10] et [11]



1.3.5- Les inhibiteurs de la synthèse *de novo* des purines :

1.3.5.1- Généralités : [22] et [23]

Lorsqu'une cellule est activée, elle prolifère. Pour cela, elle doit se diviser et entre donc dans la phase S du cycle cellulaire qui correspond à la phase de synthèse de l'ADN. Pour synthétiser de l'ADN, la cellule a besoin de bases puriques et pyrimidiques.

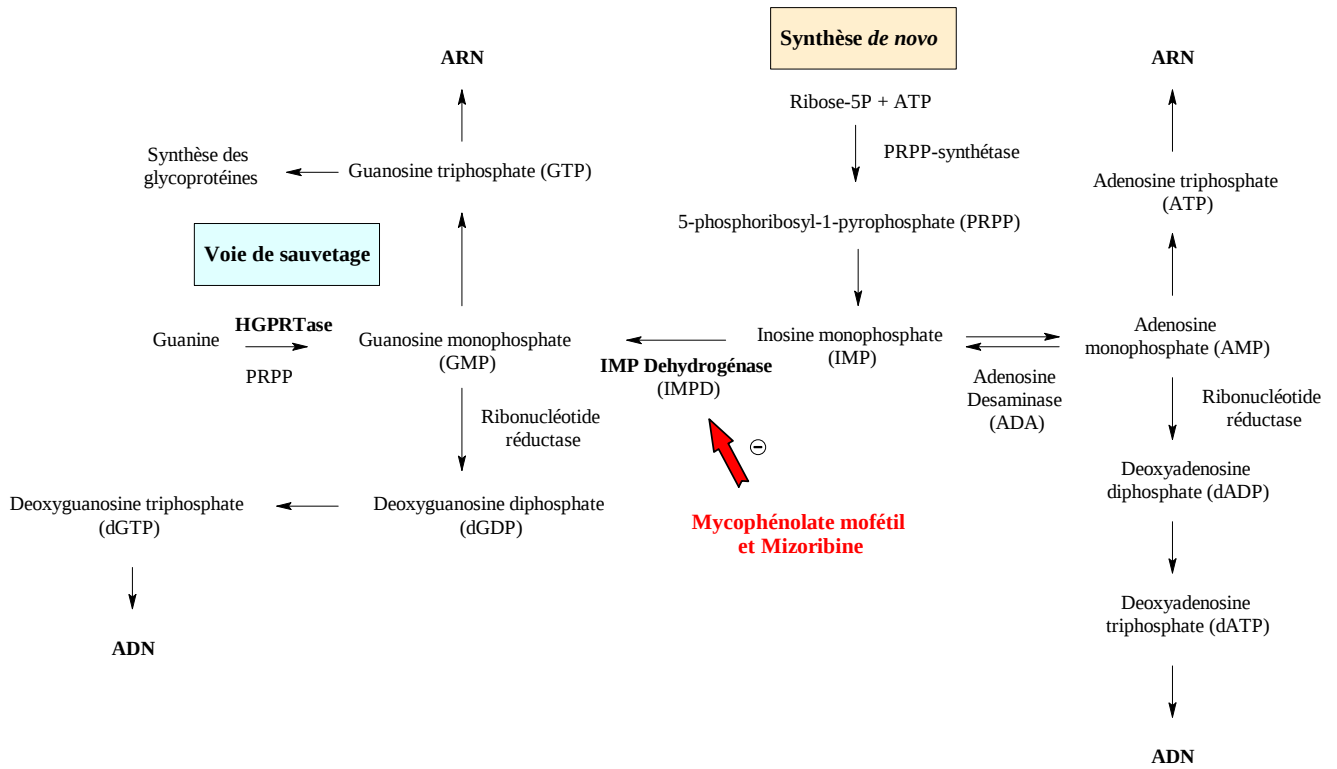
Il y a deux voies majeures de synthèse des bases puriques (cf. schéma 14) : la voie dite "de sauvetage" (voie de récupération) et la synthèse *de novo* (voie de synthèse totale).

Les lymphocytes T et B utilisent principalement la synthèse *de novo* et sont donc très sensibles à l'inhibition de cette voie contrairement aux autres types cellulaires.

Les molécules capables d'inhiber cette voie présentent donc un intérêt certain dans le domaine de l'immunosuppression étant donné qu'elles ciblent les lymphocytes de manière plus spécifique, et, plus particulièrement, les lymphocytes activés, les autres cellules étant beaucoup moins sensibles à l'inhibition de la synthèse *de novo*.

Dans cette catégorie de produits, il faut distinguer les molécules de première et de seconde génération.

Schéma 14 : Les différentes voies biosynthétiques des bases puriques [22]



HGPRTase : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

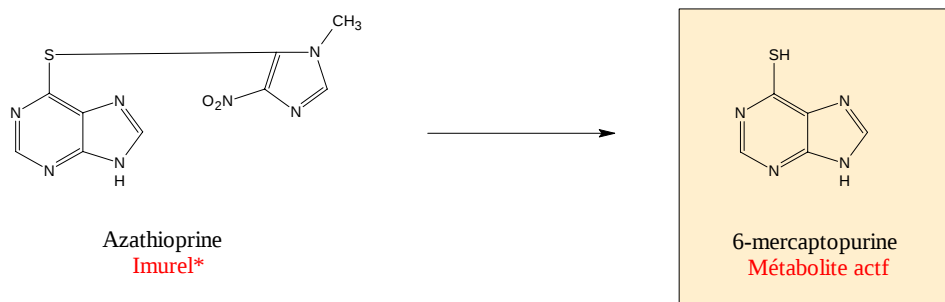
1.3.5.2- Les molécules de première génération : la 6-mercaptopurine et l'azathioprine :

1.3.5.2.1- Structure et métabolisme : [1], [9], [11], et [19]

Ces molécules sont des analogues structuraux des bases puriques (adénine, guanine et hypoxanthine). L'**azathioprine** est un dérivé nitroimidazolé de la **6-mercaptopurine**, qui se comporte comme une **prodrogue** de la 6-mercaptopurine. L'adjonction de ce radical nitroimidazole protège la molécule d'une métabolisation trop rapide par méthylation ou oxydation.

Après administration, l'azathioprine est rapidement transformée en 6-mercaptopurine. Cette dernière subit alors un très important métabolisme intracellulaire conduisant à des métabolites thiopuriques nucléotidiques actifs.

Le principal métabolite retrouvé au niveau urinaire est l'acide 6-thiourique qui est inactif et produit par une réaction d'oxydation catalysée par la xanthine oxydase. Les patients recevant, pour le traitement de la goutte, de l'allopurinol (Zyloric[®]), inhibiteur de la xanthine oxydase, doivent donc avoir une posologie d'azathioprine diminuée pour prévenir une toxicité excessive.



1.3.5.2.2- Mécanisme d'action : [1], [9], [19] et [21]

La molécule utilisée pour ses propriétés immunosuppressives en clinique est l'azathioprine.

Son activité est due à ses métabolites thiopuriques nucléotidiques dont la 6-thioinosine monophosphate.

Ces métabolites sont des analogues structuraux des nucléotides puriques endogènes qui peuvent être incorporés dans les acides nucléiques et produire des cassures chromosomiques.

Les cellules qui prolifèrent et qui ont donc besoin de dupliquer leur ADN et de produire des protéines, sont particulièrement sensibles à leur action.

Ainsi, l'azathioprine inhibe la prolifération des cellules lymphoïdes activées suite à une stimulation antigénique.

L'immunité cellulaire et les réponses humorales à anticorps primaires et secondaires sont inhibées. Néanmoins, la prolifération des lymphocytes T activés est plus diminuée que celle des lymphocytes B activés.

Enfin, l'azathioprine aurait un effet inhibiteur de la voie *de novo* et de la voie de sauvetage de la synthèse des purines en interférant avec l'action d'enzymes de ces deux voies telles que, par exemple, la phosphoribosyl phosphatase, l'inosine monophosphate deshydrogénase ou l'adénosyl succinate synthase. Cet effet complémentaire renforcerait donc son activité.

1.3.5.2.3- Indications : [17]

L'azathioprine est encore utilisée dans la prévention du rejet de certains organes transplantés en association avec les corticoïdes et d'autres agents immunosuppresseurs.

Ce médicament est également utilisé en seconde intention dans certaines formes sévères de maladies dysimmunitaires à la place des corticoïdes chez des patients intolérants aux corticoïdes, corticodépendants ou présentant une réponse insuffisante en dépit de fortes doses de corticoïdes. Parmi ces pathologies se trouvent des maladies auto-immunes et/ou inflammatoires telles que le LED, la polyarthrite rhumatoïde, l'anémie hémolytique auto-immune, la maladie de Crohn, le purpura thrombopénique idiopathique, la périartérite noueuse, le pemphigus vulgaire, la dermatomyosite, la polymyosite et la rectocolite hémorragique.

L'azathioprine est aussi parfois utilisée dans le traitement des hépatites chroniques actives.

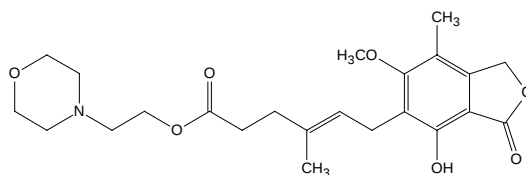
1.3.5.3- Les molécules de seconde génération : le mycophénolate mofétil et la mizoribine :

1.3.5.3.1- Le mycophénolate mofétil :

1.3.5.3.1.1- Structure et métabolisme : [22]

Le mycophénolate mofétil (MMF) est un dérivé semi-synthétique de l'acide mycophénolique (MPA) qui est un produit de fermentation de différentes espèces de *Penicillium*.

Le mycophénolate mofétil est le dérivé morpholinylester de l'acide mycophénolique. L'introduction du groupement morpholinoéthyl lui confère une meilleure biodisponibilité par voie orale.

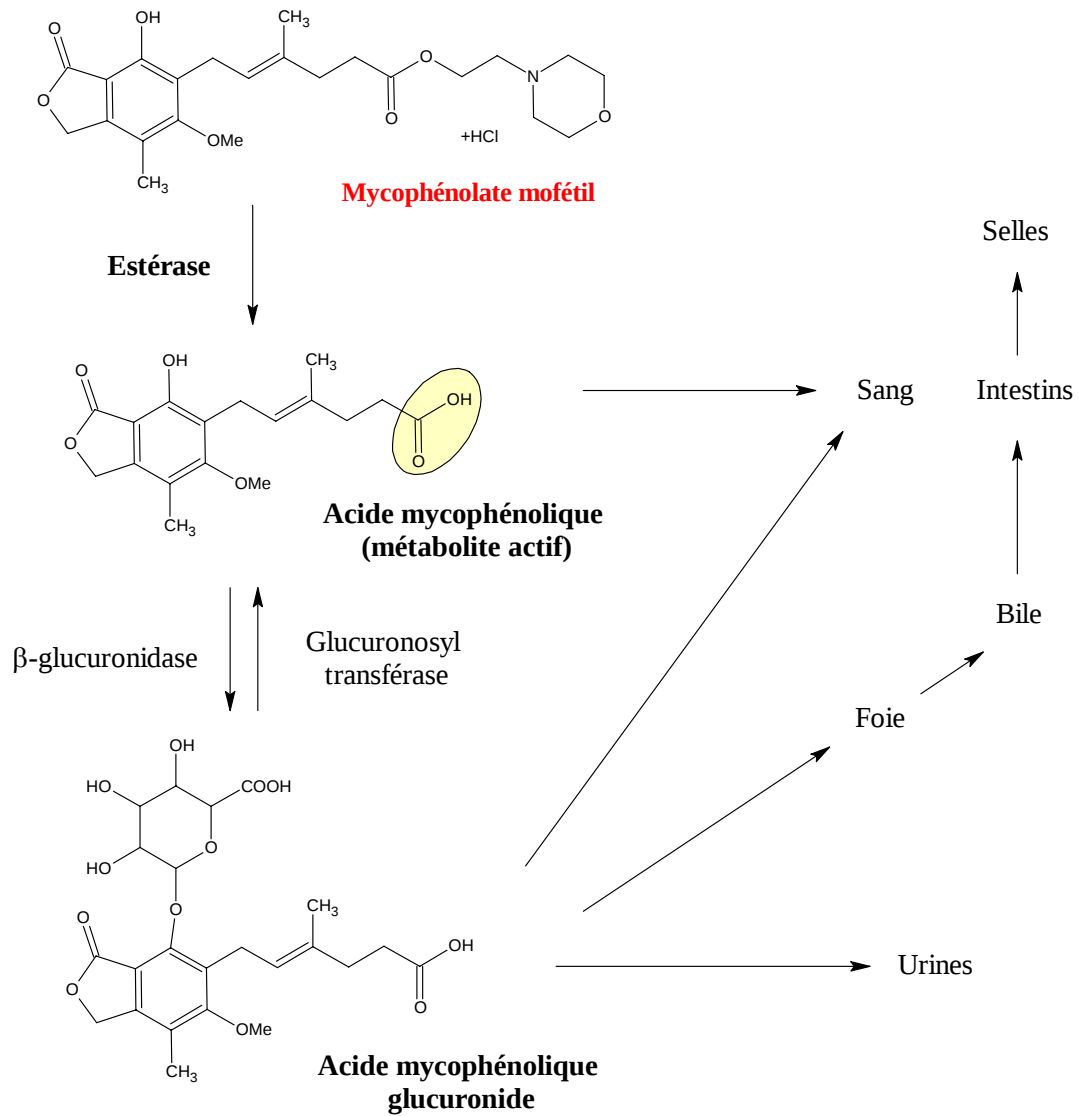


Mycophénolate mofétil
Cellcept*

Après introduction dans l'organisme, le MMF est rapidement hydrolysé par les estérases pour donner le MPA. Les activités du MMF et du MPA sont identiques. Le MMF se comporte donc comme une prodrogue.

Le MPA peut ensuite être glucuronoconjugué. C'est notamment sous cette forme qu'il est excrété dans la bile où il subit un fort recyclage entérohépatique (cf. schéma 15).

Schéma 15 : Métabolisme du mycophénolate mofétil [22]



1.3.5.3.1.2- Mécanisme d'action : [22], [24], [25] et [26]

Le MMF inhibe de manière puissante, non-compétitive et réversible l'inosine monophosphate dehydrogénase (IMPD). Cette enzyme est une enzyme clé de la synthèse *de novo* des purines qui permet la formation de guanosine monophosphate (GMP) à partir d'inosine monophosphate (IMP).

Le GMP est le précurseur de la guanosine triphosphate (GTP) qui intervient dans la composition de l'ARN et de la deoxyguanosine triphosphate (dGTP) qui est une des bases puriques de l'ADN.

L'inhibition de l'IMPD entraîne donc une déplétion en GTP et dGTP au niveau des lymphocytes bloquant ainsi la synthèse d'ARN et d'ADN. Ceci pouvant expliquer les propriétés anti-prolifératives du MMF.

De plus, le GTP et le dGTP ont une action régulatrice importante sur la 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthase (PRPP synthase) en la stimulant. Cette enzyme intervient dans la synthèse *de novo* et est nécessaire à la production d'IMP.

Ils stimulent également la ribonucléotide réductase qui intervient dans les deux voies de synthèse des purines (cf. schéma 14).

La déplétion en GTP et en dGTP amplifie donc l'action anti-proliférative.

Etant donné que la synthèse *de novo* des purines est surtout utilisée par les lymphocytes, les effets cytotoxiques engendrés par l'inhibition de cette voie sont beaucoup plus puissants sur ces cellules que sur les autres types cellulaires.

De plus, un autre facteur augmente la sélectivité d'action du MMF. En effet, l'IMPD existe dans l'organisme sous deux isoformes : type I et type II.

Des études [24] et [25] ont ainsi montré que les lymphocytes au repos exprimaient de manière prédominante le gène de l'isoforme de type I alors que dans les lymphocytes activés, le gène de l'isoforme de type II était fortement exprimé.

Or, l'isoforme de type II est presque cinq fois plus sensible à l'inhibition par le MMF que l'isoforme de type I. Le produit présente donc une sélectivité envers les lymphocytes activés ce qui est recherché en thérapeutique.

Le MMF inhibe donc la prolifération lymphocytaire de manière relativement spécifique en agissant à un stade tardif de la réponse. Il entraîne le passage des cellules en phase G1 et les bloque en phase S.

De plus, cette molécule ne semble pas interférer avec la production d'IL-2 ce qui est, selon les dernières études, plutôt favorable à l'induction de la tolérance à long terme.

Bien que son action soit centrée sur le lymphocyte, le MMF entraîne également une déplétion des stocks de GTP et de dGTP au niveau des monocytes et macrophages de manière significative.

De plus, le MMF inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire et des cellules mésangiales ce qui a un effet bénéfique dans le rejet chronique de greffe.

Même si le MMF agit principalement par un effet de type cytostatique, il peut également induire l'apoptose des lymphocytes et des monocytes/macrophages ce qui pourrait être favorable à l'induction d'une tolérance vis à vis d'allo-antigènes.

D'autres hypothèses ont été formulées pour tenter d'expliquer l'action immunosuppressive de cette molécule.

Le MMF inhiberait ainsi les processus de glycosylation et l'expression des molécules d'adhésion au niveau des lymphocytes et des macrophages.

En effet, la glycosylation des protéines et des lipides se fait *via* des intermédiaires de type nucléotidique et la déplétion en GTP médiée par le MMF inhibe le transfert de fucose et de mannose sur les glycoprotéines [26].

Parmi les glycoprotéines concernées par ce phénomène, il y a des molécules d'adhésion facilitant l'attachement des leucocytes à la cellule endothéliale et leur passage à travers les vaisseaux.

De plus, le MMF régule de manière négative l'expression des molécules d'adhésion par un mécanisme non élucidé.

En antagonisant l'expression des molécules d'adhésion, le MMF diminue le recrutement des lymphocytes et des monocytes au niveau des sites inflammatoires ce qui est utile dans les rejets de greffe vasculaires.

Il faut également souligner que les molécules d'adhésion interviennent aussi dans la phase d'initiation et les phases effectrices de la réponse immune. En effet, l'interaction entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte Th requiert une complémentarité de liaison entre les molécules d'adhésion. Il en est de même pour les lymphocytes effecteurs et leur cellule cible. Le blocage de ces interactions pourrait être à l'origine d'une activité immunosuppressive et anti-inflammatoire.

Enfin, le MMF possède des propriétés antimicrobiennes en inhibant la IMPDH des eucaryotes (beaucoup plus que celle des procaryotes).

En entraînant une déplétion en dGTP, il exerce également une activité synergique avec les inhibiteurs de l'ADN polymérase virale et les inhibiteurs de la transcriptase inverse.

Ces propriétés pourraient avoir une importance en thérapeutique.

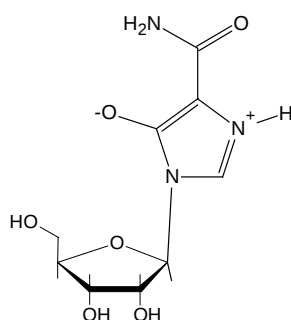
1.3.5.3.1.3- Indications :

A l'heure actuelle le MMF possède des applications thérapeutiques encore restreintes. Il est indiqué en association à la ciclosporine et aux corticoïdes dans la prévention des rejets aigus d'allogreffe rénale, cardiaque ou hépatique.

1.3.5.3.2- La mizoribine :

1.3.5.3.2.1- Structure : [27]

La mizoribine est un analogue nucléotidique des purines isolé à partir d'*Eupenicillium brefeldianum* possédant des propriétés antibiotiques.



Mizoribine

1.3.5.3.2.2- Mécanisme d'action : [27]

Dans l'organisme, la mizoribine est phosphorylée par l'adenosine kinase. Comme le MMF, elle exerce son activité immunosuppressive en inhibant la IMPD et parfois la GTP synthase.

Elle inhibe l'IMPD de manière compétitive.

L'inhibition de ces enzymes entraîne une déplétion intracellulaire de GTP et de dGTP et donc l'inhibition de la synthèse *de novo* entraînant un blocage des lymphocytes en phase S.

1.3.5.3.2.3- Indications : [9]

Cette molécule a été peu utilisée en dehors du Japon et ne possède pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour être utilisée en France.

1.3.6- les inhibiteurs de la synthèse *de novo* des pyrimidines :

1.3.6.1- Généralités : [28]

Comme ce que l'on peut observer pour les bases puriques, il y a deux voies biosynthétiques des bases pyrimidiques : la voie de sauvetage et la synthèse *de novo*.

La voie de sauvetage est majoritairement utilisée par les lymphocytes au repos et les thymocytes, tandis que la synthèse *de novo* est la voie préférentiellement empruntée par les lymphocytes T et B activés pour produire leur stock de précurseurs de nucléotides pyrimidiques.

Même si les lymphocytes activés possèdent les enzymes intervenant dans la voie de sauvetage des bases puriques et pyrimidiques, cette voie ne leur permet de couvrir que 20% de leurs besoins en précurseurs. Pour le reste, ils font appel à la synthèse *de novo*.

