



HAL
open science

Élaboration d'un protocole d'essai pré-clinique concernant une L-asparaginase vétérinaire innovante pour le traitement des lymphomes canins

Solène Rique

► **To cite this version:**

Solène Rique. Élaboration d'un protocole d'essai pré-clinique concernant une L-asparaginase vétérinaire innovante pour le traitement des lymphomes canins. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03857539

HAL Id: dumas-03857539

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03857539v1>

Submitted on 17 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2022 - Thèse n°57

**ELABORATION D'UN PROTOCOLE D'ESSAI PRE-
CLINIQUE CONCERNANT UNE L-ASPARAGINASE
VETERINAIRE INNOVANTE POUR LE TRAITEMENT DES
LYMPHOMES CANINS**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de

l'Université de Nantes le 07/10/2022

par

Solène RIQUE

Sous la direction de

Catherine IBISCH

Président du jury : Monsieur Patrick LUSTENBERGER, Professeur émérite à la faculté de Médecine de Nantes

Membre du jury : Monsieur Hervé POULIQUEN, Professeur de Pharmacie et Toxicologie à Oniris

Membre invité : Madame Mathilde MOSSER, Docteur/PhD

ANNEE 2022 - Thèse n°57

**ELABORATION D'UN PROTOCOLE D'ESSAI PRE-
CLINIQUE CONCERNANT UNE L-ASPARAGINASE
VÉTÉRINAIRE INNOVANTE POUR LE TRAITEMENT DES
LYMPHOMES CANINS**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de

l'Université de Nantes le 07/10/2022

par

Solène RIQUE

Sous la direction de

Catherine IBISCH

Président du jury : Monsieur Patrick LUSTENBERGER, Professeur émérite à la faculté de Médecine de Nantes

Membre du jury : Monsieur Hervé POULIQUEN, Professeur de Pharmacie et Toxicologie à Oniris

Membre invité : Madame Mathilde MOSSER, Docteur/PhD

Département **BPSA** Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment

Responsable : **Emmanuel JAFFRES** – Adjointe : **Frédérique NGUYEN**

Nutrition et Endocrinologie		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Adélie SALIN (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie		
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC) Florence TEXIER (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC)	Emmanuel JAFFRES (MC) Mathilde MOSSER (mc) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	

Département **SAESP** Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique

Responsable : **Raphaël GUATTEO** – Adjoint : **Jean-Michel CAPPELIER**

Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (MC HDR) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (CERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR) Sofia STRUBBIA (MC)

Département **DSC** Sciences cliniques

Responsable : **Catherine IBISCH** – Adjoint : **Marion FUSELLIE**

Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC HDR) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (MC HDR) Lamia BRIAND (MC HDR)

Département **GPA** Génie des procédés alimentaires

Responsable : **Sébastien CURET-PLOQUIN** – Adjointe : **Vanessa JURY**

Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (MC HDR) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
--	--	---

Département **MSC** Management, statistiques et communication

Responsable : **Samira ROUSSELIERE** – Adjointe : **Véronique CARIOU**

Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (MC HDR) Philippe COURCOUX (MC) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GOYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.
Cont. : Enseignant Contractuel

Table des matières

Introduction.....	- 9 -
Partie 1 : Etude bibliographique : la L-asparaginase.....	- 11 -
1. Historique.....	- 13 -
2. Fonctionnement de la L-asparaginase.....	- 13 -
2.1. La L-asparagine.....	- 13 -
2.2. La L-asparaginase.....	- 14 -
2.3. Action de la L-asparaginase.....	- 17 -
3. Indications en médecine vétérinaire.....	- 18 -
4. Spécialités pharmaceutiques et indications chez l'homme.....	- 18 -
5. Disponibilité des asparaginases en France.....	- 20 -
6. Utilisation en médecine vétérinaire.....	- 21 -
6.1. Les lymphomes malins.....	- 21 -
6.1.1. Du chien.....	- 21 -
6.1.2. Du chat.....	- 23 -
6.2. Les leucémies.....	- 24 -
6.3. Les L-asparaginases en médecine vétérinaire.....	- 25 -
6.4. Les protocoles de chimiothérapie.....	- 26 -
6.4.1. Les lymphomes malins.....	- 26 -
6.4.2. Les leucémies.....	- 30 -
7. Utilisation en médecine humaine.....	- 32 -
7.1. La leucémie aiguë lymphoblastique.....	- 32 -
7.1.1. Les protocoles.....	- 33 -
7.1.1.1. Chez l'enfant.....	- 33 -
7.1.1.2. Chez l'adulte.....	- 35 -
7.2. Les lymphomes malins non hodgkiniens.....	- 37 -
8. Autres utilisations.....	- 38 -
9. Comparaison des utilisations dans le domaine médical.....	- 38 -
10. Phénomènes de toxicité, d'inactivation et de résistance.....	- 40 -
10.1. Rappels d'immunologie.....	- 40 -
10.1.1. Le caractère immunogène des protéines.....	- 40 -
10.1.2. La sensibilité immédiate :.....	- 40 -
10.2. Toxicité de la L-asparaginase.....	- 41 -
10.2.1. Réactions allergiques.....	- 41 -
10.2.1.1. En médecine vétérinaire.....	- 41 -
10.2.1.2. En médecine humaine.....	- 42 -
10.2.2. Pancréatite aiguë.....	- 43 -

10.2.2.1.	En médecine vétérinaire	- 43 -
10.2.2.2.	En médecine humaine	- 43 -
10.2.3.	Trouble de la coagulation	- 44 -
10.2.4.	Cytolyse hépatique	- 44 -
10.2.5.	Hyperglycémie	- 45 -
10.2.6.	Syndrome de lyse tumorale aiguë	- 45 -
10.2.7.	Atteinte cérébrale	- 46 -
10.3.	Phénomènes d'inactivation	- 46 -
10.4.	Résistances à la L-asparaginase	- 47 -
Partie 2 : Production de la L-asparaginase de type II		- 49 -
1.	Introduction	- 51 -
2.	Le choix du gène codant la L-asparaginase de type II	- 51 -
3.	Le choix de l'organisme hôte	- 52 -
4.	Caractérisation de la biosynthèse d'une protéine procaryote.	- 53 -
4.1.	Choix de la souche d' <i>E.coli</i>	- 53 -
4.2.	La fermentation bactérienne	- 54 -
4.3.	Les paramètres du milieu de culture.....	- 55 -
4.3.1.	Le Substrat	- 55 -
4.3.2.	Le pH et la température.....	- 56 -
4.4.	L'extraction et la purification.....	- 57 -
5.	Caractérisation de la biosynthèse d'une protéine eucaryote	- 58 -
6.	Réglementation : le dossier qualité d'un médicament vétérinaire	- 59 -
6.1.	La fabrication de la substance active.....	- 59 -
6.2.	La fabrication du produit fini	- 60 -
7.	Expérimentations sur la protéine produite.....	- 61 -
7.1.	Détermination expérimentale de l'activité	- 61 -
7.2.	Prédiction de l'immunogénicité	- 62 -
Partie 3 : Elaboration d'un protocole d'essai pré-clinique portant sur la L-asparaginase canine.....		- 65 -
1.	Introduction	- 67 -
2.	Construction d'un protocole	- 68 -
3.	L'essai pré-clinique	- 69 -
3.1.	Première phase de l'essai : étude de la tolérance et de l'immunogénicité	- 69 -
3.1.1.	Tolérance.....	- 69 -
3.1.2.	Immunogénicité	- 72 -
3.1.2.1.	Mesure de l'activité de la L-asparaginase	- 72 -
3.1.2.2.	Dosage des anticorps anti-asparaginase	- 73 -
3.1.2.3.	Dosage de la quantité de L-asparagine résiduelle	- 74 -
3.1.2.4.	Protocole.....	- 74 -

3.2. Deuxième phase de l'essai : étude de l'efficacité.....	- 75 -
4. Discussion	- 78 -
Conclusion	- 81 -
Bibliographie	- 83 -
Annexe 1 : Grade de toxicité (LeBlanc et al., 2021)	- 95 -
Annexe 2 : Production de la L-asparaginase par les étudiants ingénieurs.....	- 115 -
Annexe 3 : Fiche d'information à l'attention du propriétaire.....	- 129 -
Annexe 4: Déclaration de consentement éclairé (étude de l'efficacité)	- 131 -
Annexe 5 : Dossier de saisine CERVO	- 133 -

Table des figures

Figure 1 : Structure de la L-asparaginase II E.coli K12("UniProtKB - P00805 (ASPG2_ECOLI)," 2021). - 15 -	- 15 -
Figure 2: Réactions in vivo (Thomas et al., 2010)	- 16 -
Figure 3 : Protocole LHOP chez le chien (Lee et al., 2021).....	- 27 -
Figure 4 : Exemple des conditions de production de la L-asparaginase.....	- 56 -
Figure 5 : Purification à l'aide du système Ni-NTA. A : Ni-NTA. B : Colonne Ni-NTA montrant un lien avec une protéine marquée His(Hainfeld et al., 1999)	- 58 -
Figure 6 : Réactions conduisant à la formation de l'indooxine à partir de l'hydrolyse de la L-asparagine par la L-asparaginase (Lanvers et al., 2002).....	- 62 -
Figure 7 : Méthode de l'escalade des doses standards (Fibonacci)(Tranchand et al., 2008)	- 70 -
Figure 8 : Frise chronologique de l'étude de l'immunogénicité.....	- 75 -
Figure 9 : Caractéristique de l'étude de l'efficacité de la L-asparaginase canine.....	- 76 -
Figure 10 : Frise chronologique de l'étude de l'efficacité de la L-asparaginase canine.....	- 77 -
Figure 11 : Frise chronologique de l'étude de l'efficacité à l'aveugle. L'animal 1 est traité avec la L-asparaginase canine et l'animal 2 est traité avec SPECTRILA®. Les deux groupes d'animaux sont traités par corticothérapie à une dose de 2mg/kg PO SID	- 79 -

Table des tableaux

Tableau 1 : Les deux isoenzymes de la L-asparaginase provenant <i>E.coli</i> (Jennings and Beacham, 1990), (Avramis and Panosyan, 2005).....	- 14 -
Tableau 2 : Comparaison des L-asparaginases du marché français (Ministère des solidarités et de la santé, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d)	- 19 -
Tableau 3 : Protocole CHOP chez le chat (Vail et al., 2019)	- 28 -
Tableau 4: Principales molécules de chimiothérapie utilisées contre le lymphome et la leucémie aiguë du chat et du chien (Cartagena Albertus and Almosni-Le-Sueur, 2012; Simon et al., 2008)	- 31 -
Tableau 5 : Protocole de chimiothérapie pédiatrique contre les LAL(Ducassou, 2018).....	- 33 -
Tableau 6 : Prémédication recommandée suivant le protocole CAALL-F0(Institut National du cancer, 2020).....	- 34 -
Tableau 7 : Les différentes asparaginases utilisées en médecine humaine	- 36 -
Tableau 8 : Comparaison des doses employées en médecine humaine et vétérinaire (Feugier et al., 2005; MacDonald et al., 2005)	- 38 -
Tableau 9: Comparaison des utilisations en médecine humaine et vétérinaire	- 39 -
Tableau 10 : Microorganismes pouvant participer à la production de L-asparaginase (Cachumba et al., 2016; Da Cunha et al., 2021; Krishnakumar and Visvanathan, 2014b; Krishnapura et al., 2016).....	- 52 -
Tableau 11: Caractéristiques de la production de la L-asparaginase recombinante	- 54 -
Tableau 12 : Seuils des impuretés (Européen Medicines Agency 2007).....	- 60 -
Tableau 13 : Escalade des doses suivant la suite de Fibonacci (Tranchand et al., 2008).....	- 70 -
Tableau 14 : Examens cliniques et signes cliniques à contrôler en priorité	- 71 -
Tableau 15 : Paramètres sanguins à contrôler en priorité.....	- 71 -
Tableau 16 : Techniques ELISA permettant le dosage des anticorps anti-asparaginase.....	- 73 -
Tableau 17 : Exemple de feuille de suivi à remplir par le propriétaire	- 77 -

Table des abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché
CRM : Méthode de réévaluation continue
<i>E.coli</i> : Escherichia coli
<i>E. chrysanthemi</i> : Erwinia chrysanthemi
IM : intramusculaire
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IV : intraveineuse
LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM : Leucémie aiguë myéloïde
L-asp : L-asparaginase
MTD : Dose maximum tolérée
PO : Per os
SID : une fois par jour
TLD : Toxicité dose limitante

Introduction

La L-asparaginase est une enzyme dont le rôle est d'hydrolyser la L-asparagine dans le sang circulant. Depuis les années 60, elle est utilisée comme traitement anticancéreux en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Depuis lors, la L-asparaginase a démontré et a mérité sa place dans l'arsenal thérapeutique des hématologistes. Elle est principalement utilisée dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant. En médecine vétérinaire, elle est employée majoritairement pour le traitement des lymphomes malins des carnivores domestiques (chiens et chats).

Un arrêt de commercialisation de deux des principaux médicaments début 2021, a engendré une perturbation des protocoles de traitement. En médecine vétérinaire, la L-asparaginase est devenue inaccessible et a été retirée des protocoles de chimiothérapie. Cette carence en asparaginase a motivé la recherche de nouvelles solutions. La création d'une nouvelle asparaginase et plus particulièrement d'une asparaginase vétérinaire canine est l'une d'entre elles. De plus, les formulations d'origine présentant des inconvénients notamment en termes d'immunogénicité, cette création est l'occasion de chercher à améliorer cet agent thérapeutique.

L'école ONIRIS comprend deux cursus de formation : l'école vétérinaire et l'école d'ingénieur agroalimentaire, de l'alimentation et des bio-industries. Cette liaison entre les deux versants de l'école a permis d'envisager la production d'une asparaginase vétérinaire en collaboration avec des étudiants ingénieurs en fin de cursus.

L'objectif de ce projet sur le long terme serait l'utilisation de cette nouvelle molécule dans un médicament vétérinaire. Dans le but de le réaliser, il est nécessaire de tester cette asparaginase in vivo afin de déterminer ses caractéristiques. Un protocole d'essai pré-clinique centré sur la tolérance, l'immunogénicité et l'efficacité est alors proposé afin de pouvoir commencer l'expérimentation dans un futur plus ou moins proche.

Partie 1 : Etude bibliographique : la L-asparaginase.

1. Historique

En 1922, la présence de L-asparaginase dans le sérum de cochon d'inde a été découverte par l'équipe de Clementi. (Clementi, 1922)

En 1953, l'équipe de recherche de Kidd a découvert que certains constituants présents dans le sérum de cochon d'inde permettaient la régression sélective des lymphomes. L'injection de sérum de cochon d'inde ne permettait pas de faire régresser d'autres types de tumeurs comme les fibrosarcomes ou les carcinomes. Des sérums d'autres animaux ont été testés et n'ont pas révélé d'action antitumorale. (Kidd, 1953)

En 1961, il a été démontré par Broome et son équipe que la L-asparaginase présente dans le sérum de cobayes était responsable d'une action inhibitrice sur des cellules de lymphomes. (Broome, 1961)

En 1964, l'équipe de Mashburn démontre que la L-asparaginase issue d'E.coli est capable d'inhiber la croissance des tumeurs (Mashburn and Wriston, 1964)

En médecine vétérinaire, l'utilité clinique de L-asparaginase dans le traitement de lymphome de haut grade canin a été montrée pour la première fois en 1967(Old et al., 1967)

La L-asparaginase a été introduite dans les années soixante pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant puis de l'adulte. Grâce à l'ajout de cette molécule, le taux de survie à 5 ans des enfants a augmenté de 90%. (Pui et al., 2015)

2. Fonctionnement de la L-asparaginase

2.1. La L-asparagine

L'asparagine est un acide aminé non essentiel. Sous sa forme L-asparagine, elle fait partie des 22 acides aminés protéinogènes, c'est-à-dire qu'elle intervient dans la synthèse des protéines. C'est un acide aminé essentiel pour le cycle cellulaire : les cellules ont besoin de l'asparagine pour entrer dans la phase G1 du cycle cellulaire (Thomas et al., 2010)

L'asparagine peut être directement produite par les cellules de l'organisme ou provenir d'un apport exogène via l'absorption de nutriments. Ce n'est donc pas un « acide aminé essentiel » au sens nutritionnel.

La synthèse de la L-asparagine est catalysée par *l'asparagine synthétase* selon la réaction de transamination suivante (Lomelino et al., 2017) :

Acide aspartique + glutamine -> Asparagine + acide glutamique (réaction ATP dépendante).

L'acide aspartique et la glutamine sont eux aussi deux acides aminés non essentiels qui peuvent être produits directement par l'organisme ou provenir de l'alimentation.

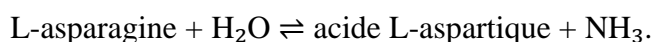
L'asparagine synthétase est en règle générale déficitaire dans les lymphoblastes. (Hunault-Berger, 2015)

2.2. La L-asparaginase

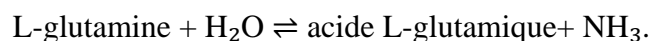
La L-asparaginase ou *L-asparagine amino-hydrolase* ou EC 3.5.1.1 est une enzyme protéique. La L-asparaginase est présente dans de très nombreux organismes. Cette enzyme peut, en effet, être détectée chez les animaux (poissons, mammifères, oiseaux), chez les plantes, les micro-organismes, les champignons et les levures. De même, elle est présente dans différents tissus tels que le foie, le pancréas, le cerveau, les reins et les poumons. (Castro et al., 2021)

Aujourd'hui, pour un usage médical, elle est extraite principalement à partir de cultures d'*Escherichia coli* ou d'*Erwinia chrysanthemi* mais aussi à partir d'autres organismes. Ces organismes seront détaillés dans la Partie 2.

La L-asparaginase hydrolyse l'asparagine extracellulaire qui se trouve dans le sang circulant en acide aspartique selon la réaction de désamination suivante :



Elle possède aussi une activité glutaminase : elle ne provoque pas seulement la désamination de la L-asparagine mais aussi celle de la L-glutamine. (Avramis and Panosyan, 2005).



La L-asparagine peut être d'origine bactérienne. Deux formes de cette enzyme coexistent chez les bactéries: une forme dimérique et une forme tétramérique qui correspondent respectivement à la L-asparaginase de type I et de type 2. Elle peut provenir de plantes (L-asparaginase de type III) ou encore provenir de *Rhizobium etli*. Pour cette dernière forme, la L-asparaginase ne possède aucune homologie avec les 3 précédentes. (Borek and Jaskólski, 2001)

La L-asparaginase de type I est produite dans le cytoplasme des bactéries et la L-asparaginase de type II est produite dans des conditions anaérobies dans l'espace périplasmique de la membrane bactérienne (Cedar and Schwartz, 1968)

Le type II a une plus grande spécificité dans la réaction d'hydrolyse de la L-asparagine en comparaison avec le type I (Ahmad et al., 2012)

L'asparaginase de type III, contrairement aux autres asparaginases, n'hydrolyse pas la glutamine (Bruneau et al., 2006)

	L-asparaginase type I	L-asparaginase type II
Localisation	Cytosol	Espace périplasmique de la membrane
Forme	Dimère	Tétramère
Expression	Aérobiose et anaérobiose	Aérobiose
L-asparagine	Moins bonne affinité (Km = $3.5 \cdot 10^{-3}$ M)	Meilleure affinité (Km $1.15 \cdot 10^{-5}$ M)
L-glutamine	Meilleure affinité	Moins bonne affinité (Km $6,25 \cdot 10^{-3}$ M)
Action	/	Activité antitumorale

Tableau 1 : Les deux isoenzymes de la L-asparaginase provenant *E.coli* (Jennings and Beacham, 1990), (Avramis and Panosyan, 2005)

La L-asparaginase de type II est la seule enzyme qui ait une activité antitumorale. C'est donc cette enzyme que l'on étudiera par la suite.

Elle est composée de quatre sous-unités qui possèdent chacune un site actif. Chacun des quatre sites actifs est situé entre les domaines N et C-terminal de deux monomères adjacents : on peut ainsi considérer cette enzyme comme un dimère de dimères. Chaque sous-unité est composée de 326 acides aminés pour un poids moléculaire de 138.9 kDa (Kozak and Jurga, 2002)

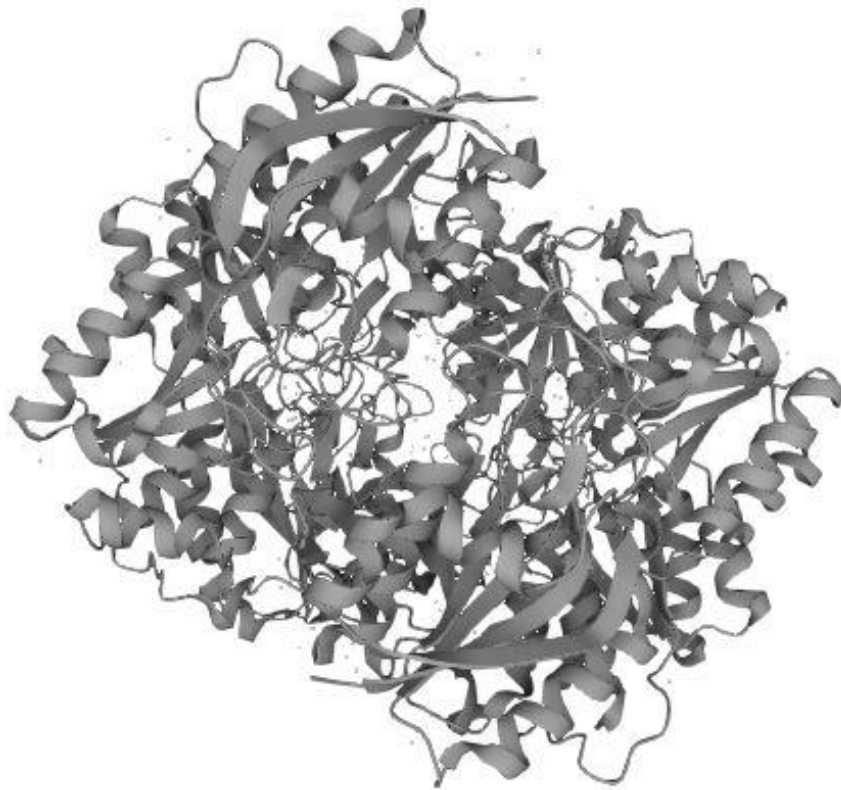


Figure 1 : Structure de la L-asparaginase II *E.coli* K12 ("UniProtKB - P00805 (ASPG2_ECOLI)," 2021)

Cette protéine est régulée par deux systèmes qui reposent sur deux protéines qui agissent en anaérobiose :

- La protéine FNR (fumarate et nitrate réductase) qui est sensible à l'oxygène et qui active un certain nombre de gènes pendant l'anaérobiose
- La protéine du récepteur de l'AMPc (CRP), qui contrôle l'initiation de la transcription de gènes et qui intervient dans de nombreuses voies cataboliques. (Jennings and Beacham, 1990)

Les caractéristiques thermodynamiques de cet enzyme sont les suivantes :

Le pH

Pour une utilisation thérapeutique, le pH optimal d'une enzyme doit se situer autour du pH physiologique, c'est-à-dire un pH proche de 7.4.

L'activité enzymatique de la L-asparaginase est stable pour des gammes de pH assez importantes : de 4,5 à 11,5 avec une légère augmentation de l'activité pour des pH basiques. Cette meilleure affinité à des pH basiques serait étroitement liée à une inhibition compétitive avec l'acide aspartique. En effet, à des pH acides, l'acide aspartique est présent en plus grande quantité par rapport à la L-asparagine et elle possède une meilleure affinité pour le site actif de la L-asparaginase. La L-asparagine est alors hydrolysée moins efficacement au profit de l'acide aspartique. (Stecher et al., 1999).

L'asparaginase de type II produite à partir d'*E.coli* possède un pH optimal avec un optimum d'activité enzymatique à pH 6 (Borah et al., 2012; Vidya et al., 2011)

La désamination est stimulée pour des pH basiques au-dessus de 8. Dans des milieux acides, la décarboxylation est privilégiée. (Cedar and Schwartz, 1968)

La Température

L'enzyme produite par *E.coli* semble avoir une température optimale entre 55°C et 60°C et être capable de tolérer des températures élevées. Cette tolérance permet d'affirmer que la L-asparaginase issue d'*E.coli* est thermostable (Borah et al., 2012; Khushoo et al., 2005). L'enzyme serait plus stable pour des températures élevées (Vidya et al., 2011)

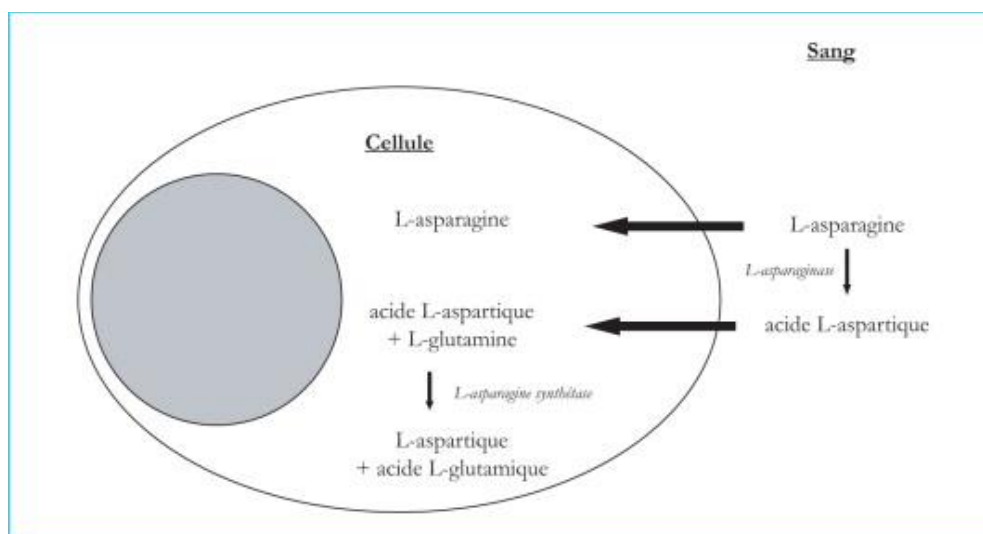


Figure 2: Réactions in vivo (Thomas et al., 2010)

2.3. Action de la L-asparaginase

Un traitement composé de L-asparaginase a pour but d'induire la mort des cellules cancéreuses en les privant de leur apport exogène en asparagine. En effet, certaines cellules cancéreuses possèdent un niveau bas à modéré d'*asparagine synthétase* et sont dépendantes de la L-asparagine circulante pour survivre. Ce traitement provoque donc la « famine » des cellules sensibles, c'est-à-dire dans notre cas, les cellules leucémiques.

Ce traitement agit au cours des phases G1 et G2 du cycle cellulaire. (Cartagena Albertus and Almosni-Le-Sueur, 2012)

La L-asparaginase, en provoquant une déplétion en L-asparagine, entraîne une inhibition de la synthèse des protéines avec une inhibition de la maturation de la transcription des ARNr et ARNt. Elle entraîne alors une inhibition de la synthèse de l'ARN et de l'ADN et une augmentation de l'activité des ribonucléases. Cette inhibition empêche alors la prolifération cellulaire en limitant l'entrée des cellules en phase S, ce qui induit l'apoptose des cellules cancéreuses. (Ellem et al., 1970; Ueno et al., 1997)

Ce traitement possède une faible toxicité sur les cellules saines car celles-ci sont capables de produire leur propre asparagine.

L'activité glutaminase semble nécessaire pour une efficacité anti-leucémique complète de la L-asparaginase. (Parmentier et al., 2015). Les lymphoblastes et les lymphocytes, en particulier les lignées B, dépendent fortement de la glutamine par rapport aux autres types de cellules. De plus, la glutamine est un cosubstrat essentiel de l'asparagine synthétase car elle participe à la néosynthèse de l'asparagine.

Cependant l'activité glutaminase de la L-asparaginase fait débat puisqu'une grande partie de la toxicité de la L-asparaginase serait imputable à son activité glutaminase. L'action glutaminase serait surtout utile dans les cas où les cellules arriveraient à produire leur propre asparagine par l'intermédiaire de l'asparagine synthétase. (Chan et al., 2014). Cependant, l'activité glutaminase semblerait tout de même nécessaire pour une activité anticancéreuse durable même pour les cellules incapables de produire leur propre asparagine. (Chan et al., 2019)

Normalement il existe un système de régulation des acides aminés. En effet, l'organisme peut détecter une carence en L-asparagine et y répondre en augmentant l'expression des ARNm de la *L-asparaginase synthétase*. C'est d'ailleurs, ce qu'il se passe dans les cellules résistantes au traitement à base de L-asparaginase. Dans les cellules sensibles au traitement, l'expression de la *L-asparaginase synthétase* n'est pas régulée à cause de la suppression de l'initiation à la traduction en raison d'une phosphorylation d'un facteur d'initiation (facteur eIF-2a) par la kinase GCN2 (Richards and Kilberg, 2006).

La L-asparaginase ne passe pas ou peu la barrière hémato-encéphalique. Cependant en diminuant le taux d'asparagine dans le sang circulant, un équilibre se réalise rapidement avec le liquide céphalorachidien (LCR), elle permet ainsi d'agir sur les tumeurs du système nerveux central (SNC). (Lanore and Delprat, 2002)

Il peut être noté que la L-asparaginase n'est pas affectée par les mécanismes de chimiorésistance classiques des cellules tumorales et qu'il n'existe pas de résistance croisée avec les autres cytostatiques. (Cartagena Albertus and Almosni-Le-Sueur, 2012; Lanore and Delprat, 2002) Cette molécule peut donc être utilisée afin de provoquer une rémission dans les cancers résistants aux autres chimiothérapies.

3. Indications en médecine vétérinaire

(Lanore and Delprat, 2002; Soyer and Doliger, 2011)

En médecine vétérinaire, la L-asparaginase est principalement utilisée pour le traitement des lymphomes de haut grade chez le chien et le chat et les leucémies lymphoïdes aiguës canines et félines mais peut être employé moins couramment lors de :

- Lymphomes de bas grade / à petites cellules
- Myélome multiples (protocole de sauvetage)
- Mastocytomes de hauts grades
- Mélanomes malins
- Tumeurs pancréatiques (insulinome, adénocarcinomes)

Notons qu'il n'existe aucune spécialité vétérinaire de L-asparaginase au monde.

4. Spécialités pharmaceutiques et indications chez l'homme

Quatre asparaginases étaient accessibles sur le marché français avant 2021 : (Ministère des solidarités et de la santé, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d)

- **KIDROLASE®** : L-asparaginase
 - Produite à partir *Escherichia coli*
 - Indication chez l'homme : leucémies aiguës lymphoblastiques, méningites leucémiques et lymphomes non hodgkiniens
- **ONCASPAR®** : PEGasparaginase = pegaspargase. Une asparaginase pégylée c'est-à-dire reliée de façon permanente au propylène glycol.
 - La pégylation est obtenue en attachant des unités de monométhoxy PEG par des liaisons covalentes. Cette pégylation permet de réduire le caractère immunogène et d'augmenter la demi-vie par rapport à l'asparaginase non pégylée et ainsi de réduire le nombre d'injections.
 - Indication chez l'homme : Leucémie lymphoblastique aiguë de l'adulte et de l'enfant (LLA) Utilisation en première intention chez l'enfant et en seconde intention après une réaction d'hypersensibilité à la KIDROLASE® chez l'adulte
- **ERWINASE®** : crisantaspase
 - Production à partir d'*Erwinia chrysanthemi* (ou *Erwinia carotovora*)
 - Indication chez l'homme : traitement pédiatrique de la leucémie aiguë lymphoblastique pour les patients ayant développé une hypersensibilité à l'asparaginase produite à partir d'*E.coli* (pégylée ou non).
 - 46% d'homologie avec L-asparaginase native (Thomas et al., 2010)
- **SPECTRILA®** : asparaginase recombinante (Haute Autorité de Santé, 2019)
 - Première asparaginase recombinante, produite à partir d'*Escherichia coli*. Elle diffère de l'asparaginase native dérivée d'*E. coli* au niveau de 4 acides aminés.
 - Indication chez l'homme : leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant et de l'adulte.