La préférence des lymphocytes activés pour la synthèse *de novo* est plus marquée pour les bases pyrimidiques que pour les bases puriques.

On comprend d'ores et déjà l'intérêt d'inhibiteurs de la synthèse *de novo* des bases pyrimidiques.

D'autant plus que ces nucléotides pyrimidiques ne sont pas uniquement utilisés pour la synthèse de l'ADN ou de l'ARN, ils servent également de précurseurs des phospholipides membranaires et de certaines glycoprotéines.

Par exemple, la cytosine triphosphate (CTP) est le plus important nucléotide pour la synthèse des phospholipides membranaires.

Or, à la suite d'une stimulation, une cellule T ou B activée présente des besoins très importants en précurseurs métaboliques dans le but de dupliquer son matériel génétique et de doubler sa membrane phospholipidique pour former deux cellules filles. Elle a donc besoin de précurseurs des bases puriques et pyrimidiques mais également de phospholipides.

De plus, les phospholipides sont à l'origine de messagers lipidiques intervenant dans l'activation et la prolifération cellulaire ainsi que dans les processus inflammatoires.

La déplétion en bases pyrimidiques peut donc entraîner des conséquences à de nombreux niveaux.

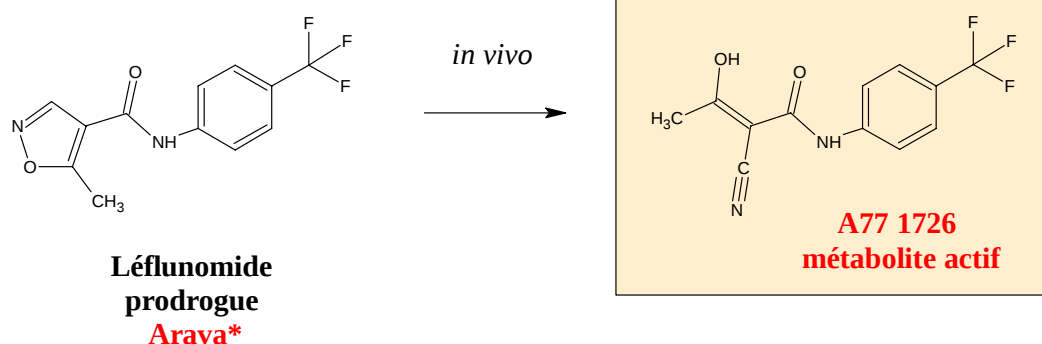
1.3.6.2- Le léflunomide :

1.3.6.2.1- Structure et métabolisme : [28]

Le léflunomide est un dérivé de l'isoxazole. Il ne possède aucune parenté structurale avec les autres molécules immunosuppressives déjà citées.

Après administration par voie orale, il est pratiquement totalement métabolisé par une réaction d'ouverture du cycle isoxazole pour donner naissance à un dérivé malonitrilamide, **A771726**, responsable de l'activité.

La conversion du léflunomide en son métabolite actif se fait de manière non enzymatique au niveau des mucosités intestinales et du plasma dans un premier temps, puis au niveau du foie par effet de premier passage.



1.3.6.2.2- Mécanisme d'action : [28]

La principale cible du A77 1726 est la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH) qui est la 4^{ème} enzyme dans la voie de synthèse *de novo* des pyrimidines.

Le A77 1726 inhibe la DHODH de manière non compétitive et réversible ce qui a pour conséquence d'inactiver la prolifération des cellules qui dépendent très fortement de la voie *de novo* c'est à dire les lymphocytes T et B activés.

La susceptibilité des cellules vis à vis du traitement par le léflunomide dépend de leur état d'activation, de leur besoins métaboliques, et de leur capacité à contourner l'inhibition de la synthèse *de novo* en utilisant la voie de sauvetage.

Toutes les conséquences de l'inhibition de la DHODH par le léflunomide ne sont pas connues à l'heure actuelle mais il semble maintenant évident que ce mécanisme est à l'origine des effets anti-prolifératifs et immunomodulateurs de la molécule.

Le leflunomide entraîne ainsi une accumulation des cellules T et B activées à la limite entre les phases G1 et S.

De plus, l'inhibition de la synthèse *de novo* et donc la déplétion en précurseurs pyrimidiques qui s'ensuit, peut, comme il a été dit dans les généralités, entraîner une déplétion en phospholipides nécessaires à la prolifération cellulaire et à la biosynthèse de seconds messagers.

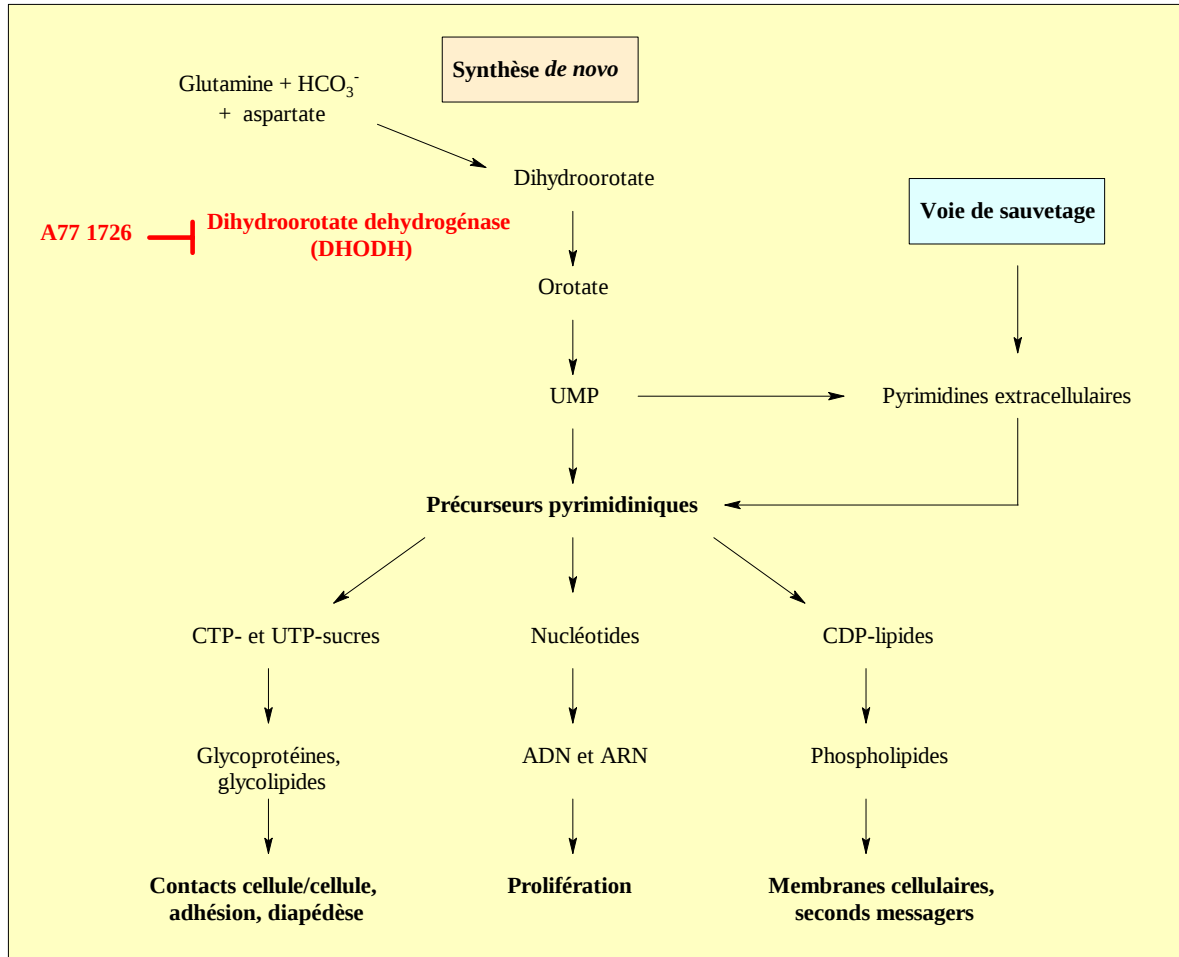
Cette déplétion peut également entraîner un déficit de glycosylation des protéines en diminuant la formation des sucres pyrimidiniques (CTP- et UTP-sucres) nécessaires à la glycosylation de certaines protéines et notamment des molécules d'adhérence.

D'ailleurs, une "down regulation" des molécules d'adhérence est observée sous traitement par le leflunomide. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une déplétion en sucre pyrimidiniques.

Les molécules d'adhérence jouant un rôle très important dans les processus d'activation lymphocytaire et de passage à travers l'endothélium, leur diminution aurait des conséquences favorables dans un contexte nécessitant une immunosuppression.

Le leflunomide exerce également une inhibition sur plusieurs variétés de protéines kinases *in vitro* mais à des concentrations bien supérieures à celles nécessaires pour obtenir une inhibition de la prolifération des cellules.

Schéma 16 : Mécanisme d'action du léflunomide via son métabolite actif (le A77 1726) [28]



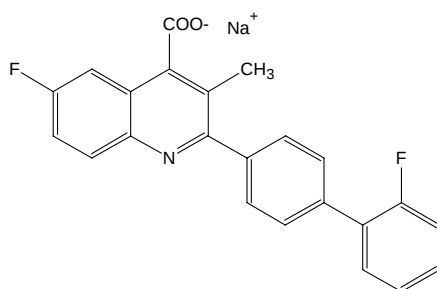
1.3.6.2.3- Indications : [17]

Le léflunomide possède une seule indication : le traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde active de l'adulte.

1.3.6.3- Le bréquinar sodique :

1.3.6.3.1- Structure : [29]

Le bréquinar est une fluoroisoquinoléine.



Bréquinar sodique

1.3.6.3.2- Mécanisme d'action : [9]

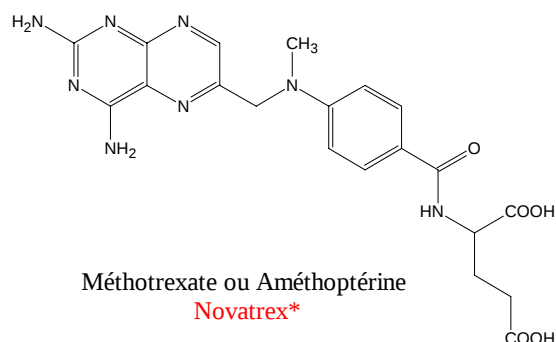
Le bréquinar est un inhibiteur réversible de la DHODH et de la cytidine deaminase. Il bloque donc la synthèse d'uridine et de cytidine.

1.3.6.3.3- Indications : [9]

Cette molécule n'est pas commercialisée en France et son développement semble actuellement abandonné.

1.3.6.4- Le cas particulier du méthotrexate (MTX) :

1.3.6.4.1- Structure et métabolisme : [30]



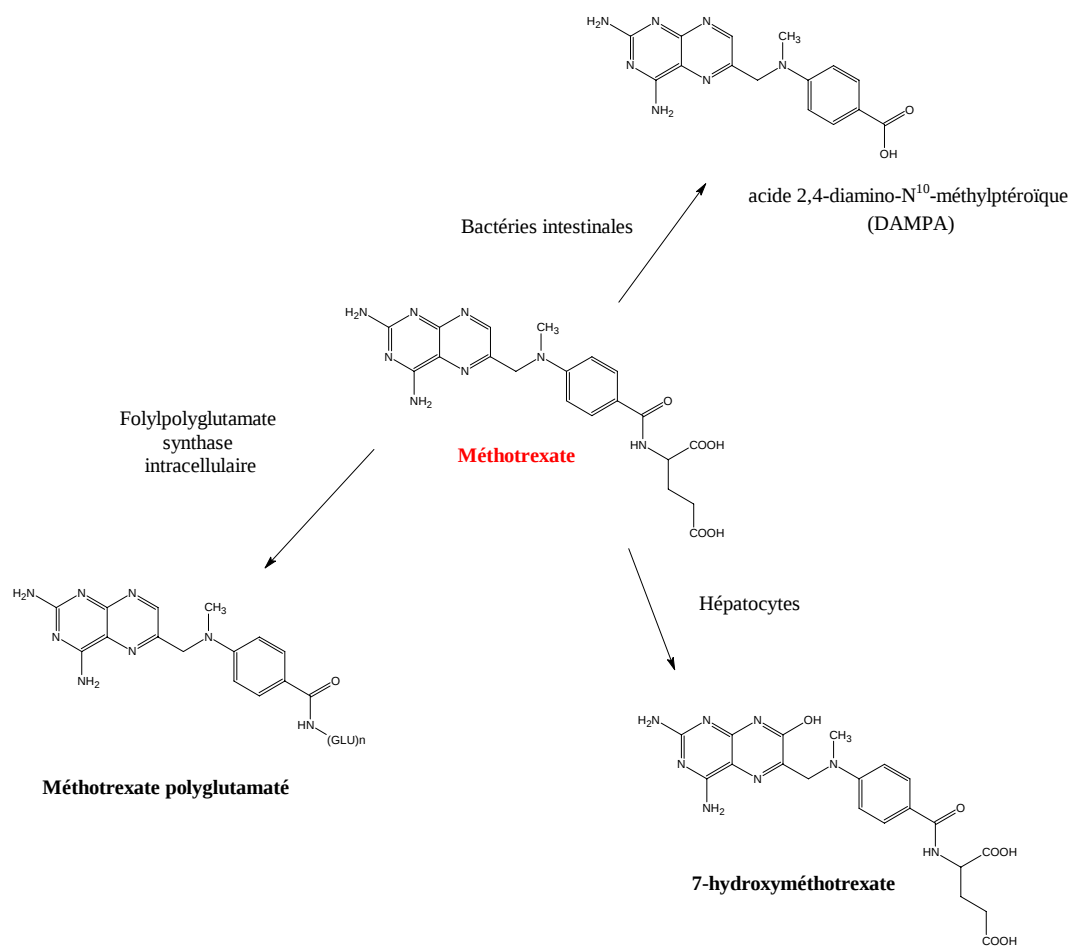
Le méthotrexate est un analogue structural de l'acide folique.

Il a la particularité d'être métabolisé au niveau intracellulaire par fixation de 2 à 5 groupements polyglutamate (cf. schéma 16). Les formes polyglutamate du méthotrexate jouent un rôle majeur dans l'activité du méthotrexate et augmentent sa demi-vie intracellulaire puisqu'elles sont retenues beaucoup plus longtemps à l'intérieur de la cellule.

Le méthotrexate peut également être hydroxylé en position 7 du noyau ptérinique au niveau hépatique ce qui constitue une voie majeure de détoxification.

Une autre voie de détoxification est la métabolisation par les bactéries de la flore intestinale en un dérivé nommé DAMPA.

Schéma 17 : Métabolisme intracellulaire de méthotrexate [30]



1.3.6.4.2- Mécanisme d'action : [21] et [30]

La principale cible du méthotrexate est la dihydrofolate réductase (DHFR) qui catalyse la réduction du dihydrofolate (FH2) en tétrahydrofolate (FH4) en présence de NADPH. Le méthotrexate va entraîner une inhibition compétitive de cette enzyme, contribuant à bloquer la régénération du pool de FH4 à partir du FH2.

Or, le FH4 est un donneur d'unités carbonées et sert à la formation du 5,10-méthylène FH4 qui est un cofacteur nécessaire à la transformation du dUMP en dTMP par la thymidylate synthase (TS). Cette réaction est une étape critique dans la synthèse *de novo* des pyrimidines puisqu'elle est la seule source de thymidylate cellulaire par la voie *de novo*.

Le méthotrexate inhibe donc la formation de dTMP et donc de dTTP qui est un précurseur des bases pyrimidiques nécessaires à la synthèse d'ADN.

Le méthotrexate se fixe sur le site actif de la DHFR avec une très forte affinité et n'en sera donc pas déplacé par les concentrations de FH2 susceptibles d'être atteintes dans l'organisme.

La forte inhibition de la synthèse *de novo* de thymidylate observée sous traitement par le MTX n'est pas seulement due à une déplétion en 5,10-méthylène FH4. En effet, les formes polyglutamate du MTX exercent une inhibition directe sur la TS.

Pour éviter une trop forte toxicité sur les cellules saines, on utilise de plus en plus des techniques dites de "rescue" qui consistent à administrer au patient de l'acide folinique quelques heures après le traitement par du MTX. L'acide folinique agit en entraînant une augmentation de la quantité de FH4. Ces méthodes permettent d'utiliser de plus fortes doses de MTX.

De plus, il inhibe, par le biais de ses formes polyglutamate, la 5-amino-4-carboxamide ribonucléotide transformylase (AICAR Tase).

Cette enzyme transforme l'AICAR et le 10-formyl FH4 en formyl-AICAR et en FH4 respectivement. Cette réaction est essentielle pour la synthèse *de novo* des bases puriques.

Le MTX exerce donc également une action inhibitrice sur la synthèse *de novo* des purines.

Enfin, récemment, il a été démontré que le MTX inhibait aussi la première étape de la synthèse *de novo* des purines en bloquant l'amidophosphoribosyltransférase.

L'inhibition par le MTX d'autres enzymes folate-dépendante n'est pas à exclure pour expliquer ses propriétés anti-prolifératives.

Le MTX est donc une molécule qui agit à la fois sur la synthèse *de novo* des pyrimidines et des purines, les deux voies de synthèse utilisées très fortement par les lymphocytes suite à une stimulation antigénique.

Le MTX est un immunosuppresseur efficace qui agit en supprimant les clones de cellules T activés par stimulation antigénique pendant le traitement.

In vitro, il entraîne l'apoptose des lymphocytes T activés en phase S/G2 du cycle cellulaire de manière sélective.

De plus, il exerce des propriétés anti-inflammatoires. D'ailleurs, ses effets bénéfiques dans le traitement de certaines maladies auto-immunes (telles que la polyarthrite rhumatoïde) peuvent être attribués à son activité immunosuppressive ainsi qu'à ses effets anti-inflammatoires.

Le problème majeur de l'utilisation de cette molécule en clinique est le développement d'une résistance des cellules tumorales par de nombreux mécanismes.

1.3.6.4.3- Indications : [17]

Le méthotrexate est une molécule majoritairement utilisée en tant qu'anticancéreux sous la spécialité Ledertrexate[®].

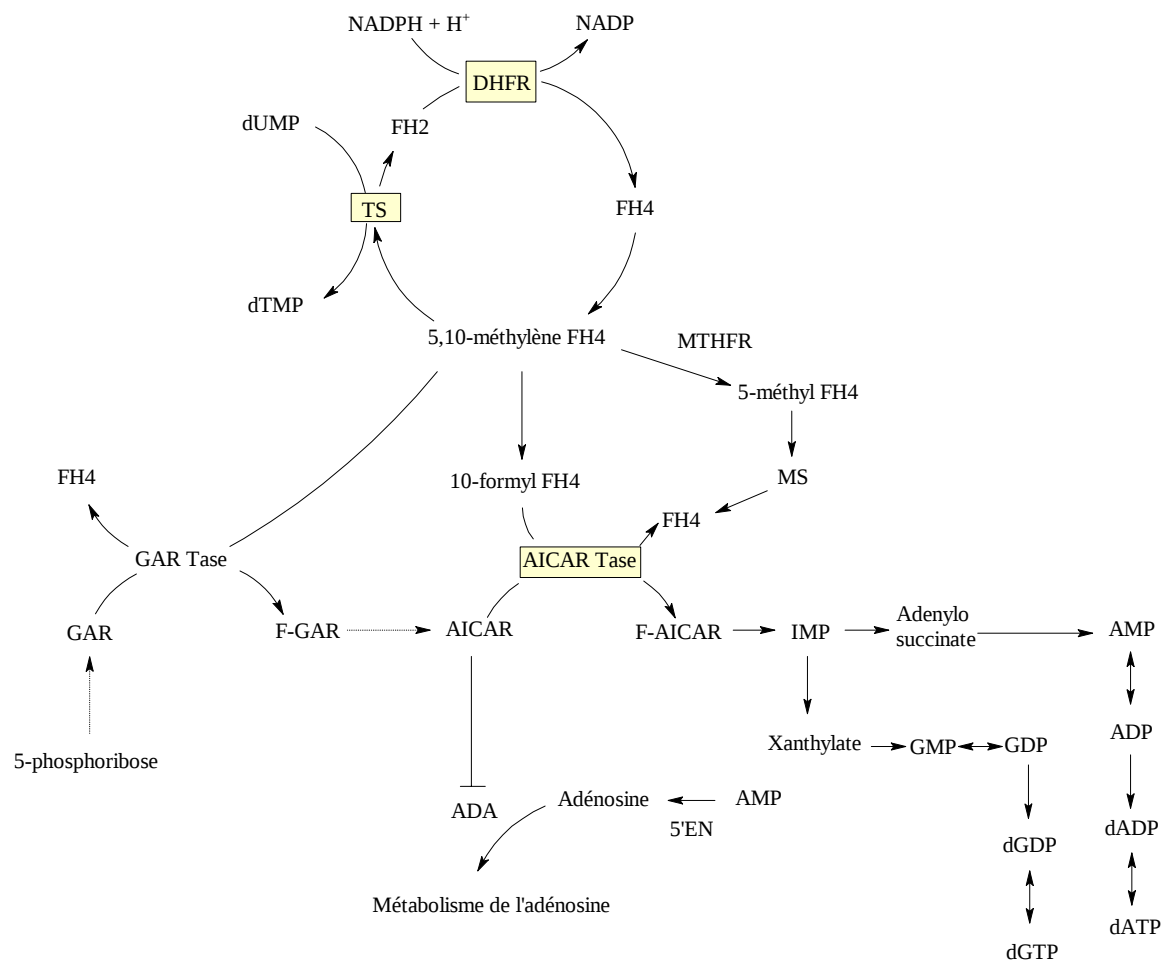
Il est néanmoins indiqué dans le traitement de certaines maladies auto-immunes sous la spécialité Novatrex[®].

Ainsi, il est recommandé dans le traitement du **psoriasis** de l'adulte, et, notamment, dans le psoriasis en grandes plaques, étendu et résistant aux thérapeutiques classiques ainsi que dans l'érythrodermie psoriasique. Il peut éventuellement être utilisé également dans le psoriasis pustuleux généralisé.

Dans ce cas, étant donné les incertitudes sur sa tolérance à long terme, son utilisation avant l'âge de 50 ans doit être soigneusement étudiée.

Ce médicament peut enfin être utilisé en seconde intention dans le traitement de la **polyarthrite rhumatoïde**.

Schéma 18 : Cycle des folates et voie de synthèse *de novo* des purines [30]



GAR : glucinamide ribonucléotide; F-GAR : formyl GAR; F-AICAR : formyl AICAR; GAR Tase : GAR transformylase; MS : méthionine synthétase; MTHFR : méthylène tétrahydrofolate réductase.

1.3.7- Les bioréactifs :

Les bioréactifs font partie intégrante de la thérapeutique immunosuppressive lors d'une allogreffe. Ils sont utilisés principalement au début du traitement pour induire une immunosuppression dans le cadre de protocoles faisant intervenir plusieurs molécules immunodépressives. Ils peuvent aussi être utilisés pour certains dans le traitement du rejet aigu.

Ces médicaments se divisent en deux groupes : les sérums anti-lymphocytaires et les anticorps monoclonaux.

1.3.7.1- Les sérums anti-lymphocytaires :

1.3.7.1.1- Composition et production : [4], [17] et [20]

Ces bioréactifs sont des sérums polyclonaux antilymphocytaires. Ils sont composés d'anticorps dirigés contre de nombreuses molécules de surface des lymphocytes humains.

Ils sont produits par immunisation d'animaux (tels que le lapin ou le cheval) avec des lymphocytes humains.

Ces produits sont d'une très grande efficacité pour le traitement préventif ou curatif du rejet aigu d'allogreffe.

Leur tolérance clinique est, par ailleurs, très mauvaise du fait de leur origine animale.

Ils peuvent en effet entraîner une immunisation des patients vis à vis des protéines animales contenues dans le sérum.

On peut également observer une certaine hétérogénéité des lots.

1.3.7.1.2- Les différentes spécialités : [17]

On distingue différentes spécialités de sérums polyclonaux (cf. tableau 3) en fonction de leur origine (équine ou de lapin) et du type de cellule contre lesquelles ils sont dirigés (thymocytes ou lymphocytes T humains).

Tableau 3 : Les différentes spécialités de sérums anti-lymphocytaires [17]

Spécialité	Origine	Cellules cible
Globulines antilymphocytaires Fresenius®	lapin	Lymphocytes T humains
Thymoglobuline®	lapin	Thymocytes humains
Lymphoglobuline®	cheval	Thymocytes humains

1.3.7.1.3- Indications : [17]

Ces globulines immunes sont tout particulièrement indiquées au moment de l'allogreffe d'organe. Elles agissent en entraînant une déplétion en lymphocytes T en particulier de type CD4 dans le but de diminuer le risque de rejet postopératoire immédiat.

Leur utilisation se fait en association avec d'autres immunosuppresseurs dans le cadre de protocoles bien définis.

Elles sont également utilisées dans le traitement du rejet aigu d'allogreffe.

La thymoglobuline® possède également l'AMM pour le traitement de la réaction aiguë corticorésistante du greffon contre l'hôte et la prévention de la réaction aiguë et chronique du greffon contre l'hôte en cas de transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

1.3.7.2- Les anticorps monoclonaux :

1.3.7.2.1- Composition et production : [17] et [20]

Les anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique immunodépressive sont dirigés contre une molécule de surface du lymphocyte T en particulier. Ils ont donc une action beaucoup plus ciblée par rapport aux sérums polyclonaux.

Leur préparation se fait à partir de cellules B qui sécrètent toutes le même anticorps dirigé contre une molécule de surface des cellules T. Ces cellules B, qui sont issues de souris préalablement immunisées avec des lymphocytes T humains, fusionnent ensuite avec des cellules de myélome pour donner des hybridomes immortels sécrétant tous le même anticorps. Ces hybridomes sont ensuite clonés.

L'avantage de ces anticorps est que les lots sont d'une très grande homogénéité.

De plus, ils sont dirigés contre une seule cible permettant, par exemple, de cibler les cellules T activées uniquement.

Le seul inconvénient majeur est l'immunisation possible du receveur envers ces protéines d'origine animale.

Pour éviter cela, des techniques de génie génétique ont été mises en œuvre permettant d'obtenir des anticorps recombinants chimériques (seule la région variable de l'anticorps est d'origine murine, le reste est d'origine humaine) ou humanisés (seule la région hypervariable de l'anticorps est d'origine murine) possédant une meilleure tolérance.

1.3.7.2.2- Les différentes spécialités : [17] et [20]

1.3.7.2.2.1- Muromonab-CD3 ou OKT3 (Orthoclone®) :

Cet anticorps monoclonal est d'origine murine et dirigé spécifiquement contre l'antigène de surface CD3 spécifique des lymphocytes T humains. Il cible, par conséquent, tous les lymphocytes T y compris ceux qui ne sont pas activés. Il est donc peu spécifique.

De plus, il expose les patients à des accidents anaphylactoïdes du fait de son origine murine.

La fixation de cet anticorps sur le CD3 empêche l'activation lymphocytaire. Il agit donc de façon précoce.

1.3.7.2.2.2- Basiliximab (Simulect®) :

Cet anticorps est dirigé contre le récepteur de l'interleukine-2 situé à la surface des lymphocytes T qui ont été stimulés par un antigène. Son action est donc beaucoup plus spécifique que celle de l'OKT3 puisqu'il agit principalement sur les lymphocytes T activés.

Le basiliximab est un anticorps chimérique (murin-humain de type IgG1 κ) c'est à dire que seule sa partie variable est d'origine murine, le reste de l'anticorps est d'origine humaine. Ceci lui confère ainsi une meilleure tolérance clinique en diminuant le risque de réactions anaphylactiques.

Cet anticorps se comporte comme un antagoniste complet du récepteur à l'IL-2 en se fixant de manière spécifique sur la chaîne α de ce récepteur (ou antigène CD25). Cette spécificité lymphocytaire est également appelée activité anti-Tac.

La fixation de cet anticorps sur le récepteur empêche la fixation de l'IL-2 sur son récepteur spécifique ce qui a pour conséquence d'inhiber la prolifération des lymphocytes T.

1.3.7.2.2.3- Daclizumab (Zenapax[®]):

Cet anticorps a une activité identique à celle du Basiliximab c'est à dire de type anti-Tac.

La seule différence entre ces deux préparations est que le daclizumab est un anticorps de type IgG1 recombinant humanisé c'est à dire que seule la partie hypervariable de l'anticorps est d'origine murine. Cette caractéristique augmente sa tolérance.

1.3.7.2.3- Indications : [17]

L'OKT3 est indiqué dans le traitement du rejet aigu d'allogreffes rénales, hépatiques et cardiaques résistant aux corticoïdes.

Le Zenapax[®] et le Simulect[®] sont, quant à eux, recommandés dans la prévention du rejet aigu après transplantation rénale allogénique *de novo* en association au sein de protocoles d'immunosuppresseurs chez des patients non hyperimmunisés.

1.4- INCONVENIENTS DES TRAITEMENTS ACTUELS

1.4.1- Généralités :

L'immunodépresseur idéal devrait être capable d'inhiber les réactions immunitaires pathologiques ou indésirables tout en maintenant intacte la capacité du système immunitaire à lutter contre les infections et les processus de cancérisation, et, de plus, il devrait être dénué de toxicité intrinsèque.

Actuellement, une telle molécule n'existe pas.

En effet, tous les immunosuppresseurs utilisés en thérapeutique entraînent une immunodépression généralisée plus ou moins importante qui peut parfois avoir de graves conséquences, en favorisant la survenue d'infections, de cancers et de lymphomes.

L'incidence de ces complications peut être diminuée par une surveillance étroite du traitement. L'objectif est de diminuer les posologies des molécules les plus immunodépressives, en ajoutant, par exemple, aux protocoles des molécules entraînant moins de complications de sur-immunosuppression.

Une antibiothérapie adéquate permet souvent de prévenir les infections.

Mais, malgré toutes ces précautions, on ne peut pas toujours éviter la survenue des complications précédemment citées.

De plus, les molécules utilisées en clinique ont toutes une toxicité intrinsèque importante et sont à l'origine d'effets secondaires sérieux, hypothéquant la vie du patient.

D'autre part, les traitements immunosuppresseurs actuels sont inefficaces pour traiter les rejets chroniques survenant plusieurs années après la greffe et conduisant à la perte du greffon.

Enfin, les stratégies d'avenir en transplantation, vont de plus en plus vers la mise au point et l'utilisation de molécules capables d'induire un état de tolérance vis à vis de la greffe au lieu d'inhiber l'activation lymphocytaire.

1.4.2- Effets indésirables dus à la sur-immunosuppression :

1.4.2.1- Les complications infectieuses : [4], [31] et [32]

1.4.2.1.1- Généralités :

Les complications infectieuses représentent la cause majeure de morbi-mortalité pendant la première année suivant une greffe. En effet, 80 % des transplantés présentent au moins un épisode infectieux durant cette période.

Ce risque infectieux est bien évidemment lié aux doses cumulées d'immunosuppresseurs utilisés mais également aux facteurs environnementaux d'origine nosocomiale (germes présents dans l'eau, l'air conditionné, au niveau des salles d'opération...).

De plus, l'utilisation de matériel étranger invasif (ex : cathéters et sondes vésicales) augmente le risque infectieux en offrant une porte d'entrée importante aux germes.

L'état nutritionnel et métabolique du patient intervient également.

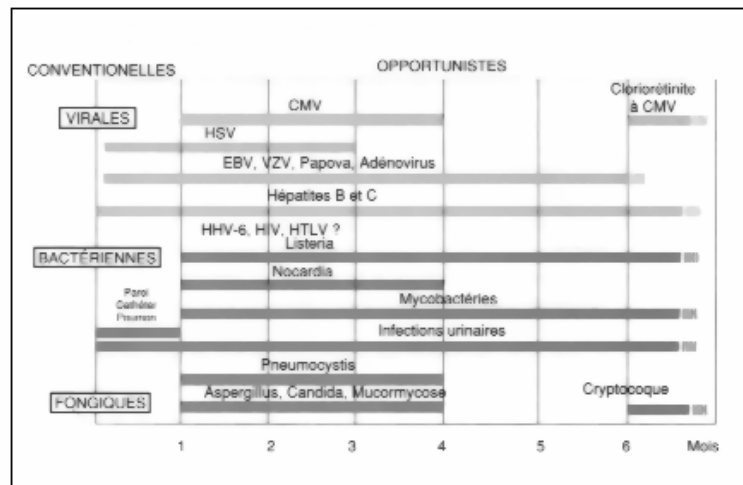
L'étiologie des infections chez les transplantés, par exemple, dépend de l'état immunitaire préalable du patient, du moment de survenue de l'épisode infectieux après la greffe, du type de greffe, du conditionnement pré-greffe et de la nature et de l'intensité du traitement immunosuppresseur.

Après transplantation d'organe, on distingue les infections qui surviennent de façon précoce (la plupart des infections graves surviennent dans les 3-4 mois) et les infections tardives (cf. schéma 19).

Les infections d'une personne immunodéprimée sont de trois types :

- les infections communautaires non spécifiques (pouvant survenir chez un sujet immunocompétent),
- les infections nosocomiales non spécifiques (infections contractées au cours d'hospitalisations répétées)
- les infections opportunistes spécifiques (infections par des germes non pathogènes chez une personne immunocompétente mais qui le deviennent du fait de l'immunodépression).

Schéma 19 : Chronologie de la survenue des infections après transplantation d'organe [4]



1.4.2.1.2- Les infections bactériennes :

Les traitements immunodépresseurs ont la particularité de diminuer l'immunité cellulaire ce qui augmente le risque d'infection par des bactéries à développement intracellulaire comme le Bacille de Koch ou les *Listeria*.

Néanmoins, les infections à *Listeria monocytogenes* sont rares.

Il peut y avoir des risques accrus d'infection à *Nocardia* et à mycobactéries atypiques et de pneumopathies à Légionnelle mais ces infections sont également rares.

Certains patients peuvent déclarer une tuberculose mais il s'agit le plus souvent d'une réactivation de la maladie chez des sujets insuffisamment traités.

1.4.2.1.3- Les infections à protozoaires :

L'une des principales infections est la pneumopathie à *Pneumocystis carinii*, germe opportuniste.

Son incidence a beaucoup diminué grâce à une prophylaxie efficace par le triméthoprim associé au sulfaméthoxazole ou aux aérosols de pentamidine.

Une toxoplasmose peut également se déclarer et entraîner des troubles plus ou moins importants.

La contamination d'un sujet séronégatif peut se faire à partir de kystes présents au niveau du greffon ou de façon classique.

Si la personne immunodéprimée est séronégative pour *Toxoplasma gondii*, des précautions d'hygiène ainsi qu'une surveillance sérologique régulière sont recommandées.

Dans le cas contraire, une prophylaxie est systématique soit par le mélange sulfadoxine-pyriméthamine soit par le cotrimoxazole.

Chez certains patients originaires d'un pays d'endémie, on peut également observer la survenue d'anguilluloses et de leishmanioses.

1.4.2.1.4- Les infections fongiques :

La survenue d'une candidose, notamment buccale, n'est pas rare. Elle doit être traitée avec beaucoup d'attention pour éviter qu'elle ne s'étende.

Une aspergillose peut également risquer de se déclarer suite à un contact du patient avec des poussières polluées. Le pronostic est souvent très grave.

D'autres champignons peuvent être responsables d'infections diverses telles que l'histoplasmosse, la coccidiomycose ou encore la mucormycose.

Enfin, des cryptococcoses peuvent se développer, entraînant des troubles méningés très graves. Les patients ayant donc un grave déficit de l'immunité cellulaire doivent donc éviter le contact avec les volatiles.

1.4.2.1.5- Les infections virales :

La principale infection virale observée chez le transplanté est l'infection à CMV ("Cytomégalovirus").

Une prophylaxie par le ganciclovir ou le valaciclovir est réalisée systématiquement chez tous les receveurs négatifs greffés avec un donneur positif et chez tous les receveurs positifs traités par des globulines anti-lymphocytaires.

Des infections à HSV ("Herpes Simplex Virus"), VZV ("Varicelle-Zona Virus") et EBV ("Epstein Barr Virus") sont également possibles.

Certains virus hépatotropes tels que ceux de l'hépatite C et B (HCV et HBV) peuvent être réactivés (cas des greffés porteurs du virus).

D'autres virus peuvent se déclarer : Adénovirus, Papovavirus, Papillomavirus, Polyomavirus, HHV-6 ("Herpes Virus Humain 6"), HHV-8 ("Herpes Virus Humain 8"), HTLV ("Human T Lymphotropic Virus").

Certains de ces virus ont un rôle important dans le développement de cancers et de lymphomes.

1.4.2.2- Les complications néoplasiques : [4], [9] et [31]

1.4.2.2.1- Les complications néoplasiques précoces :

Ces complications sont représentées par les lymphomes.

Ces syndromes lymphoprolifératifs post-transplantationnels ont une incidence maximale au cours de la première année, puis cela diminue et se stabilise les années suivantes.

Leur incidence globale est de 2%.

C'est le virus EBV qui est à l'origine du développement de ces lymphomes.

En effet, ce virus a un tropisme pour les lymphocytes B. Lors d'une primo-infection, il infecte les populations B, intègre leur ADN sous la forme de pro-virus et reste ainsi à l'état latent.

Chez le transplanté qui reçoit un traitement immunodépresseur, l'immunité anti-tumorale réalisée par les lymphocytes T est atténuée et permet donc au virus d'entraîner la prolifération incontrôlée des clones B infectés. En réponse à ces proliférations, des mutations apparaissent. De plus, cela entraîne l'activation d'oncogènes ou la désactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Tout ceci aboutit au syndrome lymphoprolifératif.

Ces syndromes peuvent être bénins ou sévères. Dans ce dernier cas, le taux de mortalité est très important surtout en cas d'atteinte multi-viscérale.

1.4.2.2.2- Les complications néoplasiques tardives :

Ces complications augmentent avec la durée d'exposition aux immunodépresseurs.

Les cancers les plus fréquents sont : les cancers cutanés, les lymphomes, les sarcomes de Kaposi, les cancers du rein, les cancers ano-génitaux et les carcinomes hépato-biliaires.

Tous ces cancers sont souvent viro-induits.

Par exemple, le sarcome de Kaposi est lié au virus HHV-8. De même, le cancer du col, souvent observé chez les transplantées, est lié au *Papilloma virus*.

1.4.3- Effets indésirables dus à la toxicité de la molécule :

1.4.3.1- Généralités :

Toutes les molécules immunosuppressives utilisées en thérapeutique actuellement possèdent une toxicité importante et doivent être maniées avec précaution. Ces traitements nécessitent donc un suivi régulier adapté en fonction des molécules utilisées de façon à détecter le plus rapidement possible un effet toxique pour pouvoir réduire la posologie ou changer le traitement.

L'objectif ici n'est pas de réaliser la liste exhaustive de tous les effets indésirables des molécules utilisées en thérapeutique immunosuppressive, mais plutôt, de dresser la liste des toxicités les plus fréquentes et les plus graves rencontrées.

1.4.3.2- Les corticoïdes : [15]

Les corticoïdes présentent de très nombreux effets secondaires surtout lorsque le traitement est prolongé et à fortes doses.

Ils entraînent principalement, en plus du risque accru d'infections :

- des troubles des **métabolismes protidique** (amyotrophie, ostéoporose et fractures pathologiques), **lipidique** et **glucidique** (effet diabétogène),
- des troubles des équilibres **hydro-électrolytiques** (rétention hydrosodée et hypokaliémie) et **phosphocalciques** (arrêt de croissance chez l'enfant)
- des troubles **endocriniens** (syndrome de Cushing, atrophie corticosurrénale secondaire, irrégularités menstruelles)
- des troubles **digestifs** (risque d'ulcères gastro-duodénaux, pancréatites aiguës)
- des troubles **psychiques** (euphorie, excitation, insomnie, état maniaque ou confusionnel)

Leur tolérance moyenne à court et long terme fait que la tendance actuelle est à diminuer les doses cumulatives de corticoïdes au sein des protocoles d'immunosuppression.

Certains de ces effets secondaires peuvent être réduits voire évités par la mise en place de régimes appropriés et d'une surveillance clinique et biologique adaptée.

1.4.3.3- Le cyclophosphamide : [17] et [33]

Le cyclophosphamide a une bonne tolérance générale et locale.

Néanmoins, un de ses effets secondaires particuliers est le risque d'apparition de **cystite hémorragique** lors de traitements prolongés ou à doses élevées.

Cet effet est dû à l'un de ses métabolites qui possède des propriétés irritantes pour la vessie : l'acroléine.

Ce risque peut être minimisé par l'administration concomitante de sulfonate sodique de mercaptoéthane (Mesna[®]) qui se combine à l'acroléine pour donner un dérivé non toxique pour la vessie.

En dehors de cela, on peut observer une **toxicité digestive** avec nausées, vomissements, diarrhées et/ou mucites.

Une **toxicité hématologique** est également possible avec des risques de neutropénie ou de thrombopénie modérée.

L'alopécie est aussi un effet indésirable de cette molécule. Elle est inconstante, transitoire et réversible.

A très fortes doses, il existe un risque de cardiotoxicité.

1.4.3.4- Les anticalcineurines : [17] et [34]

1.4.3.4.1- La ciclosporine :

L'effet indésirable majeur de la ciclosporine est la **néphrotoxicité**. Cet effet est d'autant plus gênant quand la ciclosporine est utilisée en transplantation rénale car elle peut mettre en danger la survie du greffon et être confondue avec une crise de rejet.

La ciclosporine peut entraîner une insuffisance rénale aiguë par vasoconstriction qui est réversible et dose-dépendante d'où l'intérêt de suivre de très près les concentrations plasmatiques de CsA au cours du traitement.