Il existe d'autres types d'asparaginases qui ne sont pas autorisées actuellement en France, tels que :

- **GRASPA®**, une eryaspase produite par le laboratoire Erytech. Cette spécialité est une asparaginase provenant d'*E.coli* mais qui est encapsulée dans des globules rouges (ERY-ASP). Les globules rouges doivent être compatibles avec le groupe sanguin du patient. En encapsulant l'asparaginase, cela permet de réduire le potentiel allergène de la protéine. De même, cette encapsulation permet d'éviter que l'asparaginase se décompose dans l'organisme (European medicines agency, 2016).
- ou bien divers autres spécialités :Elspar®, L-asparaginase Medac®, Leunase®, ou Paronal®, Asparaginase Medac®, Crasnitin®.(Chand et al., 2020)

Toutes les L-asparaginases du marché ont le même fonctionnement thérapeutique mais possèdent des propriétés pharmacologiques et immunologiques différentes. Ainsi la crisantaspase possède une demi-vie plus courte ce qui entraîne des injections plus répétées aux patients en comparaison avec les L-asparaginases issues d'*E.coli*. (Chien et al., 2014)

Des études ont comparé la L-asparaginase native et recombinante et ont démontré une équivalence pharmacocinétique, une non infériorité et une tolérance identique ainsi qu'une efficacité, une sécurité et une immunogénicité comparables. (Haute Autorité de Santé, 2019; van der Sluis et al., 2018)

	KIDROLASE®	ONCASPAR®	ERWINASE®	SPECTRILA®
Laboratoire	Jazz Pharmaceuticals France SAS	Les Laboratoires Servier	Jazz Pharmaceuticals France SAS	MEDAC SAS
Disponibilité	Arrêt de commercialisation le 28/02/2021	Commercialisation en 2018	Arrêt de commercialisation le 23/04/2021	Commercialisation en 2021
Prescription et délivrance	Liste I	LISTE I Médicament réservé à l'usage hospitalier. Prescription réservée aux spécialistes en hématologie ou aux médecins compétents en maladies du sang.	Liste I Médicament réservé à l'usage hospitalier. Prescription réservée aux spécialistes en hématologie.	Liste 1 Médicament réservé à l'usage hospitalier. Prescription réservée aux spécialistes en hématologie ou aux médecins compétents en maladies du sang.
Statut en France	AMM (1997)	AMM (2016)	AMM (2015)	AMM (2016)
Composition en substance actives	Poudre (10 000UI)	Poudre (750 UI) Solution (750UI)	Poudre (10 000UI)	Poudre (10 000UI)
Demi-vie	8 à 30 heures	1 à 6 jours	6,4 ± 0,5 heures (IV) 16 heures (IM)	25,8 ± 9,9 heures

Tableau 2 : Comparaison des L-asparaginases du marché français (Ministère des solidarités et de la santé, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d)

La L-asparaginase est un médicament anticancéreux à usage humain mais tout de même accessible aux vétérinaires selon l'arrêté du 29 octobre 2009 relatif aux médicaments à usage humain classés dans l'une des catégories de prescription restreinte pour l'application de l'article R. 5141-122 du code de la santé publique. (Ordre national des vétérinaires, 2009)

KIDROLASE® était la L-asparaginase la plus utilisée en médecine vétérinaire avant son arrêt de commercialisation. Aujourd'hui, SPECTRILA® est la seule asparaginase utilisée. Cette nouvelle asparaginase recombinante est un médicament réservé à l'usage hospitalier donc à prescription restreinte contrairement à son prédécesseur. SPECTRILA® reste tout de même accessible aux vétérinaires par l'article R. 5141-122 du code de la santé publique puisqu'elle « *est nécessaire pour éviter des souffrances inacceptables* » à des animaux. Les vétérinaires peuvent donc obtenir cette spécialité en s'approvisionnant directement auprès du laboratoire MEDAC SAS (ou d'un grossiste) d'après l'article R.5124-44 du code de la santé public. (Code de la santé publique, 2012, 2010)

5. Disponibilité des asparaginases en France

Depuis deux ans, le marché français de la L-asparaginase est sous tension par manque de KIDROLASE® et ERWINASE®, deux spécialités produites par le laboratoire Jazz Pharmaceuticals. Aujourd'hui, ces deux spécialités ne sont plus disponibles.

Concernant ERWINASE®, c'est l'arrêt du contrat entre Porton Biopharma Limited (PBL) le fabricant de la crisantaspase et JAZZ pharmaceuticals le 31 Décembre 2020, qui a entraîné une tension d'approvisionnement. (Guindeuil and Perez, 2021)

En Octobre 2020 : Cette tension d'approvisionnement aboutit à la mise en place de consignes pour l'utilisation de l'ERWINASE®, avec une priorisation de niveau 3 des patients pouvant être traités. La priorité est ainsi donnée aux patients adultes ou enfants atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) T par rapport aux LAL B. Et en cas de tension extrême, les enfants sont prioritaires car ils possèdent un meilleur pronostic. (Magalie PEREZ, 2020)

En Février 2021, PBL met en place un accès provisoire à la crisantaspase en France via des conditionnements non commerciaux. Des conditionnements alternatifs sont fournis par PBL Royaume-Uni. (Madichie and Bondiguel, 2021)

Cependant, cela ne suffit pas et le 10 Mars 2021, la tension d'approvisionnement entraîne une distribution contingentée stricte de la crisantaspase.

A cette tension concernant ERWINASE®, s'ajoute un arrêt de distribution mondiale de la KIDROLASE® par le laboratoire Jazz Pharmaceuticals à partir du 28 Février 2021. L'arrêt de cette distribution fait suite au retrait du certificat de bonnes pratiques de fabrication du fabricant de la L-asparaginase native. Cette spécialité est toutefois encore utilisable en fonction des stocks jusqu'au 30 juin 2021. (Perez and Loze, 2020)

Ces derniers stocks ont été réservés aux patients humains, privant ainsi la médecine vétérinaire de la seule L-asparaginase qu'elle utilisait.

A partir du 31 janvier 2022, le laboratoire Clinigen Healthcare France (qui travaille désormais avec PBL) met à disposition de la France exceptionnellement des unités de la crisantaspase des Pays-Bas. Cette mise à disposition fait suite à un retard de commercialisation du packaging français. (Madichie and Rivera-Bechetoille, 2022a)

L'arrivée nouvelle sur le marché de SPECTRILA® a permis d'alléger les tensions qui pèsent sur l'asparaginase et de compenser l'arrêt de commercialisation de KIDROLASE® et d'ERWINASE (Paitraud, 2021).

Depuis le 01 août 2022, ERWINASE® est de nouveau disponible sur le marché français. Cependant sa distribution est encore contingentée afin d'éviter une rupture d'approvisionnement. (Madichie and Rivera-Bechetoille, 2022b)

6. Utilisation en médecine vétérinaire

6.1. Les lymphomes malins

6.1.1. Du chien

(Cartagena Albertus and Almosni-Le-Sueur, 2012; Cartagena Albertus and Romairone Duarte, 2021; Ponce et al., 2017; Soyer and Doliger, 2011)

Le lymphome canin est la tumeur hématopoïétique la plus fréquente chez le chien. Le lymphome multicentrique est le lymphome que l'on retrouve le plus fréquemment dans la race canine. Il est l'un des cancers les plus diagnostiqués en médecine vétérinaire avec les tumeurs mammaires canines et les cancers de la peau.

Les éléments de définitions des lymphomes comportent les notions suivantes : la croissance incontrôlée de lymphocytes d'aspect plus ou moins lymphoblastiques selon les sous-types de lymphomes, associés à la présence de critères de malignité à l'examen cytologique anatomo-pathologique de ces populations lymphocytaires.

Les lymphomes malins sont le plus souvent traités par chimiothérapie, comme toutes les hémopathies malignes, contrairement aux cancers solides comme les tumeurs mammaires qui peuvent être traités principalement par chirurgie.

Les facteurs environnementaux jouent un rôle dans l'étiologie des lymphomes (canins ou humains). En effet, les personnes ou les animaux vivant dans une zone avec un niveau de pollution important (comme les zones industrielles) ont plus de risque d'être atteints d'un lymphome. Des facteurs génétiques sont aussi impliqués, beaucoup mieux connus chez l'homme que chez nos carnivores domestiques. (Breen and Modiano, 2008)

Le lymphome canin et le lymphome non hodgkinien humain ont des similitudes dans leur biologie moléculaire, dans leur présentation clinique et dans leur traitement.

Epidémiologie :

L'incidence annuelle du lymphome est décrite comme allant de 13 à 114 cas pour 10 000 chiens. Plus spécifiquement, l'incidence est de 1,5 pour 100,000 pour les chiens de moins de 1 an et 84 pour 100 000 pour les chiens de 10 à 11 ans.

Les lymphomes canins peuvent toucher les chiens de tous âges avec une moyenne d'âge des chiens atteints de 6,3 à 7,7 ans. De même, ils peuvent concerner des chiens de toutes races même s'il se manifeste le plus fréquemment chez des chiens de taille moyenne à grande et principalement chez certaines races comme le Boxer, le Golden Retrievers, les Rottweilers, les Bullmastiffs, le Berger Allemand, le Scottish terrier, le Setter, l'Airedale terrier, le Basset hound, le Saint-bernard ou le Bouledogue. Des races semblent épargnées comme le Chihuahua, le Yorkshire ou le Caniche.

Le sexe n'influence pas significativement l'apparition des lymphomes même si les femelles entières semblent moins atteintes dans certaines études. De même, la castration avant l'âge d'un an semble favoriser l'apparition des lymphomes chez certaines races comme les Braques Hongrois ou les Golden Retrievers mais pas chez les Labrador Retrievers.

Manifestations :

La forme clinique la plus fréquente est assez facilement identifiable chez le chien du fait de l'hypertrophie des organes lymphoïdes (poly-adénomégalie superficielle associée à une splénomégalie, hépatomégalie). Un PUPD (hypercalcémie néoplasique) et des modifications hématologiques (thrombopénie, anémie +/- neutrophilie) sont souvent présentes. Des signes généraux non spécifiques peuvent s'ajouter au tableau clinique comme un amaigrissement, une asthénie, une hyperthermie, des signes digestifs, une dyspnée ou une dysphagie.

L'hypercalcémie et l'anémie sont les signes cliniques les plus fréquents à côté de l'adénomégalie. On retrouve ces signes dans 10 à 40% des cas. Ces hypercalcémies sont causées par la production par les lymphoblastes T CD4+ d'un peptide qui reproduit l'action de la parathormone (PTH) qui est hypercalcémisante. Chez le chien, une hypercalcémie paranéoplasique est de mauvais pronostic surtout si elle est compliquée par une insuffisance rénale causée par une néphrocalcinose. (Lanore and Delprat, 2002)

Les différents types de lymphomes canins :

Les lymphomes multicentriques, gastro-intestinaux, médiastinal, cutané, oculaire, pulmonaire et du système nerveux sont les plus fréquents. Dans de rares cas, il est possible d'observer des lymphomes vertébraux, musculaires et buccaux. Le lymphome multicentrique représente à lui seul 84% des lymphomes du chien.

Diagnostic :

Le diagnostic des lymphomes repose sur un examen physique approfondi, une analyse de sang qui comprend une numération formule sanguine (en particulier les leucocytes et les plaquettes) et une analyse biochimique ainsi qu'une analyse d'urine.

L'examen morphologique et phénotypique des tissus et des cellules qui constituent la tumeur est essentiel au diagnostic et au sous-typage du lymphome. Des techniques d'immunophénotypages permettent la détermination du type de cellules qui composent la tumeur. Cette technique peut aussi s'employer afin de réaliser le diagnostic. Parfois, le diagnostic du lymphome et la différenciation de la prolifération maligne par rapport à la prolifération bénigne des lymphocytes ne sont pas possibles en fonction de critères histologiques et cytologiques standard. Dans ces cas, une analyse de la clonalité peut être utiles pour confirmer un diagnostic. (Vail et al., 2019)

6.1.2. Du chat

(Vail et al., 2019)

Particularité du chat :

L'infection par le virus de la leucémie féline (FeLV), un agent étiologique majeur de la maladie, n'est plus pertinente dans la majorité des cas en raison de l'élimination virale et des programmes de vaccination mis en place dans les années 1980.

Contrairement au chien, ce sont les formes gastro-intestinales qui prédominent, et il existe des sous-types distincts représentant à la fois des lymphomes indolents (majoritaires) et agressifs (intermédiaires/de haut grade).

Epidémiologie :

Le taux d'incidence annuel réel du lymphome chez les chats est actuellement inconnu.

Le lymphome malin correspond à 50-90% des tumeurs hématopoïétiques chez le chat.

Types de lymphomes félines : Les lymphomes digestifs, médiastinaux, extra nodal (en particulier rénaux) et ganglionnaires multicentriques sont les plus fréquents dans la race féline.

Manifestation :

Les manifestations cliniques dépendent de la localisation du lymphome. Ainsi un lymphome digestif occasionne majoritairement une diarrhée chronique, un amaigrissement, des vomissements chroniques ou une masse abdominale palpable. Quant au lymphome médiastinal, il peut provoquer des dyspnées et de l'épanchement au niveau du thorax. Les lymphomes rénaux entraînent des signes cliniques d'insuffisance rénale et une hypertrophie rénale bilatérale peut être objectivée. Le lymphome ganglionnaire multicentrique du chat ressemble par certains aspects à celui du chien, toutefois généralement avec une adénomégalie moins nette mais une spléno ou hépatomégalie prépondérante.

6.2. Les leucémies

Les leucémies sont caractérisées par la prolifération clonale de cellules néoplasiques qui sont originaires de la moelle osseuse. La prolifération des cellules hématopoïétiques cancéreuses s'accompagne souvent d'une leucocytose (une augmentation de la quantité de globules blancs circulants).

Toutes les cellules hématopoïétiques peuvent être atteintes, ainsi les lignées lymphoïdes, plasmocytaires, granulocytaires, érythrocytaires et mégacaryocytaires peuvent être responsables de la leucémie. Les leucémies peuvent être soit aiguës soit chroniques.

Les leucémies aiguës représentent moins de 10% de tous les néoplasmes hématopoïétiques chez les carnivores domestiques. Elles sont le plus souvent d'origine myéloïde (LAM) ou lymphoblastiques (LAL) et évoluent rapidement avec un très mauvais pronostic chez le chat comme le chien. La LAL est plus fréquente chez le chat contrairement aux chiens qui sont plus touchés par la LAM. Les leucémies chroniques sont généralement d'origine lymphoïde et ont une évolution plus lente avec un meilleur pronostic. (Cartagena Albertus and Romairone Duarte, 2021; Soyer and Doliger, 2011)

Epidémiologie :

Concernant les LAL, la plupart des cas se produisent chez des animaux adultes (moyenne, de cinq à six ans) mais la maladie peut survenir chez les animaux plus âgés. Quant au LAM, elles peuvent se produire chez de très jeunes chiens dès l'âge de 7 mois. Il semble y avoir une légère prédisposition sexuelle chez les chiens, avec plus de mâles touchés (ratio de 2/1). Il n'y a pas de prédisposition raciale même si ce sont des chiens de grandes tailles qui sont le plus souvent touchés. Différents facteurs impliqués dans la survenue des leucémies ont été mis en évidence. D'autres facteurs comme la pollution, les radiations ionisantes et des facteurs génétiques jouent un rôle dans l'apparition de la leucémie. De même, certaines molécules anticancéreuses provoquent des leucémies iatrogènes. (Dobson et al., 2006; Vail et al., 2019)

Concernant l'espèce féline, peu d'informations sont disponibles dans la littérature contemporaine. Les seules informations sont datées d'avant la vague de vaccination FeLV et montrent qu'environ 60% à 80% des chats atteints de LAL étaient positifs au FeLV. (Vail et al., 2019)

La leucémie aiguë :

Les symptômes ont une évolution rapide. Les animaux manifestent alors une apathie, une anorexie et une hyperthermie. Des infections secondaires, une anémie, une leucocytose importante, une thrombocytopenie, une CIVD, une hépatomégalie, une splénomégalie ou une adénomégalie modérée peuvent être mises en évidence à l'examen clinique et à l'exploration biologique. Un syndrome paranéoplasique peut s'ajouter au tableau clinique, ainsi une hyperviscosité sanguine, une hypercalcémie ou un trouble de l'hémostase peuvent être objectivés. (Cartagena Albertus and Romairone Duarte, 2021; Soyer and Doliger, 2011)

6.3. Les L-asparaginases en médecine vétérinaire

(Ministère des solidarités et de la santé, 2022c, 2022a; Vail et al., 2019)

La KIDROLASE® était la spécialité la plus utilisée en médecine vétérinaire jusqu'à son arrêt de commercialisation. Depuis 2021, une nouvelle spécialité est disponible : SPECTRILA®

L'utilisation de SPECTRILA® est peu référencée dans la littérature scientifique vétérinaire. En pratique, chez les carnivores domestiques, les injections de SPECTRILA® semblent être réalisées faire selon la même posologie que celle de KIDROLASE® et les recommandations semblent identiques entre les deux molécules. (Zajc et al., 2022)

SPECTRILA® est conditionnée dans un flacon de 10 000 UI sous la forme d'une poudre lyophilisée. Une fois reconstitué, chaque mL de solution contient approximativement 2 500 UI.

La pegasparaginase est tout de même disponible en médecine vétérinaire cependant son utilisation est limitée en raison de son coût.

Voie d'administration :

SPECTRILA® est injectée de la même façon que l'était KIDROLASE®

L'administration se fait usuellement par voie intramusculaire. Elle peut se faire par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale.

Une étude a montré une meilleure efficacité avec les injections par voie intramusculaire chez le chien. (Valerius et al., 1999)

Posologie :

10 000 UI/m² de surface corporelle par voie intramusculaire en une seule injection.

Interactions médicamenteuses :

- La L-asparaginase insensibilise les cellules tumorales au méthotrexate pendant une dizaine de jours c'est-à-dire, la période de l'inhibition de la synthèse protéique.
- La L-asparaginase ne doit pas être injectée en même temps que la vincristine. En effet, ces injections simultanées peuvent aboutir à une toxicité suraiguë de la vincristine par diminution du métabolisme hépatique. Cette toxicité aiguë peut aboutir à la mort de l'animal. Il est recommandé d'attendre 24 à 48h entre les deux injections. De même, la combinaison de vincristine et de L-asparaginase peut provoquer une myélosuppression qui se manifeste sous la forme d'une neutropénie 7 jours après le traitement. (Northrup et al., 2002)

Toxicité environnementale

La L-asparaginase agit seulement sur les cellules tumorales, elle n'est pas « CMR » c'est-à-dire qu'elle ne présente pas de caractère cancérigène, mutagène ou reprotoxique. Elle n'est pas un danger pour l'environnement. L'animal n'a pas à être hospitalisé lors de son traitement et il n'y a pas de protocole spécifique pour la gestion des mictions et des déjections de l'animal.

Métabolisme

L'excrétion de la L-asparaginase est rénale.

6.4. Les protocoles de chimiothérapie

(Cartagena Albertus and Almosni-Le-Sueur, 2012; Cartagena Albertus and Romairone Duarte, 2021; Vail et al., 2019)

6.4.1. Les lymphomes malins

Le plus souvent, les lymphomes malins sont traités par chimiothérapie. La chimiothérapie du lymphome en médecine vétérinaire contrairement à la médecine humaine, est palliative et non curative. L'objectif de celle-ci est de contrôler l'évolution clinique du lymphome en prenant en compte les contraintes éthiques, logistiques et financières acceptables pour le propriétaire et l'animal. Ainsi, le but des protocoles de chimiothérapie est d'utiliser une dose efficace la plus faible possible sur la période la plus courte possible afin d'obtenir une rémission qui permet de redonner un confort de vie à l'animal. Les molécules utilisées visent une efficacité maximale pour une toxicité minimale et un coût minimal.

Avant de débiter un protocole de chimiothérapie, il est recommandé de connaître certaines valeurs des paramètres sanguins afin de suivre une éventuelle myélosuppression lors du traitement.

Les protocoles sont généralement composés de deux phases : une phase d'induction et une phase de maintien. La phase d'induction permet d'induire la rémission des signes cliniques et la phase de maintien permet de conserver la rémission.

Une troisième phase peut être ajoutée lorsque les résultats n'atteignent pas l'effet recherché. Cette phase de secours fait généralement intervenir d'autres molécules que celles utilisées dans les précédentes phases.

La L-asparaginase est incorporée dans de nombreux protocoles de chimiothérapie dirigés contre les tumeurs lymphoïdes car elle permet une rémission rapide. En effet, les lymphocytes tumoraux sont très sensibles à cette enzyme ce qui permet une réponse thérapeutique rapide. Dans la majorité des cas, celle-ci est obtenue en 48h. De plus, la L-asparaginase permet une régression rapide et marquée des ganglions lymphatiques et une amélioration spectaculaire de l'état général. (Old et al., 1967).

La L-asparaginase peut être utilisée en monothérapie ou incluse dans des protocoles de polychimiothérapie. Elle est alors utilisée lors de la phase d'induction ou lors des échappements thérapeutiques en réintroduction.

Les protocoles de monothérapie sont globalement moins efficaces que les protocoles qui associent différentes molécules de chimiothérapie. Cependant, ces protocoles sont avantageux dans les cas où les propriétaires sont peu disponibles, réticents à débiter un protocole complet ou limités financièrement. La L-asparaginase en monothérapie est de même, une solution très intéressante dans l'adhésion du propriétaire à la chimiothérapie en permettant une rémission perceptible par celui-ci dès le début de la thérapie. Il peut être noté que la L-asparaginase seule est moins efficace chez le chat en comparaison avec le chien. En effet, le taux de réponse est de 30% et la molécule est plus rapidement éliminée par l'organisme (moins de 7 jours).

La L-asparaginase est souvent associée à la prednisolone. Avec cette association, le taux de rémission initiale pour les lymphomes multicentriques du chien est élevé puisqu'il est de 96,5%. Ce taux de rémission est plus important que lors d'une corticothérapie seule. La L-asparaginase est donc un agent d'induction précoce efficace contre les lymphomes canins. (Shida et al., 2010)

Les protocoles de polythérapie sont nombreux, certains font intervenir la L-asparaginase, d'autres l'excluent totalement. En général, ces protocoles ont un coût plus élevé que ceux de monothérapie, sont plus toxiques et plus contraignants car ils exigent plus de visites chez le vétérinaire et un nombre d'exams complémentaires plus importants.

Les protocoles de polythérapie les plus courants qui utilisent la L-asparaginase sont les suivants :

- L-COP (protocole COP avec ajout de L-asparaginase): cyclophosphamide, vincristine, prednisone, L-asparaginase
- L-CHOP/ ACOPA/ COPLA : cyclophosphamide, vincristine, prednisone, L-asparaginase + doxorubicine
- Protocole Madison-Wisconsin : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone, L-asparaginase + méthotrexate

L'un des protocoles les plus utilisés dans le traitement des lymphomes canins reste le protocole CHOP. La plupart des protocoles vétérinaires CHOP comprennent également une dose de L-asparaginase au début de l'induction. La pertinence de l'ajout de la L-asparaginase a été étudiée et a révélé une absence d'impact significatif de celle-ci sur les résultats du traitement. En effet, aucune différence n'a été observée concernant le temps de survie (310 jours contre 308 jours sans L-asparaginase) ou le taux de réponse globale entre les chiens qui ont reçu ou non la L-asparaginase (respectivement 89,3 % contre 87,1 %). L'ajout de la L-asparaginase ne serait donc pas indiquée dans les protocoles de polythérapie tel que le protocole le CHOP mais serait à réserver en cas de rechute. (MacDonald et al., 2005)

En médecine vétérinaire, les protocoles de polychimiothérapie pour le traitement des lymphomes canins sont souvent discontinus c'est-à-dire sans phase de maintenance. L'équipe de Lautscham a démontré que le protocoles L-CHOP était tout aussi efficace avec ou sans maintenance. L'utilisation d'un protocole constitué seulement de la phase d'induction pourrait de même se justifier par un stress moindre pour l'animal et un coût plus abordable pour le propriétaire. Cependant, la phase de maintenance permettrait de maintenir un suivi plus régulier avec l'animal et donc de percevoir plus précocement une potentielle rechute.(Lautscham et al., 2017)

Une étude plus récente s'est intéressée à la composition du protocole CHOP et plus particulièrement au cyclophosphamide qui possède l'effet thérapeutique le plus faible par rapport à la vincristine et à la doxorubicine. Un nouveau protocole a ainsi été envisagé par l'équipe de Lee, en remplaçant le cyclophosphamide par la L-asparaginase. Transformant ainsi le protocole CHOP traditionnel en protocole LHOP. Les résultats de cette étude sont encourageants car les chiens qui ont reçu une chimiothérapie avec le protocole LHOP ont une survie sans progression médiane (SSP médiane) significativement plus longue que les chiens traités avec le protocole CHOP. (Lee et al., 2021)

	Semaine																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	16	17	18	19		
Vincristine (0.7 mg/m ² IV)	.																		
L-asparaginase (400 U/kg IM)	.																		
Doxorubicin (30 mg/m ² IV)				.															
Prednisolone (PO q24h)																			

Figure 3 : Protocole LHOP chez le chien (Lee et al., 2021)

A l'école vétérinaire de Nantes (ONIRIS), les injections de L-asparaginase sont réalisées par voie intramusculaire à une posologie de 400 UI/kg (pour le chien et le chat). La L-asparaginase est utilisée en monothérapie ou dans le protocole de chimiothérapie COPLA. Lors d'une monothérapie, la L-asparaginase est soit injectée de façon isolée, soit administrée de façon répétée à une fréquence d'une fois par mois. Ces injections peuvent être administrées concomitamment d'une corticothérapie orale.

Le protocole COPLA est composé de 2 phases : une phase d'induction de 4 semaines qui utilise la L-asparaginase, la vincristine, le cyclophosphamide et une phase de maintenance qui est composée de vincristine, de cyclophosphamide et de doxorubicine. Une corticothérapie à base de prednisolone est réalisée pendant tout le protocole de chimiothérapie.

Les glucocorticoïdes peuvent être aussi intéressants pour le traitement des lymphomes lorsqu'ils sont associés à des médicaments cytostatiques, car ils provoquent une apoptose des lymphoblastes et des lymphocytes. Cependant, lorsqu'ils sont utilisés seuls, si une thérapie plus agressive est décidée à une date ultérieure, ces chiens seront plus susceptibles de développer une multirésistance aux médicaments.

Concernant l'espèce féline, tout comme le chien, de nombreux protocoles de chimiothérapie sont employés. Les protocoles CHOP et COP sont ainsi souvent utilisés pour les chats. Ces protocoles ont été utilisés chez de nombreux chats présentant diverses formes de lymphome et sont généralement bien tolérés. À l'heure actuelle, la plupart des protocoles de lymphome canin impliquent une phase d'induction de 12 à 25 semaines, après quoi la chimiothérapie est abandonnée et aucune chimiothérapie d'entretien n'est utilisée. Bien que des données existent chez les chiens pour une approche sans entretien, des données comparatives similaires n'existent pas actuellement dans le chat. (Vail et al., 2019)

Semaines de traitement	Molécules
1	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV L-asparaginase 400 UI/kg SC Prednisolone 2,0 mg/kg PO
2	Cyclophosphamide 200mg/m ² PO Prednisolone 2,0 mg/kg PO
3	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV Prednisolone 1.0 mg/kg PO
4	Doxorubicine 25mg/m ² IV Prednisolone 1.0 mg/kg PO
6	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV
7	Cyclophosphamide 200mg/m ² PO
8	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV
9	Doxorubicine 25mg/m ² IV
11	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV
13	Cyclophosphamide 200mg/m ² PO
15	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV
17	Doxorubicine 25mg/m ² IV
19	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV
21	Cyclophosphamide 200mg/m ² PO
23	Vincristine 0,5-0,7 mg/m ² IV
25	Doxorubicine 25mg/m ² IV

Tableau 3 : Protocole CHOP chez le chat (Vail et al., 2019)

Pour l'espèce canine :

Le pronostic est fonction du grade histologique ou cytologique, de la présence ou non de syndrome paranéoplasique et du traitement employé:

- Sans traitement, la médiane de survie est de 1 à 2 mois pour les lymphomes multicentriques
- Avec une corticothérapie seule, la médiane de survie est de 2 à 4 mois
- Avec un protocole de polychimiothérapie, le protocole CHOP conventionnel induit une rémission dans environ 80% à 95% des chiens, avec des durées médianes de survie de 10 à 12 mois. Environ 20% à 25% des chiens traités seront vivants 2 ans après l'initiation de ces protocoles.
- Lorsque la L-asparaginase est utilisée dans des protocoles de sauvetage en association avec la lomustine et la prednisolone, une réponse complète est observée dans 52 à 65% des cas avec une durée médiane de réponse de 63 à 70 jours.

Le pronostic reste tout de même réservé, même avec un traitement. La guérison est extrêmement rare.

Pour l'espèce féline :

Les taux de réponse et la durabilité de la réponse pour les chats traités avec des protocoles de polychimiothérapie ne sont généralement pas aussi bons que chez les chiens. On peut s'attendre à des taux de rémission de 50 % à 65 % et à ce qu'environ un tiers d'entre eux atteignent la rémission clinique. La durée médiane de survie pour les chats en rémission complète est d'environ 7 à 10 mois avec un sous-ensemble vivant jusqu'à 1 an ou plus.

Il n'y a donc pas de protocole unique dans le traitement des lymphomes malins. Ainsi la L-asparaginase peut être présente comme totalement absente des protocoles de traitement.

La L-asparaginase n'est pas toujours utilisée en première intention chez les animaux en bonne santé pouvant réaliser un protocole de chimiothérapie "classique". En effet, l'ajout de la L-asparaginase chez cette catégorie d'animaux n'apporte pas une amélioration significative du taux de réponse, de la durée de survie ou de la durée de rémission. La L-asparaginase peut ainsi être utilisée en première intention chez les animaux qui présentent des symptômes contre-indiqués pour les protocoles de chimiothérapie comme par exemple : un état d'abattement sévère, une neutropénie ou bien une hyperthermie.

La L-asparaginase est utilisée le plus couramment dans les cas de sauvetage en combinaison d'autres molécules. (Valence Vieilleigne and Cyril Parachini-Winter, 2021)

6.4.2. Les leucémies

La chimiothérapie est le traitement de choix des leucémies aiguës. Il est nécessaire concernant ces pathologies de miser sur un protocole de chimiothérapie agressif.