Elle peut également entraîner des insuffisances rénales chroniques par fibrose interstitielle qui sont indépendantes de la dose.

En outre, la ciclosporine possède de nombreux effets indésirables mineurs :

- hypertrichose
- tremblements
- hypertrophie gingivale
- troubles gastro-intestinaux
- paresthésie
- dysfonctionnement hépatique dose-dépendant
- troubles métaboliques
- hypertension artérielle

1.4.3.4.2- Le tacrolimus :

Le tacrolimus n'apporte pas d'amélioration en terme de **néphrotoxicité**, qui est comparable à celle de la ciclosporine.

Il se caractérise, de plus, par une toxicité au niveau **neurologique** pouvant occasionner des troubles mineurs (tremblements, insomnies, paresthésies ou photophobies) ou sévères (aphasie, convulsions ou polyneuropathies).

Le tacrolimus entraîne également très fréquemment des hyperglycémies allant jusqu'à déclencher un diabète sucré surtout si la personne traitée possède des prédispositions.

La glycémie est donc à surveiller de très près.

Enfin, d'autres effets indésirables sont fréquemment observés tels que des troubles digestifs, de l'hypertension artérielle ou encore des prurits.

Le seul avantage du tacrolimus par rapport à la ciclosporine est qu'il entraîne significativement moins de troubles lipidiques.

1.4.3.5- La rapamycine : [17]

La rapamycine, contrairement aux molécules précédentes, présente l'intérêt de ne pas être néphrotoxique.

En revanche, elle n'est pas dénuée de **myélotoxicité** (anémie, thrombopénie, leucopénie et purpura)

Des **dyslipidémies** sont très fréquentes (60 % des patients traités par la rapamycine sont sous statines) ainsi que des troubles hépatiques (augmentation des paramètres biologiques hépatiques).

Des cas de pneumopathie interstitielle, parfois létale, ont également été relevés.

Enfin, des troubles généraux et gastro-intestinaux sont souvent rapportés ainsi que des cas de tachycardie, d'acné et d'arthralgie.

1.4.3.6- L'azathioprine : [17] et [35]

Les effets indésirables les plus fréquents sont de nature **hématologique** avec des risques de leucopénie, thrombopénie, anémie, macrocytose, mégalo-blastose et hypoplasie médullaire.

Ces effets indésirables limitent son utilisation. Ils sont néanmoins dose-dépendants et réversibles à l'arrêt du traitement.

D'autres effets secondaires plus rares peuvent être observés tels que des troubles gastro-intestinaux, des réactions d'hypersensibilité, des alopecies et des troubles hépatiques.

1.4.3.7- Le mycophénolate mofétil : [17] et [36]

Les principales manifestations indésirables pouvant survenir suite au traitement d'un patient par le mycophénolate mofétil sont de nature **hématologique** (51.5 % des cas). Ainsi, des neutropénies parfois sévères peuvent apparaître, mais également des anémies et des thrombopénies. Quelques cas d'agranulocytose ont été répertoriés.

Il convient donc de réaliser une surveillance spécialisée, clinique et biologique, avec, notamment, une numération de formule sanguine hebdomadaire le 1^{er} mois, tous les 15 jours les deux mois suivants puis, tous les mois pendant toute la durée du traitement.

Des **troubles digestifs** divers sont également fréquents.

1.4.3.8- Le méthotrexate : [17] et [37]

Le principal inconvénient du méthotrexate est sa **toxicité hépatique** cumulative pouvant aller parfois jusqu'à la cirrhose hépatique.

Une **toxicité hématologique** dose-dépendante et non cumulative peut être également observée avec des risques de leucopénie de thrombopénie voire de pancytopenie.

Des troubles gastro-intestinaux et une alopecie peuvent également apparaître avec un risque accru lorsque les doses utilisées sont fortes.

En cas de surdosage, l'antidote de choix est l'acide folinique.

1.4.3.9- Le léflunomide : [17]

Des troubles divers peuvent être observés lors de l'utilisation de cette molécule.

Ainsi, on retrouve parmi les effets indésirables les plus fréquents :

- des troubles gastro-intestinaux divers
- des troubles hématologiques et du système lymphatique (leucopénies fréquentes)
- des troubles du système immunitaire (réactions allergiques modérées fréquentes et de très rares cas d'accidents anaphylactoïdes graves)
- des troubles cutanés et des tissus sous-cutanés (accentuation de la chute naturelle des cheveux, eczéma, sécheresse cutanée)
- des troubles du système nerveux (ex : céphalées, paresthésies, asthénie, étourdissements)
- augmentation de la pression artérielle
- élévation des paramètres hépatiques
- amaigrissement
- ténosynovite

Le métabolite actif du léflunomide, l'A77 1726, a une longue demi-vie pouvant varier de 1 à 4 semaine. En cas d'intolérance grave, il s'avère nécessaire d'éliminer rapidement le A77 1726 de l'organisme. Pour cela, il faut mettre en œuvre un protocole de détoxification ou de "washout" qui consiste à administrer de la cholestyramine ou du charbon actif.

Cet inconvénient majeur limite son utilisation.

1.4.3.10- Les bioréactifs :

1.4.3.10.1- Les sérums anti-lymphocytaires : [17] et [38]

Ces produits étant d'origine animale, leur tolérance est donc mauvaise et des réactions diverses, notamment allergiques, peuvent survenir.

Les réactions indésirables les plus fréquentes et les plus graves apparaissent après la première ou la deuxième perfusion. Elles sont probablement liées à une activation transitoire des lymphocytes, par les immunoglobulines, à l'origine d'une libération de cytokines. Ce phénomène est appelé : "**syndrome de la première dose**" et se manifeste la plupart du temps par de la fièvre, des frissons, un prurit et un érythème avec de l'hyper- ou de l'hypotension.

Des **réactions allergiques vraies** peuvent être observées entraînant des manifestations cutanées ou respiratoires ou, lorsque celles-ci s'avèrent sévères, des chocs anaphylactiques et/ou des oedèmes laryngés. Ces manifestations sont rares et s'observent surtout avec la Lymphoglobuline[®] et les Globulines antilymphocytaires Fresenius[®].

De plus, une réaction allergique retardée peut être observée : **la maladie sérique**. Elle survient 5 à 15 jours après le début du traitement et correspond à l'immunisation du patient contre les immunoglobulines d'origine animale ce qui entraîne la formation puis le dépôt de complexes immuns. Les symptômes de cette réaction sont variables : fièvre, prurit, érythème, arthralgies ou myalgies.

Enfin, des troubles hématologiques peuvent survenir tels qu'une neutropénie ou une thrombopénie. Ces manifestations sont dues à une réactivité croisée des immunoglobulines à l'égard des polynucléaires neutrophiles ou des plaquettes.

1.4.3.10.2- Les anticorps monoclonaux : [17] et [39]

Le Zénapax[®] et le Simulect[®] ont été utilisés dans différentes études en association avec d'autres immunosuppresseurs classiques et n'ont pas entraîné d'effets indésirables supplémentaires par rapport aux témoins recevant le même traitement mais avec un placebo au lieu de l'anti-Tac.

L'OKT3 est par contre responsable de nombreux effets indésirables.

Le principal inconvénient de cet anticorps est son origine murine qui peut induire une réponse immunitaire du patient traité avec une apparition d'anticorps spécifiques dirigés contre la région constante ou contre le site de reconnaissance de l'antigène (anticorps anti-idiotypiques).

Ces anticorps anti-idiotypiques peuvent bloquer l'interaction de l'OKT3 avec sa cible et donc diminuer l'efficacité du traitement.

Les anticorps dirigés contre l'OKT3 sont également responsables de la survenue de **réactions d'hypersensibilité** en formant des complexes immuns ou en entraînant des réactions médiées par les IgE.

Ces réactions peuvent être légères (ex : éruption, prurit) ou très sévères (ex : réactions anaphylactiques, chocs, œdème angioneurotique).

Enfin, cet anticorps est très souvent à l'origine, lors de l'administration des toutes premières doses, **du syndrome de libération des cytokines** par les lymphocytes et les monocytes activés.

Ce syndrome clinique est aigu mais le plus souvent léger, de type grippal et limité dans le temps. Parfois, il peut entraîner des réactions graves avec des symptômes cardiovasculaires et neuropsychiatriques (céphalées, convulsions, encéphalopathie, œdème cérébral, et méningite aseptique).

1.5- LES NOUVELLES VOIES DE RECHERCHE

1.5.1- Généralités :

Comme il a été expliqué précédemment, les traitements immunodépresseurs actuels entraînent tous une immunosuppression plus ou moins généralisée. Il est donc important de déterminer d'autres stratégies afin d'obtenir des molécules beaucoup plus spécifiques et moins toxiques.

De plus, ces traitements, ciblent pratiquement tous le lymphocyte, et, plus particulièrement, la cellule T. Or, d'autres cibles, notamment, les CPA, semblent intéressantes à explorer.

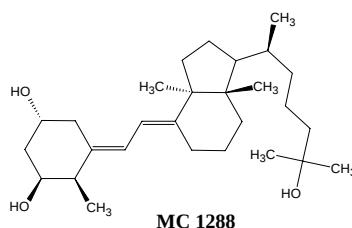
La longévité des greffes à long terme en diminuant la survenue des rejets chroniques est également un des défis de la recherche de nouvelles molécules immunodépresseives.

Enfin, dans le domaine des transplantations, l'objectif actuel est d'entraîner un état de tolérance vis à vis de la greffe et d'ainsi éliminer le traitement immunosuppresseur. Les mécanismes d'établissement de la tolérance sont encore mal connus mais déjà quelques pistes sont explorées et semblent présenter un certain intérêt chez l'animal.

1.5.2- Analogues de la vitamine D : [21], [40a] et [40b]

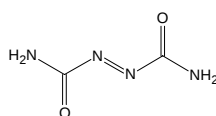
Les recherches sur la forme active de la vitamine D, le 1,25-dihydroxycholecalciferol (vitamine D₃) ont montré que cette dernière possédait des propriétés immunodépresseives. En effet, des récepteurs spécifiques de la vitamine D sont exprimés à la surface des lymphocytes T et B activés ainsi que sur les monocytes. La fixation de la vitamine D sur ses récepteurs spécifiques entraîne une down-regulation de la formation d'IL-2 ce qui inhibe la différenciation et la prolifération des lymphocytes activés.

Des analogues de la vitamine D₃ ont donc été synthétisés dans le but d'éliminer l'activité hypercalcémiant et d'augmenter l'affinité pour les récepteurs à la vitamine D. Ces études ont permis d'isoler par exemple le MC 1288 qui possède des propriétés immunosuppresseives intéressantes.



1.5.3- L'Azodicarbonamide : [21], [16] et [41]

Ce composé exerce son activité immunosuppressive en supprimant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ par un mécanisme nouveau qui est l'inhibition de la mobilisation du calcium, générée après une stimulation lymphocytaire engageant le TCR.

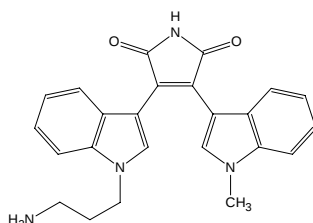


Azodicarbonamide

1.5.4- Les dérivés du bisindolylmaleimide VIII : [21], [16] et [42]

Plusieurs dérivés de cette famille augmentent l'apoptose des lymphocytes T médiée par le système Fas/ Fas-ligand sur des lignées de cellules T humaines.

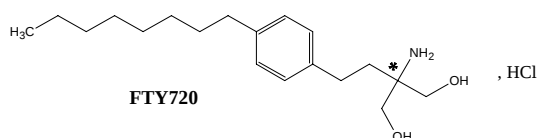
La plus active de ces molécules exerce son activité sur les lymphocytes T activés uniquement.



Bisindolylmaleimide VIII

1.5.5- Le FTY720 : [23], [43] et [50]

Ce composé est un dérivé semi-synthétique de la myriocyne (ISP-1), produit isolé à partir du bouillon de culture d'un champignon : *Isaria sinclairii*.



Cette molécule présente l'intérêt d'agir par un mécanisme complètement nouveau. En effet, il entraîne une accumulation des lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques mésentériques et

périphériques. Cette séquestration est à l'origine d'une lymphocytopénie par diminution du nombre de lymphocytes circulants (Cf. schéma 20).

Un des mécanismes incriminés est l'up-regulation de l'expression des intégrines $\alpha 4/\beta 7$ présentes à la surface des lymphocytes.

Ces intégrines se lient à des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales (CAM-1 et MadCAM-1) au niveau des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques ce qui entraîne l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium vasculaire, puis, la migration de ceux-ci à travers l'endothélium vers les tissus lymphoïdes.

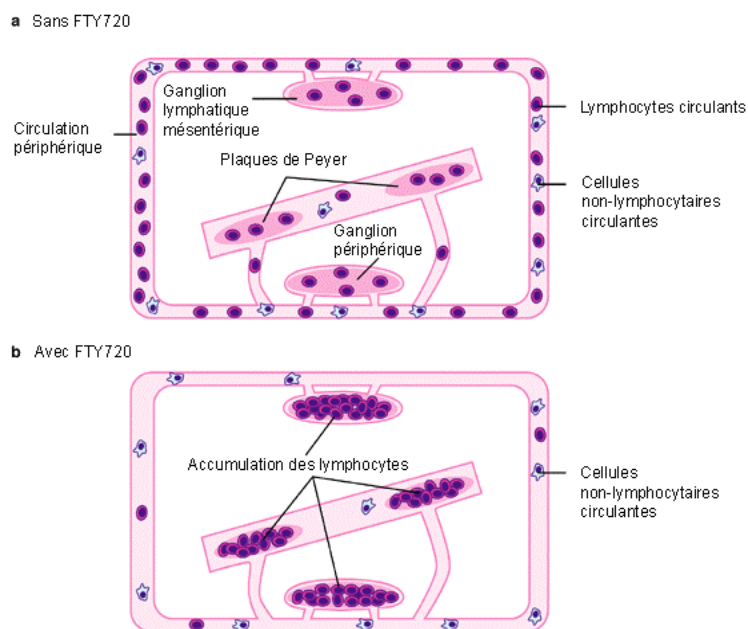
Ce processus permet de réduire l'infiltration du greffon lors d'une transplantation.

De plus, le FTY720 n'affecte pas les cellules immunitaires non spécifiques tels que les monocytes et les polynucléaires ainsi que les cellules T et B mémoire ce qui permettrait à l'hôte d'éviter les complications infectieuses post-greffe.

Les premières expériences réalisées sur l'animal semblent être prometteuses (faible toxicité, forte biodisponibilité par voie orale, peu de variations inter- et intra-individuelles).

Enfin, selon les premières données, le FTY720 semblerait être intéressant pour réduire la survenue du rejet chronique.

Schéma 20 : Mécanisme d'action du FTY720 [23]



- a) Distribution des lymphocytes en l'absence de traitement par le FTY720.
- b) Séquestration des lymphocytes au niveau des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques.

1.5.6- Les agents bloquant les signaux de co-stimulation des cellules T : [7], [44] et [45]

Rappelons, tout d'abord, que l'activation des lymphocytes Th nécessite, en plus du signal médié par le TCR, un signal de co-stimulation. En l'absence de ce signal, le lymphocyte devient anergique.

L'inhibition de ces signaux s'avère donc intéressante en vue d'une étude plus approfondie dans un but thérapeutique.

Ces signaux de co-stimulation sont réalisés par l'interaction de deux couples de molécules, B7/CD28 ou CTLA-4 et CD40/CD40L (ou CD154), présents respectivement sur la CPA et le lymphocyte.

Il est possible de bloquer ces deux signaux.

Le premier signal peut être inhibé par une molécule nommée CTLA4-Ig qui est une protéine de fusion soluble constituée du domaine extra-cellulaire du CTLA-4 (présent uniquement sur les lymphocytes T activés et ayant une affinité pour le B7 20 fois supérieure à celle du CD28) et de la région constante de la chaîne lourde d'une IgG1 humaine. Cette molécule agit comme un inhibiteur compétitif puissant de l'interaction B7/CD28.

Le 2^{ème} signal peut être bloqué par un anticorps monoclonal dirigé contre le CD40-L.

Des expériences ont ainsi été menées [45] dans lesquelles des reins ont été transplantés entre des singes incompatibles au niveau des antigènes de classe I et II du CMH. Les singes traités par l'association CTLA4-Ig/anticorps monoclonal anti-CD40L n'ont présenté aucun signe de rejet 150 jours après la transplantation sans montrer un état d'immunosuppression généralisé.

Ces résultats encourageants incitent à poursuivre dans cette voie.

1.5.7- Les agents bloquant les molécules d'adhésion ou accessoires des cellules T : [7], [44] et [46]

Les molécules d'adhésion, comme nous l'avons vu précédemment, jouent un rôle très important dans l'activation des lymphocytes ainsi que dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau de la greffe.

Ces molécules constituent donc une cible thérapeutique intéressante.

Plusieurs anticorps monoclonaux ont été créés dans ce but : l'anti-ICAM 1 (enlimomab), l'anti-LFA 1 (odulimomab), et l'anti-CD2 (BTI-322 : IgG2b murine anti CD2 humain).

Le couple de molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1 (respectivement sur la CPA et sur la cellule T) intervient dans l'activation lymphocytaire et dans l'adhésion entre les cellules.

Il semble qu'une activité immunosuppressive soit observée uniquement lorsque l'on utilise ces deux anticorps simultanément.

Le ligand du CD2 (présent à la surface des cellules T) est le LFA3. Cette molécule est exprimée à la surface des CPA mais aussi par de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales.

Le LFA3 des cellules endothéliales est un stimulus important des cellules T lors de leur migration à travers l'endothélium pour rejoindre la greffe.

Les premiers essais du blocage de l'interaction CD2/LFA3 sont encourageants.

D'autres études ont été réalisées sur des molécules accessoires telles que le CD4. L'anticorps monoclonal anti-CD4 a ainsi été créé dans le but d'inhiber l'activation lymphocytaire.

Les premières études ont été réalisées sur des anticorps de souris avec tous les inconvénients que cela représente en terme de mauvaise tolérance.

De plus en plus, les anticorps de souris sont donc remplacés par des anticorps chimériques ou humanisés beaucoup mieux tolérés.

1.5.8- Les anticorps dirigés contre des cytokines : [7] et [47]

Certaines cytokines jouent un rôle primordial dans le rejet de greffe. On a déjà cité l'IL-2 et l'IFN γ mais il faut aussi signaler le TNF α qui intervient dans le chimiotactisme et l'extravasation des macrophages (composante inflammatoire).

Des anticorps monoclonaux spécifiques de ces cytokines ont donc été développés.

Ainsi, dans certains cas, il a été démontré que des anticorps monoclonaux anti-IL-2 ou anti-IFN γ pouvaient prolonger la vie de transplants cardiaques chez le rat.

Enfin, des anticorps monoclonaux anti-TNF α (adalimumab) prolongent les greffes de moelle osseuse chez la souris et réduisent la fréquence des GVHD. Ils auraient également un intérêt, selon les premières études, dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

1.5.9- Immunosuppression médiée par des peptides : [44] et [48]

Des études ont montré que certains peptides dérivés des molécules du CMH de classe I et II présentaient des propriétés immunomodulatrices très intéressantes *in vitro* et *in vivo*.

A la suite de ces observations, les recherches se sont portées sur des peptides dérivés de l'hélice α -1 des molécules du CMH de classe I et plus particulièrement sur les résidus 75-84 des allèles humains HLA B7 et HLA B2702.

Leur mécanisme d'action est encore mal élucidé, mais on pense qu'ils inhibent les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques.

Des études se sont focalisées sur d'autres types de peptides exerçant une activité totalement différente.

Ainsi, par exemple, un inhibiteur du NFAT possédant une perméabilité cellulaire a été développé. Ce produit inhibe la transcription du gène de l'IL-2, comme le font la ciclosporine et le tacrolimus. L'avantage est que, contrairement à ces produits, il n'agit pas sur la calcineurine dont l'inhibition en dehors du système immunitaire entraîne de nombreux effets secondaires tels que, notamment, de l'hyperglycémie.

Des transplantations allogéniques d'îlots de Langherans chez la souris ont été réalisées avec succès en présence de ce peptide.

1.5.10- Thérapie génique : [23] et [44]

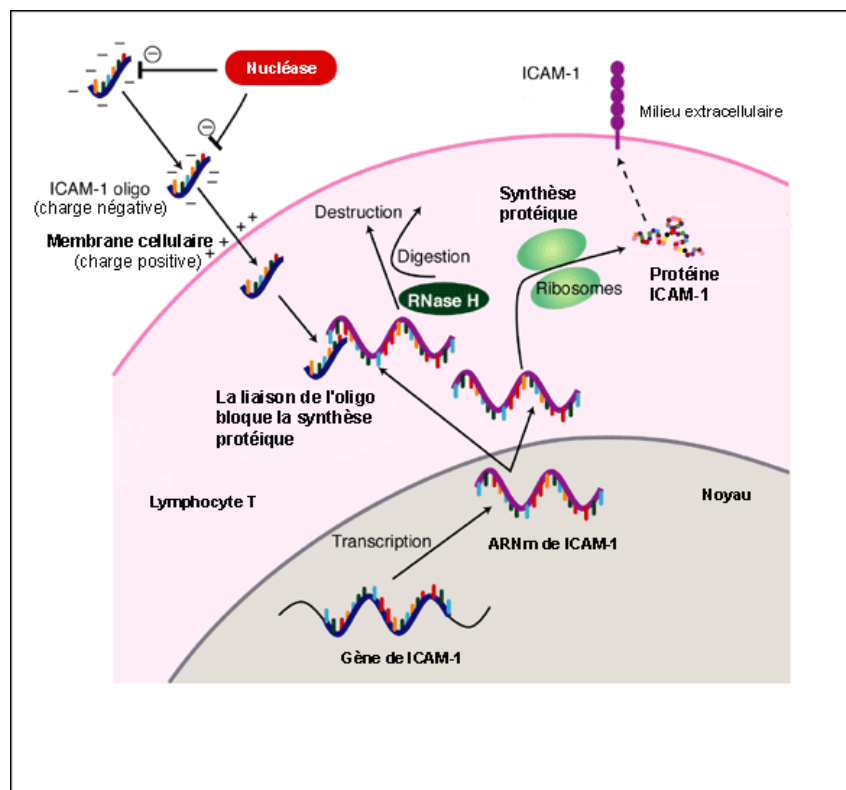
L'avancée des connaissances et des techniques en génétique offre d'immenses possibilités d'application en thérapeutique et notamment dans le domaine des transplantations et des maladies auto-immunes. Il serait impossible de faire le tour de toutes les possibilités envisagées.

Néanmoins, nous pouvons citer l'exemple de la **technologie des antisens** dont l'objectif est de synthétiser des oligonucléotides antisens capables de bloquer sélectivement une fonction d'un gène.

Pour mieux comprendre ce mécanisme, prenons l'exemple d'un oligonucléotide antisens dirigé contre l'ARN messager (ARNm) spécifique de ICAM-1 (ou ICAM-1 oligo), molécule d'adhésion dont l'importance lors de l'activation lymphocytaire a été décrite précédemment.

L'ICAM-1 oligo a été modulé de telle sorte qu'il évite la dégradation par les nucléases extracellulaires. Sa charge négative facilite sa liaison à la membrane cellulaire plutôt chargée positivement. Après passage dans le cytoplasme de la cellule, il se fixe à une séquence spécifique (dont il est complémentaire) sur les molécules d'ARNm spécifiques de ICAM-1. Les complexes formés activent la ribonucléase H (RNase H) qui est une enzyme qui va couper l'ARNm et ainsi prévenir la synthèse d'ICAM-1 à partir de cet ARNm (cf. schéma 21)

Schéma 21 : Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens spécifiques de ICAM-1 [23]



L'avantage majeur de cette technologie est sa haute spécificité. De plus l'affinité de ces oligonucléotides est très grande.

Cette technique peut être appliquée à n'importe quel ARNm à l'origine d'une protéine d'intérêt.

Des études approfondies sur leur efficacité *in vivo* sont actuellement en cours.

Une autre application intéressante de la thérapie génique est la modification du matériel génétique d'animaux (ex : le porc) dans le but de réaliser des xenotransplantations.

1.5.11- L'induction de la tolérance en transplantation : [7], [44] et [49]

L'idée la plus séduisante est actuellement de mettre au point des traitements capables d'induire un **état de tolérance** du receveur d'une allogreffe vis à vis des antigènes étrangers du donneur.

La tolérance peut être définie dans ce cas comme une absence de réponse immunitaire du receveur à l'égard des antigènes du donneur.

La tolérance immunologique est un mécanisme qui existe au niveau physiologique. Elle se manifeste par une absence de réactivité du système immunitaire vis à vis des éléments du soi. Elle peut être induite de diverses façons.

La première méthode est celle de la délétion clonale que l'on observe au niveau du thymus avec les cellules T immatures.

La tolérance peut aussi être obtenue par séquestration de l'antigène à l'abri du système immunitaire (ex : système nerveux central). Ce phénomène est observé lors des greffes dans un site immunologiquement privilégié (chambre antérieure de l'œil, cornée, utérus, testicules et cerveau).

Une autre possibilité est d'induire la tolérance par anergie clonale que l'on observe lorsqu'il y a une absence de molécules de co-stimulation sur les CPA (ce qui les empêche d'entraîner l'activation des cellules T) ou lorsque les CPA sont immatures et donc incapables d'apprêter et de présenter les antigènes efficacement.

Enfin, des cellules T régulatrices peuvent être à l'origine d'une suppression des lymphocytes activés. Les mécanismes d'activation de ces cellules sont encore mal connus.

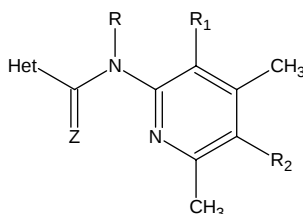
Les recherches actuelles se portent plus particulièrement sur l'induction d'une anergie clonale *via* le blocage des signaux de co-stimulation.

Une autre tentative est d'administrer en même temps que la greffe des cellules CD34⁺ qui semblent induire une tolérance immunologique du receveur.

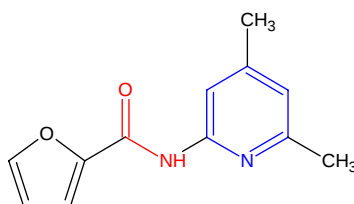
II- TRAVAUX REALISES

INTRODUCTION

Les travaux du laboratoire de Chimie Thérapeutique dans le domaine des immunosuppresseurs ont débuté avec la mise en évidence d'une famille de molécules de structure benzamidique [51] et [52] (dont la formule générale est indiquée ci-après) présentant une activité immunosuppressive importante par un mécanisme différent des molécules actuellement sur le marché.



Le chef de file de cette famille est le **trancamide**. Cette molécule exerce une inhibition sélective de la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).



Trancamide ou JM34

Ce nouveau mécanisme faisant intervenir les CPA comme cible d'action, a fait l'objet d'un dépôt de brevet par l'Université de Nantes [53].

Les CPA sont, comme il a été expliqué dans la première partie, au centre de la réaction immunitaire allogénique et sont responsables de l'activation des T qui se fait par trois types de signaux (cf. 1.2.2.2.1.2).

Les CPA sont principalement des cellules dendritiques dont certains précurseurs sont les monocytes sanguins. Pour assurer leur fonction de présentation antigénique, ces précurseurs vont subir différentes modifications morphologiques et structurales que l'on peut séparer en deux étapes [54] (cf. schéma 22). Ces cellules se différencient, tout d'abord, en cellules dendritiques présentatrices immatures ce qui se traduit par l'acquisition de récepteurs

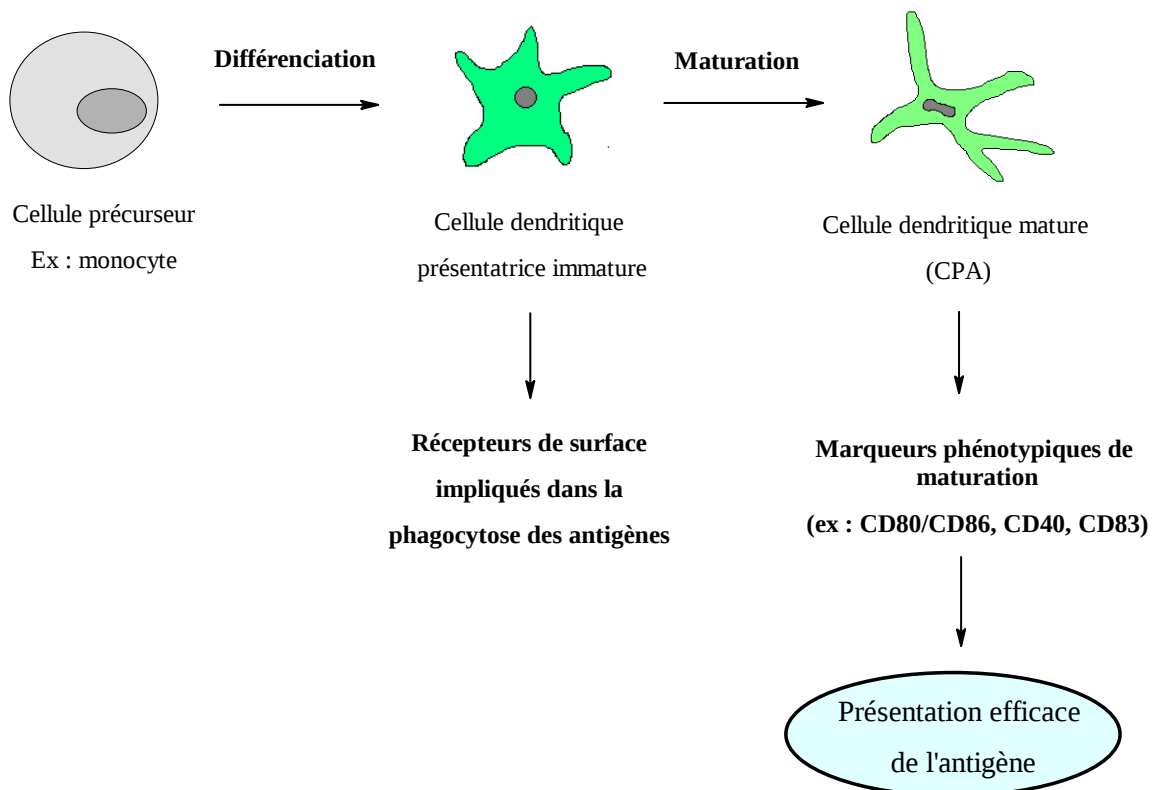
de surface impliqués dans la phagocytose des antigènes. Cette étape est suivie d'une phase de maturation en cellule capable de présenter efficacement des antigènes de surface aux lymphocytes T. Cette transformation se caractérise par l'expression de différents marqueurs phénotypiques tels que CD80/CD86, CD40, et CD83 impliqués pour certains dans la co-stimulation lymphocytaire.

La corrélation entre l'expression des marqueurs de maturation sur les cellules dendritiques et leur capacité à présenter efficacement les antigènes aux lymphocytes T a été démontrée. Ceci est particulièrement vrai pour le marqueur CD83 [53].

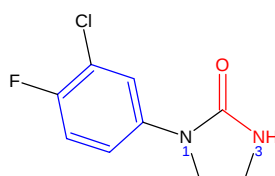
Les études pharmacologiques [53] ont permis de prouver que le trancamide inhibe l'expression de certains de ces marqueurs de maturation avec notamment un effet prononcé sur l'expression de CD83. Ceci est à l'origine d'une inhibition très significative de la MLR ("Mixed lymphocytes reaction") avec des cellules dendritiques prétraitées par le trancamide. Cette activité s'explique par une diminution de la capacité des CPA à présenter efficacement l'antigène.

Cet effet pourrait donc entraîner une anergie des cellules T et donc induire une tolérance.

Schéma 22 : Les différentes étapes de la maturation des CPA [54]



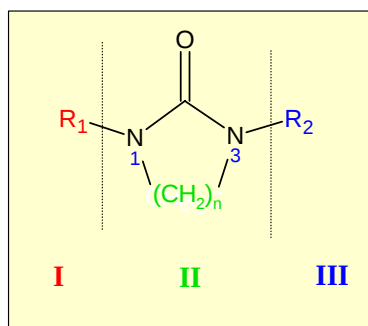
Ces résultats nous ont incités à poursuivre dans cette voie. Ainsi, lors d'un précédent travail d'élaboration de molécules à visée antiparasitaire [55] et [56], des analogues à structure imidazolidin-2-one ont été synthétisés et évalués dans le domaine de l'immunosuppression. Ces études ont permis d'identifier un chef de file (**JM03023**) présentant des propriétés immunosuppressives significatives [57].



JM03023

L'objectif de ce travail est donc d'envisager des pharmacomodulations à partir du modèle structural de JM03023 au niveau des 3 zones (I, II et III) décrites dans le schéma ci-dessous.

Schéma 23 : Pharmacomodulations envisagées



2.1- ETUDE CHIMIQUE :

2.1.1- Voies d'accès envisagées :

Le schéma général de synthèse (cf. schéma 24) qui a été suivi est celui décrit dans la littérature [55].

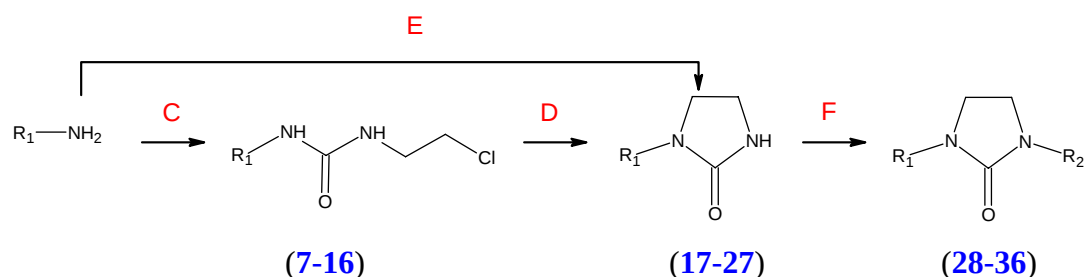
L'accès aux dérivés *N, N'*-disubstitués de l'imidazolidin-2-one est réalisé par le biais de la cyclisation intramoléculaire d'une *N*-aryl-*N'*-(chloroéthyl)urée en présence de carbonate de césium au reflux de l'acétonitrile (méthode D).

L'urée ainsi cyclisée a été préalablement préparée par condensation de l'isocyanate de 2-chloroéthyle sur l'amine convenablement choisie, au reflux du chloroforme (méthode C).

L'amine utilisée peut être commerciale ou, pour quelques structures particulières (cf. schéma 25), synthétisée par hydrogénation catalytique du dérivé nitré correspondant en présence de palladium sur charbon dans le méthanol (méthode B). Le dérivé nitré précurseur est obtenu par une réaction de substitution nucléophile entre un dérivé nitré fluoré activé et un hétérocycle azoté (méthode A).

Enfin, l'imidazolidinone *N, N'*-disubstituée est obtenue par réaction d'alkylation de l'intermédiaire monosubstitué en faisant réagir un chlorure d'acide en présence d'hydrure de sodium dans le DMF (méthode E).

Schéma 24 : Méthodes de synthèse pour la préparation des imidazolidin-2-ones **17-36**



C : $O=C=N-CH_2-CH_2-Cl$, $CHCl_3$, reflux;

Le nombre d'équivalents d'isocyanate de 2-chloroéthyle ainsi que le temps de reflux (30 min à 48 h) varient en fonction de l'amine utilisée.

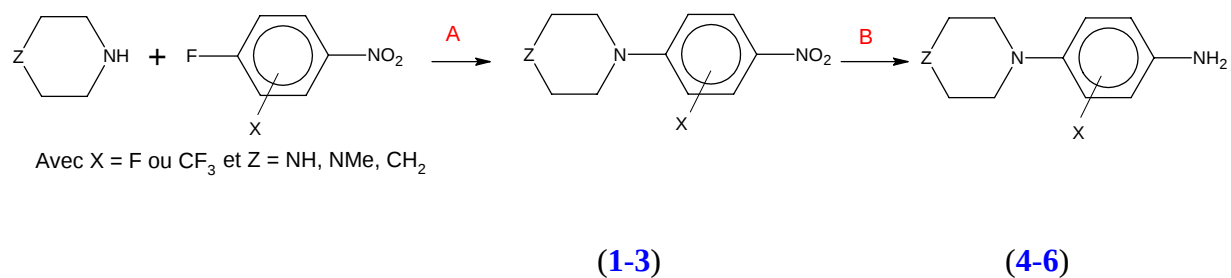
D : Cs_2CO_3 (1 eq), acétonitrile, reflux;

Le temps de reflux (quelques minutes à 30 h) varie selon l'urée mise en réaction.

E : synthèse **“one pot”** : $O=C=N-CH_2-CH_2-Cl$, acétonitrile, reflux (10 h), puis Cs_2CO_3 (1 eq)

F : $Ar-CH_2-Br$ (1 eq), NaH (3 eq), DMF, TA, 1h30;

Schéma 25 : Méthodes de synthèse pour la préparation des amines **4-6**



A : TA, 5 minutes à 1 h ;

B : H_2 , Pd/C (quantité catalytique), méthanol, TA, 3 h.

2.1.2- Partie expérimentale :

2.1.2.1- Matériels, méthodes et produits utilisés :

- Points de fusion :

Les points de fusion ont été déterminés au moyen d'un appareil Tottoli-Büchi (Büchi, Flawil, Suisse) et la valeur indiquée n'a pas été corrigée.

- Infra-rouge (IR) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

Les structures des produits précédemment décrits ont été confirmées par IR et RMN du ^1H et du ^{13}C .

Les spectres IR ont été réalisés avec des pastilles de KBr et un spectrophotomètre infra rouge Perkin-Elmer FTIR Paragon 1000 (P.E., St-Quentin-en-Yvelines, France).

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC250 (250 MHz) (Bruker Wissenbourg, France), avec pour solvant le CDCl_3 ; les déplacements chimiques sont indiqués en parties par million (ppm) par rapport au Me_4Si . Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz. Les solvants deutérés ont été fournis par S.D.S. (Peypin, France).

- Chromatographie sur Couche Mince (CCM) :

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques d'aluminium préalablement recouvertes de gel de silice (1.2 mm, GF254, E. Merck, Darmstadt, Allemagne). Les spots sont révélés par éclairage UV (254 nm).

- Colonne ouverte de chromatographie :

La purification des produits synthétisés a été réalisée à travers des colonnes de gel de silice (gel de silice de mailles 60, 70-230 mesh, E. Merck), au moyen d'un solvant approprié (généralement CH_2Cl_2).

- Evaporations :

Les évaporations ont été faites sous vide, au moyen d'un évaporateur rotatif.

- Produits utilisés :

L'agent de déshydratation utilisé a toujours été le sulfate de sodium.

Les produits chimiques proviennent de Sigma-Aldrich Chimie (St.Quentin Fallavier, France) et de Lancaster Synthesis (Bischheim, France) ou Avocado.

Les procédures expérimentales suivantes sont représentatives des voies généralement utilisées pour obtenir les molécules souhaitées.

2.1.2.2- Description des différentes procédures expérimentales :

Méthode A

Ex : 4-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]décanyl)-3-fluoronitrobenzène 3

Mettre en contact le 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]décane (1 g, 6.98 mmol) et le 3,4-difluoronitrobenzène (1.1 g, 6.98 mmol) dans un ballon. Après 5 minutes, récupérer le produit avec 2 à 5 mL d'eau et filtrer sur entonnoir fritté. Recueillir 1.70 g du dérivé nitré **3** sous la forme d'une poudre jaune ; rendement : 86%.

Méthode B

Ex : 4-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]décanyl)-3-fluoroaniline 6

Dissoudre le 4-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]décanyl)-3-fluoronitrobenzène **3** (1.5 g ; 5.31 mmol) dans le méthanol (50 mL) et ajouter le palladium sur charbon en quantité catalytique. Placer le milieu réactionnel dans l'hydrogénateur. Laisser sous agitation et à température ambiante pendant 4 h. Filtrer le mélange réactionnel au moyen d'un filtre de papier. Evaporer ensuite le filtrat obtenu sous pression réduite. Enfin, reprendre le résidu, qui cristallise, par l'éther diéthylique. Isoler 0.20 g de l'amine **6** sous la forme d'une poudre jaune ; rendement : 15%.

Méthode C

Ex : 1-(2-chloroéthyl)-3-(2-méthoxy-5-trifluorométhylphényl)urée 9

Mettre en solution la 2-méthoxy-5-trifluorométhylaniline (3 g, 15.69 mmol) dans le chloroforme (100 mL) puis ajouter l'isocyanate de 2-chloroéthyle (1.35 mL, 15.69 mmol) et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 15 minutes. Après refroidissement, évaporer le solvant et le reste d'isocyanate sous pression réduite, puis réaliser un rinçage du précipité par l'éther diéthylique pour éliminer l'excès éventuel d'amine de départ et filtrer sur entonnoir fritté pour récupérer l'urée. Isoler 3.70 g de l'urée **9** sous forme d'une poudre blanche; rendement : 80%.

Méthode D

Ex : 1-(2-méthoxy-5-trifluorométhylphényl)imidazolidin-2-one 19

Mettre en solution la 1-(2-chloroéthyl)-3-(2-méthoxy-5-trifluorométhylphényl)urée **9** (2 g, 6.74 mmol) dans l'acétonitrile (50 mL) puis ajouter le carbonate de césium (2.3 g, 6.74 mmol) et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 3 h 30. Filtrer le mélange réactionnel à chaud sur papier filtre pour éliminer le Cs_2CO_3 et évaporer sous pression réduite le filtrat obtenu. Puis, récupérer le produit avec de l'éther diéthylique. Laisser cristalliser dans un bain de glace et filtrer sur entonnoir fritté. Recueillir 0.96 g de l'imidazolidin-2-one **19** sous forme d'une poudre blanche; rendement : 55%.