Cependant la réalisation de celle-ci est parfois compliquée du fait de l'aplasie médullaire provoquée par la leucémie. En effet, certaines molécules habituellement utilisées telles que le cyclophosphamide ou la doxorubicine accentuent cette aplasie. L'incapacité de conserver des niveaux suffisants de cellules sanguines normales pendant le traitement est un problème constant auquel sont confrontés les praticiens. La leucémie aiguë la plus fréquente est la leucémie aiguë myéloïde mais malheureusement elle répond rarement aux protocoles de chimiothérapie et toute réponse est de courte durée. (Dobson et al., 2006; Soyer and Doliger, 2011)

Il n'existe pas vraiment de traitement efficace contre les leucémies aiguës. Confrontés au diagnostic, les propriétaires ne privilégient pas souvent la réalisation d'un traitement compte tenu des coûts et de l'issue probable. Cependant, dans les cas où les propriétaires sont déterminés à réaliser une chimiothérapie, les protocoles du lymphome sont souvent utilisés. Chez le chien, pour le traitement des LAM, plusieurs variantes de protocoles basées sur le CHOP ou le COP (avec ou sans arabinoside de cytosine) sont utilisées. Le pronostic global avec le traitement actuellement disponible est faible. Bien que les taux de réponse aux protocoles multi-agents soient relativement élevés (50 % à 70 %), les réponses ne sont pas durables et les durées médianes de survie, malgré des protocoles agressifs, sont généralement de 0,5 à 2,0 mois. Chez le chat, l'utilisation de la chimiothérapie pour traiter les LAL est décevante. À l'aide de protocoles basés sur le protocole COP, le taux de rémission complète est seulement de 27 %. (Bennett et al., 2017; Vail et al., 2019)

Le pronostic des leucémies aiguës est sombre en raison du faible taux de réponse, des défaillances d'organes possibles (qui peuvent augmenter les effets toxiques de la chimiothérapie) ou bien des septicémies secondaires à la maladie ou aux traitements. Le pronostic des LAL est légèrement meilleur que celui des LAM : 20 à 40% des LAL entrent en rémission avec un temps de survie court allant de 1 à 3 mois mais parfois plus, alors que le temps de survie des LAM ne dépasse que très rarement les 3 mois. Sans traitement, la mort survient en moins d'1 mois. (Dobson et al., 2006)

En ce qui concerne les leucémies chroniques, elles sont traitées le plus souvent par l'intermédiaire d'un traitement symptomatique. En effet, les traitements de chimiothérapie sont controversés car cette leucémie ne provoque pas ou peu de manifestation clinique. Les rémissions sont rares mais l'espérance de vie pour les animaux atteints est de 1 à 3 ans. (Cartagena Albertus and Romairone Duarte, 2021)

Médicaments	Dose chien chat		Indications	Commentaires
L-asparaginase	10 000 UI/m ² IM	10 000 UI/m ² IM	Tumeurs lymphoïdes	Hypersensibilité
Doxorubicine (adriamycine)	30 mg/m ² IV stricte	1 mg/kg IV stricte	Lymphome, Certains carcinomes sarcomes	Cardiotoxicité Substrat MDR1
Predniso(lo)ne	1mg/kg PO toutes les 24h	Dose totale de 5mg PO toutes les 12h	Tumeurs lymphoïdes, mastocytomes,	Prednisolone chez le chat
Vincristine	0,5 à 0,75 mg/m ² IV tous les 7 jours	0,025 mg/kg IV tous les 7 jours	Lymphome	Métabolisme hépatique Substrat MDR1
Cyclophosphamide	250 mg/m ² IV ou PO		Lymphome	Risque cystite hémorragique Prémédication avec du furosémide

Tableau 4: Principales molécules de chimiothérapie utilisées contre le lymphome et la leucémie aiguë du chat et du chien (Cartagena Albertus and Almosni-Le-Sueur, 2012; Simon et al., 2008)

7. Utilisation en médecine humaine

Pour rappel, les indications principales de la L-asparaginase en médecine humaine sont les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et les lymphomes malins non hodgkiniens.

7.1. La leucémie aiguë lymphoblastique

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est un cancer hématologique rare qui est caractérisé par le développement incontrôlé dans la moelle osseuse de précurseurs lymphoïdes immatures. Ce qui entraîne un envahissement progressif de la moelle osseuse, du sang et de certains organes. Cet envahissement est alors responsable de signes cliniques d'insuffisance médullaire et induit un pronostic vital sombre. (Haute Autorité de Santé, 2019; Thomas et al., 2010)

Epidémiologie :

La répartition des cas de leucémie aiguë lymphoblastique est bimodale : 60% des cas de LAL sont détectés chez des patients enfants ou adolescents de moins de 21 ans (le pic d'incidence se situe entre 1 et 10 ans). Les 40% de cas restants sont diagnostiqués chez des adultes de plus de 60 ans. (Haute Autorité de Santé, 2019)

Le taux de guérison est élevé chez l'enfant, la survie à 5 ans pour les LAL chez l'enfant est aujourd'hui supérieure à 85% (Ducassou, 2018) alors que le taux de survie à long terme pour les adultes est assez bas : environ deux tiers des adultes connaissent une rechute (Thomas et al., 2010).

Traitement : (Thomas et al., 2010)

Contrairement à la médecine vétérinaire, l'objectif du traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique de l'homme est la rémission complète et la guérison.

La L-asparaginase est employée dans le traitement de première intention des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant et de l'adulte. Elle est aussi utilisée dans les protocoles de rechute.

En médecine humaine, différentes spécialités de L-asparaginase sont utilisées. Ainsi actuellement, la L-asparaginase, la crisantaspase et la pegasparaginase sont présentes dans les protocoles. La L-asparaginase provenant *E.coli* est souvent utilisée en première ligne. Cependant du fait de l'apparition de réaction d'hypersensibilité, celle-ci est souvent remplacée par la pegasparaginase dans les protocoles pédiatriques car elle présente un taux de rémission complète similaire pour une activité plasmatique prolongée et une immunogénicité moindre. Pour les adolescents et les jeunes adultes, le protocole pédiatrique semble fournir de bons résultats.

La crisantaspase est, quant à elle, utilisée lorsque des réactions d'hypersensibilité sont observées lors de l'utilisation des deux précédentes asparaginases. Cependant comme nous l'avons vu précédemment (4.), cette molécule n'est actuellement plus commercialisée en France.

7.1.1. Les protocoles

(Ducassou, 2018; Haute Autorité de Santé, 2019; Institut National du cancer, 2020)

Pour les patients de moins de 60 ans : le traitement des LAL repose sur une chimiothérapie intensive de 6 mois (phase d'induction et de consolidation), une prévention des atteintes neuroméningées et une chimiothérapie d'entretien pendant 2 ans. Pour certains patients : une allogreffe est possible

Pour les patients de plus de 60 ans, les doses de chimiothérapie sont réduites.

7.1.1.1. Chez l'enfant

En France, le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant suit le protocole du protocole national multicentrique CAALL-F01 (depuis 2018) qui correspond à un protocole de polychimiothérapie se déroulant sur plusieurs années. Ce protocole vise à cibler un schéma thérapeutique permettant une activité d'asparaginase la plus stable et durable, une production minimale d'anticorps neutralisant et une toxicité moindre.

Le traitement est composé de 3 phases :

- Une phase d'attaque de 5 à 6 semaines
- Une phase de consolidation de 4 à 6 mois
- Une phase d'entretien de 18 à 24 mois.

Les molécules les plus utilisées sont les suivantes : la vincristine, des corticostéroïdes, la L-asparaginase, le 6-mercaptopurine, le méthotrexate, l'anthracyclines ainsi que des alkylants.

Afin de prévenir un syndrome de lyse tumorale (spontanée ou iatrogène) et donc une insuffisance rénale aiguë, un traitement préventif est fréquemment mis en place pendant le protocole de chimiothérapie.

En médecine humaine, les protocoles de chimiothérapie varient suivant le type de leucémie :

	Risque standard	LAL-B de « haut risque » les LAL-T de « risque standard »	LAL-T de « haut risque »
Phase d'induction	Glucocorticoïde, vincristine Pegasparaginase	Glucocorticoïde, vincristine Pegasparaginase Anthracyclines	Glucocorticoïde, vincristine Pegasparaginase Anthracyclines Alkylants
Phase de consolidation (Utilisation de molécules non utilisées dans la phase d'entretien)	Cyclophosphamide Cytarabine 6-mercaptopurine L-asparaginase Vincristine Corticoïdes Méthotrexate		
Phase d'intensification retardée (3 mois au plus tard après la rémission complète)	Polychimiothérapie avec anthracyclines		
Phase d'entretien	6- mercaptopurine Méthotrexate		

Tableau 5 : Protocole de chimiothérapie pédiatrique contre les LAL(Ducassou, 2018)

Même si le protocole majoritaire chez les enfants est le protocole CAALL-F0, il existe d'autres protocoles comme le protocole EsPhALL et le protocole IntReALL. Ce dernier est utilisé lors des rechutes. Dans les protocoles pédiatriques, ONCASPAR® c'est-à-dire la L-asparaginase pégylée est principalement utilisée avec une administration sur 2h par voie intraveineuse (IV). Cependant, il se peut parfois que certains enfants soient traités hors protocole par de la L-asparaginase provenant *E.coli* (KIDROLASE®).

Les modalités d'administration des différentes spécialités pharmaceutiques d'asparaginase seront répertoriées dans le tableau 7.

Lors de l'utilisation de la pegasparaginase, les protocoles recommandent une prémédication afin de limiter les risques allergiques. Cette prémédication est composée d'un antagoniste des récepteurs aux leucotriènes, d'anti-inflammatoire et d'antihistaminiques :

Prémédication	Délais avant l'injection de ONCASPAR®	Posologie
Montelukast PO	2 ou 3 heures avant l'injection	entre 2-5 ans : 4 mg entre 6-14 ans : 5 mg si > 15 ans : 10 mg
Hemisuccinate d'hydrocortisone IV	30 minutes	1 mg/kg
Dexchlorphéniramine, Polaramine IV	30 minutes	< 10kg : 1.25 mg Entre 10 kg et 30 kg : 2.5 mg > 30 kg : 5 mg
Paracétamol IV	30 minutes	15 mg/kg

Tableau 6 : Prémédication recommandée suivant le protocole CAALL-F0 (Institut National du cancer, 2020)

Afin d'évaluer l'efficacité de la L-asparaginase, la mesure de l'activité de celle-ci et des taux de L-asparagine sont régulièrement mis en place lors du traitement. L'activité de la L-asparaginase est étudiée différemment en fonction du traitement utilisé car la demi-vie des asparaginases n'est pas identique.

Ainsi, selon l'Institut Nationale du Cancer, un monitoring de l'activité de la L-asparaginase est préconisé 48h et 7 jours après l'administration de la pegasparaginase. Pour les asparaginases provenant d'*E. coli* (SPECTRILA® et KIDROLASE®) le monitoring doit être réalisée à 48h de l'injection. (Institut National du cancer, 2020). L'équipe de Van der Sluis quant à elle recommande un monitoring chez les patients traités avec la L-asparaginase native à 72h et 7 jours après l'administration. Concernant la pegasparaginase, les analyses sont préconisées le 7^{ème} et le 14^{ème} jour après l'injection et 48h concernant la crisantaspase. (van der Sluis et al., 2016)

Ces mesures d'activités servent majoritairement à détecter les inactivations silencieuses. On considère qu'il y a une inactivation silencieuse lorsque dans 2 échantillons indépendants, l'activité de l'asparaginase est inférieure à la valeur seuil (0,1 UI/mL) (van der Sluis et al., 2016). Lorsqu'une inactivation silencieuse est détectée chez les patients qui reçoivent une asparaginase issue d'*E.coli*, le traitement est stoppé et la crisantaspase est alors utilisée.

7.1.1.2. Chez l'adulte

Le protocole de chimiothérapie des adultes correspond au protocole GRAALL-2014. L'utilisation des asparaginases provenant *E. coli* est recommandée.

Si la pegasparaginase est employée, les recommandations suivent le protocole CAALL-F01. Un monitoring est mis en place en cas de réaction à 48h et 7 jours après l'injection. En absence de réaction, une mesure de l'activité à J14 doit être réalisée.

Le dosage des anticorps anti-asparaginase en cas de traitement par la KIDROLASE® est recommandé chez les patients adultes en plus du dosage de l'activité de l'asparaginase. Le dosage des anticorps sera explicité dans la partie 3.

Pour l'enfant comme pour l'adulte, un changement de molécule pour ERWINASE® est réalisé lors de réactions d'hypersensibilité aux précédentes asparaginases. Chez l'adulte, le changement est ainsi réalisé lorsqu'il y a apparition d'anticorps anti-asparaginase ou bien si l'activité de l'asparaginase est inférieure à 100 UI/L

La L-asparaginase peut être utilisée 24h après un traitement à base de méthotrexate afin d'interrompre l'action anti-folique de la molécule. Cette utilisation peut permettre de remplacer le traitement de sauvetage composé d'acide folique. Cette action n'est pas utilisée en médecine vétérinaire. (Soyer and Doliger, 2011)

Molécule	L-asparaginase native	L-asparaginase recombinante	Pegasparaginase	Crisantaspase		
Nomination commerciale	KIDROLASE®	SPECTRILA®	ONCASPAR®	ERWINASE®		
Accessibilité	Indisponible	Disponible	Disponible	Disponible		
Mode d'administration	IM, IV, intrarachien	IV	IV ou IM	IM, IV		
Posologie (SC : surface corporelle)	Enfants : 500 à 1 000 UI/m ² /j	< 6 mois	6 700 UI/m ²	SC < 0,6 m ²	82,5 UI	25 000 UI/m ²
	Adultes : 7 500 et 10 000 UI/m ² /j	Entre 6 et 12 mois	7 500 UI/m ²	< 21 ans et SC > 0,6m ²	25000 UI	
	Voie intrarachidienne : 50 à 100 UI/kg	>12 mois	5 000 UI/m ²	>21 ans	2000 UI	
Fréquence d'administration	<u>Phase d'attaque</u> : quotidiennement pendant 6 à 21 jours <u>Phase d'entretien</u> : 1 à 2 fois par semaine <u>Cure de réintroduction</u> : quotidiennement pendant 5 à 15 jours	Tous les 3 jours en perfusion en 30min à 2h	Tous les 14 jours	3 fois par semaine pendant deux semaines		
Remarques	Environ 30% des patients traités par la L-asparaginase issue d'E. coli développeraient une réaction allergique		Cette spécialité est intéressante par l'intermédiaire de sa voie d'administration (perfusion IV) et de son délai plus important entre 2 administrations.	Variabilité interindividuelle : la dose peut varier. Il peut être donc intéressant de monitorer la concentration d'asparaginase dans l'objectif d'individualiser les posologies		
Sources	(Ministère des solidarités et de la santé, 2022a)	(Ministère des solidarités et de la santé, 2022c)	(Ministère des solidarités et de la santé, 2022b)	(Ministère des solidarités et de la santé, 2022d)		

Tableau 7 : Les différentes asparaginases utilisées en médecine humaine

Différentes recommandations accompagnent ces différentes spécialités. Une vigilance est recommandée après l'injection de toutes les asparaginases. Il est par conséquent important de surveiller différents paramètres sanguins tels que : la bilirubinémie, la transaminasémie, les paramètres hépatiques, la glycémie, les paramètres de la coagulation, l'amylasémie, la lipasémie, la triglycéridémie ainsi que la cholestérolémie.

7.2. Les lymphomes malins non hodgkiniens

(Drouet et al., 2010; “Le traitement des divers types de lymphome,” 2021; “Lymphomes - symptômes, causes, traitements et prévention,” 2021)

Seule la L-asparaginase native (KIDROLASE®) avait une indication pour les lymphomes malins non hodgkiniens. Actuellement, il n'existe plus d'asparaginase ayant pour indication ce type de lymphome.

Les lymphomes non hodgkiniens correspondent à la pathologie hématologique la plus courante en France (85% des lymphomes). Ils recouvrent un nombre important de lymphomes, le plus fréquent étant le lymphome B diffus à grandes cellules. La chimiothérapie peut être associée à des séances de radiothérapie et elle se repose sur des protocoles de type CHOP. À ce protocole, la L-asparaginase peut être ajoutée ainsi que du rituximab qui sont des anticorps monoclonaux anti-CD20 destiné aux lymphomes B. Le protocole R-CHOP est actuellement le protocole de chimiothérapie standard des lymphomes malins non hodgkiniens.

Les lymphomes non hodgkiniens peuvent être répertoriés en deux catégories : les indolents et les agressifs. Concernant les indolents (dont l'évolution est lente), quand un traitement est mis en place, il repose sur une chimiothérapie composée de 6 à 8 cures espacées de 3 semaines. La chimiothérapie peut être associée à d'autres anticorps monoclonaux ou des interférons alpha. Des séances de radio-immunochimie peuvent être ajoutées au plan thérapeutique.

Concernant le lymphome B diffus à grandes cellules, environ 60 à 70 % des patients sont guéris de la maladie. Cependant, environ 30 à 40 % des patients feront une rechute ou, dans le cas d'un petit groupe de patients, seront réfractaires au traitement R-CHOP. L'ajout de rituximab a permis d'augmenter le taux de survie sans événement sur 3 ans par rapport au protocole classique CHOP. (Li et al., 2018; Pfreundschuh et al., 2006) Il peut être noté qu'en médecine vétérinaire, les tentatives pour utiliser un anticorps monoclonal comme rituximab se sont révélées infructueuses.

8. Autres utilisations

Aujourd'hui, la L-asparaginase n'est pas seulement utilisée dans le domaine médical. Elle est aussi employée dans l'industrie agro-alimentaire afin de diminuer la production d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$), un composé potentiellement cancérigène qui est produit par la réaction de Maillard lors d'une cuisson à haute température (supérieur à 120°C) d'aliments riches en glucides ou en asparagine comme les céréales, les pommes de terre ou le café. (Mottram et al., 2002)

L'homme peut aussi être exposé à l'acrylamide par l'intermédiaire de la fumée de cigarette.

Des observations ont indiqué une association positive entre la consommation d'acrylamide et le cancer de l'endomètre, des ovaires et une légère association pour le cancer du sein (en particulier chez les femmes avant la ménopause) (Adani et al., 2020).

Pour pouvoir être utilisée dans l'industrie agroalimentaire, il est nécessaire que l'asparaginase ait des caractéristiques différentes de celle utilisée dans le domaine médical. En effet, elle doit être stable sur une grande plage de pH et de température contrairement à l'asparaginase médicale qui doit être stable dans les conditions physiologiques.

La L-asparaginase peut être utilisée aussi comme biocapteur dans le but de monitorer l'asparagine lors des traitements de chimiothérapie (Erdogan et al., 2014).

9. Comparaison des utilisations dans le domaine médical

Molécule du protocole	Médecine humaine	Médecine vétérinaire (chien)	Rapport H/V
CHOP			
Cyclophosphamide IV	750 mg/m ²	250 mg/m ²	3
Doxorubicine IV	50 mg/m ²	30 mg/m ²	1,7
Vincristine IV	1,4-2 mg/m ²	0,5-0,7 mg/m ²	2,8

Tableau 8 : Comparaison des doses employées en médecine humaine et vétérinaire (Feugier et al., 2005; MacDonald et al., 2005)

Comme nous pouvons l'observer, la chimiothérapie vétérinaire est moins dosée par rapport à celle humaine. En effet, chez les carnivores domestiques, l'objectif de la chimiothérapie n'est pas curatif mais palliatif afin de garantir au maximum le bien-être animal en diminuant les effets secondaires. Cependant, cette diminution de doses entraîne une diminution de l'efficacité. Afin d'augmenter l'efficacité des traitements, une molécule ayant peu d'effet secondaire notamment digestifs et myélotoxique peut être intéressante : c'est le cas de la L-asparaginase.

Comme nous l'avons vu précédemment, les asparaginases ne sont pas employées de la même manière en médecine vétérinaire et en médecine humaine.

	Médecine vétérinaire	Médecine humaine
Objectif du traitement	Curatif	Palliatif
Indication majoritaire	Lymphomes malins	Leucémies aiguës lymphoblastiques
Molécules utilisées actuellement	SPECTRILA®	SPECTRILA®, ONCASPAR®
Voie d'administration majoritaire	IM	IV en perfusion (SPECTRILA®)
		IV ou IM (ONCASPAR®)
Nombre d'injection	Le plus souvent unique ou mensuelle	Administrations répétées
Phase où la L-asparaginase est utilisée	Induction	Consolidation
Variabilité des protocoles	Identique	Variable selon âges et selon le type de leucémie aiguë lymphoblastique
Choix du protocole	Variable en fonction de la volonté du propriétaire (coût, faisabilité...)	/
Monitoring de l'activité de l'asparaginase	Aucun	Réalisé systématiquement

Tableau 9: Comparaison des utilisations en médecine humaine et vétérinaire

La fréquence d'administration de la L-asparaginase est beaucoup plus élevée en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. En prenant l'exemple de la KIDROLASE®, elle était utilisée chez l'enfant lors de la phase d'attaque tous les jours pendant 6 à 21 jours et était administrée 1 fois par mois voire 1 unique fois chez les carnivores domestiques. Cette haute fréquence d'administration tout au long du traitement permet de garantir une déplétion en L-asparagine continue pour les cellules tumorales chez l'homme. Ce qui n'est pas le cas en médecine vétérinaire où le lymphome se remet à croître très rapidement. Le maintien d'une déplétion en L-asparagine chez les carnivores domestiques permettrait peut-être d'atteindre une rémission se rapprochant des résultats chez l'homme et l'enfant.

10. Phénomènes de toxicité, d'inactivation et de résistance

10.1. Rappels d'immunologie

10.1.1. Le caractère immunogène des protéines

Le caractère immunogène d'une molécule exogène est en lien avec son poids moléculaire. Une protéine étrangère commence à être immunogène à partir de 6 kDa et son immunogénicité augmente avec sa taille (ASSIM, 1993). Le caractère très immunogène des protéines est dû à leur structure complexe, à leur polymorphisme, à leur stabilité structurale et à leur action biologique. (Day and Schultz, 2014; Tizard, 2013)

De multiples paramètres influencent le pouvoir immunogène d'une protéine. Un des principaux paramètres est le degré de « non-soi ». Ainsi, une protéine thérapeutique d'origine bactérienne sera considérée plus étrangère qu'une protéine possédant un haut niveau d'homologie avec les protéines « du soi » de l'individu. De même, les procédés de production et de purification influent aussi sur le caractère immunogène d'une protéine. Ainsi la présence d'agrégats, de produits de dégradation ou d'endotoxines (tels que les LPS) peuvent induire une réponse immunitaire. (Stas et al., 2009)

10.1.2. La sensibilité immédiate :

La réaction d'hypersensibilité immédiate est une réaction des mastocytes et des IgE qui provoquent rapidement des fuites vasculaires et des sécrétions muqueuses.

Les réactions d'hypersensibilités se développent de la façon suivante : les cellules Th2 et Tfh (T folliculaires auxiliaires) s'activent et sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13. Cette sécrétion stimule alors la production d'IgE contre l'antigène. Les IgE se lient aux récepteurs Fc des mastocytes. Un nouveau contact avec l'antigène conduit alors à l'activation des mastocytes et donc à la libération de médiateurs : des amines vasoactives et des médiateurs lipidiques qui provoquent une réaction d'hypersensibilité immédiate (quelques minutes après le contact) et des cytokines qui provoquent une réaction retardée (6 à 24h après le contact).

Les hypersensibilités peuvent prendre différentes manifestations cliniques comme une rhinite, une sinusite allergique, une allergie alimentaire, de l'asthme bronchique ou pour la forme la plus sévère : la réaction anaphylactique.

L'anaphylaxie se manifeste cliniquement par une chute de la pression artérielle provoquée par une vasodilatation et par une obstruction des voies respiratoires provoquée par une bronchoconstriction et un œdème laryngé. L'anaphylaxie est provoquée par une dégranulation importante des mastocytes en réponse à un antigène systémique. Cette réaction peut être mortelle. (Abbas et al., 2020)

10.2. Toxicité de la L-asparaginase

Deux mécanismes sont à l'origine de la toxicité de la L-asparaginase : la réaction immunoallergique et la déplétion en asparagine qui provoque l'inhibition de la synthèse protéique.

L'efficacité du traitement à base de L-asparaginase est directement liée à son degré de tolérance. En effet, les patients traités par une dose moindre, du fait de leur sensibilité aux effets toxiques de la molécule, ont un moins bon pronostic que ceux pouvant être traités avec la dose maximale. (Rousseau et al., 2011)

En médecine vétérinaire, globalement les effets secondaires sont rares. La dose toxique est éloignée de la dose thérapeutique : la DL50 est de 50 000 UI/m² contre une dose de thérapeutique 400 UI/kg. Le traitement provoque peu de signes cliniques non spécifiques : absence d'alopécie, peu de troubles digestifs ou de trouble hématologique. Des vomissements sont possibles à partir de 10 000 UI/kg. (Lanore and Delprat, 2002)

En médecine humaine, une toxicité est rapportée dans 30% des cas (Raetz and Salzer, 2010). Les phénomènes de toxicité les plus fréquents sont les réactions allergiques, les pancréatites et les thromboses vasculaires qui se manifestent respectivement dans 5.8%, 5.6% and 3.5% des cas d'après l'étude de l'équipe de Tanfous. (Ben Tanfous et al., 2015)

D'autres troubles sont associés aux L-asparaginases tels que des troubles gastrointestinaux (53,6%), des douleurs (51,5%), des troubles neurologiques (47,4%), de la fatigue (34%), des infections (29,9%) et des réactions allergiques (2 %). (Haute Autorité de Santé, 2019)

Nous détaillerons ci-dessous ces effets toxiques ou indésirables.

10.2.1. Réactions allergiques

Les réactions allergiques peuvent prendre diverses manifestations : allant de la simple réaction locale sur le site d'injection à la réaction anaphylactique.

Les réactions allergiques suite à une seule administration sont rares mais, comme la L-asparaginase peut être issue d'*E. coli* qui est présente dans la flore intestinale normale, des anticorps contre l'enzyme peuvent être présents à la première injection. (Blake et al., 2016)

Les réactions d'hypersensibilités sont favorisées par une augmentation des doses, une administration intraveineuse à la place d'une administration intramusculaire ainsi qu'une répétition des injections.

10.2.1.1. En médecine vétérinaire

Les réactions allergiques cliniquement significatives sont rares en médecine vétérinaire, que ce soit chez les chiens ou chats recevant une ou plusieurs doses lors du traitement. Les réactions allergiques sont encore plus rares chez le chat que chez le chien. (Blake et al., 2016)

Les réactions d'hypersensibilité apparaissent principalement dans l'heure après l'injection de L-asparaginase. Le risque de choc histaminique est majoré dans le cas où l'injection se réalise par voie intraveineuse ou par voie intrapéritonéale. Cette réaction peut se déclencher jusqu'à 24h après l'injection. Elle est observée chez 5% des chiens et est moins fréquente chez les chats. (Valence Vieilleigne and Cyril Parachini-Winter, 2021). Les réactions d'hypersensibilités sont donc rares chez les carnivores domestiques. Lors de ces chocs, un œdème de Quincke, une urticaire généralisée, une hypotension peuvent être présents.

En prévention des réactions allergiques, il est possible de procéder à un traitement préventif à base de corticoïdes ou à base d'antihistaminiques (diphénhydramine 2mg/kg SC ou IM) 20 à 30 minutes avant l'injection de la L-asparaginase. Il est important de garder l'animal sous surveillance pendant au moins 30 min après l'injection du traitement. (Cartagena Albertus and Almosni-Le-Sueur, 2012)

On peut noter que l'utilisation de la pegasparaginase réduit le risque de ces chocs allergiques. (Soyer and Doliger, 2011)

Les réactions d'hypersensibilité immédiate ne sont donc pas un réel problème en médecine vétérinaire.

10.2.1.2. En médecine humaine

Les réactions d'hypersensibilité demeurent les effets indésirables les plus importants. La fréquence des réactions allergiques varie entre 0% à 76% selon les études. Mais en moyenne 10 à 30% des individus recevant une première injection développent une réaction allergique. (Raetz and Salzer, 2010)

Les réactions allergiques se manifestent de différentes manières : de l'urticaire, du prurit, de l'œdème une réaction érythémateuse au point d'injection ou même une réaction systémique. Différents paramètres influent sur la survenue des réactions allergiques comme la formulation de la L-asparaginase, les molécules de chimiothérapie utilisées concomitamment, la localisation du point d'injection, la voie d'administration ou les antécédents allergiques du patient. (Chien et al., 2014)

La survenue de réaction allergique varie en fonction de l'asparaginase utilisée. La L-asparaginase pégylée provoque moins d'allergie que la L-asparaginase native. De plus, l'incidence des réactions allergiques est plus faible dans les protocoles utilisant la PEGasparaginase comme traitement de première intention. (Brigitha et al., 2022)

Dans les cas où les patients traités par les L-asparaginase d'*E.coli*, développent une allergie, leur traitement est basculé pour la crisantaspase car il n'existe pas de réaction croisée avec celle-ci. (Vrooman et al., 2010; Wang et al., 2003). La crisantaspase provoque néanmoins elle-aussi des réactions anaphylactiques. Des recherches concernant une crisantaspase pégylée sont en cours. (Chien et al., 2014)

La différence d'immunogénicité entre la voie intramusculaire et intraveineuse a été observée chez l'homme. Ainsi, des études ont démontré que la pegasparaginase était plus immunogène lors des injections par voie intraveineuse que lors des injections par voie intramusculaire. L'administration de la pegasparaginase se faisait traditionnellement par voie intramusculaire mais cette voie a été rapidement modifiée car elle était beaucoup moins pratique dans son utilisation et provoquait plus de douleur pour le patient. La voie intraveineuse a donc été privilégiée. Ainsi la voie actuellement utilisée majoritairement est la voie intraveineuse même si elle engendre plus de réactions allergiques car elle présente tout de même un profil d'innocuité acceptable pour le traitement des patients atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques. (Petersen et al., 2014).

Un traitement en parallèle avec de la vincristine ou de la prednisone et la diminution de l'intervalle entre les injections permettent de diminuer les risques d'hypersensibilité.

En médecine humaine, du fait des risques de réactions anaphylactiques, la L-asparaginase ne doit pas être injectée en injection intraveineuse en bolus. Des tests intradermiques ou l'inoculation d'une petite dose peuvent être réalisés en amont de la perfusion. (Ministère des solidarités et de la santé, 2022c)

10.2.2. Pancréatite aiguë

Une pancréatite est une inflammation du pancréas, qui est dans la majorité des cas, réversible. Elle est caractérisée par la présence d'œdème interstitiel, par une infiltration de cellules inflammatoires et à des degrés variables d'apoptose, de nécrose et d'hémorragies.

Comme cité précédemment, un traitement à base de L-asparaginase provoque une inhibition de la synthèse protéique par la déplétion en L-asparagine. Ce serait alors cette réduction de la synthèse protéique qui provoquerait une cytotoxicité pour les organes à haute teneur en protéine comme l'est le pancréas ou le foie. Cependant, le mécanisme exact reliant la L-asparaginase est une toxicité pancréatique reste encore flou. Le risque de pancréatite aiguë est majoré lorsque la L-asparaginase est injectée par voie intravasculaire ou intrapéritonéale. (Lanore and Delprat, 2002)

10.2.2.1. En médecine vétérinaire

(Cridge et al., 2021; Soyer and Doliger, 2011)

Dans 1% à 2% des cas, une pancréatite hémorragique aiguë peut être observée, surtout lorsque la L-asparaginase est injectée par voie intrapéritonéale. Il n'existe pas de signes pathognomoniques chez le chien, mais les signes cliniques les plus fréquents sont des vomissements, une anorexie, un syndrome abdominal aigu et un état de choc. Chez le chien, la douleur abdominale peut être parfois mise en évidence par la « position du prier ». Une déshydratation (une augmentation de l'hématocrite et des protéines totale), une leucocytose, une augmentation des amylases, des lipases et du trypsinogène (TLI) peuvent être objectivées. Dans ces cas de pancréatite aiguë hémorragique, il convient de mettre l'animal à la diète et de réaliser une fluidothérapie tout en surveillant régulièrement l'ionogramme.

10.2.2.2. En médecine humaine

Les pancréatites aiguës ont été notifiées en pédiatrie. Elles sont apparues, pour la majorité des cas, quelques jours après l'administration de la L-asparaginase. Ce délai pourrait être expliqué par le délai pour atteindre une déplétion des protéines.