Méthode E

Ex : 1-(3-fluoro-4-N-pipéridinylphényl)imidazolidin-2-one 26

Mettre en solution la 3-fluoro-4-N-pipéridinylaniline (2 g, 10.29 mmol) dans l'acétonitrile (50 mL) puis ajouter l'isocyanate de 2-chloroéthyle (0.89 mL, 10.29 mmol) et porter le milieu réactionnel au reflux pendant 10 h. Introduire ensuite le carbonate de césium (3.55 g, 10.29 mmol) et laisser au reflux pendant 3 h 30. Filtrer le mélange réactionnel à chaud sur papier filtre pour éliminer le Cs_2CO_3 et évaporer sous pression réduite le filtrat obtenu. Puis, récupérer le produit avec de l'éther diéthylique. Recueillir 0.04 g de l'imidazolidin-2-one **26** sous forme d'une poudre blanche; rendement : 2%

Méthode F

Ex : 1-(3-chloro-4-fluorophényl)- 3-(4-bromobenzyl)imidazolidin-2-one 28

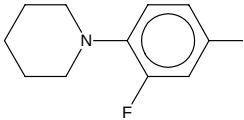
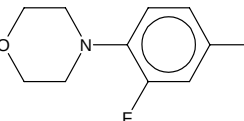
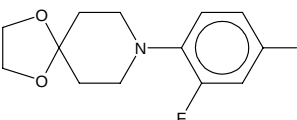
Dissoudre la 1-(3-chloro-4-fluorophényl)imidazolidin-2-one **17** (0.8 g, 3.73 mmol) dans le DMF (2 mL) à 0°C. Ajouter ensuite par petites quantités le NaH^* (0.45 g, 11.19 mmol), et laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 min. Additionner ensuite le bromure de 4-bromobenzyle (0.93 g, 3.73 mmol). Au bout de 10 minutes, arrêter la réaction par adjonction d'eau (50 mL) et épuiser le mélange par extraction à l'éther diéthylique. Réunir

ensuite les fractions organiques, sécher sur Na_2SO_4 et évaporer le mélange sous pression réduite. Enfin, reprendre le produit isolé par l'éther diéthylique et provoquer la cristallisation par trituration. Recueillir 0.51 g du produit recherché **28** sous forme d'une poudre blanche; rendement : 36%.

* Le NaH utilisé est sous une forme commerciale dans laquelle il est dispersé à 60% dans une huile minérale. Le poids indiqué est le poids effectivement pesé en tenant compte de cette dispersion. Avant d'être introduit dans le mélange réactionnel, le NaH doit être lavé par le toluène ou l'éther diisopropylique.

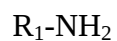
Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques des dérivés nitrés **1-3**

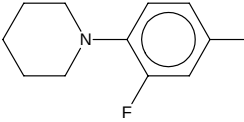
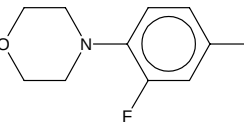
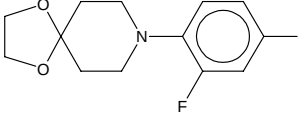
R₁-NO₂

N°	R ₁	Formule brute Mr	F°C Sol. rec.	Méthode : rendement (%)
1		C ₁₁ H ₁₃ FN ₂ O ₂ 224.24	30 ^{a)}	A : 61
2		C ₁₀ H ₁₁ FN ₂ O ₃ 226.21	110 ^{e)}	A : 90
3		C ₁₃ H ₁₅ FN ₂ O ₄ 282.27	124 ^{e)}	A : 86

^{a)} éther diéthylique, ^{b)} CH₂Cl₂/éther diéthylique, ^{c)} CHCl₃, ^{d)} CH₃CN, ^{e)} H₂O

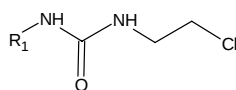
Tableau 5 : Propriétés physico-chimiques des amines 4-6



N°	R ₁	Formule brute Mr	F°C Sol. rec.	Méthode : rendement (%)
4		C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ 194.25	38 ^{a)}	B : 54
5		C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ O 196.23	120 ^{a)}	B : 66
6		C ₁₃ H ₁₇ FN ₂ O ₂ 252.29	110 ^{a)}	B : 15

^{a)} éther diéthylique, ^{b)} CH₂Cl₂/éther diéthylique, ^{c)} CHCl₃, ^{d)} CH₃CN, ^{e)} H₂O

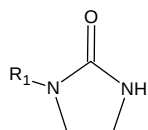
Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques des urées **7-16**



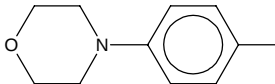
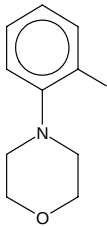
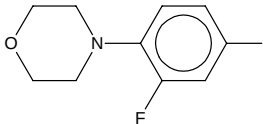
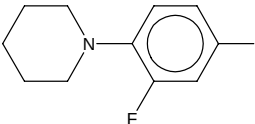
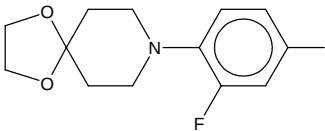
N°	R ₁	Formule brute Mr	F°C Sol. rec.	Méthode : rendement (%)
7		C ₉ H ₉ Cl ₂ FN ₂ O 251.09	116 ^{a)}	C : 87
8		C ₁₀ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O 266.65	132 ^{a)}	C : 75
9		C ₁₁ H ₁₂ ClF ₃ N ₂ O ₂ 296.68	140 ^{a)}	C : 80
10		C ₁₀ H ₉ Cl ₂ N ₃ O 258.11	131 ^{a)}	C : 62
11		C ₈ H ₁₃ ClN ₄ O 216.67	128 ^{b)}	C : 35
12		C ₁₂ H ₁₂ ClN ₃ O 249.70	157 ^{a)}	C : 84
13		C ₁₃ H ₁₈ ClN ₃ O ₂ 283.76	146 ^{c)}	C : 86
14		C ₁₃ H ₁₈ ClN ₃ O ₂ 283.76	149 ^{a)}	C : 82
15		C ₁₃ H ₁₇ ClFN ₃ O ₂ 301.75	129 ^{c)}	C : 87
16		C ₁₆ H ₂₁ ClFN ₃ O ₃ 357.81	91 ^{a)}	C : 57

^{a)} éther diéthylique, ^{b)} CH₂Cl₂/éther diéthylique, ^{c)} CHCl₃, ^{d)} CH₃CN, ^{e)} H₂O

Tableau 7: Propriétés physico-chimiques des imidazolidin-2-ones **17-27**



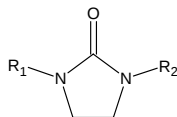
N°	R ₁	Formule brute Mr	F°C Sol. rec.	Méthode : rendement (%)
17		C ₉ H ₈ ClFN ₂ O 214.63	161 ^{a)}	D : 87
18		C ₁₀ H ₉ F ₃ N ₂ O 230.19	170 ^{a)}	D : 70
19		C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂ 260.22	120 ^{a)}	D : 55
20		C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O 221.65	140 ^{a)}	D : 86
21		C ₈ H ₁₂ N ₄ O 180.21	130 ^{a)}	D : 50
22		C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O 213.24	151 ^{a)}	D : 36

23		$C_{13}H_{17}N_3O_2$ 247.30	185 ^{d)}	D : 80
24		$C_{13}H_{17}N_3O_2$ 247.30	77 ^{d)}	D : 57
25		$C_{13}H_{16}FN_3O_2$ 265.29	237 ^{d)}	D : 57
26		$C_{14}H_{18}FN_3O$ 263.32	150 ^{a)}	E : 2
27		$C_{16}H_{20}FN_3O_3$ 321.35	224 ^{a)}	D : 36

^{a)} éther diéthylique, ^{b)} CH₂Cl₂/éther diéthylique, ^{c)} CHCl₃, ^{d)} CH₃CN, ^{e)} H₂O

Tableau 8 : Propriétés physico-chimiques des imidazolidin-2-ones

N^1 - et N^3 - disubstituées **28-36**



N°	R ₁	R ₂	Formule brute Mr	F°C Sol. rec.	Méthode : rendement (%)
28			C ₁₆ H ₁₃ BrClFN ₂ O 383.65	102 ^{a)}	F : 36
29			C ₁₆ H ₁₃ BrClFN ₂ O 383.65	144 ^{a)}	F : 45
30			C ₁₈ H ₁₆ BrF ₃ N ₂ O ₂ 429.25	96 ^{a)}	F : 24
31			C ₁₈ H ₁₆ BrF ₃ N ₂ O ₂ 429.25	98 ^{a)}	F : 40
32			C ₁₇ H ₁₃ BrClN ₃ O 390.68	194 ^{a)}	F : 46
33			C ₁₇ H ₁₃ BrClN ₃ O 390.68	180 ^{a)}	F : 37
34			C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₂ Br 416.33	172 ^{a)}	F : 28
35			C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₂ Br 416.33	156 ^{a)}	F : 57
36			C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₂ Br 416.33	144 ^{a)}	F : 40

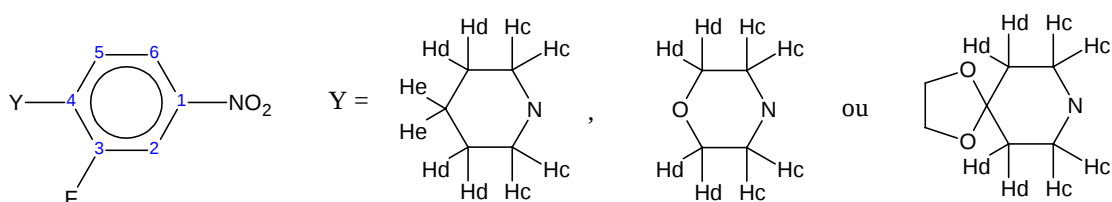
^{a)} éther diéthylique, ^{b)} CH₂Cl₂/éther diéthylique, ^{c)} CHCl₃, ^{d)} CH₃CN, ^{e)} H₂O

2.2- ETUDE SPECTRALE :

2.2.1. Propriétés IR et RMN des produits synthétisés : [58] et [59]

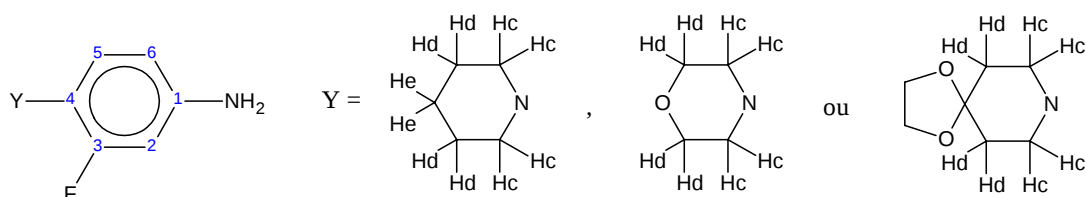
Les structures des dérivés nitrés **1** à **3**, des amines **4** à **6**, des urées **7** à **16** et des imidazolidin-2-ones **17** à **36** ont été confirmées par l'IR et les données spectrales de la RMN du ^1H . La corrélation entre la RMN du ^1H et la RMN du ^{13}C a permis de faire la distinction entre les hydrogènes H^a et H^b . En ce qui concerne la molécule **12**, l'irradiation du proton H^8 a permis de déterminer avec certitude les protons du cycle quinoléique.

Tableau 9 : Données spectrales des dérivés nitrés **1-3**



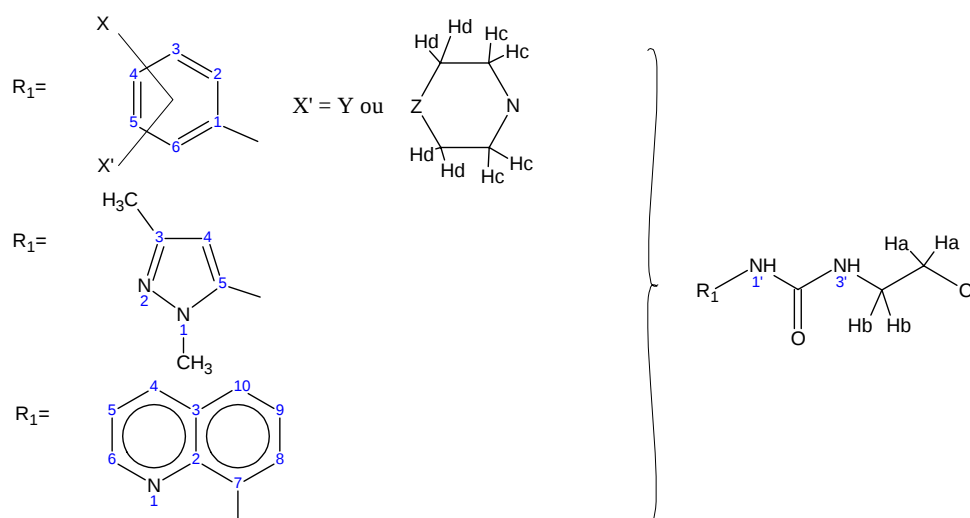
Composé N°	IR (KBr) en cm^{-1}		RMN du ^1H (CDCl_3), δ (ppm), J (Hz)
	vas NO_2	Autres fréquences	
1	1511	$\nu\text{C-F}$: 1024	1.69 (m, 6H, H^d et H^e); 3.27 (t, 4H, H^c , $\text{JH}^c\text{H}^d = 5.5$); 6.89 (d, 1H, H^5 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.9$); 7.87 (dd, 1H, H^2 , $\text{JH}^2\text{F} = 13.2$, $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.6$); 7.96 (ddd, 1H, H^6 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.9$, $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.6$, $\text{JH}^6\text{F} = 0.8$).
2	1495	$\nu\text{C-F}$: 1048	3.28 (t, 4H, H^c , $\text{JH}^c\text{H}^d = 4.7$); 3.87 (t, 4H, H^d , $\text{JH}^c\text{H}^d = 4.7$); 6.91 (d, 1H, H^5 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.8$); 7.88 (dd, 1H, H^2 , $\text{JH}^2\text{F} = 13.1$, $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.6$); 7.96 (ddd, 1H, H^6 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.8$, $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.6$, $\text{JH}^6\text{F} = 1.1$).
3	1512	$\nu\text{C-F}$: 1027	1.87 (t, 4H, H^d , $\text{JH}^c\text{H}^d = 5.8$); 3.41 (t, 4H, H^c , $\text{JH}^c\text{H}^d = 5.8$); 4.01 (s, 4H, CH_2O); 6.92 (d, 1H, H^5 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.9$); 7.89 (dd, 1H, H^2 , $\text{JH}^2\text{F} = 13.0$, $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.6$); 7.97 (dd, 1H, H^6 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.9$, $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.6$).

Tableau 10 : Données spectrales des amines 4-6



Composé N°	IR (KBr) en cm ⁻¹		RMN du ¹ H (CDCl ₃), δ (ppm), J (Hz)
	νNH ₂	Autres fréquences	
4	vas : 3445 vs : 3320	νC-F : 1029	1.53 (m, 2H, H ^e); 1.72 (m, 4H, H ^d); 2.89 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 5.4); 3.53 (s, 2H, NH ₂); 6.40 (m, 2H, H ² et H ⁶); 6.80 (dd, 1H, H ⁵ , JH ⁵ H ⁶ = JH ⁵ F = 8.6).
5	vas : 3420 vs : 3333		2.96 (s, 4H, H ^c); 3.51 (s, 2H, NH ₂); 3.85 (s, 4H, H ^d); 6.40 (m, 2H, H ² et H ⁶); 6.79 (dd, 1H, H ⁵ , JH ⁵ H ⁶ = JH ⁵ F = 8.7).
6	vas : 3457 vs : 3362	νC-F : 1029	1.89 (t, 4H, H ^d , JH ^c H ^d = 5.4); 3.05 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 5.4); 4.00 (s, 4H, CH ₂ O); 6.41 (m, 2H, H ² et H ⁶); 6.84 (dd, 1H, H ⁵ , JH ⁵ H ⁶ = JH ⁵ F = 8.6).

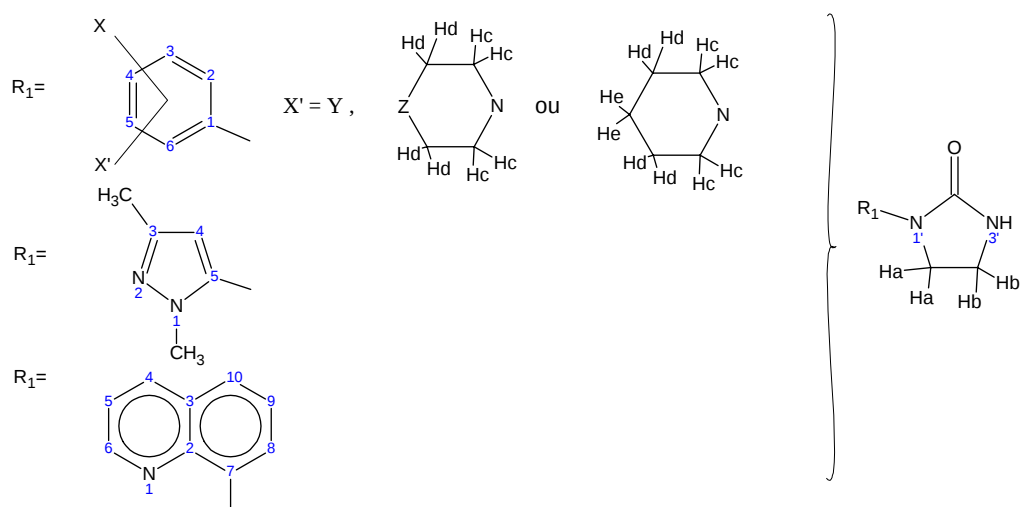
Tableau 11 : Données spectrales des urées **7-16**



Composé N°	IR (KBr) en cm^{-1}		RMN du ^1H (CDCl_3), δ (ppm), J (Hz)
	νNCON	Autres fréquences	
7	1646	$\nu\text{C-Cl}$: 823 $\nu\text{C-F}$: 1057	3.44 (q, 2H, H^b , $\text{JH}^{3'}\text{H}^b = 5.5$); 3.69 (t, 2H, H^a); 6.53 (t, 1H, $\text{H}^{3'}$, $\text{JH}^{3'}\text{H}^b = 5.5$); 7.26-7.35 (m, 2H, H^2 et H^5); 7.79 (dd, 1H, H^6 , $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.1$, $\text{JH}^6\text{H}^5 = 6.8$); 8.91 (s, 1H, $\text{H}^{1'}$).
8	1641	νNH : 3356	3.59-3.70 (m, 4H, H^a et H^b); 5.66 (se, 1H, $\text{H}^{3'}$); 7.30 (s, 1H, $\text{H}^{1'}$); 7.40 (d, 2H, H^2 et H^6 , $\text{JH}^2\text{H}^3 = \text{JH}^6\text{H}^5 = 8.5$); 7.50 (d, 2H, H^3 et H^5 , $\text{JH}^2\text{H}^3 = \text{JH}^6\text{H}^5 = 8.5$).
9	1660	νNH : 3381	3.63-3.73 (m, 4H, H^a et H^b); 3.92 (s, 3H, OCH_3); 5.27 (se, 1H, $\text{H}^{3'}$); 6.90 (d, 1H, H^3 , $\text{JH}^{3'}\text{H}^4 = 8.5$); 7.04 (s, 1H, H^6); 7.25 (d, 1H, H^4 , $\text{JH}^4\text{H}^3 = 8.5$); 8.45 (s, 1H, $\text{H}^{1'}$).
10	1656	νNH : 3327 νCN : 2228	3.60-3.70 (m, 4H, H^a et H^b); 6.01 (se, 1H, $\text{H}^{3'}$); 7.34 (dd, 1H, H^6 , $\text{JH}^6\text{H}^5 = 8.6$, $\text{JH}^6\text{H}^2 = 2.0$); 7.52 (d, 1H, H^5 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.6$); 7.71 (d, 1H, H^2 , $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.0$); 8.13 (s, 1H, $\text{H}^{1'}$).