Les symptômes d'une pancréatite sévère sont les suivants : douleur épigastrique ou péri-ombilicale, irradiation ou douleur dorsale, nausées, vomissement, anorexie, pâleur, ictère, signe de Cullen caractérisé par un hématome sous-cutané péri-ombilical, une hyperthermie, une hyperamylasémie ou une hyperlipasémie.

Le traitement initial repose sur la prise en charge d'éventuelles complications systémiques (en particulier un état de choc et une CIVD) et la correction des troubles hydroélectrolytiques (traitement de l'hypocalcémie, de l'hyperglycémie ou de l'acidocétose). En cas de pancréatite aiguë sévère, une antibiothérapie précoce (association ceftazidime ou imipénème ou pipéracilline avec un aminoside) est importante pour prévenir une surinfection causée par une nécrose pancréatique. La mise au repos du tube digestif avec une alimentation parentérale et la mise en place de protecteur gastrique sont indiquées. De même, une insulinothérapie peut être appliquée lors d'hyperglycémie.

Comme énoncé précédemment, des complications peuvent survenir lors de cette pathologie comme un choc, une CIVD, mais aussi de l'ascite, un épanchement pleural, une acidocétose, des pseudokystes ou une insuffisance pancréatique exocrine. Chez certains patients, un diabète insulino-dépendant persiste après l'épisode aigu de la pancréatite. L'autodigestion du pancréas (par la trypsine par exemple) pourrait expliquer de même, une extension des lésions. (Laugel et al., 2005)

Lors d'un traitement, l'amylasémie et la lipasémie sont généralement augmentées. Cette augmentation est normale chez les patients du fait de la diminution de la synthèse protéique. Cependant, la pancréatite aiguë peut être majorée chez les patients qui présentent une hypertriglycéridémie sévère. (Ministère des solidarités et de la santé, 2022c)

Une étude a démontré que les patients n'étaient pas tous égaux concernant les risques de développer une pancréatite (ou une allergie) à la suite d'un traitement par l'asparaginase. En effet, les patients homozygotes pour l'allèle 3R de l'asparagine synthétase ont un risque de toxicité plus élevée. (Ben Tanfous et al., 2015)

10.2.3. Trouble de la coagulation

La déplétion en L-asparagine provoquée par la L-asparaginase est à l'origine d'une diminution de la synthèse des protéines procoagulantes, anticoagulantes et fibrinolytiques, ce qui provoque un état d'hypercoagulabilité.

Ainsi, on observe chez les patients traités par la L-asparaginase une diminution de l'antithrombine III et du fibrinogène. Les patients sont donc exposés à un risque de thrombose veineuse. La localisation des thrombus est diverse : des thromboses cérébrales, des embolies pulmonaires, des thromboses des veines profondes, de l'atrium droit et des membres peuvent survenir.

Des mesures prophylactiques peuvent être utilisées. Ainsi, l'administration d'antithrombine ou d'héparine peut être envisagée. L'utilisation de plasma frais congelé n'est pas recommandée.

Les risques de thromboses sont majorés par les contraceptifs à base d'œstrogènes, qui doivent donc être remplacés par des progestagènes. De même, un traitement de longue durée, ou l'utilisation simultanée de prednisone ou d'anthracyclines peuvent augmenter ce risque. (De Stefano et al., 2015; Hunault-Berger, 2015; Hunault-Berger et al., 2008)

En médecine vétérinaire, la déplétion en protéines est moins importante avec les protocoles actuels et a donc moins de répercussion sur l'animal qu'en médecine humaine. En effet, c'est l'utilisation répétée de la L-asparaginase qui perturbe la synthèse des protéines. On peut, tout de même, observer une diminution de l'albumine (asymptomatique en générale), une légère diminution des facteurs de la coagulation comme la prothrombine et le fibrinogène qui accroît de façon modérée les temps de coagulation : les temps de quick (TQ) et de céphaline kaolin (TCK) et une diminution de l'antithrombine III ; ce qui peut augmenter le risque de thrombose. (Rogers et al., 1992; Soyer and Doliger, 2011)

10.2.4. Cytolyse hépatique

Les adultes âgés de plus de 45 ans, obèses avec une stéatose hépatique sont plus à risque vis-à-vis de la toxicité hépatique de la L-asparaginase. (Hunault-Berger, 2015)

Des cas d'insuffisance hépatique sévère ont été rapportés. Ainsi des cholestases, des ictères, des nécroses hépatiques et des défaillances hépatiques ont été observés dans de rares cas. Il est donc essentiel de suivre les paramètres hépatiques lors du traitement.

Il est recommandé d'arrêter le traitement lors qu'un patient déclare une insuffisance hépatique sévère qui peut être objectivée par une augmentation de la bilirubine, des transaminases, une hypertriglycéridémie, une hyperglycémie ou bien des troubles de la coagulation. (Ministère des solidarités et de la santé, 2022c)

10.2.5. Hyperglycémie

En inhibant la synthèse des protéines, la L-asparaginase entraîne une diminution de la synthèse de l'insuline, une diminution des récepteurs à l'insuline, une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques ainsi qu'une hyperglucagonémie qui occasionnent une hyperglycémie. Cette hyperglycémie est le plus souvent auto-résolutive. Une corticothérapie concomitante peut prendre part à ce syndrome. La glycémie et la glycosurie doivent donc être contrôlées au cours du traitement.

(Ministère des solidarités et de la santé, 2022c; Raetz and Salzer, 2010; Soyer and Doliger, 2011)

10.2.6. Syndrome de lyse tumorale aiguë

La L-asparaginase agit de façon très efficace sur les cellules lymphoblastiques. Mais, lorsque le traitement fonctionne très bien, cela peut aboutir à un syndrome de lyse tumorale aiguë qui correspond à la libération rapide dans le sang d'une importante quantité d'éléments qui habituellement sont intracellulaires. Ainsi du phosphore, du potassium, des lactates, de l'acide urique et des bases azotées se retrouvent en excès dans la circulation sanguine. Cet excès entraîne un défaut de métabolisation et d'excrétion par les reins et par le foie, ce qui provoque finalement un déséquilibre métabolique et électrolytique potentiellement fatal.

L'association de traitements puissants de chimiothérapie comme la L-asparaginase et la vincristine a été décrite comme pouvant dans de rares cas provoquer un syndrome de lyse tumorale aiguë lors de lymphomes de haut grade chez le chien.(Clifford and De Lorimier, 2008)

Les signes cliniques d'une lyse trop brutale des cellules cancéreuses se manifestent le plus souvent 24 à 48h après l'injection de L-asparaginase et entraînent des symptômes peu spécifiques comme des vomissements, de la diarrhée, une bradycardie ou un état de choc. Ce syndrome occasionne de même une hypocalcémie, une acidose lactique ainsi qu'une augmentation de la kaliémie, de la phosphatémie, de l'urémie et de la créatinémie.(Clifford and De Lorimier, 2008)

Lorsqu'un risque de syndrome de lyse tumorale est présent (volume tumoral élevé, insuffisance rénale ou hépatique existante, animal déshydraté...), certains vétérinaires injectent l'asparaginase en 2 temps (2 injections de 200 UI/kg à 24 ou 48h d'intervalle). (Soyer and Doliger, 2011; Valence Vieilleville and Cyril Parachini-Winter, 2021)

En prévention de la néphropathie uratique provoquée par une hyperuricémie, une alcalinisation des urines et l'administration d'allopurinol peuvent être employées. (Ministère des solidarités et de la santé, 2022c)

10.2.7. Atteinte cérébrale

Par son mode d'action, la réaction d'hydrolyse de l'asparagine produit de l'ammoniac, de l'acide aspartique ainsi que de l'acide glutamique. Ces deux acides aminés peuvent induire la mort cellulaire des neurones du système nerveux central (SNC) par l'intermédiaire des récepteurs NMDA ce qui a pour conséquence l'afflux de calcium dans les cellules et leurs apoptoses. (Beziat et al., 2019)

De plus, une insuffisance hépatique peut s'ajouter et accentuer l'accumulation d'ammoniac dans l'organisme. Cette accumulation est alors provoquée par une diminution de la dégradation de l'ammoniac par les enzymes du foie.

Les complications du SNC (à l'exception de la thromboembolie du SNC) se manifestent par de la confusion, de la somnolence, de la déperdition, de la léthargie, de la fatigue voire même un coma (Raetz and Salzer, 2010)

En médecine humaine, le risque d'une hyperammoniémie subaiguë a été notifié. Par précaution, il convient par conséquent de surveiller les animaux insuffisants hépatiques chroniques afin de contrôler une potentielle encéphalopathie hépatique. (Lanore and Delprat, 2002)

10.3. Phénomènes d'inactivation

Comme nous l'avons étudié précédemment, la L-asparaginase est une protéine exogène qui provoque la formation d'anticorps. Cette réaction immunitaire déclenche parfois une réaction allergique sévère (hypersensibilité) mais peut aussi conduire à une réaction asymptomatique qui peut être qualifiée d'inactivation silencieuse. En effet, les anticorps circulants (le plus souvent des IgG) peuvent neutraliser la L-asparaginase ou entraîner une clairance rapide du médicament sans déclencher de symptômes cliniques d'hypersensibilité. (Raetz and Salzer, 2010)

En médecine humaine, cette inactivation est perceptible chez 8 à 30% des patients. (Hunault-Berger, 2015). La quantité d'anticorps anti-asparaginase varie en fonction des patients mais aussi de la forme d'asparaginase utilisée. Ainsi, le taux d'anticorps produit lors de l'utilisation de la pegasparaginase est moins important que pour la crisantaspase et la L-asparaginase native. (Raetz and Salzer, 2010)

Les anticorps circulants pourraient potentiellement réduire ou neutraliser l'activité de l'asparaginase de plusieurs façons :

- Une clairance accrue par opsonisation et liaison des complexes [Ig-asparaginase] aux récepteurs Fc
- Une séquestration de la L-asparaginase au site d'injection
- Une inhibition directe, par blocage stérile ou liaison au site catalytique (Kidd et al., 2015)

En médecine humaine, un monitoring de l'activité de l'asparaginase est mis en place pour contrôler l'inactivation silencieuse de la molécule et ainsi contrôler l'efficacité du traitement à base de L-asparaginase. Le monitoring de l'activité sera abordé dans la partie 3.

10.4. Résistances à la L-asparaginase

Chez l'homme, la résistance à la L-asparaginase peut provenir d'une hyper-expression de l'asparagine synthétase, d'un polymorphisme du gène codant l'asparagine synthétase ou codant le facteur de transcription ATF5.

(Ben Tanfous et al., 2015; Rousseau et al., 2011)

De même, une régulation positive de l'arginosuccinate synthase 1 (ASS 1) dans les cellules leucémiques peut provoquer une résistance au traitement. L'ASS 1 est une enzyme à la croisée des cycles de l'urée et de l'oxyde nitrique, qui catalyse la conversion de l'aspartate et de la citrulline en arginosuccinate. Cette dernière peut servir de source pour la synthèse de l'asparagine. (Rousseau et al., 2011).

Les cellules leucémiques ne sont pas les seules impliquées dans les phénomènes de résistance. En effet, les individus eux-mêmes peuvent jouer un rôle dans cette résistance. Une hyper-expression de la glutamine synthétase par les adipocytes dans le cas d'un surpoids peut entraîner une résistance au traitement. En effet, les adipocytes contribuent de façon importante à la réserve de glutamine de l'organisme. L'obésité peut, de ce fait, contrecarrer l'activité de l'asparaginase en perturbant son action glutaminase. (Chen, 2015; Ehsanipour et al., 2013)

Partie 2 : Production de la L-asparaginase de type II

1. Introduction

Comme nous l'avons évoqué dans la partie I, suite à l'arrêt de commercialisation de la KIDROLASE® et de l'ERWINASE®, le corps médical s'est retrouvé confronté à une pénurie de L-asparaginase. Pour pallier cette pénurie, nous avons mené une réflexion sur la possibilité de produire une asparaginase vétérinaire.

Cette production permettrait alors de produire une molécule plus homologue de la molécule canine pour nos carnivores domestiques et de limiter l'immunisation des animaux contre le traitement. Rappelons, en effet, que l'un des problèmes majeurs de la L-asparaginase est l'immunisation silencieuse des individus contre le traitement qui diminue l'efficacité du traitement voire le rend totalement inefficace.

L'objectif de cette étude est par conséquent la production d'une molécule vétérinaire moins immunogène pour l'espèce canine.

Afin de réaliser cet objectif, deux alternatives sont possibles :

- soit produire une asparaginase bactérienne recombinante en essayant de modifier ses caractéristiques
- soit produire une asparaginase à l'aide, non pas d'une séquence bactérienne, mais directement à l'aide d'une séquence canine afin de diminuer son immunogénicité.

La production de cette L-asparaginase a été rendue possible par une étroite collaboration entre le pôle vétérinaire et le pôle ingénieur agroalimentaire de l'école ONIRIS. Des étudiants ingénieurs lors de leur dernière année de formation se sont rassemblés afin de participer au projet. Leur travail et le résultat de leurs recherches seront illustrés en annexe 2. Cette partie II rassemblera mes recherches pour le projet, elles ont été effectuées séparément de celles réalisées par le pôle ingénieur.

2. Le choix du gène codant la L-asparaginase de type II

Les L-asparaginases utilisées en médecine humaine et vétérinaire sont des asparaginases issues de gènes bactériens. KIDROLASE®, ONCASPAR® et SPECTRILA® proviennent d'*E.coli* et ERWINASE® de *E. chrysanthemi*. KIDROLASE® et ERWINASE® sont des asparaginases natives c'est-à-dire produites directement par les bactéries. SPECTRILA® est la seule asparaginase recombinante sur le marché français. Cette L-asparaginase est produite par une cellule bactérienne dont le matériel génétique a été transformé. Le gène *E.coli* le plus couramment utilisé dans la recherche est le gène *ansB*. ("ansB - L-asparaginase 2 - *Escherichia coli* (strain K12)," n.d.)

Aucune asparaginase n'est actuellement produite à partir d'un gène eucaryote. Cependant, le gène est séquencé chez différents organismes eucaryotes comme par exemple chez le chien. ("Asparaginase - *Canis lupus familiaris* (Dog)," n.d.)

3. Le choix de l'organisme hôte

La L-asparaginase peut être synthétisée à l'aide de nombreux organismes. Parmi ces organismes, ce sont les microorganismes qui sont majoritairement utilisés pour la production industrielle. En effet, leur croissance facile et rapide ainsi que leurs substrats peu chers placent les microorganismes en première position pour la production d'enzymes tels que la L-asparaginase. De même, les microorganismes peuvent être facilement modifiés génétiquement dans le but d'augmenter les rendements ou pour rendre plus facile certaines étapes comme l'extraction ou la purification.

Dans la thérapeutique vétérinaire et humaine, seules les asparaginases produites par l'intermédiaire de deux organismes *Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi* sont utilisées. D'autres organismes peuvent aussi être exploités. Ainsi des bactéries, des levures, des champignons ou des algues sont aujourd'hui étudiés pour la production de L-asparaginase.

La L-asparaginase est aussi employée dans l'industrie agroalimentaire afin de diminuer la formation d'acrylamide dans les denrées alimentaires. Cette asparaginase est produite principalement à partir de deux champignons : *Aspergillus niger* (PreventASe®) et *Aspergillus oryzae* (Acrylaway®) (Da Cunha et al., 2021; Krishnakumar and Visvanathan, 2014a)

Bactéries	<i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>Bacillus sp</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
Actinomycètes	<i>Streptomyces albidoflavus</i> , <i>Streptomyces gulbargensis</i> , <i>Streptomyces venezuelae</i>
Champignons	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus tamarisii</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium sp</i> , <i>Fusarium</i> .
Levures	<i>Rhodosporidium</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Archées	<i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Thermococcus kodakaraensis</i> , <i>Thermococcus gammatolerans</i> , <i>EJ3</i>

Tableau 10 : Microorganismes pouvant participer à la production de L-asparaginase (Cachumba et al., 2016; Da Cunha et al., 2021; Krishnakumar and Visvanathan, 2014b; Krishnapura et al., 2016)

Le système de production via *E.coli* est un modèle usuellement utilisé et parfaitement connu dans le cadre de la production de protéines recombinantes.

Nous étudierons alors par la suite, la biosynthèse par l'intermédiaire *E.coli* à l'aide d'une séquence génomique provenant aussi *E.coli* car utilisée lors de la production des asparaginases thérapeutiques SPECTRILA® et KIDROLASE® afin de vérifier si elle pourrait être utilisée dans le cadre de notre projet.

4. Caractérisation de la biosynthèse d'une protéine procaryote.

4.1. Choix de la souche d'*E.coli*.

Le vecteur pET associé à l'étiquette 6-histidine (His-tag) est très souvent utilisé pour obtenir une protéine recombinante. His-tag est un petit marqueur d'affinité avec un niveau élevé d'expression grâce à un promoteur fort et un système de purification robuste (Ni-NTA). Cependant, His-tag peut diminuer la solubilité de la protéine. Dans ce cas, un nouveau vecteur peut être utilisé : le vecteur pHAT.

La souche d'*E.coli* BL2(DE3) est souvent privilégiée en raison de l'absence de deux principaux gènes de protéases clonés dans le système pET. Ainsi cette souche d'*E.coli* possède un gène codant la polymérase T7 et ne possède pas les gènes codants pour les protéases Lon et OmpT ce qui la rend incapable de dégrader les protéines étrangères.(Gopal and Kumar, 2013)

Concernant l'expression du gène d'intérêt, l'inducteur d'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) est le système le plus utilisé. IPTG est un analogue de l'allolactose, un métabolite du lactose, qui active la transcription de l'opéron lactose.(Vidya et al., 2011; Zhang et al., 2017).

Cependant, lorsqu'on utilise la souche BL2(DE3) et le système pET, le niveau d'expression de la protéine recombinante est difficile à manipuler. En effet, l'inducteur est un inducteur puissant même à de très faibles concentrations. (Rosano et al., 2019)

De plus, avec la souche d'*E.coli* BL2(DE3), il peut exister des fuites lors de l'expression. Si la protéine produite est toxique même en petite quantité, ce n'est peut-être pas la meilleure méthode pour la production de cette protéine recombinante. Une autre souche peut être utilisée pour minimiser les fuites : il s'agit des souches BL21(DE3)pLys S et BL21(DE3)pLys E. Ces souches améliorées possèdent un plasmide codant pour un lysozyme. Ce lysozyme est un inhibiteur de la polymérase T7 ce qui inhibe la polymérase T7 résiduelle et empêche donc les fuites lors de l'expression.(Gopal and Kumar, 2013).

Concernant la L-asparaginase, cette enzyme n'est pas toxique pour *E.coli* car produite naturellement par celle-ci.

L'utilisation de la souche d'*E.coli* BLR (DE3) associée au vecteur pPNHAsp a aussi présenté de bons résultats. (Khushoo et al., 2005)

Gène (ansB)	E.coli	E. coli MTCC 739	E.coli MG27
Hôte	d' <i>E.coli</i> BL21(DE3) (et <i>E. coli</i> DH5a)	<i>E.coli</i> BL21(DE3) (et DH5a)	<i>E. coli</i> JM109
Plasmide	pET-15b-ansB	pET-20b	pGEMT
Site de restriction	Nde I et <i>Xho</i> I	<i>Eco</i> RI et <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI et <i>Hind</i> III
Amorce	5'-AAACATATGT TACCCAATAT CAC-3'	5'-GCGGAATTCG TTACCCAATA TCACCA-3'	5'-GGTGGATCC TTACCCAATA TCACCATTTTA G-3'
Amorce inverse	5'-AAACTCGAGT TAGTACTGAT TGAAG-3'	5'-GCGGAATTCG TTACCCAATA TCACCA-3'	5'-GGGAAGCTTT TAGTACTGAT TGAAGATCTG-3
Induction de l'expression	IPTG	IPTG	IPTG
Sources	(Zhang et al., 2017)	(Vidya et al., 2011)	(Mohamed et al., 2015)

Tableau 11: Caractéristiques de la production de la L-asparaginase recombinante

4.2. La fermentation bactérienne

Pour la production d'enzymes par des microorganismes tels que les bactéries, la meilleure méthode de production est la fermentation car elle permet une haute disponibilité, un faible coût et une production possible à grande échelle.(Chia et al., 2016)

Il existe 2 types de fermentation : la fermentation immergée (SmF) et la fermentation solide (SSF).

La fermentation immergée est la technique la plus utilisée. Cette technique permet la croissance des microorganismes dans un bouillon de culture liquide qui contient les nutriments nécessaires. La culture se déroule dans un réacteur fermé contenant le milieu de fermentation ainsi qu'une forte quantité d'oxygène. Les bactéries sont couramment utilisées dans ce processus de fermentation car elles ont le plus souvent besoin d'une quantité importante d'humidité. Ce processus dépend de plusieurs paramètres comme : la température, le pH, le temps de fermentation, la concentration en oxygène, l'aération, la concentration en carbone et en azote.

Cependant, cette technique présente des inconvénients comme un faible rendement, un coût élevé et une production importante d'eaux usées.

La fermentation solide est une fermentation par laquelle les micro-organismes croissent dans un milieu solide possédant un taux d'humidité réduit. Cette technique permet l'utilisation de déchets tels que les déchets agricoles ou les résidus industriels ce qui permet de réduire les coûts de production. Cependant cette méthode de fermentation n'est utilisée que pour des productions à petites échelles car les processus d'extraction et de purification sont plus complexes. (Doriya et al., 2016)

4.3. Les paramètres du milieu de culture

Afin d'optimiser au mieux la synthèse d'une protéine recombinante par des organismes bactériens, ici *E.coli*, le milieu de culture doit être choisi avec soin. Ainsi il est primordial d'étudier les paramètres du substrat, la température et le pH.

4.3.1. Le Substrat

Afin de permettre la croissance et de maintenir en vie les cultures des lignées bactériennes, un milieu de culture nutritif doit être utilisé. Les milieux de culture LB sont une référence dans l'industrie pour la production de protéines recombinantes à partir d'*E.coli*. (Chia et al., 2016; Kenari et al., 2011; Vidya et al., 2011; Zhang et al., 2017)

Différentes études ont cherché à optimiser la production de L-asparaginase par l'intermédiaire des paramètres du milieu de culture des bactéries. Ainsi, l'étude de Kenari et son équipe sur une souche *E.coli* ATCC 11303 a permis de déterminer des conditions de milieu optimales pour la production de L-asparaginase qui sont les suivantes :

1,8% de lactose comme source de carbone, 1,6% d'extrait de levure, 1,79% de tryptone et 0,19% de L-asparagine comme source d'azote ainsi que 2% de phosphate de monopotassium (KH₂PO₄) comme source d'ions. (Kenari et al., 2011)

D'après les recherches de l'équipe de Cedar, la production de L-asparaginase est stimulée par un enrichissement du milieu « mineral-salt-glucose » avec du tryptone, de l'extrait de levure ou d'un hydrolysate de caséine. L'hydrolysate de caséine est aussi efficace que le tryptone ou l'extrait de levures. De plus, pour augmenter la production, il est nécessaire d'ajouter deux à trois groupes d'acide aminé. Certains paramètres ne stimulent pas la production, c'est le cas de l'ajout de L-asparagine seule ou bien d'une supplémentation en vitamines ou en chlorure de sodium. (Cedar and Schwartz, 1968)

De même, l'étude de Roberts a démontré qu'un milieu de culture composé de mouture humide de maïs permettait une très bonne production de L-asparaginase. Celle-ci est associée à la présence de L-glutamine, de L-méthionine et d'acide lactique. La présence de sodium quant à elle, semble supprimer la production de L-asparaginase (Roberts et al., 1968)

Cependant les sucres, particulièrement le glucose, inhibent la production de notre enzyme d'intérêt. Parmi les sucres, le galactose inhibe le moins sa production. Cette inhibition pourrait être expliquée par un défaut d'assimilation des lactates par les cellules bactériennes. En effet, les lactates stimulent la synthèse de L-asparaginase et le glucose provoquerait une inhibition des catabolites qui interviennent dans le transport des lactates. (Cedar and Schwartz, 1968; Garaev and Golub, 1977)

4.3.2. Le pH et la température

Le pH du milieu est un paramètre important à prendre en compte lors de la production. En effet, il peut agir sur la structure de l'enzyme mais aussi sur les bactéries en influant sur les différents échanges à travers la membrane bactérienne.

Lors de la production de l'enzyme, le contrôle du pH est crucial lorsque du fructose, du glucose ou du mannitol est utilisé comme source de carbone. En effet, ils diminuent le pH du milieu par la production d'acides dans le processus de fermentation ce qui inhibe la synthèse de la L-asparaginase (Alrumman et al., 2019; Kenari et al., 2011).

La L-asparaginase II a un optimum de synthèse par *E.coli* pour des pH entre 7 et 8 (Cedar and Schwartz, 1968).

La maîtrise de la température et toute aussi importante puisqu'elle a une action sur la stabilité de l'enzyme et sur la vitesse de la catalyse. Cependant, si une augmentation de la température permet d'augmenter l'activité catalytique, une trop forte augmentation peut avoir l'effet inverse et aboutir à l'inactivation de la protéine. De même, la température peut aussi influencer la viabilité des souches d'*E.coli*. Une température de 37°C est usuellement employée pour les cultures de cette bactérie.

Micro-organisme	Milieu de culture	Température	pH initial	sources
<i>E.coli</i> ATCC 11303	Milieu LB : tryptone 1%, extrait de levure 0,5% et NaCl 1%	37°C	7,2	(Kenari et al., 2011)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	Milieu LB	37°C	/	(Zhang et al., 2017)
<i>E.coli</i> ATCC 10536	Milieu LB	37°C	/	(Chia et al., 2016)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	Milieu LB : 0,5% glucose et 5µg/mL ampicilline	37°C	/	(Vidya et al., 2011)
<i>E.coli</i> <i>E. coli</i> K-12	Dans une jarre avec 90 % d'azote et 10 % de gaz carbonique à une pression de 3 psi.	37°C	7-8	(Cedar and Schwartz, 1968)

Figure 4 : Exemple des conditions de production de la L-asparaginase

4.4. L'extraction et la purification

L'extraction et la purification sont deux étapes importantes pour la production d'une enzyme. L'étape d'extraction conditionne le rendement de la production. La purification, quant à elle, conditionne l'utilisation de l'enzyme à des fins pharmaceutiques puisque ce domaine implique un très haut degré de pureté. (Cachumba et al., 2016)

Différentes méthodes peuvent être utilisées comme la centrifugation, la filtration, l'extraction liquide-liquide, la chromatographie ou la précipitation de protéines. Pour une production industrielle, la précipitation de protéine semble être la meilleure technique car cette technique implique des équipements simples et peu coûteux.

- Précipitation des protéines

Cette méthode peut intervenir dans les étapes d'extraction et de purification. Elle entraîne une perturbation temporaire des structures secondaires et tertiaires des protéines. L'extraction de la L-asparaginase est souvent réalisée par précipitation. De même, la purification peut être obtenue par ajout de sulfate d'ammonium ($\text{NH}_4(2\text{SO}_4)$). Le principe de cette purification est l'ajout du sulfate d'ammonium jusqu'à saturation du milieu ce qui provoque la précipitation de la L-asparaginase. (Amena et al., 2010). La précipitation est généralement associée à d'autres méthodes comme la filtration sur gel ou la chromatographie par échange d'ions afin d'augmenter la pureté. Cette technique de précipitation peut aussi permettre de concentrer l'enzyme pour les étapes suivantes. (Lopes et al., 2017)

- Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide a été utilisée par (Qin and Zhao, 2003) afin d'extraire la L-asparaginase de la souche *E.coli* ATCC 11303 par l'intermédiaire de systèmes micellaires aqueux à deux phases (ATPMS). Le système est composé de K_2HPO_4 et de Triton X-100. Les cellules d'*E.coli* sont traitées avec 9,4% de K_2HPO_4 et 15% de triton X-100 à 25°C. Ce traitement libère 80% de l'enzyme.

Une autre méthode utilisant les systèmes micellaires aqueux à deux phases (ATPMS) a été réalisée par l'équipe de Zhu, en utilisant une perturbation des cellules par un homogénéisateur haute pression pour extraire et purifier la L-asparaginase intracellulaire.

- Chromatographie

La technique de chromatographie par échange d'ions est une technique couramment. (Borah et al., 2012) Le plus souvent, afin de garantir un haut niveau de pureté, différentes techniques peuvent être combinées. Ainsi une chromatographie par affinité à l'aide d'une résine de nickel suivie d'une chromatographie par échange d'anions peut être employée. (Zhang et al., 2017)

Lorsque le système pET est utilisé, la protéine à purifier est marquée par l'étiquette His6. Un moyen de purification est le système Ni-NTA, c'est-à-dire une chromatographie d'affinité à l'aide de la colonne de spin de l'acide nickel-nitrilotriacétique (Ni-NTA). (Khushoo et al., 2005; Vidya et al., 2011)

Un autre moyen de réaliser une bonne purification serait de réaliser une chromatographie puis une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Whelan and Wriston, 1969).

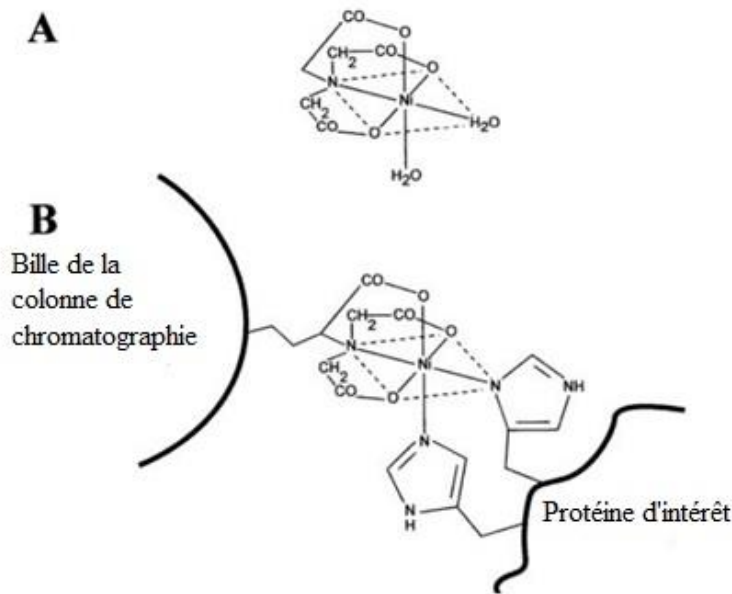


Figure 5 : Purification à l'aide du système Ni-NTA. A : Ni-NTA. B : Colonne Ni-NTA montrant un lien avec une protéine marquée His (Hainfeld et al., 1999)

5. Caractérisation de la biosynthèse d'une protéine eucaryote

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des recherches pour la production de la L-asparaginase se focalise sur l'utilisation des organismes procaryotes que ce soit pour la séquence d'ADN ou pour l'organisme permettant la synthèse protéique.

Or, notre projet est la synthèse d'une protéine qui serait moins immunogène pour l'animal en particulier le chien. De ce fait, l'utilisation d'une séquence qui ne provient pas d'*E.coli* mais plutôt une séquence canine donc eucaryote.

Cet objectif est contraignant. En effet, le système procaryote est le système le plus facile et le moins coûteux pour la biosynthèse de protéines. Mais la production d'une protéine fonctionnelle eucaryote par un organisme procaryote est inenvisageable. En effet, les deux organismes n'ont pas exactement le même système de synthèse des protéines. Les procaryotes n'ont pas de maturation de l'ARN et sont donc dans l'incapacité d'éliminer les séquences non codantes (intron). De même, la glycosylation n'est pas la même chez les procaryotes ce qui aboutit à une mauvaise structure et donc une absence de fonctionnalité de la protéine produite. (Walter et al., 2012)

Vient alors la question du système cellulaire à utiliser pour la production de notre protéine eucaryote. Différents organismes eucaryotes peuvent être utilisés dans la production de protéines recombinantes. Ainsi des levures, des cellules isolées d'insectes ou de mammifères peuvent être exploitées. (O'Flaherty et al., 2020)

Ces différents organismes présentent des avantages et des inconvénients. Les modifications post-traductionnelles des cellules de mammifères sont plus correctes mais ces cellules présentent un risque plus élevé de contamination virale. Quant aux cellules qui ne proviennent pas de mammifères, elles possèdent souvent un meilleur rendement et une croissance plus rapide mais elles peuvent produire des épitopes immunogènes chez le patient. Ce que l'on cherche justement à éviter pour la L-asparaginase canine.

A partir de ces informations, une utilisation de cellules de mammifères semble être plus adéquate à notre projet. De plus, les cellules de mammifères sont désormais les cellules de prédilection dans l'industrie pharmaceutique. Actuellement, 60 à 70% des protéines qui ont un intérêt pharmaceutique sont issues de cellules animales. (Betton and Chaffotte, 2005)

Concernant les cellules de mammifères, la lignée de cellules CHO est la plus souvent utilisée. Cette lignée est issue de cellules d'ovaire de hamsters chinois (CHO pour Chinese Hamster Ovary). De même, une lignée de cellule canine est employée dans la recherche. Il s'agit de la lignée MDCK (Madin-Darby Canube Kidney). Elle est employée majoritaire pour l'étude de la régulation de la croissance cellulaire, du métabolisme et des mécanismes de transport dans les épithéliums rénaux. (Irvine et al., 1999)

6. Réglementation : le dossier qualité d'un médicament vétérinaire

Avant d'être mis sur le marché, un médicament vétérinaire doit obtenir une AMM (Autorisation de mise sur le marché). Afin d'obtenir cette AMM, un dossier de demande doit être constitué, avec en partie II le dossier qualité, lequel comporte une description détaillée des processus et des conditions de fabrication ainsi que des contrôles et tests mis en place.

La qualité pharmacologique d'un médicament se divise en 2 points : la fabrication de la substance active et la fabrication du produit fini (la substance active et les excipients). (European Medicines Agency, 2017; Parlement européen, 2019)

6.1. La fabrication de la substance active

Le dossier qualité porte sur les points suivants :

- Une description détaillée du procédé de fabrication qui comprend toutes les matières utilisées en identifiant les étapes où elles interviennent. Les matières premières, les solvants, les réactifs, les catalyseurs ou encore les adjuvants sont inclus dans cette définition. Concernant les produits biologiques, il est nécessaire de fournir des informations sur leurs sources, leurs traitements, leurs caractérisations et leurs contrôles ainsi que des données concernant leur sécurité virale et leur sécurité vis-à-vis des EST (encéphalopathies spongiformes transmissibles). Les procédés de fabrication optionnels, alternatifs ou de retraitement doivent eux aussi être décrits.
- Une description des procédés de contrôle de la qualité. Des contrôles qualités doivent être mis en place à chaque étape critique et des critères d'acceptation doivent être identifiés et justifiés. Les étapes critiques sont, par exemple, les étapes où sont mixés les éléments, les phases de séparation, les étapes où le contrôle du pH et de la température est critique et les étapes où des impuretés sont ajoutées ou retirées de la matière première. Le contrôle qualité doit comprendre des données relatives aux produits intermédiaires et la validation des procédés.
- Une description des impuretés (solvant, réactifs, dérivés des réactifs résiduels...), leur niveau, leur nature, leur innocuité. Des méthodes analytiques validées et adaptées à la détection et à la quantification des impuretés doivent être mises en place. L'utilisation de deux décimales pour les seuils ne reflète pas nécessairement la précision de la méthode d'analyse utilisée à des fins de contrôle de la qualité. Ainsi, l'utilisation des techniques de moindre précision (comme la chromatographie sur couche mince) peuvent être acceptables lorsqu'elles sont justifiées et dûment validées. La limite d'identification et de qualification pour la procédure d'analyse ne doit pas être supérieure à la déclaration seuil : (European Medicines Agency, 2007)

	Seuil pour les médicaments vétérinaires
Identification	0,20%
Qualification	0,50%

Tableau 12 : Seuils des impuretés (Européen Medecines Agency 2007)

- Une caractérisation de la substance active détaillant la nomenclature, la structure, les propriétés physico-chimiques (granulométrie, solubilité, coefficient de partage huile/eau, hygroscopie, point d'ébullition, pH, pka...) et la stabilité.

6.2. La fabrication du produit fini

Concernant la fabrication du produit fini, de nouvelles informations sont demandées :

- Une caractérisation générale du produit fini et une description des paramètres de contrôle à l'aide des paramètres physico-chimique (densité, pH, indice réfraction...), des paramètres microbiologiques et organoleptiques. Pour chaque caractéristique du produit fini, des normes doivent être déterminées.
- Une identification et un dosage de la substance active : la teneur en substance active ne doit pas différer de plus de 5% par rapport au moment de sa fabrication.
- Une identification et un dosage des éléments de l'excipient. Tout conservateur antimicrobien ou excipient capable d'altérer la biodisponibilité de la substance active doit être soumis à un essai limite supérieur et inférieur. Il en est de même pour les anti-oxygènes et les excipients qui peuvent affecter les fonctions organiques.
- Des essais d'innocuité par l'intermédiaire de contrôle de stérilité ou d'endotoxine bactérienne.
- Une description des essais de stabilité qui permettent la détermination de la durée de conservation, des conditions de conservation et de la durée d'utilisation. Les tests sont réalisés à la fois sur la substance active et à la fois sur le produit fini c'est-à-dire en prenant en compte le comportement et les propriétés de la substance active et de la forme galénique. Des tests de stress peuvent être utilisés afin de déterminer les produits de dégradation possible. L'effet de la température (par palier de 10°C), de l'humidité (par exemple 75% d'humidité relative ou plus), de l'oxydation, de la photolyse et de l'hydrolyse (sur une large gamme de pH) sont inclus sans ces tests.
- Les études sur la stabilité doivent prendre en compte les paramètres qui sont susceptibles de changer pendant l'entreposage et qui peuvent affecter la qualité, l'innocuité et/ou l'efficacité de la substance active. La fréquence des tests dépend du type de test (test accéléré, test intermédiaire ou test à long terme)
- Lors de ces tests, si un changement significatif est notifié, des essais supplémentaires doivent être réalisés. Ces changements significatifs correspondent à un défaut de satisfaction aux critères d'acceptation concernant l'activité du produit lors de son utilisation, les produits de dégradation, l'apparence, les caractéristiques physiques ou la fonctionnalité du produit (une modification de couleur, de pH, de texture, une mauvaise dissolution ou une séparation de phase). Si le produit nécessite une phase préalable de dilution ou de reconstitution, une durée de conservation ainsi que la caractérisation du nouveau produit doivent être notifiées. (European Medicines Agency, 2008, 2005)

7. Expérimentations sur la protéine produite

Une fois la L-asparaginase produite, des tests peuvent être réalisés sur celle-ci afin de s'assurer de son efficacité. De plus, dans notre cas, nous souhaitons obtenir une enzyme moins immunogène pour le chien. Il pourrait être intéressant d'étudier l'immunogénicité de la nouvelle molécule canine.

7.1. Détermination expérimentale de l'activité

L'activité de l'asparaginase est mesurée en unité : 1 unité d'asparaginase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère $1\mu\text{ mol}$ d'ammoniac et d'acide aspartique à partir de $1\mu\text{mol}$ de L-asparagine par minute à $37\text{ }^\circ\text{C}$. (Roberts et al., 1968)

Afin de déterminer l'activité de l'asparaginase, différentes méthodes ont été élaborées. Les différentes méthodes diffèrent par le substrat utilisé. Ainsi la L-asparagine, le L-aspartique b-hydroxamate (AHA), le 5-diazo-4-oxo-L-norvaline ou l'acide L-aspartique peuvent être employés. Mais le principe reste le même : faire agir la L-asparaginase et doser le produit obtenu.

Pour déterminer l'activité de la L-asparaginase produite lors de la synthèse, la réaction de Nessler être souvent utilisée. Pour ce faire, la L-asparagine est utilisée comme substrat. Puis le réactif de Nessler est ajouté afin de mesurer la concentration d'ammoniac libérée par la réaction d'hydrolyse de la L-asparagine (Roberts et al., 1968; Vidya et al., 2011; Zhang et al., 2017)

La mesure se fait par spectrophotométrie car le réactif de Nessler forme un produit brun orangé au contact de l'ion ammonium. Ainsi la mesure se fait majoritairement à 450 nm . (Campbell et al., 1967; Chia et al., 2016; Vidya et al., 2011)

On retrouve dans d'autres études des mesures à 480 et 395 nm (Kenari et al., 2011; Zhang et al., 2017)

Un autre dosage de l'ammoniac peut être réalisé par une réaction enzymatique qui mesure l'oxydation du NADPH. Pour se faire, une enzyme la L-glutamate déshydrogénase est mise en présence d'alpha-cétoglutarate et du NADPH. Cette réaction couplée avec la formation d'ammoniac à partir d'asparagine va aboutir à l'oxydation du NADPH. C'est le taux de diminution de l'absorbance à 340 nm par l'oxydation du NADPH qui est mesuré afin de déterminer l'activité de la L-asparaginase. (Asselin et al., 1993)

Une autre technique consiste à utiliser non pas la L-asparagine comme substrat mais l'AHA. Cette méthode fonctionne sur tous les types de L-asparaginase.

L'AHA est hydrolysée par l'asparaginase en L-Asparagine et hydroxylamine. L'hydroxylamine réagit avec la 8-hydroxyquinoléine et par différentes réactions dont une réaction d'oxydation qui produit de l'indooxine. C'est cette molécule qui est dosée par spectrophotomètre à 710 nm .

La méthode avec l'AHA, permet la détection de l'activité de l'asparaginase avec un très bon seuil de détection, puisque cette méthode détecte une activité de 1.10^{-5} UI dans le sérum de l'homme. (Lanvers et al., 2002)

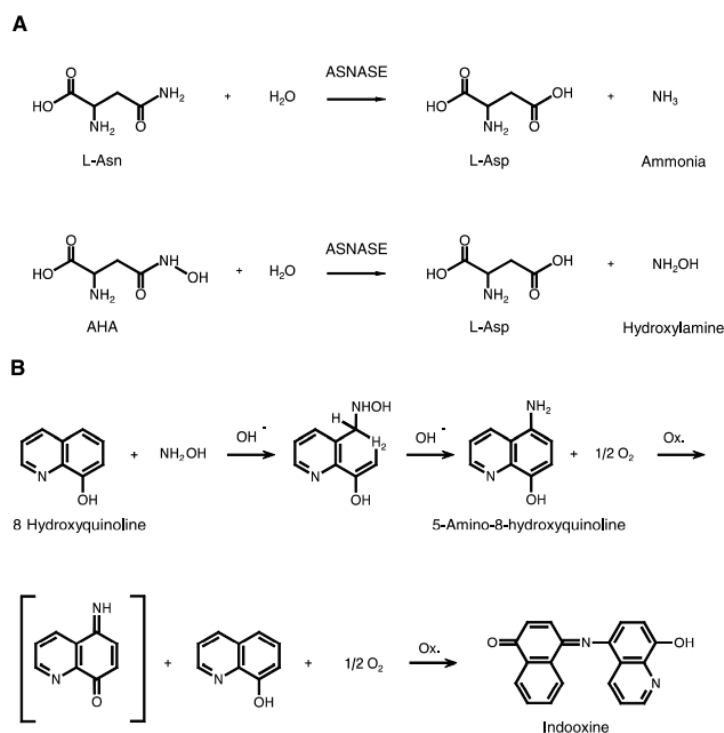


Figure 6 : Réactions conduisant à la formation de l'indooxine à partir de l'hydrolyse de la L-asparagine par la L-asparaginase (Lanvers et al., 2002)

7.2. Prédiction de l'immunogénicité

L'immunogénicité de la nouvelle asparaginase est l'un des enjeux principaux de sa fabrication. Différentes méthodes *in silico* ou *in vitro* permettent de prédire l'immunogénicité d'une protéine.

Rappel immunologique :

La production des anticorps contre une protéine fait intervenir 3 types de cellules : les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les cellules présentatrices d'antigènes dégradent la protéine en différents peptides et les présentent aux lymphocytes T CD4. Les peptides liés aux molécules HLA de classe II activent alors les lymphocytes T CD4. Ces lymphocytes sont des acteurs majeurs dans l'apparition des anticorps en participant par leur fonction helper au développement des lymphocytes B en plasmocytes qui les sécrètent.

Les méthodes *in silico* reposent sur des programmes informatiques statistiques qui identifient les peptides qui peuvent se lier aux molécules HLA de classe II de l'homme. De nombreux outils ont été développés tels que Rankpep, Propred, Tepitope, Epimatrix. Ainsi une analyse *in silico* a permis de déterminer des mutations ponctuelles de la crisantaspase qui permettaient de réduire son immunogénicité. (Yari et al., 2019)

Cependant, ces outils étudient seulement les caractéristiques de l'immunogénicité par rapport à l'homme. Or, des protéines peuvent être immunogènes chez les carnivores domestiques et non chez l'homme et vice versa. Cette méthode ne peut donc pas être employée pour prédire l'immunogénicité de la nouvelle protéine canine.

Les tests *in vitro* biologiques permettent d'identifier les peptides capables de se lier aux molécules HLA de classe II et de déterminer expérimentalement l'affinité des peptides ainsi que les meilleurs ligands. Cependant, cette méthode engendre beaucoup de faux positifs car tous les peptides qui se lient aux molécules HLA ne provoquent pas forcément l'activation des lymphocytes CD4.

L'étude de l'activation de ces lymphocytes T CD4 peut permettre de prédire l'immunogénicité d'une protéine. Ces tests *in vitro* de prédiction d'activation des lymphocytes T CD4 sont aujourd'hui les tests les plus pertinents concernant l'immunogénicité d'une protéine en médecine humaine. Cette méthode semble transposable à la médecine vétérinaire. Le principe de cette méthode est de simuler *in vitro* l'activation du système immunitaire à partir du sang d'individus n'ayant jamais été en contact avec la protéine. Des peptides de la protéine à tester sont mis en contact avec les cellules mononucléées du sang du donneur. Après une période de culture, les cellules sont incubées une nouvelle fois avec l'antigène ainsi qu'avec des monocytes autologues. Les lymphocytes T activés sont analysés soit par cytométrie de flux (détection des cytokines ou des marqueurs d'activation) soit par l'étude du profil de sécrétion des cytokines (ELISpot). (Maillère et al., 2012; Stas et al., 2009)

Partie 3 : Elaboration d'un protocole d'essai pré-clinique portant sur la L-asparaginase canine

1. Introduction

Une autorisation de mise sur le marché est obligatoire afin qu'un médicament vétérinaire soit disponible sur le marché français. Pour l'obtenir, des études pré-cliniques et cliniques doivent être réalisées dans le but de déterminer et de vérifier différents paramètres comme par exemple la sécurité ou l'efficacité du médicament. Ces études sont décrites respectivement dans les parties III et IV du dossier de demande d'AMM. (Anses, 2022)

Afin de réaliser ces études, des essais pré-cliniques et cliniques sont effectués sur des animaux de laboratoire (rats, cobayes, lapins...) ou sur les animaux cibles du médicament. En médecine vétérinaire, les essais peuvent être menés sur des animaux de laboratoires, mais les essais sont souvent réalisés rapidement sur les animaux cibles (ici le chien) dans des conditions de laboratoire en station expérimentale.

Dans notre cas, la L-asparaginase canine, produite par l'équipe d'ingénieurs d'ONIRIS, n'est pas dans sa forme finale (excipients, conditionnement final...). De ce fait, notre produit entre dans la catégorie des études pré-cliniques. L'utilisation de notre asparaginase est possible puisque les médicaments soumis aux essais de recherche et de développement (y compris les essais cliniques) ne sont pas soumis à l'AMM selon le règlement CE n°726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004. (Le parlement européen and Le conseil de l'union européen, 2004)

Concernant notre essai pré-clinique, il est possible d'y faire participer des chiens d'expérimentation ou des animaux de propriétaires. Ce qui correspond respectivement à un essai pré-clinique en station expérimentale et à un essai pré-clinique en condition de terrain.

Afin de réaliser un essai pré-clinique pertinent sur la L-asparaginase canine, il est nécessaire de déterminer les paramètres que l'on souhaite étudier. Concernant notre projet d'étude, divers paramètres peuvent être étudiés :

- La toxicité générale (aiguë ou chronique) permettant de déterminer la dose létale 50 (DL50) ou la dose sans effet (DSE)
- La pharmacologie (pharmacodynamie, pharmacocinétique) permettant de déterminer par exemple la posologie optimale
- La tolérance permettant de déterminer la marge de sécurité d'emploi (dose maximale tolérée)
- L'efficacité
- L'immunogénicité

Afin de construire notre protocole d'essai pré-clinique. Nous pouvons nous inspirer des essais cliniques réalisés en médecine humaine et surtout en oncologie. Ces essais se composent de trois phases avant l'obtention de l'AMM. (Tranchand et al., 2008) Lorsqu'un médicament de chimiothérapie est testé, les phases 1 et 2 sont généralement couplées :

- La phase I : À l'aide de volontaires sains, la toxicité et la pharmacocinétique sont étudiées afin de définir les doses ainsi que la fréquence d'administration.
- La phase II : À l'aide de patients malades, l'efficacité du médicament est étudiée.
- La phase III : Cette phase permet de déterminer le rapport bénéfice/risque du nouveau médicament en comparant celui-ci à ceux disponibles sur le marché.

Dans l'idéal, il s'agirait d'étudier tous les paramètres cités ci-dessus afin de tester la nouvelle molécule dans sa globalité. Cependant, pour cette thèse d'exercice, nous nous concentrerons seulement sur trois points : la tolérance, l'immunogénicité et l'efficacité de la L-asparaginase canine.

2. Construction d'un protocole

Afin de réaliser un essai pré-clinique sur la nouvelle L-asparaginase, il est essentiel de construire un protocole expérimental. La construction de ce protocole doit se faire rigoureusement afin d'obtenir des résultats exploitables.

Lors de l'élaboration du protocole, il est nécessaire de réduire au maximum les biais car ils peuvent compromettre les résultats de l'étude. Malheureusement certains biais ne pouvant pas être évités, il est alors important de les identifier afin d'en tenir compte lors de l'exploitation des résultats. Les essais contrôlés et randomisés sont les essais qui comportent le moins de biais. Dans notre cas, un biais possible serait de choisir en priorité de donner un certain traitement aux animaux ayant un pronostic négatif par rapport aux autres. Ce choix empêcherait de prouver l'efficacité du traitement.

Afin de réduire les biais et de déceler les effets placebo, les essais se font majoritairement à l'aveugle. Lors des essais « simple aveugle », seul le patient ne connaît pas le médicament utilisé alors que lors des essais « double aveugle », les patients, les expérimentateurs et/ou les coordonnateurs ne connaissent pas la nature du traitement. Les essais en « double aveugle » sont les essais les plus fiables. Ils sont cependant plus compliqués à réaliser et à mettre en place.

De même, il est important de constituer un bon groupe témoin. Un groupe témoin peut être constitué d'animaux recevant un placebo, d'animaux recevant un médicament de référence ou un groupe témoin de la littérature scientifique. De manière générale, lorsque l'on choisit un seul type de témoin, il est plus intéressant de choisir un groupe recevant un placebo plutôt qu'un médicament de référence. De même, il peut être préférable de choisir à la fois un groupe placebo et un groupe avec un médicament de référence. D'autres possibilités peuvent se présenter, ainsi, des groupes d'animaux peuvent recevoir le même traitement à la même dose mais avec un facteur en plus comme la prise d'un autre médicament ou la réalisation d'une chirurgie.

Concernant la constitution des groupes, il est important qu'il y ait une homogénéité entre les groupes témoins et les groupes traités par le principe actif à tester. En effet, plus il y a de similitude entre les groupes et plus les différences de résultats trouvés seront attribuables au médicament et non au hasard.

Concernant la taille de l'effectif, il est nécessaire de définir le nombre d'animaux susceptibles de terminer l'essai clinique. En effet, il faut prendre en compte les cas où certains animaux ne pourront pas poursuivre l'essai ; par exemple dans les cas de décès ou de retraits d'animaux par les propriétaires. Anticiper ce taux de retrait permet d'éviter qu'il y ait un trop petit nombre d'animaux à la fin de l'étude et donc des résultats inexploitables. Afin d'obtenir une taille d'effectif idéale, une approche statistique est préconisée. Cette approche repose sur l'ampleur de l'effet escompté, la variabilité présumée des facteurs étudiés et la puissance d'atteindre un degré significatif (la puissance utilisée est souvent de 80%). Un nombre important d'animaux est à prévoir lorsque l'effet attendu entre le groupe témoin et le groupe traité est faible et inversement.

La randomisation dans un essai permet de tirer au hasard les animaux qui recevront le nouveau traitement. Cela permet de réduire les biais lors de la distribution des animaux dans les différents groupes. Il existe différentes façons d'effectuer cette randomisation : la randomisation simple, par bloc, systématique, la stratification ou la minimisation. La randomisation en bloc semble être une méthode réalisable facilement puisqu'elle consiste à constituer des blocs d'un nombre défini d'animaux et de réaliser une randomisation au sein de ces blocs. Ainsi, si les blocs sont composés de 4 animaux, il y aura 6 façons d'effectuer le tirage : AABB, BBAA, ABAB, BABA, ABBA et BAAB. Pour cet exemple, les animaux A recevraient le nouveau traitement à tester et les animaux B constitueraient le groupe témoin. (Spilker et al., 1987)

3. L'essai pré-clinique

Il semble pertinent de tester, dans un premier temps, la tolérance de la nouvelle molécule ainsi que son immunogénicité à l'aide de chiens sains d'expérimentation. L'étude de l'immunogénicité en plus de la tolérance dans notre cas est capitale. En effet, comme nous l'avons abordé dans les précédentes parties, le nombre et la fréquence des injections seront corrélés à la neutralisation de L-asparaginase canine par les anticorps de l'individu. Cette première étape permettra alors d'établir les conditions d'administration de cette nouvelle molécule en déterminant la fréquence d'utilisation et la dose à employer.

L'aboutissement de cette première étape, permettra de débiter l'étude de l'efficacité à l'aide de chiens malades, c'est-à-dire atteints d'un lymphome multicentrique.

3.1. Première phase de l'essai : étude de la tolérance et de l'immunogénicité

La première phase de l'essai pré-clinique vise différents objectifs : une étude de la tolérance de la nouvelle molécule canine ainsi que de son immunogénicité.

Deux groupes distincts d'animaux d'expérimentation seront mis en place :

- Le groupe « tolérance »
- Le groupe « immunogénicité »

3.1.1. Tolérance

L'étude de la tolérance de la nouvelle asparaginase canine peut être rapprochée aux études de phase I des essais cliniques en médecine humaine. En cancérologie, ce n'est pas la meilleure dose qui est recherchée (c'est-à-dire la dose avec la meilleure efficacité pour un niveau de toxicité la plus faible possible) mais la dose maximum tolérée (MTD). En effet, en oncologie humaine, c'est la plus haute dose possible qui est injectée afin de maximiser l'effet thérapeutique étant donné l'indice thérapeutique étroit du médicament et le mauvais pronostic du patient. Cependant, l'approche vétérinaire est souvent moins agressive car l'objectif de traitement reste souvent palliatif. De ce fait, la dose à utiliser chez le chien sera une la dose maximale tolérée avec un niveau d'effets secondaires faible.

Afin de déterminer le profil de toxicité, différents paramètres doivent être fixés :

- La dose initiale
- Le schéma de l'escalade de dose

(Gourgou et al., 2021; Spilker et al., 1987; Tranchand et al., 2008)

En médecine humaine, la dose initiale correspond le plus souvent au 1/10^{ème} de la DL10 (c'est-à-dire de la dose létale chez 10 % des souris non atteintes de cancer) si elle n'est pas toxique chez le chien. Si elle l'est, le tiers de la plus faible dose induisant une toxicité chez le chien sera employé. Il est possible de même, d'utiliser le 6^{ème} de la dose la plus importante testée sans toxicité chez les non-rongeurs. Concernant les études sur des traitements déjà employés, il est possible d'extrapoler la dose initiale en s'appuyant sur des études cliniques et sur les propriétés pharmacologiques des molécules.

Dans notre cas, nous avons fait le choix de débiter notre étude sur les animaux cibles du traitement. Nous n'avons donc pas d'essai sur les petits animaux de laboratoire. Cependant, la L-asparaginase est une molécule déjà bien connue chez le chien. Ainsi, la DL50 est de 50 000 UI/m² et des signes cliniques commencent à être visible à partir de 10 000 UI/m² Ainsi, nous pourrions arbitrairement opter pour une dose thérapeutique proche de celle couramment utilisée, c'est-à-dire 200 UI/m² pour débiter l'essai sur la tolérance ce qui correspondrait à 1/50^{ème} de la dose la plus importante qui commence à provoquer des signes cliniques.

Le schéma de l'escalade de dose repose le plus souvent sur une échelle relative basée sur la série de Fibonacci ou la série de Fibonacci modifiée. Cette méthode inclut des cohortes de 3+3 patients pour chaque palier de dose. L'escalade continue jusqu'à atteindre un pourcentage de patients développant une toxicité dose-limitante (TDL). Les critères de décision de cette méthode sont résumés par l'intermédiaire de la Figure 5. Lorsque l'escalade est arrêtée, la MTD correspond alors à la posologie du palier inférieur. (Gourgou et al., 2021; Tranchand et al., 2008)

Palier	Série de Fibonacci		Série de Fibonacci modifiée	
	Dose (mg/m ²)	Incrément (%)	Dose (mg/m ²)	Incrément (%)
1	1	-	1	-
2	2	100	2	100
3	3	50	3,3	67
4	5	67	5	50
5	8	60	7	40
6	13	63	9	33
7	21	62	12	33
8	34	62	16	33

Tableau 13 : Escalade des doses suivant la suite de Fibonacci (Tranchand et al., 2008)

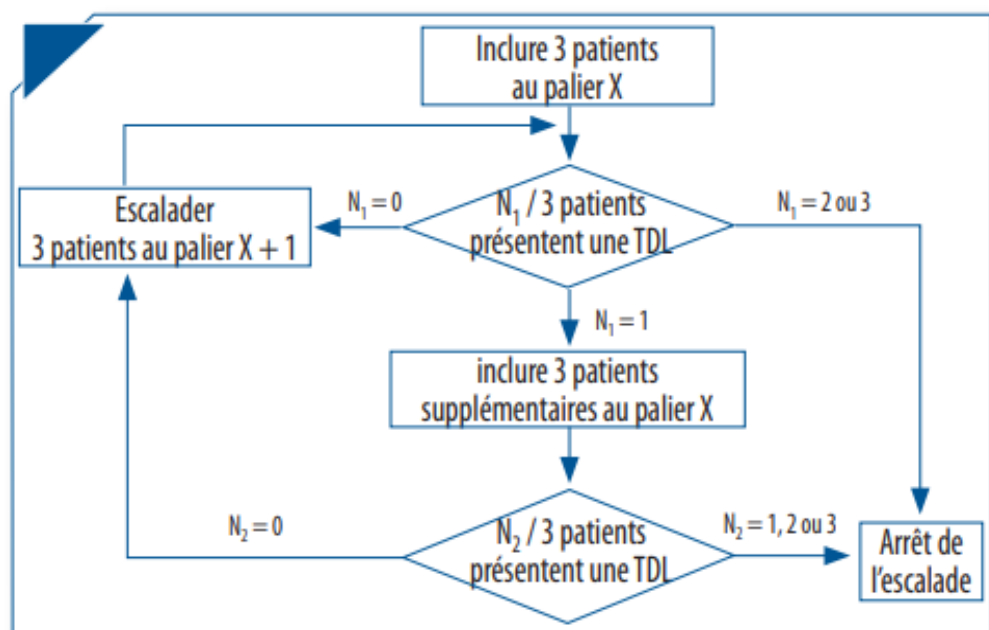


Figure 7 : Méthode de l'escalade des doses standards (Fibonacci)(Tranchand et al., 2008)

Cependant d'autres méthodes plus efficaces sont aujourd'hui encore trop peu utilisées comme la méthode d'escalade accélérée ou la méthode par réévaluation continue (CRM). La méthode d'escalade accélérée permet de diminuer le nombre de patients sous-traités. Ainsi, un seul patient est employé lors de la première étape (cohorte de 1 patient). Les doses reçues par le patient sont doublées à chaque palier jusqu'à apparition d'une TDL. Lorsqu'une TDL ou une toxicité de grade 3 est observée, de nouveaux patients sont inclus dans le palier (respectivement 6 ou 3) et l'escalade de dose se poursuit comme pour la méthode basée sur la suite de Fibonacci.

La méthode de réévaluation continue (CRM) repose sur des analyses probabilistes à chaque palier sur la survenue d'une toxicité. Ces analyses sont réalisées à partir des études précliniques et/ou sur des études de phases I publiées. (Tranchand et al., 2008)

Afin de réduire le nombre d'animaux dans l'étude de la tolérance, la méthode d'escalade accélérée semble être la méthode de choix.

Comme nous l'avons vu précédemment, pour étudier la tolérance de la nouvelle asparaginase, il est nécessaire de fixer la toxicité dose-limitante (TDL). Dans notre cas, on peut envisager de fixer la TDL à tous les événements toxiques de grade supérieur ou égal à 2 en prenant particulièrement soin de contrôler les effets secondaires de la L-asparaginase cités dans la partie I. Un exemple d'échelle des grades toxiques est décrit dans l'annexe 1

Lors de cette étude, un suivi clinique doit être réalisé régulièrement. Il semblerait judicieux de réaliser des examens cliniques deux fois par jour pendant 1 semaine afin de détecter précocement l'apparition de signes de toxicité.

Examen clinique	Paramètres à contrôler en priorité lors de l'injection de L-asparaginase
Etat général	Confusion ? Somnolence ? Fatigue ?
Température	Température
Système cardio-vasculaire	Auscultation cardiaque, fréquence cardiaque, temps de recoloration capillaire
Système respiratoire	Auscultation pulmonaire, fréquence respiratoire
Système digestif (pancréatite, hépatite)	Syndrome abdominal aigu ? Vomissement ? Nausées ? Diarrhée ?
Signes cliniques de thrombus	Paralysie flasque ? Extrémités froides ? Pouls fémoral ? Dyspnée ? Hémoptysie ? Toux ?
Signes cliniques d'une réaction allergique	Urticaire ? Prurit ? Œdème ? Choc anaphylactique

Tableau 14 : Examens cliniques et signes cliniques à contrôler en priorité

Un suivi des paramètres sanguins doit aussi être effectué afin de contrôler l'impact de la molécule sur certains organes internes comme par exemple le pancréas et le foie ou sur la coagulation.

Effets secondaires connus	Paramètres à contrôler
Déplétion en protéines	Protéïnémie, albuminémie et le rapport albumine/globuline
Pancréatite	Amylases, lipases et trypsinogènes
Cytolyse hépatique	bilirubine, transaminase, triglycéride, glycémie
Trouble de la coagulation	temps de quick, temps céphaline kaolin

Tableau 15 : Paramètres sanguins à contrôler en priorité

Les troubles cités précédemment sont déclenchés par la déplétion en protéines provoquée par la L-asparaginase. Or la vitesse de cette déplétion semble dépendre de la demi-vie de la L-asparaginase. Ainsi en prenant l'exemple des pancréatite aiguës, les symptômes apparaissent quelques jours après la dernière injection pour la L-asparaginase native qui a une demi-vie d'environ 24h et de 4 à 16 jours pour la pegasparaginase qui, elle, a une demi-vie plus longue.(Laugel et al., 2005)

Cependant dans notre cas, nous ne connaissons pas la demi-vie de notre nouvelle asparaginase canine. Il serait donc conseillé de conserver un suivi clinique assez long par exemple pendant environ une vingtaine de jours.