11	1687	vNH : 3327	2.25 (s, 3H, 3-CH ₃); 3.57 (q, 2H, H ^b , JH ^{3'} H ^b = JH ^a H ^b = 5.8); 3.64 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 5.8); 3.71 (s, 3H, 1-CH ₃); 5.30 (se, 1H, H ^{3'}); 5.97 (s, 1H, H ⁴); 6.66 (s, 1H, H ^{1'}).
12	1648	vNH : 3309	3.72 (s, 4H, H ^a et H ^b); 5.61 (s, 1H, H ^{3'}); 7.39-7.45 (m, 2H, H ¹⁰ et H ⁵); 7.51 (dd, 1H, H ⁹ , JH ⁹ H ⁸ = 7.6); 8.15 (dd, 1H, H ⁴ , JH ⁴ H ⁵ = 8.3, JH ⁴ H ⁶ = 1.6); 8.63 (dd, 1H, H ⁸ , JH ⁹ H ⁸ = 7.6, JH ¹⁰ H ⁸ = 1.2); 8.74 (dd, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ⁵ = 4.2, JH ⁶ H ⁴ = 1.6); 9.10 (s, 1H, H ^{1'}).
13	1640	vNH : 3329	3.01 (s, 4H, H ^c); 3.44 (m, 2H, H ^b); 3.68 (m, 2H, H ^a); 3.74 (s, 4H, H ^d); 6.34 (se, 1H, H ^{3'}); 6.86 (d, 2H, H ³ et H ⁵ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.6); 7.29 (d, 2H, H ² et H ⁶ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.6); 8.43 (s, 1H, H ^{1'}).
14	1641	vNH : 3330	2.88 (m, 4H, H ^c); 3.58-3.70 (m, 4H, H ^a et H ^b); 3.86 (m, 4H, H ^d); 5.77 (se, 1H, H ^{3'}); 7.00-7.19 (m, 3H, H ³ , H ⁴ et H ⁵); 7.52 (s, 1H, H ^{1'}); 7.91 (dd, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ⁵ = 8.0, JH ⁶ H ⁴ = 1.5).
15	1653	vNH : 3388	3.02 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 4.5); 3.55-3.63 (m, 4H, H ^a et H ^b); 3.87 (t, 4H, H ^d , JH ^c H ^d = 4.5); 5.80 (t, 1H, H ^{3'} , JH ^{3'} H ^b = 5.6); 6.86 (dd, 1H, H ⁵ , JH ⁵ H ⁶ = 8.8, JH ⁵ F = 8.7); 6.93 (dd, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ² = 2.1, JH ⁶ H ⁵ = 8.8); 7.11 (dd, 1H, H ² , JH ⁶ H ² = 2.1, JH ² F = 13.9); 7.37 (s, 1H, H ^{1'}).
16	1686	vNH : 3392 vC-F : 1032	1.93 (se, 4H, H ^d); 3.18 (se, 4H, H ^c); 3.61 (m, 4H, H ^a et H ^b); 4.00 (s, 4H, OCH ₂); 5.51 (se, 1H, H ^{3'}); 6.94-6.99 (m, 3H, H ¹ , H ⁵ et H ⁶); 7.19 (d, 1H, H ² , JH ² F = 12.2).

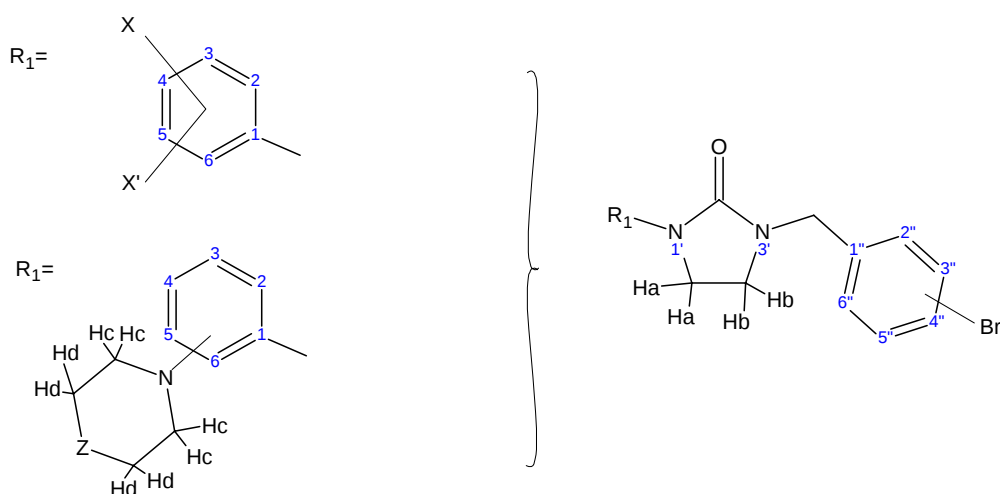
Tableau 12 : Données spectrales des imidazolidin-2-ones **17-27**



Composé N°	IR (KBr) en cm^{-1}		RMN du ^1H (CDCl_3), δ (ppm), J (Hz)
	νNCON	Autres fréquences	
17	1687	$\nu\text{C-Cl}$: 760 $\nu\text{C-F}$: 1025	3.43 (t, 2H, H^b , $\text{JH}^a\text{H}^b = 8.0$); 3.87 (t, 2H, H^a , $\text{JH}^a\text{H}^b = 8.0$); 7.16 (s, 1H, $\text{H}^{3'}$); 7.37-7.50 (m, 2H, H^2 et H^6); 7.89 (m, 1H, H^5).
18	1703		3.63 (t, 2H, H^b , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.2$); 3.93 (t, 2H, H^a , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.2$); 5.89 (s, 1H, $\text{H}^{3'}$); 7.58 (d, 2H, H^2 et H^6 , $\text{JH}^2\text{H}^3 = \text{JH}^5\text{H}^6 = 8.9$); 7.66 (d, 2H, H^3 et H^5 , $\text{JH}^2\text{H}^3 = \text{JH}^5\text{H}^6 = 8.9$).
19	1690		3.59 (t, 2H, H^b , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.3$); 3.88 (t, 2H, H^a , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.3$); 3.91 (s, 3H, OCH_3); 5.31 (s, 1H, $\text{H}^{3'}$); 6.96 (d, 1H, H^3 , $\text{JH}^3\text{H}^4 = 8.6$); 7.51 (d, 1H, H^4 , $\text{JH}^4\text{H}^3 = 8.6$); 7.64 (s, 1H, H^6).
20	1718	νCN : 2224	3.67 (t, 2H, H^b , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.4$); 3.99 (t, 2H, H^a , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.4$); 7.58 (s, 1H, $\text{H}^{3'}$); 7.64 (dd, 1H, H^6 , $\text{JH}^6\text{H}^5 = 8.8$, $\text{JH}^6\text{H}^2 = 2.1$); 7.90 (d, 1H, H^5 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = 8.8$); 8.04 (d, 1H, H^2 , $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.1$).

21	1704		2.23 (s, 3H, 3-CH ₃); 3.60 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.4); 3.74 (s, 3H, 1-CH ₃); 3.79 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.4); 5.50 (s, 1H, H ^{3'}); 5.88 (s, 1H, H ⁴).
22	1702		3.71 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 8.3); 4.30 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 8.3); 5.15 (s, 1H, H ^{3'}); 7.43 (dd, 1H, H ⁵ , JH ⁵ H ⁶ = 4.2, JH ⁴ H ⁵ = 8.3); 7.57 (dd, 1H, H ⁹ , JH ⁹ H ¹⁰ = 8.3, JH ⁹ H ⁸ = 7.3); 7.74 (dd, 1H, H ¹⁰ , JH ¹⁰ H ⁹ = 8.3, JH ¹⁰ H ⁸ = 1.3); 8.18 (dd, 1H, H ⁴ , JH ⁵ H ⁴ = 8.3, JH ⁴ H ⁶ = 1.7); 8.84 (dd, 1H, H ⁸ , JH ⁸ H ⁹ = 7.3, JH ⁸ H ¹⁰ = 1.3); 8.94 (dd, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ⁴ = 1.7, JH ⁶ H ⁵ = 4.2).
23	1692		3.07 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 4.8); 3.80 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 8.3); 3.85 (t, 4H, H ^d , JH ^c H ^d = 4.8); 4.35 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 8.3); 6.85 (d, 2H, H ³ et H ⁵ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.9); 7.20 (d, 2H, H ² et H ⁶ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.9).
24	1684		2.87 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 4.6); 3.86 (t, 4H, H ^d , JH ^c H ^d = 4.6); 3.98 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 8.5); 4.32 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 8.5); 6.97 (td, 1H, H ⁴ , JH ⁶ H ⁴ = 1.3, JH ⁵ H ⁴ = JH ³ H ⁴ = 7.1); 7.16 (m, 2H, H ³ , et H ⁵); 7.52 (se, 1H, H ^{3'}); 8.19 (d, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ⁵ = 8.1).
25	1697		2.96 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 9.1); 3.42 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.3); 3.78 (t, 4H, H ^d , JH ^c H ^d = 9.1); 3.82 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.3); 6.98 (s, 1H, H ^{3'}); 7.02 (dd, 1H, H ⁵ , JH ⁵ H ⁶ = JH ⁵ F = 8.8); 7.15 (dd, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ² = 2.3, JH ⁶ H ⁵ = 8.8); 7.62 (dd, 1H, H ² , JH ⁶ H ² = 2.3, JH ² F = 15.7).
26	1685	vC-F : 1045	1.56 (m, 2H, H ^e); 1.71 (m, 4H, H ^d); 2.95 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 5.1); 3.36 (se, 1H, H ^{3'}); 3.81 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 8.3); 4.40 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 8.3); 6.88 (d, 2H, H ⁵ et H ⁶ , JH ⁶ H ⁵ = 6.1); 7.09 (d, 1H, H ² , JH ² F = 14.7).
27	1686	vC-F : 1034	1.90 (s, 4H, H ^d); 3.13 (s, 4H, H ^c); 3.57 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.4); 3.90 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.4); 4.00 (s, 4H, OCH ₂); 4.72 (s, 1H, H ^{3'}); 6.96 (d, 1H, H ⁵ , JH ⁶ H ⁵ = 9.2); 7.10 (d, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ⁵ = 9.2); 7.43 (d, 1H, H ² , JH ² F = 12.3).

Tableau 13 : Données spectrales des imidazolidin-2-ones N^1 - et N^3 - disubstituées **28-36**



Composé N°	IR (KBr) en cm^{-1}	RMN du ^1H (CDCl_3), δ (ppm), J (Hz)
	νNCON	
28	1703	3.37 (t, 2H, H^b , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.6$); 3.77 (t, 2H, H^a , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.6$); 4.43 (s, 2H, $3'\text{-CH}_2$); 7.11 (t, 1H, H^5 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = \text{JH}^5\text{F} = 9$); 7.20 (d, 2H, $\text{H}^{2''}$, et $\text{H}^{6''}$, $\text{JH}^{3''}\text{H}^{2''} = \text{JH}^{5''}\text{H}^{6''} = 8.4$); 7.44 (ddd, 1H, H^6 , $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.8$, $\text{JH}^6\text{H}^5 = 9$, $\text{JH}^6\text{F} = 4$); 7.49 (d, 2H, $\text{H}^{3''}$, et $\text{H}^{5''}$, $\text{JH}^{3''}\text{H}^{2''} = \text{JH}^{5''}\text{H}^{6''} = 8.4$); 7.68 (dd, 1H, H^2 , $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.8$, $\text{JH}^2\text{F} = 6.4$).
29	1702	3.42 (t, 2H, H^b , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.2$); 3.79 (t, 2H, H^a , $\text{JH}^a\text{H}^b = 7.2$); 4.63 (s, 2H, $3'\text{-CH}_2$); 7.11 (t, 1H, H^5 , $\text{JH}^5\text{H}^6 = \text{JH}^5\text{F} = 9$); 7.19 (ddd, 1H, $\text{H}^{4''}$, $\text{JH}^{4''}\text{H}^{3''} = 7.9$, $\text{JH}^{4''}\text{H}^{6''} = 1.9$); 7.32 (ddd, 1H, $\text{H}^{5''}$, $\text{JH}^{6''}\text{H}^{5''} = 7.1$, $\text{JH}^{3''}\text{H}^{5''} = 1.1$); 7.41 (dd, 1H, $\text{H}^{6''}$, $\text{JH}^{6''}\text{H}^{5''} = 7.1$, $\text{JH}^{4''}\text{H}^{6''} = 1.9$); 7.46 (ddd, 1H, H^6 , $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.8$, $\text{JH}^6\text{H}^5 = 9$, $\text{JH}^6\text{F} = 4$); 7.59 (dd, 1H, $\text{H}^{3''}$, $\text{JH}^{3''}\text{H}^{4''} = 7.9$, $\text{JH}^{5''}\text{H}^{3''} = 1.1$); 7.69 (dd, 1H, H^2 , $\text{JH}^2\text{H}^6 = 2.8$, $\text{JH}^2\text{F} = 6.4$).
30	1706	3.35 (m, 2H, H^b); 3.76 (m, 2H, H^a); 3.90 (s, 3H, OCH_3); 4.42 (s, 2H, $3'\text{-CH}_2$); 6.99 (d, 1H, H^3 , $\text{JH}^4\text{H}^3 = 8.5$); 7.23 (d, 2H, $\text{H}^{2''}$, et $\text{H}^{6''}$, $\text{JH}^{3''}\text{H}^{2''} = \text{JH}^{5''}\text{H}^{6''} = 8.5$); 7.47-7.51 (m, 3H, $\text{H}^{3''}$, $\text{H}^{5''}$ et H^4); 7.67 (s, 1H, H^6).

31	1690	3.47 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.2); 3.80 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.2); 3.91 (s, 3H, OCH ₃); 4.62 (s, 2H, 3'-CH ₂); 7.01 (d, 1H, H ³ , JH ⁴ H ³ = 8.7); 7.18 (dd, 1H, H ^{4''} , JH ^{5''} H ^{4''} = 7.4); 7.34 (dd, 1H, H ^{5''} , JH ^{5''} H ^{4''} = 7.4); 7.48 (m, 2H, H ^{3''} et H ^{6''}); 7.58 (d, 1H, H ⁴ , JH ⁴ H ³ = 8.7); 7.69 (s, 1H, H ⁶).
32	1705	3.43 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.6); 3.83 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.6); 4.45 (s, 2H, 3'-CH ₂); 7.19 (d, 2H, H ^{2''} et H ^{6''} , JH ^{3''} H ^{2''} = JH ^{5''} H ^{6''} = 8.3); 7.50 (d, 2H, H ^{3''} , et H ^{5''} , JH ^{3''} H ^{2''} = JH ^{5''} H ^{6''} = 8.3); 7.60 (s, 2H, H ⁵ et H ⁶); 7.84 (s, 1H, H ²).
33	1710	3.53 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.3); 3.84 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.3); 4.65 (s, 2H, 3'-CH ₂); 7.20 (ddd, 1H, H ^{4''} , JH ^{4''} H ^{3''} = 7.8, JH ^{4''} H ^{6''} = 1.8); 7.33 (ddd, 1H, H ^{5''} , JH ^{6''} H ^{5''} = 7.6); 7.40 (dd, 1H, H ^{6''} , JH ^{6''} H ^{5''} = 7.6, JH ^{4''} H ^{6''} = 1.8); 7.60-7.62 (m, 3H, H ⁵ , H ⁶ et H ^{3''}); 7.85 (s, 1H, H ²).
34	1659	3.10 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 4.7); 3.35 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.8); 3.86 (t, 4H, H ^d , JH ^c H ^d = 4.7); 4.31 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.8); 4.53 (s, 2H, 3'-CH ₂); 6.86 (d, 2H, H ³ et H ⁵ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.8); 7.05 (d, 2H, H ² et H ⁶ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.8); 7.27 (d, 2H, H ^{2''} et H ^{6''} , JH ^{6''} H ^{5''} = JH ^{2''} H ^{3''} = 8.3); 7.48 (d, 2H, H ^{3''} et H ^{5''} , JH ^{6''} H ^{5''} = JH ^{2''} H ^{3''} = 8.3).
35	1665	3.10 (t, 4H, H ^c , JH ^c H ^d = 4.7); 3.46 (t, 2H, H ^b , JH ^a H ^b = 7.7); 3.87 (t, 4H, H ^d , JH ^c H ^d = 4.7); 4.35 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 7.7); 4.73 (s, 2H, 3'-CH ₂); 6.86 (d, 2H, H ³ et H ⁵ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.9); 7.06 (d, 2H, H ² et H ⁶ , JH ² H ³ = JH ⁶ H ⁵ = 8.9); 7.17 (ddd, 1H, H ^{4''} , JH ^{4''} H ^{3''} = 1.6, JH ^{3''} H ^{4''} = 7.9); 7.33 (ddd, 1H, H ^{5''} , JH ^{6''} H ^{5''} = 7.6, JH ^{3''} H ^{5''} = 1.1); 7.52 (dd, 1H, H ^{6''} , JH ^{6''} H ^{5''} = 7.6, JH ^{4''} H ^{6''} = 1.6); 7.58 (dd, 1H, H ^{3''} , JH ^{3''} H ^{4''} = 7.9, JH ^{3''} H ^{5''} = 1.1).
36	1646	2.98 (se, 4H, H ^c); 3.86 (m, 6H, H ^b et H ^d); 4.30 (t, 2H, H ^a , JH ^a H ^b = 8.5); 4.92 (s, 2H, 3'-CH ₂); 6.92-6.94 (m, 2H, H ³ et H ⁵); 7.02 (d, 1H, H ⁶ , JH ⁶ H ⁵ = 7.8); 7.09 (d, 2H, H ^{2''} et H ^{6''} , JH ^{6''} H ^{5''} = JH ^{2''} H ^{3''} = 8.3); 7.20 (m, 1H, H ⁴); 7.35 (d, 2H, H ^{3''} et H ^{5''} , JH ^{6''} H ^{5''} = JH ^{2''} H ^{3''} = 8.3).

2.3-. ETUDE PHARMACOLOGIQUE :

2.3.1- Tests *in vitro* :

Ces évaluations ont été réalisées par le laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Nantes.

2.3.1.1- Test sur splénocytes de souris en présence de concanavaline A (Con A) : [57]

2.3.1.1.1- Principe :

Ce test de screening consiste à évaluer l'activité inhibitrice des produits testés sur la prolifération de splénocytes de souris en présence de concanavaline A (Con A). La concanavaline A est une lectine d'origine végétale de 26 kDa qui, par ses propriétés de mitogène, stimule la prolifération cellulaire.

2.3.1.1.2- Mode opératoire :

Les tests ont été réalisés sur des souris femelle C57/BL6 (Janvier, Laval) âgées de 8 à 9 semaines. Les souris ont été exsanguinées et leur rate a été excisée et placée dans des boîtes de Pétri stériles contenant du milieu HBSS (Sigma, St Quentin-Fallavier, France). Une suspension de rate a été réalisée dans du HBSS et traitée avec un tampon spécifique de lyse des globules rouges du sang contenant 0,02M de Tris-HCl et 0,14M de NH₄Cl. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du milieu HBSS et resuspendues en milieu RPMI (Sigma) dans lequel a été ajouté 1% de L-glutamine (Gibco BRL, Paisley, Scotland), 10% de SCF inactivé (Sigma) et 50µM de M-2-mercaptoéthanol (Sigma).

Les cellules spléniques ont par la suite été semées à $1,5 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques de 96 puits à fond U (Falcon). Les cellules ont alors été incubées avec 1µg/mL de Concanavalin A (Sigma) en présence des imidazolidinones à tester à différentes concentrations (30µM et 90µM) ou de la CsA (5µM) et mises en culture à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le volume final a été ajusté à 150µL avec du milieu RPMI complété.

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée en sextuplate après 72 h de culture. Cette analyse se fait par la méthode au MTT qui repose sur la réduction de sels de tétrazolium par les dehydrogénases mitochondriales. Les absorbances ont été déterminées à 570nm au moyen d'un lecteur de microplaques (Dynex Technologies, Guyancourt, France).

2.3.1.2- Inhibition de la prolifération des lymphocytes T induite par la phytohémagglutinine (PHA) : [53]

2.3.1.2.1- Principe :

Ce test est réalisé sur les molécules qui présentent une activité inhibitrice significative dans le test précédemment décrit.

Cette étude vise à déterminer l'activité inhibitrice des dérivés testés sur la prolifération lymphocytaire induite par la PHA.

La PHA est une lectine d'origine végétale classiquement utilisée pour tester la prolifération des lymphocytes T. Elle constitue un stimulus non spécifique de la prolifération des lymphocytes T faisant intervenir des molécules telles que CD2 ou CD3. La présence de CPA est indispensable à cette prolifération.

2.3.1.2.2- Mode opératoire :

Dans ce test, des lymphocytes du sang périphérique (PBL pour "Peripheral Blood Lymphocytes") ont été purifiés à partir du sang frais d'un donneur au moyen d'un gradient de Ficoll-hypaque.

Ces lymphocytes totaux ont ensuite été mis en contact avec la PHA (0,1µM) et différentes doses des imidazolidinones à tester pendant 72 h.

L'évaluation de la prolifération lymphocytaire a été réalisée grâce à l'analyse de l'incorporation de thymidine tritiée sur les 8 dernières heures de l'expérience.