3.1.2. Immunogénicité

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, l'apparition d'anticorps neutralisants est un obstacle majeur lors des traitements composés de L-asparaginase. De plus, les ingénieurs d'ONIRIS ont mis en évidence un effet dose de l'immunogénicité (annexe 2). Il est donc essentiel de déterminer un nombre et une fréquence optimale d'injections de la nouvelle molécule permettant de limiter cette inactivation silencieuse.

En médecine humaine, la neutralisation silencieuse est principalement étudiée au cours du traitement par l'intermédiaire de l'activité de la L-asparaginase sérique, mais d'autres méthodes peuvent aussi être employées en complément, comme par exemple le dosage des anticorps anti-asparaginase ou encore le dosage de la L-asparagine résiduelle.

3.1.2.1. Mesure de l'activité de la L-asparaginase

La mesure de l'activité de l'asparaginase a pour but de mettre en évidence une inactivation silencieuse (due à la production anticorps neutralisant). La mesure de l'activité de la L-asparaginase est faisable sur le plan technique, reproductible et fiable et est considérée comme la technique qui possède la meilleure corrélation avec l'efficacité clinique.(van der Sluis et al., 2016)

L'activité de la L-asparaginase sérique de 0,1 UI/mL est considérée suffisante pour permettre la déplétion en asparagine. Cette mesure de l'activité peut se faire sur du sérum, du plasma ou du liquide céphalorachidien (LCR). Les échantillons doivent être conservés sur glace sèche. Les méthodes de mesure ont été explicitées dans la partie II 7.1 et sont basées sur différentes réactions enzymatiques ainsi qu'un dosage par spectrophotométrie. Des kits sont disponibles dans le commerce pour effectuer ce dosage plus facilement. Le laboratoire Medac commercialise un kit de mesure de l'activité de la L-asparaginase.(medac, 2016)

La surveillance médicamenteuse de l'activité de la L-asparaginase ne décrit pas exactement l'activité enzymatique in vivo, mais est équivalente aux concentrations sériques de l'enzyme fonctionnelle. En effet, certains facteurs sériques qui pourraient moduler l'activité sont susceptibles d'être masqués par la dilution de l'échantillon lors du dosage. Pour cette raison, il peut être utile afin d'estimer au mieux l'activité in vivo de comparer les résultats obtenus à la déplétion en L-asparagine. Cependant, une surveillance thérapeutique régulière de l'activité de la L-asparaginase seule permet tout de même de fournir un outil efficace pour contrôler et assurer l'intensité optimale du traitement. (Lanvers et al., 2002)

Concernant SPECTRILA®, le monitoring de son activité est usuellement réalisé chez l'homme 3 jours après l'injection, c'est-à-dire juste avant la nouvelle injection. Pour la KIDROLASE®, le monitoring était préconisé à 48h de la dernière injection. En regard de ces informations, il serait intéressant de tester dans un premier temps la fréquence d'injection actuellement recommandée pour SPECTRILA®, soit une injection tous les 3 jours avec un monitoring à 48h de l'injection. Une inactivation silencieuse sera alors décrétée lorsque dans 2 échantillons indépendants, l'activité de l'asparaginase est inférieure à la valeur seuil (0,1 UI/mL).

3.1.2.2. Dosage des anticorps anti-asparaginase

La mesure des anticorps anti-asparaginase est souvent utilisée dans le contexte des recherches cliniques concernant l'hypersensibilité et l'inactivation silencieuse. (van der Sluis et al., 2016)

La technique ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) permet le dosage des anticorps. Cette technique peut être qualitative, semi-qualitative ou quantitative. Les techniques les plus souvent utilisées font intervenir les ELISA indirecte et sandwich.

Différentes techniques ELISA sont décrites dans la littérature afin de doser les anticorps anti-asparaginase.

	ELISA indirecte	ELISA indirecte
Source du prélèvement	Sérum de l'homme	Plasma de chien
Antigène cible	Asparaginase native	L-asparaginase native et pegasparaginase
Anticorps détecté	IgG et IgM	IgG et IgM
Révélateur	Peroxydase de raifort marquée par des anticorps anti-homme de chèvre (labeled goat anti-human IgG/M)	Anticorps de moutons (IgG) anti-chien conjugués à la peroxydase de raifort (HRP)
Spectrophotométrie (DO)	450 nm	415 nm
Sources	(Willer et al., 2011)	(Kidd et al., 2015)

Tableau 16 : Techniques ELISA permettant le dosage des anticorps anti-asparaginase

La technique ELISA peut détecter les IgG et les IgM anti-asparaginase chez les chiens. Même si les anticorps sont souvent mesurés dans le sérum, l'utilisation du plasma peut être plus aisée. En effet, la plupart des chiens qui subissent une chimiothérapie contre le lymphome ont des prises de sang régulières pour la réalisation d'un hémogramme : le plasma peut être ainsi utilisé.

Il est difficile de comparer l'incidence des anticorps chez les chiens et chez les humains, car le traitement de l'homme est beaucoup plus intensif que celui du chien. La plupart des patients, en médecine humaine, reçoivent initialement un total de huit ou neuf doses, administrées à des intervalles de 3 jours alors que, le plus souvent, les animaux reçoivent une injection unique. On peut cependant conjecturer qu'une plus grande exposition aux médicaments augmenterait la fréquence des réponses. (Kidd et al., 2015)

Selon l'étude de l'équipe de Willer, il existe une relation entre l'activité de la L-asparaginase et les anticorps anti-asparaginase d'*E.coli* (asparaginase native ou pegasparaginase). Ainsi, l'activité de la L-asparaginase est inversement liée aux anticorps anti-asparaginase que ce soit lors d'un traitement de première ou seconde intention. Cependant, ce phénomène n'a été observé qu'en présence d'une concentration élevée d'anticorps (> 200 AU/mL). Dans cette étude, les échantillons de sang sont jugés positifs, c'est-à-dire possédant des anticorps pour des valeurs de 6.25 AU/mL ou plus. (Willer et al., 2011)

Il est difficile avec le test ELISA seul d'associer un titre en anticorps et une résistance à la L-asparaginase et d'interpréter la positivité d'un patient en absence de surveillance de l'activité de l'asparaginase. En effet, de nombreux patients développent des anticorps sans pour autant présenter des signes de réactions allergiques ou d'inactivation de la molécule. L'évaluation des anticorps n'est donc pas la méthode de choix pour une utilisation clinique. (van der Sluis et al., 2016) Cependant, le test ELISA peut s'avérer utile pour concevoir et comparer des protocoles de traitement afin de réduire efficacement l'immunogénicité issue des L-asparaginases provenant d'*E. coli*. (Kidd et al., 2015; Paillassa et al., 2018)

3.1.2.3. Dosage de la quantité de L-asparagine résiduelle

(Lanvers-Kaminsky et al., 2014; Paillassa et al., 2018; van der Sluis et al., 2016)

Le rôle de l'asparaginase étant d'épuiser la L-asparagine circulante, une mesure directe de celle-ci dans le sang semble être la technique la plus simple afin de mettre en évidence l'efficacité du traitement. Cependant, en pratique, la mesure directe de la L-asparagine est difficile et peu fiable pour un usage clinique. En effet, l'hydrolyse de la L-asparagine perdure ex-vivo. Ce qui implique un recueil de l'échantillon et son analyse dans un laps de temps très limité (5 à 15 minutes).

Des méthodes de détection de l'asparagine ont été mises en place en considérant que des basses températures inactivaient l'enzyme. Ainsi, une méthode consiste à recueillir l'échantillon, le mettre dans de la glace, recueillir le plasma et procéder à une étape de déprotéinisation. Une autre méthode analyse l'échantillon après congélation rapidement par chromatographie liquide en phase inversée conjuguée à une spectrométrie de masse. Cependant, ces études surestiment les valeurs de la déplétion en asparagine car la congélation ne permet pas l'inhibition totale de la L-asparaginase.

Ainsi, il est actuellement recommandé de déterminer l'activité de la L-asparaginase plutôt que la déplétion en asparagine. Dans notre cas, il aurait été tout de même intéressant de déterminer la quantité d'asparagine résiduelle afin de la comparer aux résultats d'activité ou concernant la production d'anticorps. Cependant, cette détermination ne semble pas faisable car complexe à mettre en place.

3.1.2.4. Protocole

Par l'intermédiaire de l'étude de la tolérance, une dose optimale en UI/kg aura été déterminée. Cette dose sera donc utilisée pour l'étude portant sur l'immunogénicité de la molécule de L-asparaginase canine.

Le protocole consiste à injecter tous les 3 jours une même dose de L-asparaginase canine et de tester 48h après l'activité de celle-ci. Si cette activité est inférieure à 0,1 UI/mL, une inactivation silencieuse peut être suspectée. La prochaine injection sera tout de même réalisée. Lors du prochain test d'activité, si les mesures sont toujours inférieures à la valeur seuil, l'inactivation silencieuse sera confirmée. Ce protocole permettra de connaître le nombre d'injections nécessaires pour que l'inactivation silencieuse se mette en place chez la majorité des animaux et alors déterminer un nombre d'injections optimal lorsque la L-asparaginase canine est injectée tous les 3 jours.

Concernant l'étude des anticorps anti-asparaginase canine, il pourrait être intéressant de réaliser un dosage quantitatif des anticorps produit au cours de traitement afin d'étudier la cinétique d'apparition de ceux-ci. Même si, comme nous l'avons vu précédemment, le taux d'anticorps n'est pas forcément corrélé à l'inactivation de la molécule.

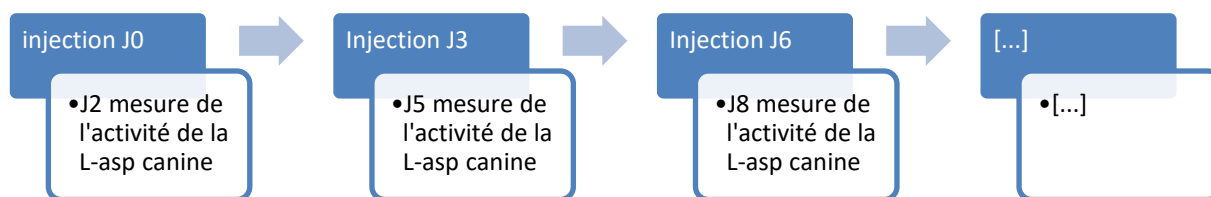


Figure 8 : Frise chronologique de l'étude de l'immunogénicité

3.2. Deuxième phase de l'essai : étude de l'efficacité

La première partie de l'essai permettra de déterminer la dose à utiliser ainsi que la fréquence d'injection chez le chien. Nous pourrons alors enclencher la deuxième partie de l'essai sur des chiens malades afin d'étudier l'efficacité de cette nouvelle asparaginase canine.

Concernant les animaux malades, seuls des chiens atteints d'un lymphome multicentrique seront intégrés à l'étude afin de nous focaliser sur le lymphome le plus fréquent dans la race canine.

Cette deuxième phase de l'essai pré-clinique fait intervenir des animaux malades. Une fiche explicative ainsi qu'une déclaration de consentement éclairée seront fournies aux propriétaires. Ces documents figurent dans les annexes 3 et 4.

Afin de tester l'efficacité de notre nouvelle molécule ainsi que du nouveau schéma d'administration, il pourrait être intéressant de suivre un plan de traitement usuellement utilisé. L'association de la L-asparaginase et d'une corticothérapie (prednisolone) sera employée puisque ayant déjà fait ses preuves et permettant de ne pas faire intervenir un nombre trop conséquent de molécules, ce qui pourrait compliquer l'exploitation des résultats.

Afin de diminuer le nombre d'animaux de l'étude, le groupe témoin pourra être constitué par des animaux qui ont déjà été suivis à l'école vétérinaire ONIRIS. En effet, le service oncologie dispose d'une base de données importantes. Les animaux sélectionnés pour entrer dans l'étude seront des chiens atteints d'un lymphome multicentrique diagnostiqué à l'aide d'un examen cytologique et histologique et ayant reçu seulement un traitement composé de KIDROLASE® et d'une corticothérapie. Nous pourrons alors utiliser la base de données réalisée par Grégory Bouillet lors de sa thèse sur la validité de la classification Ann Arbor pour le lymphome canin non-hodgkinien (Bouillet, 2020)

L'étude prospective sera alors constituée de deux groupes :

- Un groupe de chiens recevant la L-asparaginase canine à la fréquence déterminée dans la première phase de l'essai.
- Un groupe témoin de chiens recevant la L-asparaginase usuellement utilisée en médecine vétérinaire à la fréquence d'une fois par mois.

Les deux groupes étant traités simultanément avec une corticothérapie (prednisolone 1mg/kg PO SID pendant 1 mois puis 0,5mg/kg PO SID).

Etude de l'efficacité	
Critère d'inclusion	Chien atteint d'un lymphome multicentrique, n'ayant pas reçu de traitement pour cette pathologie ultérieurement.
Critère d'exclusion	Absence de réponse au traitement au bout de 10 jours
Groupe traité	Chiens atteints de lymphome multicentrique traité par la L-asparaginase canine et de corticoïdes (prednisolone 1mg/kg PO SID)
Groupe témoin	Chiens de la base de données d'ONIRIS ayant reçu à traitement de chimiothérapie (L-asparaginase et prednisolone 1mg/kg PO SID)

Figure 9 : Caractéristique de l'étude de l'efficacité de la L-asparaginase canine

Afin de pouvoir étudier l'efficacité du traitement, il sera nécessaire d'effectuer un examen de pré-traitement afin de définir les lésions présentes chez l'animal. En particulier, l'hypertrophie des ganglions lymphatiques à l'aide d'un examen échographique (ou tomодensitométrique) ainsi qu'une radiographie pulmonaire (face et profil) pour la recherche de potentielles métastases au niveau des poumons.

A la suite de l'injection du traitement, il pourrait être intéressant de garder l'animal hospitalisé 24h afin de pouvoir surveiller l'animal et de réaliser différents examens de suivi dans le but d'objectiver l'avancée du traitement. Ces examens seront donc réalisés le lendemain de chaque administration de L-asparaginase canine et permettront de déterminer une réponse tumorale objective (réponse complète, réponse partielle, maladie stable ou en progression). Afin de suivre l'avancement des lésions, il pourrait être intéressant de se focaliser sur un nombre restreint de lésions. Ainsi un maximum de ganglions lymphatiques à étudié devra se limiter à 5.

De plus, un bilan sanguin avec une numération formule pourra être réalisé afin d'étudier une potentielle anémie (majoritairement normochrome et normocytaire non régénérative), une thrombopénie ou une neutropénie. Une analyse biochimique pourrait de même être mise en place afin de contrôler les paramètres sanguins rénaux et hépatiques afin de détecter une potentielle infiltration métastatique de ces deux organes. De même, un ionogramme pourra être réalisé afin de suivre la présence d'une hypercalcémie. Cette hypercalcémie peut servir de biomarqueur pour la réponse au traitement et en cas de rechute. (Vail et al., 2019)

Une feuille de suivi subjective sera à remplir à la maison par le propriétaire entre les consultations :

Signes observés	Cocher oui ou non si les signes sont observés. Veuillez préciser s'il y a une amélioration, une stagnation ou une dégradation depuis le dernier contrôle		
Abattement	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation
Anorexie	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation
Perte de poids	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation
Vomissement	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation
Diarrhée	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation
Difficulté respiratoire	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation
PUPD	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation
Douleur	Oui		Non
	Amélioration	Stagnation	Dégradation

Tableau 17 : Exemple de feuille de suivi à remplir par le propriétaire

On jugera la maladie en progression lorsque de nouvelles lésions apparaissent ou qu'une augmentation de 25% des signes cliniques sera objectivée. La rémission partielle sera définie comme une réduction seulement partielle des signes cliniques. Les animaux qui survivront au moins 2 ans seront considérés guéris .

Si une rémission complète est observée, les animaux seront suivis pendant 2 ans . Tous les mois pendant 6 mois puis tous les 3 mois. Lors de ces suivis, un examen clinique, une analyse biochimique et une numération formule sanguine sera réalisée. Ainsi qu'un examen d'imagerie (échographie ou scanner).

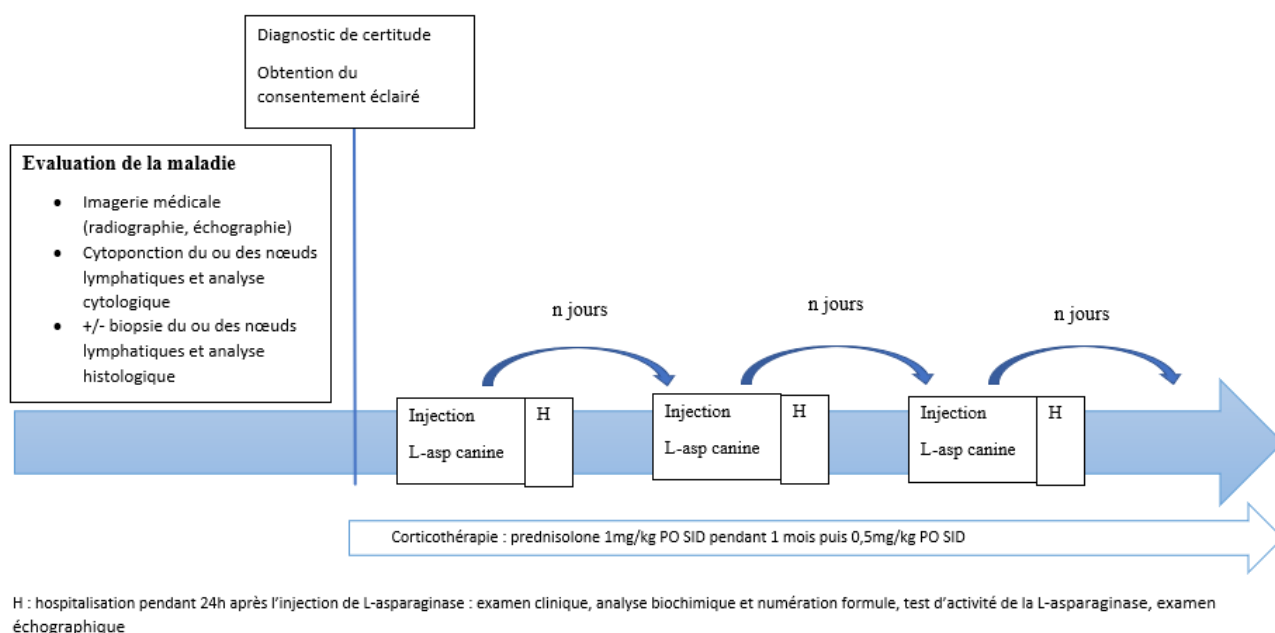


Figure 10 : Frise chronologique de l'étude de l'efficacité de la L-asparaginase canine

4. Discussion

Les étudiants ingénieurs d'ONIRIS sont parvenus à élaborer un protocole de production de la L-asparaginase canine. Leur travail est détaillé dans l'annexe 2. Les résultats obtenus sont encourageants puisqu'ils permettent de prouver la possibilité de produire une L-asparaginase canine à partir de cellules eucaryotes.

Cependant, la quantité de L-asparaginase canine produite est trop faible et n'a pas permis de réaliser de test sur l'efficacité et l'immunogénicité de la nouvelle molécule *in vivo*. Il serait donc intéressant de perfectionner les techniques de production et d'étudier plus en détails cette nouvelle asparaginase avant de débiter les essais sur les animaux.

De même, afin de réaliser une étude pré-clinique sur le nouveau médicament, il est important de disposer d'une molécule en grande quantité et dont la production est réalisée par un laboratoire habilité qui respecte les BPF (bonnes pratiques de fabrication), ce qui n'est pas notre cas.

L'équipe de Rigouin a découvert une L-asparaginase humaine qui pourrait être utilisée en médecine humaine. Cependant, pour qu'une L-asparaginase puisse permettre l'épuisement complet en L-asparagine dans le sang, son Km doit être micromolaire alors que celui de la L-asparaginase humaine est millimolaire. Afin de réduire le Km de la L-asparaginase humaine (hASNase1), une humanisation avec une L-asparaginase de cochon d'inde (gpASNase1) qui possédait un Km satisfaisant a été testée et s'est révélée efficace *in vitro*. Le Km de la L-asparaginase canine devra donc être pris en compte pour la production du médicament vétérinaire. Cette technique d'hybridation pourra être une perspective d'amélioration dans le cas où la L-asparaginase canine posséderait un Km trop élevé. (Rigouin et al., 2017)

Afin de réaliser l'essai au sein de notre établissement, il serait nécessaire d'effectuer certaines démarches qui n'ont pas été réalisées dans le cadre de la thèse. En effet, il est indispensable d'effectuer une demande auprès du Ministère de l'enseignement supérieur de la recherche et de l'innovation afin d'obtenir une dérogation. De même, lors d'un essai sur des animaux, le comité éthique de l'établissement, ici le CERVO (annexe 5), doit donner son accord. Afin de pouvoir réaliser pleinement notre étude sur la L-asparaginase, il faudrait de même réfléchir aux moyens de financement.

Une question s'est posée lors du choix des animaux employés lors des tests préliminaires de toxicité et d'immunogénicité. En effet, l'utilisation de chiens d'expérimentation ou de chiens de laboratoire était possible. Cependant, nous avons fait le choix de commencer directement l'essai sur les animaux cibles et donc de ne pas utiliser de petits animaux de laboratoire ; ce choix nous permettant de tester la molécule dans des conditions les plus proches de son utilisation. Nous avons, par conséquent, décidé de privilégier des chiens d'expérimentation pour la première phase de l'étude. Cependant, ce choix n'est pas anodin d'un point de vue financier. En effet, afin de réaliser ces expérimentations sur des chiens d'expérimentation, il est possible soit d'en acheter soit de sous-traiter la recherche à un centre dédié. Ces deux options se révèlent être très coûteuses.

Concernant l'élaboration des protocoles de l'essai-préclinique, nous ne possédons pas actuellement d'information expérimentale au sujet de l'activité ou de l'immunogénicité de la L-asparaginase canine. De même, la comparaison entre la nouvelle molécule et les molécules déjà présentes n'ayant pas été possible, il est compliqué d'anticiper certains paramètres. Pour la construction des protocoles de tolérance et d'immunogénicité, les doses en UI/kg, la fréquence d'injection et le monitoring de l'activité de la L-asparaginase ont été fixés en s'inspirant des caractéristiques des molécules déjà présentes sur le marché. Ces approximations ne seront pas forcément pertinentes pour la L-asparaginase canine et les paramètres devront sûrement être ajustés lorsque l'on possédera plus d'éléments.

Au sujet de l'étude de l'immunogénicité de notre nouvelle molécule, notre approche vise la détermination des modalités d'injection du nouveau traitement. Pour ce faire, l'immunogénicité de la molécule est comparée avec un groupe témoin recevant un placebo. Cependant, la L-asparaginase canine a été produite dans le but de réduire son immunogénicité. La comparaison de l'immunogénicité de la nouvelle molécule avec celles du commerce comme SPECTRILA® permettra de vérifier ce postulat.

Concernant l'étude de l'efficacité, nous avons choisi d'utiliser une base de données propre à l'école vétérinaire comme groupe témoin. Cependant en utilisant cette base de données, il ne s'agit plus d'une étude à l'aveugle. Afin de réaliser une telle étude, nous aurions pu répartir les chiens dans chaque groupe (nouvelle molécule et témoin) selon la méthode de randomisation explicitée dans le paragraphe 2 « construction d'un protocole ». De même, afin de préserver l'anonymat des échantillons, une méthode consisterait à entreposer dans un congélateur les différentes doses de traitement numérotées et préparées à l'avance par le coordinateur. Cependant, comme la fréquence des deux traitements ne sont pas identiques, cela complexifierait la réalisation des injections. En effet, pour seulement 1 mois de traitement, il serait obligatoire de faire revenir les animaux 4 fois à des jours bien précis comme l'explique la figure ci-après et recevoir leur traitement ainsi qu'un placebo qui serait constitué seulement de sérum physiologique par exemple.

De même, en cas de grande différence de volume à employer entre la L-asparaginase canine et SPECTRILA®, une dilution devrait être réalisée afin de ne pas réussir à déterminer la nature du traitement lors de l'injection.

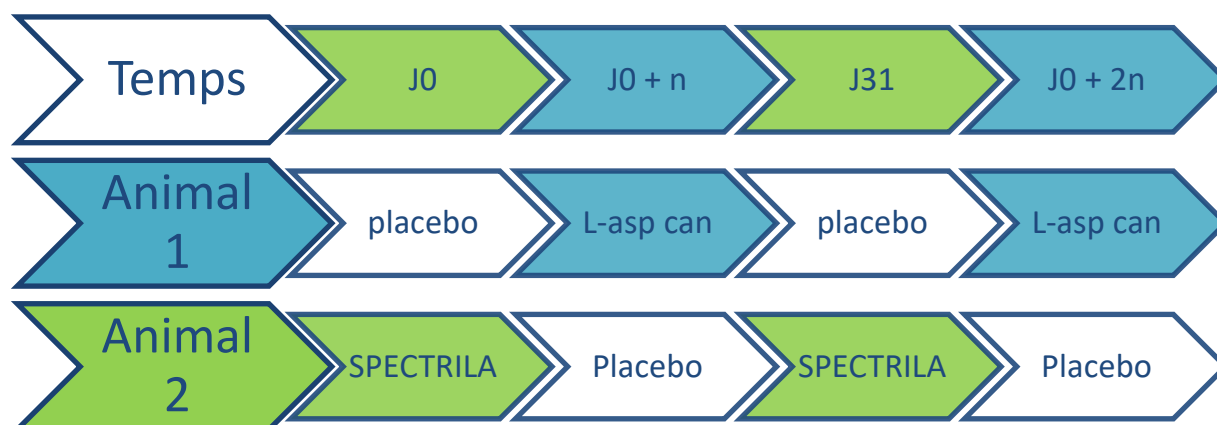


Figure 11 : Frise chronologique de l'étude de l'efficacité à l'aveugle. L'animal 1 est traité avec la L-asparaginase canine et l'animal 2 est traité avec SPECTRILA®. Les deux groupes d'animaux sont traités par corticothérapie à une dose de 2mg/kg PO SID

Concernant la base de données énoncée précédemment, seuls 9 cas de chiens ayant reçu un traitement composé de L-asparaginase et de corticoïdes y sont décrits. Cependant, la base de données a été réalisée en 2020. D'autres cas pourront alors y être ajoutés afin de compléter le groupe témoin de l'étude.

Le calcul de l'effectif pour l'étude de l'efficacité n'a pas pu être réalisé. En effet, pour ces calculs, il est nécessaire d'avoir une idée du résultat attendu. En effet, si on s'attend à une différence minime entre les deux protocoles, le nombre de chiens dans l'étude sera important et inversement. Comme nous l'avons vu précédemment, la production de la L-asparaginase est encore à ses débuts. Afin d'avoir une idée plus précise de l'activité de la L-asparaginase canine, des études plus poussées in vitro devront être mise en place avant l'utilisation de la molécule chez le chien.

Conclusion

La L-asparaginase est une enzyme connue et étudiée depuis de nombreuses années que ce soit pour son utilisation médicale ou dans l'industrie agro-alimentaire. De nombreuses recherches sont encore menées afin d'optimiser sa production et son efficacité dans les traitements des leucémies aiguës lymphoblastiques chez l'homme et des lymphomes chez les carnivores domestiques.

La limite majeure de la L-asparaginase est son inactivation silencieuse. Elle entraîne la perte de son activité et donc une diminution de l'efficacité des traitements qui l'emploient. La production d'une molécule homologue à celle de l'espèce canine, potentiellement moins immunogène pour le chien, peut-être une piste pour améliorer le traitement des lymphomes canins.

La collaboration avec l'équipe d'étudiants ingénieurs d'ONIRIS nous a permis d'envisager et de mener à bien le projet de la production d'une nouvelle L-asparaginase. La collaboration a été très enrichissante puisqu'elle a permis d'associer différents corps de métier afin d'aboutir à la production à l'échelle laboratoire d'une L-asparaginase issue non pas d'une séquence bactérienne, mais bien d'une séquence canine.

La réussite de la production de la L-asparaginase canine nous a permis de prolonger le projet en envisageant la possibilité de réaliser un essai clinique sur l'animal cible, bien que la réalisation de l'essai clinique ne soit pas directement possible avec la production réalisée par les étudiants ingénieurs pour l'instant. La confection d'un protocole d'essai nous permet de réfléchir aux différentes expérimentations que nous souhaiterions mener sur la nouvelle enzyme canine. Une étude de la tolérance, de l'immunogénicité ainsi que de son efficacité a été proposée.

Ces expérimentations pourront déterminer une dose et une fréquence d'administration de la molécule. Elles permettront de garantir au mieux une déplétion en L-asparagine le plus longtemps possible au cours du traitement et de prévoir les effets secondaires.

Si les résultats de cet essai pré-clinique sont concluants, une possible poursuite de l'étude ainsi que la production d'un produit fini sera envisageable. Un produit fini qui pourra poursuivre les étapes afin d'obtenir une AMM et devenir un médicament vétérinaire. Cependant, cet aboutissement reste très hypothétique et demandera encore beaucoup de travail.

Bibliographie

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2020. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique., 6ème édition. ed, Campus référence. Elsevier, Issy-les-Moulineaux.
- Adani, G., Filippini, T., Wise, L.A., Halldorsson, T.I., Blaha, L., Vinceti, M., 2020. Dietary Intake of Acrylamide and Risk of Breast, Endometrial, and Ovarian Cancers: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 29, 1095–1106. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1628>
- Ahmad, N., Pandit, N., Maheshwari, S.K., 2012. L-asparaginase gene- a therapeutic approach towards drugs for cancer *Cell. Int. J. Biosci.* 2, 12.
- Alrumman, S.A., Mostafa, Y.S., Al-izran, K.A., Alfaifi, M.Y., Taha, T.H., Elbehairi, S.E., 2019. Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. *Sci. Rep.* 9, 3756. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40512-x>
- Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., Lingappa, K., 2010. Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 41, 173–178. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220100001000025>
- ansB - L-asparaginase 2 - *Escherichia coli* (strain K12) [WWW Document], n.d. . UniProt. URL <https://beta.uniprot.org/uniprotkb/P00805/entry> (accessed 5.17.22).
- Anses, 2022. Autorisation de mise sur le marché [WWW Document]. [anses.fr](https://www.anses.fr/fr/content/autorisation-de-mise-sur-le-march%C3%A9). URL <https://www.anses.fr/fr/content/autorisation-de-mise-sur-le-march%C3%A9> (accessed 7.15.22).
- ANSM, 2015. Résumé des Caractéristiques du Produit, ERWINASE 10000 UI/flacon, poudre pour solution pour injection. [WWW Document]. URL <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0255750.htm> (accessed 10.30.21).
- Asparaginase - *Canis lupus familiaris* (Dog) [WWW Document], n.d. . UniProt. URL <https://beta.uniprot.org/uniprotkb/A0A8C0LU56/entry> (accessed 5.17.22).
- ASSIM, 1993. immunologie générale-2ème édition, Arnette. ed. Paris.
- Avramis, V.I., Panosyan, E.H., 2005. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 367–393. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544040-00003>
- Ben Tanfous, M., Sharif-Askari, B., Ceppi, F., Laaribi, H., Gagné, V., Rousseau, J., Labuda, M., Silverman, L.B., Sallan, S.E., Neuberg, D., Kutok, J.L., Sinnett, D., Laverdière, C., Krajcinovic, M., 2015. Polymorphisms of Asparaginase Pathway and Asparaginase-Related Complications in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 21, 329–334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0508>
- Bennett, A.L., Williams, L.E., Ferguson, M.W., Hauck, M.L., Suter, S.E., Lanier, C.B., Hess, P.R., 2017. Canine acute leukaemia: 50 cases (1989–2014). *Vet. Comp. Oncol.* 15, 1101–1114. <https://doi.org/10.1111/vco.12251>
- Betton, J.-M., Chaffotte, A., 2005. Repliement et production de protéines recombinantes. *MS Médecine Sci.* 21, 613–617. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005216-7613>

Beziat, G., Tavitian, S., Picard, M., Faguer, S., Recher, C., Huguet, F., 2019. Multiple Severe Toxicities of L-Asparaginase and Their Innovative Management during Induction Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in an Adult Patient. *Case Rep. Hematol.* 2019, e9086570. <https://doi.org/10.1155/2019/9086570>

Blake, M.K., Carr, B.J., Mauldin, G.E., 2016. Hypersensitivity reactions associated with L-asparaginase administration in 142 dogs and 68 cats with lymphoid malignancies: 2007–2012. *Can. Vet. J.* 57, 176–182. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26834270/>

Borah, D., Yadav, R., Sangra, A., Shahin, L., Anand, A., Chaubey, K., 2012. Production, purification and process optimization of L-Asparagines (an anticancer enzyme) from *E. coli*, from sewage water. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 560–563.

Borek, D., Jaskólski, M., 2001. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochim. Pol.* 48, 893–902. https://doi.org/10.18388/abp.2001_3855

Bouillet, G., 2020. Validité de la classification Ann Arbor pour le lymphome canin non hodgkinien. ONIRIS.

Breen, M., Modiano, J.F., 2008. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans – man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res.* 16, 145–154. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1212-4>

Brigitha, L.J., Fiocco, M., Pieters, R., Albertsen, B.K., Escherich, G., Lopez-Lopez, E., Mondelaers, V., Vora, A., Vrooman, L., Schmiegelow, K., van der Sluis, I.M., 2022. Hypersensitivity to Pegylated *E. coli* asparaginase as first-line treatment in contemporary paediatric acute lymphoblastic leukaemia protocols: a meta-analysis of the Ponte di Legno Toxicity working group. *Eur. J. Cancer* 162, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.11.016>

Broome, J., 1961. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/1911114A0>

Bruneau, L., Chapman, R., Marsolais, F., 2006. Co-occurrence of both l-asparaginase subtypes in *Arabidopsis*: At3g16150 encodes a K⁺-dependent l-asparaginase. *Planta* 224, 668–679. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0245-9>

Cachumba, J.J.M., Antunes, F.A.F., Peres, G.F.D., Brumano, L.P., Santos, J.C.D., Da Silva, S.S., 2016. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 47 Suppl 1, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>

Campbell, H.A., Mashburn, L.T., Boyse, E.A., Old, L.J., 1967. Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry* 6, 721–730. <https://doi.org/10.1021/bi00855a011>

Cartagena Albertus, J.C., Almosni-Le-Sueur, F., 2012. Guide clinique de cancérologie du chien et du chat, Sine qua non. *Le Point Vétérinaire.*

Cartagena Albertus, J.C., Romairone Duarte, A., 2021. Oncologie du chien et du chat âgés. Cas cliniques inclus. *Med'Com.*

Castro, D., Marques, A.S.C., Almeida, M.R., de Paiva, G.B., Bento, H.B.S., Pedrolli, D.B., Freire, M.G.,

- Tavares, A.P.M., Santos-Ebinuma, V.C., 2021. L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 4515–4534. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11359-y>
- Cedar, H., Schwartz, J.H., 1968. Production of l-Asparaginase II by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 96. <https://doi.org/10.1128/jb.96.6.2043-2048.1968>
- Chan, W.-K., Horvath, T.D., Tan, L., Link, T., Harutyunyan, K.G., Pontikos, M.A., Anishkin, A., Du, D., Martin, L.A., Yin, E., Rempe, S.B., Sukharev, S., Konopleva, M., Weinstein, J.N., Lorenzi, P.L., 2019. Glutaminase Activity of L-Asparaginase Contributes to Durable Preclinical Activity against Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol. Cancer Ther.* 18, 1587–1592. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1329>
- Chan, W.K., Lorenzi, P.L., Anishkin, A., Purwaha, P., Rogers, D.M., Sukharev, S., Rempe, S.B., Weinstein, J.N., 2014. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood* 123, 3596–3606. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535112>
- Chand, S., Mahajan, R.V., Prasad, J.P., Sahoo, D.K., Mihooliya, K.N., Dhar, M.S., Sharma, G., 2020. A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 67, 619–647. <https://doi.org/10.1002/bab.1888>
- Chen, S.-H., 2015. Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance. *Pediatr. Neonatol.* 56, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2014.10.006>
- Chia, V.V., Batool, T., Makky, E.A., Suhaity, N., Yusoff, M.M., 2016. Production of l-asparaginase from natural substrates by *Escherichia coli* atcc 10536 and comparison of physiology parameters. *ARPN J. Eng. Appl. Sci.* 11, 5.
- Chien, W.-W., Allas, S., Rachinel, N., Sahakian, P., Julien, M., Le Beux, C., Lacroix, C.-E., Aribat, T., Salles, G., 2014. Pharmacology, immunogenicity, and efficacy of a novel pegylated recombinant *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase. *Invest. New Drugs* 32, 795–805. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0102-9>
- Clementi, A., 1922. La Désamidation Enzymatique De L'asparagine Chez Les Différentes Espèces Animales Et La Signification Physio Logique De Sa Presence Dans L'organisme. *Arch. Int. Physiol.* 19, 369–398. <https://doi.org/10.3109/13813452209145156>
- Clifford, C., De Lorimier, L.-P., 2008. Oncologic Emergencies: Chemotherapy-Related Side Effects ACVIM 2008. *ACVIM*.
- Code de la santé publique, 2012. Article R5141-122 [WWW Document]. Légifrance. URL https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000025787349/ (accessed 5.19.22).
- Code de la santé publique, 2010. Article R5124-44 [WWW Document]. Légifrance. URL https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000022288930/ (accessed 5.19.22).
- Cridge, H., Twedt, D.C., Marolf, A.J., Sharkey, L.C., Steiner, J.M., 2021. Advances in the diagnosis of acute pancreatitis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 35, 2572–2587. <https://doi.org/10.1111/jvim.16292>
- Da Cunha, M.C., Aguilar, J.G. dos S., Orrillo Lindo, S.M.D.R., de Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2021. L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* spp.: effects of production process and biochemical parameters. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 0, 1–11. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1931881>

- Day, M.J., Schultz, R.D., 2014. *Veterinary immunology. Principles and practice*, CRC Press. ed.
- De Stefano, V., Za, T., Ciminello, A., Betti, S., Rossi, E., 2015. Haemostatic alterations induced by treatment with asparaginases and clinical consequences. *Thromb. Haemost.* 113, 247–261. <https://doi.org/10.1160/TH14-04-0372>
- Dobson, J., Villiers, E., Morris, J., 2006. Diagnosis and management of leukaemia in dogs and cats. In *Pract.* 28, 22–31. <https://doi.org/10.1136/inpract.28.1.22>
- Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., Kumar, D.S., 2016. Chapter Six - Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase, in: Kim, S.-K., Toldrá, F. (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research, Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part I - Production of Enzymes*. Academic Press, pp. 115–135. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>
- Drouet, F., Cahu, X., Pointreau, Y., Denis, F., Mahé, M.-A., 2010. Lymphomes malins non hodgkiniens. *Cancer/Radiothérapie, Atlas de radio-anatomie et aide à la délimitation - Numéro spécial SIRIADE 14*, S210–S229. [https://doi.org/10.1016/S1278-3218\(10\)70025-1](https://doi.org/10.1016/S1278-3218(10)70025-1)
- Ducassou, S., 2018. Traitement des leucémies aiguës de l'enfant : aujourd'hui et demain. *Perfect. En Pédiatrie* 1, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.perped.2018.07.005>
- Ehsanipour, E.A., Sheng, X., Behan, J.W., Wang, X., Butturini, A., Avramis, V.I., Mittelman, S.D., 2013. Adipocytes Cause Leukemia Cell Resistance to L-Asparaginase via Release of Glutamine. *Cancer Res.* 73, 2998–3006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4402>
- Ellem, K.A., Fabrizio, A.M., Jackson, L., 1970. The dependence of DNA and RNA synthesis on protein synthesis in asparaginase-treated lymphoma cells. *Cancer Res.* 30, 515–527.
- Erdogan, A., Koytepe, S., Ates, B., Yilmaz, I., Seckin, T., 2014. Preparation of the L-Asparaginase-Based Biosensor With Polyimide Membrane Electrode for Monitoring L-Asparagine Levels in Leukemia. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 63, 909–917. <https://doi.org/10.1080/00914037.2014.886228>
- European Medicines Agency, 2017. Guideline on the chemistry of active substances for veterinary medicinal products [WWW Document]. [ema.europa. URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-chemistry-active-substances-veterinary-medicinal-products_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-chemistry-active-substances-veterinary-medicinal-products_en.pdf) (accessed 2.1.22).
- European medicines agency, 2016. Retrait de la demande d'autorisation de mise sur le marché pour Graspas (eryaspase) [WWW Document]. [Eur. Med. Agency. URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-qa/questions-answers-withdrawal-marketing-authorisation-application-graspas-eryaspase_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-qa/questions-answers-withdrawal-marketing-authorisation-application-graspas-eryaspase_fr.pdf) (accessed 10.30.21).
- European Medicines Agency, 2008. Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products [WWW Document]. [ema.europa. URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-stability-testing-existing-active-substances-related-finished-products_en-0.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-stability-testing-existing-active-substances-related-finished-products_en-0.pdf) (accessed 2.1.22).
- European Medicines Agency, 2007. Guideline on impurities in new veterinary drug substances [WWW Document]. [ema.europa. URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl10-impurities-new-veterinary-drug-substances-step-7-after-revision-step-9_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl10-impurities-new-veterinary-drug-substances-step-7-after-revision-step-9_en.pdf) (accessed 2.1.22).

European Medicines Agency, 2005. Guideline on stability testing of new veterinary drug substances and medicinal products (revision at step 9) [WWW Document]. ema.europa. URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl3-stability-testing-new-veterinary-drug-substances-medicinal-products-revision-step-9_en.pdf (accessed 2.12.22).

Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Fermé, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., Gaulard, P., Salles, G., Bosly, A., Gisselbrecht, C., Reyes, F., Coiffier, B., 2005. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 4117–4126. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.131>

Garaev, M.M., Golub, E.I., 1977. [Mechanism of action of glucose on L-asparaginase synthesis by *Escherichia coli* bacteria]. *Mikrobiologiya* 46, 433–439.

Gopal, G.J., Kumar, A., 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 32, 419–425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>

Gourgou, S., Paoletti, X., Mathoulin-Pélissier, S., 2021. Méthodes Biostatistiques appliquées à la recherche clinique en cancérologie. John Libbey Eurotext.

Guindeuil, G., Perez, M., 2021. Jazz pharmaceuticals - Information importante concernant la fin de distribution par le laboratoire jazz pharmaceuticals de la spécialité erwinase® 10 000 UI/flacon, poudre pour solution pour injection [WWW Document]. ansm.sante. URL <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/04/12/rs-20210412-erwinase-courrier-jazz-22-03-2021-2.pdf> (accessed 9.17.21).

Hainfeld, J.F., Liu, W., Halsey, C.M.R., Freimuth, P., Powell, R.D., 1999. Ni–NTA–Gold Clusters Target His-Tagged Proteins. *J. Struct. Biol.* 127, 185–198. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4149>

Haute Autorité de Santé, 2019. Commission de la transparence : asparaginase recombinante.

Hunault-Berger, M., 2015. L-asparaginase et LAL. *Horiz. Hémato* 05.

Hunault-Berger, M., Chevallier, P., Delain, M., Bulabois, C.-E., Bologna, S., Bernard, M., Lafon, I., Cornillon, J., Maakaroun, A., Tizon, A., Padrazzi, B., Ifrah, N., Gruel, Y., 2008. Changes in antithrombin and fibrinogen levels during induction chemotherapy with L-asparaginase in adult patients with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. Use of supportive coagulation therapy and clinical outcome: the CAPELAL study. *Haematologica* 93, 1488–1494. <https://doi.org/10.3324/haematol.12948>

Institut National du cancer, 2020. Préconisations de traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique chez l'enfant et chez l'adulte dans un contexte de tension d'approvisionnement en erwinase (crisantaspase) [WWW Document]. ansm.sante. URL <https://ansm.sante.fr/uploads/2022/08/02/20210930-crisantaspase-avis-experts-inca-4.pdf>

Irvine, J.D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J.W., Selick, H.E., Grove, J.R., 1999. MDCK (Madin–Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.* 88, 28–33. <https://doi.org/10.1021/js9803205>

Jennings, M.P., Beacham, I.R., 1990. Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II, ansB, and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *J. Bacteriol.* 172, 1491–1498. <https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1491-1498.1990>

Kenari, S.L.D., Alemzadeh, I., Maghsodi, V., 2011. Production of l-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. *Food Bioprod. Process.* 89, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.11.002>

Khushoo, A., Pal, Y., Mukherjee, K.J., 2005. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 189–197. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1867-0>

Kidd, J.A., Ross, P., Buntzman, A.S., Hess, P.R., 2015. Development of an ELISA to detect circulating anti-asparaginase antibodies in dogs with lymphoid neoplasia treated with *Escherichia coli* l-asparaginase. *Vet. Comp. Oncol.* 13, 77–88. <https://doi.org/10.1111/vco.12014>

Kozak, M., Jurga, S., 2002. A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II. *Acta Biochim. Pol.* 49, 509–513. https://doi.org/10.18388/abp.2002_3810

Krishnakumar, T., Visvanathan, R., 2014a. Acrylamide in food products: a review. *J. Food Process. Technol.* 5. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000344>

Krishnakumar, T., Visvanathan, R., 2014b. Acrylamide in food products: a review. *J. Food Process. Technol.* 5. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000344>

Krishnapura, P.R., Belur, P.D., Subramanya, S., 2016. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 720–737. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1022505>

Lanore, D., Delprat, C., 2002. *Chimiothérapie anticancéreuse*. Elsevier Masson.

Lanvers, C., Paulo Vieira Pinheiro, J., Hempel, G., Wuerthwein, G., Boos, J., 2002. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of l-asparaginase in human serum. *Anal. Biochem.* 309, 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00232-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00232-4)

Lanvers-Kaminsky, C., Westhoff, P.S., D'Incalci, M., Zucchetti, M., Boos, J., 2014. Immediate cooling does not prevent the ex vivo hydrolysis of L-asparagine by asparaginase. *Ther. Drug Monit.* 36, 549–552. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000030>

Laugel, V., Escande, B., Entz-Werle, N., Mazingue, F., Ferster, A., Bertrand, Y., Missud, F., Lutz, P., 2005. Pancréatites aiguës sévères à l'asparaginase chez l'enfant : étude rétrospective multicentrique. *Arch. Pédiatrie* 12, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2004.07.020>

Lautscham, E.M., Kessler, M., Ernst, T., Willimzig, L., Neiger, R., 2017. Comparison of a CHOP-LAsp-based protocol with and without maintenance for canine multicentric lymphoma. *Vet. Rec.* 180, 303–303. <https://doi.org/10.1136/vr.104077>

Le parlement européen, Le conseil de l'union européenne, 2004. Règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance en ce qui concerne les médicaments à usage humain et à usage vétérinaire, et instituant une Agence européenne des médicaments (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [WWW Document]. Eur-Lex. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/LSU/?uri=CELEX:32004R0726> (accessed 7.1.22).

Le traitement des divers types de lymphome [WWW Document], 2021. . VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/maladies/cancers/lymphomes/traitements-types.html> (accessed 2.8.22).

LeBlanc, A.K., Atherton, M., Bentley, R.T., Boudreau, C.E., Burton, J.H., Curran, K.M., Dow, S., Giuffrida, M.A., Kelliham, H.B., Mason, N.J., Oblak, M., Selmic, L.E., Selting, K.A., Singh, A., Tjostheim, S., Vail, D.M., Weishaar, K.M., Berger, E.P., Rossmeisl, J.H., Mazcko, C., 2021. Veterinary Cooperative Oncology Group—Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE v2) following investigational therapy in dogs and cats. *Vet. Comp. Oncol.* 19, 311–352. <https://doi.org/10.1111/vco.12677>

Lee, J.-J., Liao, A.T., Wang, S.-L., 2021. L-Asparaginase, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisolone (LHOP) Chemotherapy as a First-Line Treatment for Dogs with Multicentric Lymphoma. *Animals* 11, 2199. <https://doi.org/10.3390/ani11082199>

Li, S., Young, K.H., Medeiros, L.J., 2018. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology (Phila.)*, 50th anniversary review issue 50, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.006>

Lomelino, C.L., Andring, J.T., McKenna, R., Kilberg, M.S., 2017. Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *J. Biol. Chem.* 292, 19952–19958. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.819060>

Lopes, A.M., Oliveira-Nascimento, L. de, Ribeiro, A., Tairum, C.A., Breyer, C.A., Oliveira, M.A. de, Monteiro, G., Souza-Motta, C.M. de, Magalhães, P. de O., Avendaño, J.G.F., Cavaco-Paulo, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C. de O., Sette, L.D., Converti, A., Pessoa, A., 2017. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 82–99. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1120705>

Lymphomes - symptômes, causes, traitements et prévention [WWW Document], 2021. . VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/maladies/cancers/lymphomes.html> (accessed 2.8.22).

MacDonald, V.S., Thamm, D.H., Kurzman, I.D., Turek, M.M., Vail, D.M., 2005. Does l-Asparaginase Influence Efficacy or Toxicity When Added to a Standard CHOP Protocol for Dogs with Lymphoma? *J. Vet. Intern. Med.* 19, 732–736. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02753.x>

Madichie, E., Bondiguel, K., 2021. Porton Biopharma - Informations importantes sur un médicament - à l'attention des pharmaciens hospitaliers [WWW Document]. *ansm.sante*. URL <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/04/12/rs-20210218-erwinase.pdf> (accessed 9.18.21).

Madichie, E., Rivera-Bechetoille, S., 2022a. Porton Biopharma - informations importantes sur un médicament à destination des médecins et pharmaciens hospitaliers [WWW Document]. URL <https://ansm.sante.fr/disponibilites-des-produits-de-sante/medicaments/erwinase-10-000-ui-flacon-poudre-pour-solution-pour-injection-arret-de-distribution> (accessed 2.2.22)

Madichie, E., Rivera-Bechetoille, S., 2022b. Remise à disposition sur le marché français de la spécialité Erwinase 10 000 U, poudre pour solution injectable/pour perfusion en conditionnement France [WWW Document]. *ansm.sante*. URL <https://ansm.sante.fr/uploads/2022/08/02/20220802-dhpc-erwinase.pdf> (accessed 9.6.22).

Magalie PEREZ, 2020. Jazz pharmaceuticals - Information à l'attention des pharmaciens hospitaliers erwinase® 10 000 ui/flacon, poudre pour solution pour injection [WWW Document]. *ansm.sante*. URL <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/03/17/20210310-rs-erwinase-lettre-information-2.pdf> (accessed 9.21.21).

Maillère, B., Delluc, S., Ravot, G., 2012. La prédiction de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques. *médecine/sciences* 28, 82–88. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012281021>

medac, 2016. medac Asparaginase-Aktivitäts-Test MAAT [WWW Document]. medac. URL <https://www.medac.fr/wp-content/uploads/2016/11/Notice-MAAT.pdf> (accessed 7.27.22).

Ministère des solidarités et de la santé, 2022a. Fiche info - KIDROLASE 10 000 U.I., poudre et solvant pour solution injectable / pour perfusion - Base de données publique des médicaments [WWW Document]. URL <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=67313600> (accessed 5.17.22).

Ministère des solidarités et de la santé, 2022b. Fiche info - ONCASPAR 750 U/ml, poudre pour solution injectable/pour perfusion - Base de données publique des médicaments [WWW Document]. URL <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=61861579#> (accessed 5.17.22).

Ministère des solidarités et de la santé, 2022c. Fiche info - SPECTRILA 10 000 U, poudre pour solution à diluer pour perfusion - Base de données publique des médicaments [WWW Document]. Base Données Publique Médicam. URL <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=66242506#> (accessed 5.17.22).

Ministère des solidarités et de la santé, 2022d. Fiche info - ERWINASE 10000 UI, poudre pour solution injectable/pour perfusion - Base de données publique des médicaments [WWW Document]. URL <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=63341207> (accessed 5.17.22).

Mohamed, Z.K., Elnagdy, S.M., Seufi, A.E., Gamal, M., 2015. Cloning and molecular analysis of L-asparaginase II gene (ansB). *J. Biosci. Biotechnol.* 4, 291–302.

Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T., 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448–449. <https://doi.org/10.1038/419448a>

Northrup, N.C., Rassnick, K.M., Snyder, L.A., Stone, M.S., Kristal, O., Cotter, S.M., Moore, A.S., 2002. Neutropenia Associated with Vincristine and L-Asparaginase Induction Chemotherapy for Canine Lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 570–575. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02389.x>

O'Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L.M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., Butler, M., 2020. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnol. Adv.* 43, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>

Old, L.J., Boyse, E.A., Campbell, H.A., Brodey, R.S., Fidler, J., Teller, J.D., 1967. Treatment of lymphosarcoma in the dog with L-asparaginase. *Cancer* 20, 1066–1070. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196707\)20:7<1066::AID-CNCR2820200709>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196707)20:7<1066::AID-CNCR2820200709>3.0.CO;2-M)

Ordre national des vétérinaires, 2009. Guide réglementaire Bonnes pratiques d'emploi des médicaments anticancéreux en médecine vétérinaire.

Paillassa, J., Leguay, T., Thomas, X., Huguet, F., Audrain, M., Lheritier, V., Vianey-Saban, C., Acquaviva-Bourdain, C., Pagan, C., Dombret, H., Ifrah, N., Boissel, N., Hunault-Berger, M., 2018. Monitoring of asparagine depletion and anti-L-asparaginase antibodies in adult acute lymphoblastic leukemia treated in the pediatric-inspired GRAALL-2005 trial. *Blood Cancer J.* 8, 45. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0084-5>

Paitraud, D., 2021. Leucémie aiguë lymphoblastique: SPECTRILA, nouvelle spécialité à base d'asparaginase - Actualités - VIDAL eVIDAL [WWW Document]. URL https://evidal.vidal.fr/actualites/details/26584-leucemie_aigue_lymphoblastique_spectrila_nouvelle_specialite_a_base_d_asparaginase.html (accessed 2.10.22).

Parlement européen, 2019. Règlement (UE) 2019/ du Parlement européen et du Conseil du 11 décembre 2018 relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE. J. Off. L'Union Eur. 125.

Parmentier, J.H., Maggi, M., Tarasco, E., Scotti, C., Avramis, V.I., Mittelman, S.D., 2015. Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 39, 757–762. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.04.008>

Perez, M., Loze, J.-Y., 2020. Jazz Pharmaceuticals - Information à destination des professionnels de santé Arrêt mondial de commercialisation de Kidrolase 10 000UI / Flacon [WWW Document]. *ansm.sante*. URL <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/03/23/rs-20201104-kidrolase.pdf> (accessed 9.10.21).

Petersen, W.C., Clark, D., Senn, S.L., Cash, W.T., Gillespie, S.E., McCracken, C.E., Keller, F.G., Lew, G., 2014. Comparison of allergic reactions to intravenous and intramuscular pegaspargase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 31, 311–317. <https://doi.org/10.3109/08880018.2013.876134>

Pfreundschuh, M., Trümper, L., Österborg, A., Pettengell, R., Trneny, M., Imrie, K., Ma, D., Gill, D., Walewski, J., Zinzani, P.-L., Stahel, R., Kvaloy, S., Shpilberg, O., Jaeger, U., Hansen, M., Lehtinen, T., López-Guillermo, A., Corrado, C., Scheliga, A., Milpied, N., Mendila, M., Rashford, M., Kuhnt, E., Loeffler, M., 2006. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 7, 379–391. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70664-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70664-7)

Ponce, F., Sayag, D., Chamel, G., 2017. Classification pronostic et traitement des lymphomes multicentriques canins. *Point Vét. Démarche Clin. En Cancérologie Vét. Volume 48*, 111.
Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., Escherich, G., Horibe, K., Benoit, Y.C.M., Izraeli, S., Yeoh, A.E.J., Liang, D.-C., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V., Mullighan, C.G., 2015. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 2938–2948. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1636>

Qin, M., Zhao, F., 2003. l-Asparaginase release from Escherichia coli cells with aqueous two-phase micellar systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 110, 11–21. <https://doi.org/10.1385/ABAB:110:1:11>

Raetz, E.A., Salzer, W.L., 2010. Tolerability and Efficacy of L-Asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32, 554–563. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3181e6f003>

Richards, N., Kilberg, M., 2006. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142520>

Rigouin, C., Nguyen, H.A., Schalk, A.M., Lavie, A., 2017. Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution. *Sci. Rep.* 7, 10224. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10758-4>

Roberts, J., Burson, G., Hill, J.M., 1968. New Procedures for Purification of L-Asparaginase with High Yield from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/jb.95.6.2117-2123.1968>

Rogers, K.S., Barton, C.L., Benson, P.A., Green, R.A., 1992. Effects of single-dose L-asparaginase on coagulation values in healthy dogs and dogs with lymphoma. *Am. J. Vet. Res.* 53, 580–584.

Rosano, G.L., Morales, E.S., Ceccarelli, E.A., 2019. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 28, 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>

Rousseau, J., Gagné, V., Labuda, M., Beaubois, C., Sinnett, D., Laverdière, C., Moghrabi, A., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Neuberg, D., Kutok, J.L., Krajcinovic, M., 2011. ATF5 polymorphisms influence ATF function and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 5883–5890. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-355560>

Shida, T., Fukuoka, R., Maruo, T., Ito, T., Kawamura, H., Takeda, H., Sugiyama, H., Ishikawa, T., Yamada, T., Madarame, H., Kayanuma, H., Sukanuma, T., 2010. Initial response to L-asparaginase and prednisolone induction chemotherapy in 107 cases of canine lymphoma. *J. Jpn. Vet. Cancer Soc.* 1, 58–63. <https://doi.org/10.12951/jvcs.2009-006>

Simon, D., Eberle, N., Laacke-Singer, L., Nolte, I., 2008. Combination Chemotherapy in Feline Lymphoma: Treatment Outcome, Tolerability, and Duration in 23 Cats. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 394–400. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0057.x>

Soyer, C., Doliger, S., 2011. *Vade-mecum de cancérologie vétérinaire 2ème édition, 2ème édition.* ed. MED'COM, Paris.

Spilker, B., Lantz, B., Institut de recherches nationales Servie, Poirier, J.-P., 1987. *Méthodologie des études cliniques*, Doin Editions. ed, *Méthodologie expérimentale.* Paris.

Stas, P., Lasters, I., Coulombel, T., 2009. Immunogénicité de protéines d'intérêt thérapeutique: les anticorps monoclonaux thérapeutiques. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/200925121070>

Stecher, A.L., de Deus, P.M., Polikarpov, I., Abrahão-Neto, J., 1999. Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. *Pharm. Acta Helv.* 74, 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0031-6865\(99\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0031-6865(99)00009-6)

Thomas, X., Cannas, G., Chelghoum, Y., Gougounon, A., 2010. Alternatives thérapeutiques à la L-asparaginase native dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique de l'adulte. *Bull. Cancer (Paris)* 97, 1105–1117. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1168>

Tizard, I.R., 2013. *Veterinary immunology - ninth edition*, Elsevier. ed. St Louis Missouri.

Tranchand, B., Chabaud, S., Colombar, O., Dussart, S., Pérol, D., 2008. *Méthodologie des essais cliniques en cancérologie.* Lett. Pharmacol.

Ueno, T., Ohtawa, K., Mitsui, K., Koder, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Inada, Y., Nishimura, H., 1997. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* 11, 1858–1861. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400834>

UniProtKB - P00805 (ASPG2_ECOLI) [WWW Document], 2021. . uniprot. URL <https://www.uniprot.org/uniprot/P00805> (accessed 11.2.21).

Vail, D., Thamm, D., Liptak, J., 2019. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 6th Edition. Elsevier, Missouri.

Valence Vieilleigne, Cyril Parachini-Winter, 2021. *Cancérologie clinique du chat et du chien*, Les Editions du Point Vétérinaire. ed, Manuel pratique. Puteaux.

Valerius, K.D., Ogilvie, G.K., Fettman, M.J., Walton, J.A., Richardson, K., Powers, B.E., McNiel, E.A., Rogers, Q.R., 1999. Comparison of the effects of asparaginase administered subcutaneously versus intramuscularly for treatment of multicentric lymphoma in dogs receiving doxorubicin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 353–356.

van der Sluis, I.M., de Groot-Kruseman, H., Te Loo, M., Tissing, W.J.E., van den Bos, C., Kaspers, G.J.L., Bierings, M., Kollen, W.J.W., König, T., Pichlmeier, U., Kühnel, H.-J., Pieters, R., 2018. Efficacy and safety of recombinant *E. coli* asparaginase in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: A randomized multicenter study of the Dutch Childhood Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* 65, e27083. <https://doi.org/10.1002/pbc.27083>

van der Sluis, I.M., Vrooman, L.M., Pieters, R., Baruchel, A., Escherich, G., Goulden, N., Mondelaers, V., de Toledo, J.S., Rizzari, C., Silverman, L.B., Whitlock, J.A., 2016. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica* 101, 279–285. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.137380>

Vidya, J., M. V, U., Soccol, C., Pandey, A., 2011. Cloning, Functional Expression and Characterization of L-Asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 286–290.

Vrooman, L.M., Supko, J.G., Neuberger, D.S., Asselin, B.L., Athale, U.H., Clavell, L., Kelly, K.M., Laverdière, C., Michon, B., Schorin, M., Cohen, H.J., Sallan, S.E., Silverman, L.B., 2010. Erwinia asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 54, 199–205. <https://doi.org/10.1002/pbc.22225>

Walter, P., Roberts, K., Martin, R., Karen, H., Dennis, B., Alexander, J., Julian, L., Bruce, A., 2012. *L'essentiel de la biologie cellulaire (3e édition)*, Lavoisier Medecine Science. ed. Paris.