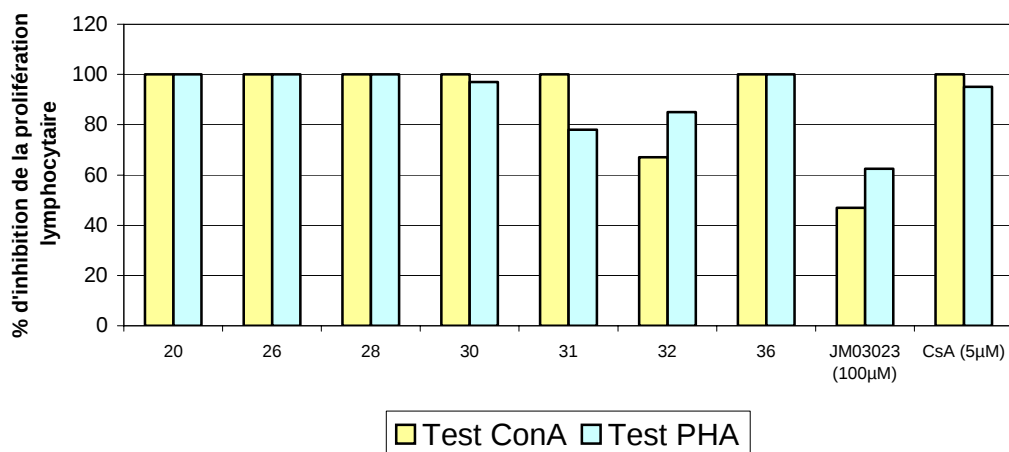
2.3.1.3- Résultats :

Tableau 14 : Effets des molécules évaluées dans les deux tests en comparaison avec la ciclosporine A (CsA) et JM03023 (17)

	Pourcentage d'inhibition (en %) de la prolifération des splénocytes de souris induite par la Con A par les molécules testées (90 µM)	Pourcentage d'inhibition (en %) de la prolifération des PBL induite par la PHA par les molécules testées (100 µM)
18	inactif	inactif
19	inactif	ND
20	100	100
21	inactif	ND
22	inactif	ND
23	inactif	ND
24	inactif	ND
25	39	inactif
26	100	100
27	inactif	ND
28	100	100
29	inactif	ND
30	100	97
31	100	78
32	67	85
33	inactif	ND
34	inactif	ND
35	inactif	ND
36	100 (à 90 et 30 µM)	100 (à 50 et 25µM)t
JM03023 (17) : 100 µM	47	60-65
CsA (5 µM : dose optimale)	100	90-100

ND: non déterminé.

Tableau 15 : Graphique récapitulatif des résultats pharmacologiques des molécules les plus actives



L'analyse des premiers résultats permet d'identifier sept molécules (20, 26, 28, 30, 31, 32 et 36) présentant une activité immunosuppressive *in vitro* intéressante.

Cinq molécules (20, 26, 28, 30, et 36) inhibent pratiquement totalement la prolifération lymphocytaire avec des pourcentages d'inhibition de la prolifération proches de 100 % comme ce que l'on peut observer avec la ciclosporine A à la dose optimale de 5μM.

Deux molécules (30 et 31) présentent des pourcentages d'inhibition de la prolifération inférieurs mais ces résultats sont tout de même supérieurs à ceux observés avec JM03023 (17), molécule chef de file, ayant servi de point de départ pour nos pharmacomodulations.

2.3.2- Tests *in vivo* :

A l'heure actuelle, un seul test *in vivo* a été réalisé. Ce test consiste à déterminer l'effet des dérivés testés sur un modèle expérimental d'hypersensibilité retardée (ou DTH pour "Delayed Type Hypersensitivity").

2.3.2.1- Principe : [53]

La DTH ou hypersensibilité de type IV est une réaction immunitaire pathologique exagérée, à médiation cellulaire, contre un antigène externe. Le mécanisme détaillé de ce phénomène a été décrit dans la première partie (cf. 1.2.2.2.2).

Le modèle expérimental utilisé pour ces tests est une DTH induite par des hématies de mouton.

L'hypersensibilité se caractérise alors par une induration et une tuméfaction au niveau du point d'injection de l'antigène. Au niveau cellulaire, on observe un infiltrat important de cellules mononucléées : macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes T.

2.3.2.2- Mode opératoire : [53]

L'immunisation primaire de souris femelle Balb/C a été réalisée (J=0) avec des hématies de mouton (Biomérieux, France) par voie I.V..

L'administration des imidazolidinones à tester à différentes doses a débuté à J=0 et s'est poursuivi jusqu'à J=4.

L'immunisation secondaire a été réalisée à J=4 par injection sous-cutanée des hématies au niveau d'une des deux pattes arrières. L'autre patte, non traitée, a servi de témoin.

Les mesures ont été réalisées à J=5. La variable mesurée a été la différence entre la mesure de l'épaisseur de la patte inflammatoire et celle de la patte témoin.

L'efficacité du traitement a pu être évaluée en comparant la valeur moyenne obtenue chez un lot de souris traitées par rapport à celle obtenue chez un lot témoin non traité.

2.3.2.3- Résultats :

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 16 : Résultats des tests de détermination de la DTH

Molécule testée	% d'inhibition de la DTH
CsA (à 50mg/Kg)	73,9
Dexaméthasone (à 0,5mg/Kg)	53,5
Trancamide ou JM34 (à 150mg/Kg)	49,5
JM03023 (à 80mg/Kg)	74
20 (à 50 mg/Kg)	66.8
36 (à 50 mg/Kg)	72.7

Les résultats des tests *in vivo* confirment bien l'existence d'un effet immunosuppresseur des molécules 20 et 36 qui présentent, dans ces conditions, des activités comparables à celle de la CsA à la même dose.

La molécule 20 a très bien été tolérée par les souris au cours de ces tests ce qui est encourageant en ce qui concerne son profil de toxicité.

Les autres molécules actives *in vitro* sont en cours d'évaluation pour confirmer leur effet *in vivo* sur ce modèle.

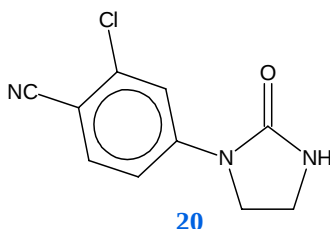
2.3.3- Analyse des résultats :

Les tests réalisés ont permis d'identifier sept molécules (20, 26, 28, 30, 31, 32 et 36) présentant une activité immunosuppressive *in vitro* intéressante.

Des évaluations complémentaires concernant la toxicité de ces molécules et leur activité *in vivo* sont actuellement en cours de réalisation.

D'après les premiers résultats, les molécules 20 et 36 confirment bien leur activité immunosuppressive *in vivo*.

La molécule 20 s'avère, selon les premières données, faiblement toxique.



D'une manière générale, il semble que la N^3 -substitution par un groupement 4-bromobenzyle soit favorable à l'activité immunosuppressive.

Par exemple, la molécule 19 est inactive alors que la molécule dérivée 30 entraîne 100 % d'inhibition de la prolifération des splénocytes à 90 μ M.

De même, lorsque l'on greffe un groupement 4-bromobenzyle en N^3 sur les molécules 17 et 24, faiblement actives (47 et 26 % d'inhibition de la prolifération des splénocytes à 90 μ M respectivement), on obtient les molécules 28 et 36 qui inhibent à 100 % la prolifération des splénocytes à 90 μ M.

Un exemple vient cependant nuancer cette affirmation. En effet, la molécule 20, qui entraîne 100 % d'inhibition de la prolifération dans les deux tests à 90 et 100 μ M, donne par N^3 -substitution par un groupement 4-bromobenzyle, la molécule 32 qui est moins active (67 % d'inhibition de la prolifération des splénocytes à 90 μ M).

La N^3 -substitution par un groupement 2-bromobenzyle s'est avérée défavorable à l'activité dans la plupart des cas. En effet, les molécules **29** et **33** sont complètement inactives dans les tests in vitro réalisés alors que leur analogue non substitué (**17** et **20** respectivement) était actif.

Dans un cas, cette substitution a néanmoins été favorable. En effet, la molécule **19**, inactive, a donné, par cette modulation, la molécule **31** qui entraîne 100 % d'inhibition de la prolifération des splénocytes à 90µM.

Enfin, si l'on regarde les pourcentages d'inhibition de la prolifération des splénocytes à 90µM pour les molécules **34** et **36** (19 % et 100 % respectivement), il se dégage que la fixation d'un groupement morpholinyle en *ortho* (au lieu de *para*) du groupement phényle est beaucoup plus favorable à l'activité.

CONCLUSION

Au cours de ces travaux, 34 nouveaux produits ont été synthétisés.

Parmi ces molécules, seules les imidazolidinones ont été testées (ou sont actuellement en cours d'évaluation) en ce qui concerne leur éventuelle activité immunosuppressive.

Les premiers résultats *in vitro* permettent d'identifier sept nouvelles molécules (20, 26, 28, 30, 31, 32 et 36) présentant, dans les tests réalisés, une activité supérieure à celle observée avec le chef de file JM03023, avec des résultats comparables à ceux de la ciclosporine A à la dose optimale de 5µM pour cinq d'entre elles.

Les molécules 20 et 36 confirment leur effet immunosuppresseur *in vivo* sur un modèle de DTH avec, dans ces conditions, des activités comparables à celle de la CsA à la même dose.

La molécule 20, du fait de sa faible toxicité, selon les premiers tests réalisés, s'avère particulièrement intéressante.

Ce travail de pharmacomodulation sur le modèle structural de JM03023 (17) a donc permis d'optimiser l'activité de ces molécules.

D'autres études pharmacologiques *in vitro*, sur des lymphocytes T humains, et *in vivo*, sur des modèles animaux, sont nécessaires pour confirmer cette activité immunosuppressive.

Des investigations complémentaires sont actuellement en cours pour tenter de déterminer la cible de telles structures.

Ces résultats encourageants justifient la poursuite des pharmacomodulations autour de ce modèle structural afin d'étudier les **relations structure/activité**, d'**optimiser l'activité** et d'**affiner**, en parallèle, **nos connaissances concernant le mécanisme d'action de ces molécules**.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Katzung, G.B., Pharmacologie fondamentale et clinique, 7^{ème} édition, Piccin Nuova Libreria S.p.A., 947-963 (2000);
- [2] Male, D., Immunologie, aide mémoire illustré, 3^{ème} édition, De Boeck Université Paris, 67 (1999);
- [3] Male, D., Immunologie, aide mémoire illustré, 3^{ème} édition, De Boeck Université Paris, 80-83 (1999);
- [4] Collège universitaire des enseignants de Néphrologie, Néphrologie, Ellipses Edition, 295-321 (2003);
- [5] Bach, J.-F., Chatenoud, L., Immunologie, 4^{ème} édition, Médecine-Sciences, Flammarion, 203-214 (2002);
- [6] Male, D., Immunologie, aide mémoire illustré, 3^{ème} édition, De Boeck Université Paris, 96-97 (1999);
- [7] Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Immunologie, le cours de Janis Kuby, 4^{ème} édition, W.H. Freeman and Company, 517-535 (2000);
- [8] Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Immunologie, le cours de Janis Kuby, 4^{ème} édition, W.H. Freeman and Company, 250-256 (2000);
- [9] <http://www.assim.refer.org/transy.htm>;
- [10] Bach, J.-F., Chatenoud, L., Immunologie, 4^{ème} édition, Médecine-Sciences, Flammarion, 86-91 (2002);
- [11] Bach, J.-F., Chatenoud, L., Immunologie, 4^{ème} édition, Médecine-Sciences, Flammarion, 341-349 (2002);

- [12] Male, D., Immunologie, aide mémoire illustré, 3^{ème} édition, De Boeck Université Paris, 70-72 (1999);
- [13] Bach, J.-F., Chatenoud, L., Immunologie, 4^{ème} édition, Médecine-Sciences, Flammarion, 130-141 (2002);
- [14] Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Immunologie, le cours de Janis Kuby, 4^{ème} édition, W.H. Freeman and Company, 497-515 (2000);
- [15] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 816-821 (2000);
- [16] <http://www.google.fr>;
- [17] <http://www.vidalpro.net>;
- [18a] Schorderet, M., Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 3^{ème} édition, Editions Frison-Roche et éditions Slatkine, 923 (1998);
- [18b] Allain, P., Pharmacologie, les médicaments, 2^{ème} édition, CdM Editions, 361-364 (1999);
- [19] Boulieu, R., Bolon, M., Mornex, J.-F., Pharmacie clinique et Thérapeutique, traitements médicamenteux de la greffe, 2^{ème} édition, Masson, 1168-1183 (2002);
- [20] Moulin, M., Coquerel, A., L'abrégé de Pharmacologie, 2^{ème} édition, Masson, 439-446 (2002);
- [21] Allison, A.C., Immunosuppressive drugs : the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology, **47**, 63-83 (2000);
- [22] Allison, A.C., Eugui, E.M., Mycophenolate mofetil and its mechanism of action. Immunopharmacology, **47**, 85-118 (2000);

- [23] Stepkowski, S.M., Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. ISSN, Cambridge University Press, 1462-3994 (2000);
- [24] Konno, Y., Natsumeda, Y., Nagai, M., Yamaji, Y., Ohno, S., Suzuki, K., Weber, G., Expression of IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. J. Biol. Chem., **266**, 506-509 (1991);
- [25] Nagai, M., Natsumeda, Y., Weber, G., Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. Cancer Res., **52**, 258-261 (1992);
- [26] Allison, A.C., Eugui, E.M., The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. Springer Semin. Immunopathol., **14**, 353-380 (1993);
- [27] Itoh, H., Komatsuda, A., Wakui, H., Miura, A.B., Tashima, Y., Mammalian HSP60 is a major target for an immunosuppressant mizoribine. J. Biol. Chem., **274**(49), 35147-35151 (1999);
- [28] Herrmann, M.L., Leflunomide : an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other auto-immune diseases. Immunopharmacology, **47**, 273-289 (2000);
- [29] Schuurman, H.-J., Tanner, M., Pally, C., Jaffee, B.D., Brequinar and brequinar analogues in rat allo- and xeno-transplantation. Transplantation Proceedings, **30**, 2240-2243 (1998);
- [30] Genestier, L., Paillot, R., Quemeneur, L., Izeradjene, K., Revillard, J.-P., Mechanism of action of methotrexate. Immunopharmacology, **47**, 247-257 (2000);
- [31] CMIT, Infections et immunodépression. In : CMIT, ed. E. PILLY, Montmorency : 2M2 Ed, 529-533 (2004);
- [32] CMIT, Toxoplasmose. In : CMIT, ed. E. PILLY, Montmorency : 2M2 Ed, 468-470 (2004);
- [33] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 1512-1513 (2000);

- [34] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 828-829 (2000);
- [35] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 838-839 (2000);
- [36] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 830-831 (2000);
- [37] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 1484-1485 (2000);
- [38] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 836-837 (2000);
- [39] Dorosz, Ph., Guide pratique des Médicaments, 20^{ème} édition, Maloine, 832-833 (2000);
- [40a] Binderup, L., Latini, S., Binderup, E., Bretting, C., Calverley, M., Hansen, K., 20-epi-vitamin D₃ analogues : a novel class of potent regulators of cell growth and immune responses. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 1569-1575 (1991);
- [40b] Gniadecki, R., Serup, J., Stimulation of epidermal proliferation in mice with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and receptor-active 20-epi analogues of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem. Pharmacol.*, **49**(5), 621-624 (1995);
- [41] Ismaili, J., Tassignon, J., Le Moine, A., Azodicarbonamide as a new immunosuppressive agent. *Transplantation*, **67**, S26 (1989);
- [42] Zhou, T., Song, L., Yang, P., Wang, Z., Lui, D., Joep, R.S., Bisindolylmaleimide VIII facilitates Fas-mediated apoptosis and inhibits T-cell-mediated autoimmune diseases. *Nat. Med.*, **5**, 42-48 (1999);
- [43] Kahan, B.D., FTY720 : from bench to bedside. *Transplantation Proceedings*, **36**(2), supp.1, S531-S543 (2004);
- [44] Denton, M.D., Magee, C.C., Sayegh, M.H., Immunosuppressive strategies in transplantation. *The Lancet.*, **353**, 1083-1091 (1999);

- [45] Kirk, A.D., Harlan, D.M., Armstrong, N.N., Davis, T.A., Dong, Y., Gray, G.S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J.H. Jr, Knechtle, S.J., CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 8789-8794 (1997);
- [46] Braun, F., Lorf, T., Ringe, B., Update of current immunosuppressive drugs used in clinical organ transplantation. *Transpl. Int.*, **11**, 77-81 (1998);
- [47] Bang L.M., Keating G.M., Adalimumab : a review of its use in rheumatoid arthritis. *BioDrugs.*, **18**(2), 121-39 (2004);
- [48] Noguchi, H., Matsushita, M., Okitsu, T., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Kang, S., Li, S.T., Kobayashi, N., Matsumoto, S., Tanaka, K., Tanaka, N., Matsui, H., A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med.*, **10**(3), 305-309 (2004);
- [49] Paczek, L., New concepts in organ transplantation. *Transplantation Proceedings*, **36**(5), 1232-1234 (2004);
- [50] Mealy, N.E., Castaner, R., Martin, L., del Fresno, M., Revel, L., Bayes, M., Sorbera, L.A., Cole, P., Leeson, P.A., Prous, J., Treatment of transplant rejection. *Drugs of the Future*, **27**(5), 495-508 (2002);
- [51] Robert-Piessard, S., Le Baut, G., Courant, J., Brion, J.D., Sparfel, L., Bouhayat, S., Petit, J.-Y., Sanchez, R.-Y., Jugé, M., Grimaud, N., Welin, L., Non acidic anti-inflammatory compounds : activity of N-(4,6-dimethyl-2-pyridinyl)benzamides and derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **25**, 9-19 (1990);
- [52] Robert, J.-M., Robert-Piessard, S., Duflos, M., Le Baut, G., Khetab, E.N., Grimaud, N., Petit, J.-Y., Welin, L., *Eur. J. Med. Chem.*, **29**, 841-854 (1994);
- [53] Lang, F., Carbonnelle, D., Petit, J.-Y., Robert, J.-M., French Patent, n° 01.16443, (December 2001);

- [54] Bach, J.-F., Chatenoud, L., Immunologie, 4^{ème} édition, Médecine-Sciences, Flammarion, 91-98 (2002);
- [55] Abdala, H., Robert, J.-M., Le Pape, P., Wielgosz, G., Robert-Piessard, S., Le Baut, G., Arneimitt. Forschung/Drug Research, **50**, 479-484 (2000);
- [56] Robert, J.-M., Sabourin, C., Alvarez, N., Robert-Piessard, S., Le Baut, G., Le Pape, P., Synthesis and antileishmanial activity of new imidazolidin-2-one derivatives, Eur. J. Med. Chem., **38**, 711-718 (2003);
- [57] Sabourin, C., Robert, J.-M., Robert-Piessard, S., Carbonnelle, D., Lang, F., Synthesis and evaluation of disubstituted N^1 - and N^3 -imidazolidin-2-ones acting as potential immunosuppressive agents. J. Enz. Inh. Med. Chem., **19** (2004), sous presse;
- [58] Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W., Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, 2^{ème} édition, Springer-Verlag (1998);
- [59] Silverstein, R.M., Basler, G.C., Morill, T.C., Identification spectrométrique de composés organiques, 5^{ème} édition, De Boeck Université Paris (1998).

Nom – Prénoms : SABOURIN Caroline, Alice, Elisabeth

Titre de la Thèse : Les applications cliniques de l'immunosuppression :

Etat des lieux et perspectives d'avenir, à propos de la synthèse et de l'évaluation pharmacologique de nouvelles molécules à structure imidazolidin-2-ones.

Résumé de la Thèse :

L'induction d'une immunosuppression thérapeutique est parfois nécessaire pour lutter contre des réactions immunitaires indésirables ou pathologiques. Les immunosuppresseurs sont donc principalement utilisés, en clinique, pour la prévention et le traitement du rejet d'allogreffe. Ils font également partie du traitement de certaines maladies auto-immunes telles que le diabète de type I, la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux disséminé.

Les molécules actuelles sont efficaces pour prévenir et/ou traiter le rejet aigu d'allogreffe mais ont peu d'effet sur la survenue des rejets chroniques responsables de la perte du greffon. De plus, leur très forte toxicité limite leur utilisation dans le domaine des maladies auto-immunes et implique un suivi thérapeutique très drastique. Enfin, leur manque de spécificité est souvent responsable d'une dépression généralisée de l'immunité favorisant les complications infectieuses et néoplasiques. La découverte de nouvelles voies thérapeutiques est donc nécessaire.

Les recherches dans le domaine de l'allogreffe vont dans le sens du développement d'une tolérance du receveur à l'égard des cellules du donneur. L'induction d'une anergie clonale des lymphocytes, en inhibant les signaux de co-stimulation ou la maturation des CPA, permettrait de favoriser la mise en place d'un état de tolérance.

Les travaux rapportés ici, concernant la synthèse d'imidazolidin-2-ones N^1 - et/ou N^3 -substituées, ont permis d'identifier sept molécules présentant une activité immunosuppressive significative *in vitro*, avec des résultats comparables à ceux obtenus avec la CsA, qui ont été confirmés *in vivo* pour deux d'entre elles.

Des études complémentaires sont en cours pour tenter de déterminer la cible de telles structures.

MOTS CLES : - IMMUNOSUPPRESSEURS,
- **ALLOGREFFES,**
- **MALADIES AUTO-IMMUNES,**
- **IMIDAZOLIDIN-2-ONES.**

Adresse de l'auteur : 6, rue de Budapest, 44000 Nantes