Wang, B., Relling, M.V., Storm, M.C., Woo, M.H., Ribeiro, R., Pui, C.-H., Hak, L.J., 2003. Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia* 17, 1583–1588. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403011>

Whelan, H.A., Wriston, J.C., 1969. Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli* B. *Biochemistry* 8, 2386–2393. <https://doi.org/10.1021/bi00834a020>

Willer, A., Gerss, J., König, T., Franke, D., Kühnel, H.-J., Henze, G., von Stackelberg, A., Möricke, A., Schrappe, M., Boos, J., Lanvers-Kaminsky, C., 2011. Anti-*Escherichia coli* asparaginase antibody levels determine the activity of second-line treatment with pegylated *E. coli* asparaginase: a retrospective analysis within the ALL-BFM trials. *Blood* 118, 5774–5782. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-367904>

Yari, M., Eslami, M., Ghoshoon, M.B., Nezafat, N., Ghasemi, Y., 2019. Decreasing the immunogenicity of *Erwinia chrysanthemi* asparaginase via protein engineering: computational approach. *Mol. Biol. Rep.* 46, 4751–4761. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04921-5>

Zajc, A.L., Warwick, H., Rosa, C., Grant, J., Marrington, M., 2022. Bilateral trigeminal neuropathy associated with multicentric lymphoma in two dogs: Clinical presentation, MRI findings and flow

cytometry characteristics. *Vet. Rec. Case Rep.* 10, e358. <https://doi.org/10.1002/vrc2.358>

Zhang, Y., Li, D., Li, Y., 2017. Expression and purification of L-asparaginase from *Escherichia coli* and the inhibitory effects of cyclic dipeptides. *Nat. Prod. Res.* 31, 2099–2106. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1277350>

Annexe 1 : Grade de toxicité (LeBlanc et al., 2021)

ADMINISTRATION SITE CONDITIONS					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Infusion site extravasation/ reaction	Swelling including oedema but without erythema or pain	Erythema with associated signs (eg, oedema, pain, swelling induration, phlebitis)	Ulceration or necrosis; severe tissue damage; surgical intervention indicated (such as soft tissue debridement and repair)	Life-threatening consequences (euthanasia will be performed without intervention), primarily wound that shows no evidence of healing or improvement over 2 weeks; urgent and extreme intervention indicated (such as limb amputation)	Death
Definition: A disorder characterized by leakage of a pharmacologic or a biologic substance from the infusion site into the surrounding tissue. Signs include induration, erythema, swelling and marked discomfort at the infusion site.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
ADL hospitalization indicated; limiting self care ADL					
ALLERGIC/IMMUNOLOGIC EVENT					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Allergic reaction/ hypersensitivity	Transient urticaria or rash distant from injection/infusion site; drug fever; intervention not indicated	Intervention or infusion interruption indicated; responds promptly to treatment (eg, antihistamines, NSAIDs, narcotics); prophylactic medications indicated	Prolonged (eg, not rapidly responsive to medication and/or brief interruption of infusion); recurrence of signs following initial improvement; hospitalization indicated for clinical sequelae (eg, renal impairment, pulmonary infiltrates or oedema)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by an adverse local or general response from exposure to an allergen.					
Anaphylaxis	–	–	Bronchospasm, with or without urticaria; parenteral intervention indicated; allergy-related oedema/ angioedema; hypotension	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by an acute inflammatory reaction resulting from the release of histamine and histamine-like substances from mast cells, causing a hypersensitivity immune response. Clinically, it presents with breathing difficulty, hypotension, cyanosis and loss of consciousness and may lead to death.					
Autoimmune disorder	Subclinical and serologic or other evidence of autoimmune reaction, with normal organ function and intervention not indicated.	Evidence of autoimmune reaction involving a non-essential organ or function (eg, hypothyroidism)	Reversible reaction involving function of a major organ or other adverse event (eg, transient colitis or anaemia)	Autoimmune reaction with life-threatening consequences	Death
Definition: A disorder resulting from loss of function or tissue destruction of an organ or multiple organs, arising from humoral or cellular immune responses of the individual to their own tissue constituents.					
Cytokine release syndrome	Fever (>39.5°C/103.5°F) with or without constitutional signs	Hospitalization for observation and supportive care without requirement for		Life-threatening consequences; urgent	Death
ALLERGIC/IMMUNOLOGIC EVENT					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
		pressors or oxygen supplementation; hypotension responding to intravenous fluids	Hypotension managed with one pressor; hypoxia requiring non-invasive oxygen support (flow-by/prongs/mask/oxygen cage)	intervention required; hypoxia requiring mechanical ventilation	
Definition: A disorder characterized by fever, depression, tachypnea, tachycardia, hypotension, rash and/or hypoxia caused by the release of cytokines.					
Serum sickness	Clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate arthralgia; fever, rash, urticaria, antihistamines indicated	Severe arthralgia or arthritis; extensive rash; steroids or IV fluids indicated	Life-threatening consequences; pressor or ventilatory support indicated	Death
Definition: A disorder characterized by a delayed-type hypersensitivity reaction to foreign proteins derived from an animal serum. It occurs approximately 6-21 days following the administration of the foreign antigen. Signs include fever, arthralgias, myalgias, skin eruptions, lymphadenopathy and dyspnoea.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
BLOOD/BONE MARROW					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Bone marrow hypocellularity	Mildly hypocellular; <25% reduction from normal cellularity for age	Moderately hypocellular; >25-<50% reduction from normal cellularity for age	Severely hypocellular; >50%-<75% reduction of cellularity from normal for age	Aplastic persistent for longer than 2 weeks	Death
Definition: A disorder characterized by the inability of the bone marrow to produce haematopoietic elements.					
Haemoglobin	Dog: 10 g/dL <LLN Cat: 8.0 g/dL <LLN	Dog: <10-8.0 g/dL Cat: <8.0-6.5 g/dL	Dog: <8.0-6.5 g/dL Cat: <6.5-5.0	Dog: <6.5 g/dL Cat: <5.0	Death
Haemolysis	Laboratory evidence of haemolysis only (eg, direct antiglobulin test; DAT; Coombs'; schistocytes and/or spherocytes present	Evidence of haemolysis and ≥2 g decrease in haemoglobin.	Transfusion or medical intervention indicated (eg, steroids)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by laboratory test results that indicate widespread erythrocyte cell membrane destruction.					
Lymphocytosis	–	>4000/μL 20 000/μL	>20 000/μL	Clinical manifestations of leucostasis; urgent intervention indicated	–

BLOOD/BONE MARROW					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Packed cell volume (PCV)	Dog: 30%-<LLN Cat: 25%-<LLN	Dog: 20-<30% Cat: 20-<25%	Dog: 15-<20% Cat: 15-<20% Transfusion indicated	Dog: <15% Cat: <15% Life threatening; urgent medical intervention indicated	Death
Neutropenia	1500/μL-<LLN	1000-1499/μL	500-999/μL	<500/μL	Death
Neutrophilia	–	50 000-100 000/μL	>100 000/ μL	Clinical manifestations of leucostasis; urgent intervention indicated	–
Thrombocytopenia (no clinical bleeding)	100 000/μL-<LLN	50 000-99 000/μL	25 000-49 000/μL	<25 000	Death
Thrombocytopenia– with clinical bleeding	–	–	–	Life threatening bleeding prompting urgent medical intervention	Death
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

LLN, lower limit of normal.

BODY CAVITY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Abdominal pain	Mild pain	Moderate pain; limiting ADL	Severe pain; limiting ADL	–	–
Definition: A sensation of marked discomfort in the abdominal region.					
Ascites	Clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; medical intervention indicated	Severe symptoms; invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death

BODY CAVITY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by accumulation of serous or haemorrhagic fluid in the peritoneal cavity.					
Hernia, non- diaphragmatic	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Reducible, non-strangulating; elective intervention indicated	Incarcerated, symptomatic; operative intervention indicated	Life-threatening consequences; strangulating or necrotic; urgent intervention indicated	Death
Definition: Organ or tissue displacement through an opening in muscle or fascia of the body wall, scrotum, or inguinal, femoral or pelvic canals					
Hernia, hiatal	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Symptomatic; medical management indicated	Symptomatic; operative intervention indicated	Severe symptoms; urgent intervention indicated	Death
Definition: Displacement of abdominal contents into the thorax through the oesophageal hiatus					
Hernia, diaphragmatic	–	Clinical or diagnostic observation with minimal or absent symptoms; incidental finding without recent history of trauma; elective intervention indicated	Symptomatic; operative intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death
Definition: Displacement of abdominal contents into the thorax through an abnormal opening in the diaphragm muscle, fascia, or attachments to the body wall.					
Peritonitis (septic)	–	Symptomatic; medical management indicated	Hospitalization, IV antimicrobials indicated; invasive intervention indicated (eg, tube feeding, abdominal drainage, surgery)	Life-threatening consequences including organ system dysfunction; urgent operative intervention indicated	Death
Definition: Focal or generalized inflammation of the peritoneum attributed to microbial contamination.					
Peritonitis (non- septic)	Asymptomatic diagnostic finding; intervention not indicated	Symptomatic; medical management indicated	Hospitalization, invasive intervention indicated (eg, tube feeding, abdominal drainage, surgery)	Life-threatening consequences including organ system dysfunction; urgent intervention indicated	Death
Definition: Focal or generalized inflammation of the peritoneum attributed to non-microbial (sterile) aetiologies.					
Pleural effusion (non- malignant)	Asymptomatic	Symptomatic, intervention with diuretics or single thoracocentesis indicated	Symptomatic and supplemental oxygen, >1 thoracocenteses, continuous tube drainage or pleurodesis indicated	Life-threatening (eg, haemodynamic instability or ventilatory support)	Death
Definition: A disorder characterized by an increase in amounts of fluid within the pleural cavity. Symptoms include shortness of breath, cough and marked chest discomfort.					
Pleuritis (septic)	–	Symptomatic; medical management indicated	Hospitalization, IV antimicrobials indicated; invasive intervention indicated (eg, thoracic drainage or lavage, surgery)	Life-threatening consequences including organ system dysfunction; urgent operative intervention indicated	Death
Definition: Focal or generalized inflammation of the pleural cavity attributed to microbial contamination.					
Pneumothorax	Asymptomatic, radiographic findings only	Symptomatic; non-operative intervention indicated	Sclerosis and/or operative intervention indicated	Life-threatening, haemodynamic instability; ventilatory support	Death

BODY CAVITY

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by abnormal presence of air in the pleural cavity resulting in the collapse of the lung.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

CARDIAC ARRHYTHMIA

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Supraventricular and junctional arrhythmias. <u>Select:</u> - Sinus tachycardia - Atrial premature complexes (APCs) - APCs patterns (atrial bigeminy/trigeminy) - Focal atrial tachycardia - Multi-focal atrial tachycardia - Atrioventricular tachycardia mediated by accessory pathways (OAVRT [orthodromic atrioventricular reciprocating tachycardia], PJRT [persistent or permanent junctional reciprocating tachycardia]) - Atrial flutter - Atrial fibrillation - Atrial parasystole - Junctional premature complexes (JPCs) - Junctional tachycardia - Other (specify, _____)	Asymptomatic, intervention not indicated	Non-urgent medical intervention indicated	Incompletely controlled medically or controlled with device (eg, pacemaker)	Life-threatening (eg, arrhythmia associated with CHF [congestive heart failure], hypotension, syncope, shock)	Death
Bradycardias. <u>Select:</u> - Sinus bradycardia - Sinus arrest - Sinus node dysfunction (sick sinus syndrome) - Atrial standstill - Sino-ventricular rhythm - Ventricular asystole/arrest - Pulseless electrical activity; electromechanical dissociation	Asymptomatic, intervention not indicated	Non-urgent medical intervention indicated	Incompletely controlled medically or controlled with device (eg, pacemaker)	Life-threatening (eg, arrhythmia associated with CHF, hypotension, syncope, shock)	Death
Conduction abnormality/atrioventricular heart block. <u>Select:</u> - AV block-first degree - AV block-second degree Mobitz I - AV block-second degree Mobitz II	Asymptomatic, intervention not indicated	Non-urgent medical intervention indicated	Incompletely controlled medically or controlled with device (eg, pacemaker)	Life-threatening (eg, arrhythmia associated with CHF, hypotension, syncope, shock)	Death

CARDIAC ARRHYTHMIA

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
- AV block-second degree (2:1 conduction) - AV block-second degree (advanced) - AV block-third degree (complete) - Interventricular conduction disturbance (IVCD) - Bundle branch block (BBB) - Phasic (rate-dependent) aberrant conduction - Other (specify _____)					
Ventricular arrhythmias. <u>Select:</u> - VPCs (ventricular premature complexes)/uniform - VPCs/multiform - VPC patterns (ventricular bigeminy/trigeminy) - Accelerated idioventricular rhythm - Monomorphic ventricular tachycardia - Polymorphic ventricular tachycardia - R on T ventricular tachycardia - Torsade de pointes - Ventricular fibrillation - Ventricular parasystole - Other (specify _____)	Asymptomatic, intervention not indicated	Non-urgent medical intervention indicated	Symptomatic and incompletely controlled medically or controlled with device (eg, pacemaker)	Life-threatening (eg, arrhythmia associated with CHF, hypotension, syncope, shock)	Death
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

CARDIAC GENERAL

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Acquired valvular heart disease	Valvular thickening with or without mild valvular regurgitation or stenosis, treatment not indicated	Moderate regurgitation or stenosis by imaging, treatment not indicated	Severe regurgitation or stenosis; signs controlled with medical therapy	Life-threatening; disabling; poorly responsive to medical therapy	Death
Cardiopulmonary arrest	—	—	—	Life-threatening	Death
Infective vegetative endocarditis	—	—	CHF or arrhythmia responsive to intervention	Severe or refractory CHF or life-threatening arrhythmia (eg, (eg, 3rd degree AV block, ventricular tachycardia)	Death
Left ventricular diastolic dysfunction	Asymptomatic diagnostic finding without associated signs; intervention not indicated	Asymptomatic, intervention indicated (eg, LAE [left atrial enlargement] and clopidogrel indicated)	Symptomatic CHF responsive to intervention	Refractory CHF, poorly controlled with intervention	Death

CARDIAC GENERAL

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Left ventricular systolic dysfunction	Asymptomatic, resting ejection fraction (EF) 45%-50%	Asymptomatic, resting EF 40%-45%	Symptomatic CHF responsive to intervention; EF 20%-40%	Refractory CHF or poorly controlled; EF < 20%	Death
Myocarditis	–	–	CHF responsive to intervention	Severe or refractory CHF	Death
Pericardial effusion (non-malignant)	–	Effusion without associated clinical signs	Physiologic consequences (eg, tamponade)	Life-threatening; emergency intervention indicated	Death
Pulmonary hypertension	–	No associated clinical signs without therapy	Clinical signs present (eg, syncope, ascites, exercise intolerance) present, responsive to intervention	Clinical signs present (eg, syncope, ascites, exercise intolerance) and refractory to intervention, poorly controlled	Death
Sinus bradycardia	Dog: <60 bpm Cat: <140 bpm	Dog: <40 bpm Cat: <120 bpm	Dog: <30 bpm Cat: <100 bpm	Dog: <20 bpm Cat: <80 bpm	Death
Sinus tachycardia	Dog: >140 bpm Cat: >220 bpm	Dog: >180 bpm Cat: >230 bpm	Dog: >200 bpm Cat: >240 bpm	Dog: >240 bpm Cat: >260 bpm	Death
Systemic hypertension (systolic BP > 160 mm Hg)	Asymptomatic, transient (<24 h) increase, intervention not indicated	Recurrent or persistent (>24 h); monotherapy may be indicated	Requiring more than one drug or more intensive therapy	Life-threatening consequences (eg, hypertensive crisis)	Death
Systemic hypotension (systolic BP < 100 mm Hg)	Asymptomatic, transient (<24 h), intervention not indicated	Brief (<24 h) fluid replacement or other therapy; no physiologic consequences	Sustained therapy, resolves without persisting physiologic consequences	Shock (eg, impairment of vital organ function)	Death
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

COAGULATION

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
DIC (disseminated intravascular coagulation)	–	Laboratory findings, no haemorrhage detected.	Laboratory findings, evidence of haemorrhage, non-disabling	Laboratory findings, life-threatening or disabling consequences (eg, CNS haemorrhage, organ damage, or haemodynamically significant blood loss); urgent intervention indicated	Death

Definition: A disorder characterized by systemic pathological activation of blood clotting mechanisms which results in clot formation throughout the body. There is an increase in the risk of haemorrhage as the body is depleted of platelets and coagulation factors.

PT (prothrombin time)	>1-1.5 × ULN	>1.5-2.5 × ULN	>2.5 × ULN; bleeding	–	–
PTT (partial thromboplastin time)	>1-1.5 × ULN	>1.5-2.5 × ULN	>2.5 × ULN; bleeding	–	–
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

ULN, upper limit of normal.

CONSTITUTIONAL CLINICAL SIGNS

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Lethargy/fatigue	Mild lethargy over baseline; diminished activity from pre-disease level, but able to function as an acceptable pet	Moderate lethargy causing some difficulty with performing ADL; ambulatory only to the point of eating, sleeping, and consistently defecating and urinating in acceptable area; Decreased grooming habits	Compromised, severely restricted in ADL; will ambulate if assisted; unable to confine urinations and defecation to acceptable areas unless assisted; absent grooming habits	Disabled, fully recumbent posture; reliant on urinary catheter and/or bladder expression; has no control over bowel movements	Death
Definition: Disorders characterized by a state of generalized weakness with a pronounced inability to summon sufficient energy to accomplish daily activities.					
Fever	39.5-40.0°C (103.5-104°F)	>40.0-40.8°C (>104-105.5°F)	>40.9-41.7°C (>105.6-107.6°F)	>41.8°C (>107.6°F)	Death
Hypothermia	–	36.1->34.4°C (97.0->94.0°F)	34.4->32.2°C (93.9->90.0°F)	<32.1°C (<89.9°F) or life-threatening consequences (eg, coma, hypotension, pulmonary oedema)	Death
Weight loss	>5% but <10% from baseline	10%-15% from baseline	>15% but <20% of baseline	>20% of baseline	Death
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

DERMATOLOGIC/SKIN

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Alopecia	Transient sparse thinning or denuding of hair at localized site, patchy alopecia (regrows but takes longer than 4 weeks)	Transient generalized thinning of hair coat, generalized alopecia (regrows but takes longer than 4 weeks)	Permanent sparse or generalized thinning of hair at localized site, or permanent patchy or generalized alopecia	—	—
Definition: A disorder characterized by a decrease in density of hair compared to normal for a given individual at a given age and body location.					
Bruising (in absence of Grade 3 or 4 thrombocytopenia)	Localized or in a dependent area	Generalized/multi-focal	—	—	—
Definition: A finding of injury of the soft tissues or bone characterized by leakage of blood into surrounding tissues.					
Oedema, limbs	5%-10% inter-limb discrepancy in volume or circumference at point of greatest difference; swelling or obscuration of anatomic architecture on close inspection	>10%-30% inter-limb discrepancy in volume or circumference at point of greatest difference; readily apparent obscuration of anatomic architecture, deviation from normal anatomic contour	>30% inter-limb discrepancy in volume; gross deviation from normal anatomic contour; limiting ADL	—	—
Definition: Swelling due to excessive fluid accumulation in the upper or lower extremities.					
Oedema, localized	Localized to dependent areas; no disability or functional impairment	Moderate localized oedema; intervention indicated	Severe localized oedema limiting ADL; intervention indicated	—	—
Definition: Swelling due to excessive fluid accumulation at a specific anatomic site.					
Erythema	Limited to localized site	Generalized	—	—	—
Definition: Superficial reddening of the skin, usually in patches, as a result of injury or irritation causing dilatation of the blood capillaries.					
Erythema multiforme	Target lesions covering <10% BSA and not associated with skin tenderness	Target lesions covering 10%-30% BSA and associated with skin tenderness	Target lesions covering >30% BSA, or any number of lesions associated with oral or genital erosions	Target lesions covering >30% BSA; associated with fluid or electrolyte abnormalities; ICU care indicated	Death
Definition: A disorder characterized by target lesions (a pink-red ring around a pale centre).					
Hyperpigmentation	Slight or moderate and confined to fewer than	Marked localized (<3 sites), or moderate generalized changes (more than 3 sites)	Marked generalized changes	—	—

DERMATOLOGIC/SKIN

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
	3 sites (localized), or slight generalized changes				
Hypopigmentation	Slight or moderate and confined to fewer than 3 sites (localized), or slight generalized changes	Marked localized (<3 sites), or moderate generalized changes (more than 3 sites)	Marked generalized changes	—	—
Nail/nailbed/claw changes	Discoloration, pitting, any number of nail(s)/claw(s)	Weakening (friable, breaks easily), no pain or changes in gait, any number of nail(s)/claw(s)	Partial or complete loss of nail(s)/claw(s) on any number of paws/feet; pain; lameness	Partial or complete loss of nail(s)/claw(s) on at least two paws/feet and significantly interfering with ADL—unwilling to ambulate	Nail/nailbed/claw changes that result in a decision for euthanasia
Palmar-plantar erythrodysesthesia syndrome	Minimal changes or pododermatitis (eg, erythema) without pain	Skin or paw pad changes (eg, peeling/flaking, blisters, bleeding, oedema) or pain, not interfering with function, easily managed medically, resolves significantly within 1 week of drug withdrawal	Skin or paw pad changes that are painful and interfere with function (lameness, excessive licking) and include moist, ulcerative dermatitis, and return to function within 1 week of drug withdrawal	Skin or paw pad changes that are painful, interfere with function and change in function persists longer than 1 week	Skin or paw pad changes that result in a decision for euthanasia
Definition: A disorder characterized by redness, marked discomfort, swelling and possible ulceration of the palmar/plantar surfaces of the paws.					
Photosensitivity	Painless erythema	Painful erythema	Erythema with dry desquamation	Erythema with moist desquamation or ulceration, life-threatening (would result in euthanasia if not treated); disabling	Complications of photosensitivity that result in death or euthanasia
Definition: A disorder characterized by an increase in sensitivity of the skin to light.					
Pruritus	Mild or localized, does not result in lesions because of self-trauma	Moderate or widespread and occurs regularly; may occur at night but not when eating or playing; would result in lesions due to self-trauma if restraint (e-collar or covering of affected area) is not used when unsupervised.	Licking or scratching continuously, requires restraint (e-collar or covering of affected area) at all times to prevent self-trauma, oral corticosteroid or immunosuppressive therapy usually prescribed unless contraindicated	Severe and prolonged; continues when eating, playing, exercising, limits sleeping and eating; oral corticosteroid or immunosuppressive therapy indicated	—
Definition: A disorder characterized by intense itching.					
Purpura	Combined area of lesions covering <10% BSA	Combined area of lesions covering 10%-30% BSA; bleeding with trauma	Combined area of lesions covering >30% BSA; spontaneous bleeding	—	—

DERMATOLOGIC/SKIN					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by haemorrhagic areas of the skin and mucous membrane. Newer lesions appear reddish in colour. Older lesions are usually a darker purple colour and eventually become a brownish-yellow colour.					
Rash: acne/acneiform	Macules, papules apules and/or pustules covering <10% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness	Macules, papules apules and/or pustules covering 10%-30% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness	Macules, papules apules and/or pustules covering >30% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness; limiting ADL; associated with local superinfection with oral antibiotics indicated	Macules, papules apules and/or pustules covering any % BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness and are associated with extensive superinfection with IV antibiotics indicated; life-threatening consequences	Death
Definition: A disorder characterized by an eruption of papules and pustules or a disorder characterized by the presence of macules (flat) and papules (elevated). Also known as morbilliform rash.					
Scaling	Fine scaling, noticeable only upon close examination	Scaling easily visible but not exfoliation in clumps; minimal crusting	Easily visible generalized scaling and crusting with generalized exfoliation upon examination	–	–
Definition: A disorder characterized by flaky and dull skin.					
Skin atrophy	Covering <10% BSA; associated with telangiectasia or changes in skin colour	Covering 10%-30% BSA; associated with striae or adnexal structure loss	Covering >30% BSA; associated with ulceration	–	–
Definition: A disorder characterized by the degeneration and thinning of the epidermis and dermis.					
Skin ulceration	Non-blanchable erythema of only superficially eroded intact skin with associated warmth or oedema	Combined area of ulcers ≤2 cm and partial thickness skin loss involving skin or subcutaneous fat	Combined area of ulcers >2 cm with partial thickness skin loss or full-thickness skin loss (any size) involving damage to or necrosis of subcutaneous tissue that may extend down to fascia	Any size ulcer (full thickness) with extensive destruction, tissue necrosis, or damage to muscle, bone, or supporting structures with or without full thickness skin loss	Death
Definition: A disorder characterized by circumscribed, inflammatory and necrotic erosive lesion on the skin. If depth and size are discrepant, grade is assigned based on depth of ulceration and not size.					
Toxic epidermal necrolysis	–	–	–	Skin sloughing covering ≥30% body surface area with associated symptoms (eg, erythema, purpura or epidermal detachment)	Death
Definition: A disorder characterized by greater than 30% total body skin area separation of dermis. The syndrome is thought to be a hypersensitivity complex affecting the skin and the mucous membranes.					
Urticaria (hives, welts, wheals)	Transient, resolves without treatment	Some discomfort, intervention indicated for <48 h	Moderate to marked discomfort, intervention indicated for >48 h	–	–

DERMATOLOGIC/SKIN					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by a pruritic skin eruption characterized by wheals with pale interiors and well-defined red margins.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

EAR and LABRYINTH DISORDERS					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Ear pain	Mild pain	Moderate pain; not limiting ADL	Severe pain; limiting ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by a sensation of marked discomfort in any part of the ear.					
External ear inflammation	External otitis with erythema or dry desquamation	External otitis with moist desquamation, oedema, enhanced cerumen or discharge; tympanic membrane perforation; tympanostomy indicated	External otitis with mastoiditis; stenosis or osteomyelitis; necrosis of soft tissue or bone	Urgent operative intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation, swelling and redness to the outer ear and ear canal.					
Hearing impaired	Slow to respond to auditory stimuli; mild BAER abnormalities such as prolonged peak latencies and decreased wave amplitudes	Only responsive to loud auditory stimuli; moderate BAER abnormalities such as isoelectric air conducted BAER with normal or abnormal bone conducted BAER	Clinically deaf; severe BAER abnormalities such as isoelectric air and bone conducted BAER	–	–
Definition: A disorder characterized by partial or complete loss of the ability to detect or understand sounds resulting from damage to ear structures. BAER = brainstem auditory evoked potentials					
Middle ear inflammation	Serous otitis	Serous otitis, medical intervention indicated	Mastoiditis; necrosis of canal soft tissue or bone	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation, swelling and redness to the middle ear.					
Vertigo	–	Symptomatic; not limiting ADL	Severe symptoms; limiting ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by dizziness, imbalance, nausea and vision problems.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

ENDOCRINE

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Adrenal insufficiency	Asymptomatic, intervention not indicated	Symptomatic, out-patient intervention indicated	Symptomatic, hospitalization indicated	Life-threatening; disabling	Death
Definition: A disorder that occurs when the adrenal cortex does not produce enough of the hormone cortisol and in some cases, the hormone aldosterone. It may be due to a disorder of the adrenal cortex as in Addison's disease or primary adrenal insufficiency.					
Hyperadrenocorticism (Cushing syndrome)	–	Symptomatic, out-patient medical intervention indicated	Symptomatic, in-patient medical intervention indicated	–	–
Definition: A disorder characterized by elevated cortisol concentrations. It may be due to exogenous (iatrogenic) or endogenous (pituitary-dependent, adrenal-dependent) causes.					
Pancreatic endocrine: transient glucose intolerance, diabetes mellitus	Blood glucose <200 mg/dL, no intervention needed	Symptomatic, dietary modification or oral agent or short-term insulin indicated	Symptoms interfering with ADL (eg, anorexia); insulin indicated; hospitalization could be considered	Life-threatening consequences (eg, ketoacidosis, hyperosmolarity); hospitalization indicated	Death
Definition: A disorder characterized by insufficient production of pancreatic insulin leading to glucose intolerance and/or diabetes mellitus.					
Pancreatic exocrine: maldigestion	Asymptomatic, intervention not indicated	Symptomatic, dietary modification or oral agents indicated	Symptoms interfering with ADL; Grade 3 weight loss	Life-threatening consequences; cachexia	Death
Definition: A disorder characterized by insufficient production of pancreatic exocrine enzymes leading to maldigestion.					
Parathyroid function (hyperparathyroidism)	Asymptomatic, diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic, intervention indicated	–	–	Death
Definition: A disorder characterized by an increase in production of parathyroid hormone by the parathyroid glands. This results in hypercalcaemia.					
Parathyroid function (hypoparathyroidism)	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate symptoms; medical intervention indicated	Severe symptoms; medical intervention and hospitalization indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by a decrease in production of parathyroid hormone by the parathyroid glands.					
Thyroid function (hyperthyroidism)	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; thyroid suppression therapy indicated; limiting ADL	Severe symptoms; thyroid suppression, limiting ADL, hospitalization indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by excessive levels of thyroid hormone in the body. Common causes include an overactive thyroid gland or thyroid hormone overdose.					
Thyroid function (hypothyroidism)	Asymptomatic, diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic, not interfering with ADL, thyroid replacement indicated	Symptoms interfering with ADL, hospitalization indicated	Life-threatening myxedema; coma	Death
Definition: A disorder characterized by a decrease in production of thyroid hormone by the thyroid gland.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

GASTROINTESTINAL

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Abdominal distention	Clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Clinical signs present; outpatient medical management indicated	Severe discomfort; limiting ADL; inpatient management indicated.	–	–
Definition: A disorder characterized by swelling of the abdomen.					
Appetite, altered	Decreased appetite lasting ≤1 week	Decreased appetite lasting 1-2 weeks	Decreased appetite lasting >2 weeks	–	–
Definition: A disorder characterized by a loss of appetite/decreased interest in food.					
Anorexia	Complete anorexia lasting <48 h	Complete anorexia lasting 2-3 days	Anorexia of 3-5 days duration; associated with significant weight loss (≥10%) or malnutrition; IV fluids, tube feeding or force feeding indicated	Life-threatening consequences; TPN indicated; complete anorexia of >5 days duration	Death
Definition: A disorder characterized by a complete lack of food intake.					
Colitis	Asymptomatic, pathologic or radiologic findings only	Abdominal cramping/pain; mucus or blood in stool; outpatient medical intervention indicated; ≤5 days duration	Abdominal pain, fever, change in bowel habits, ileus, peritoneal signs; hospitalization indicated; >5 days duration	Life-threatening consequences (eg, perforation, bleeding, ischaemia, necrosis)	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the colon.					
Constipation	Occasional or intermittent symptoms; occasional use of stool softeners, laxatives, dietary modification or enema	Persistent symptoms with regular use of laxatives or enemas indicated	Symptoms interfering with ADL; obstipation with manual evacuation indicated	Life-threatening consequences (eg, obstruction, megacolon)	Death
Definition: A disorder characterized by irregular and infrequent or difficult evacuation of the bowels.					
Dehydration	Increased oral fluids indicated; dry mucous membranes; decreased skin turgor	Parenteral (IV or SC) fluids indicated <48 h	IV fluids indicated >48 h	Life-threatening (eg, haemodynamic collapse)	Death
Definition: A disorder characterized by excessive loss of water from the body.					
Diarrhoea	Decreased stool consistency or mild diarrhoea lasting ≤24 h that resolves with or without the use of medication and/or parenteral (IV or SC) fluids	Diarrhoea lasting longer than 24 h	Diarrhoea that requires hospitalization; interfering with ADL	Life-threatening (eg, haemodynamic collapse)	Death
Definition: A disorder characterized by frequent and watery bowel movements.					
Dysphagia	Symptomatic but able to eat regular diet	Symptomatic and altered eating/swallowing (eg, altered dietary habits, food consistency); parenteral (IV or SC) fluids indicated <48 h	Symptomatic and severely altered eating/swallowing (eg, inadequate oral caloric or fluid intake); IV fluids >48 h, tube feeding or PPN/TPN indicated	Life-threatening (eg, obstruction, perforation)	Death

GASTROINTESTINAL					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by difficulty in swallowing.					
Enteritis	Asymptomatic, pathologic or radiologic findings only	Abdominal pain/cramping; mucus or blood in stool; medical management indicated; Hospitalization ≤48 h indicated	Abdominal pain/cramping, fever, change in bowel habits with ileus; peritoneal signs; hospitalization >48 h indicated	Life-threatening (eg, perforation, bleeding, ischaemia, necrosis)	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the small intestine.					
Esophagitis	Clinical or diagnostic observation only; ≤2 episodes of regurgitation in a 48-h period; intervention not indicated	>2 episodes of regurgitation in a 48-h period; medical management indicated	Severe, recurrent symptoms; invasive intervention indicated (eg, endoscopy, luminal dilation, gastrostomy tube feeding)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: inflammation of the oesophagus, including sequelae such as stricture; typically due to gastroesophageal reflux.					
Flatulence	Mild	Moderate	Severe	–	–
Definition: A disorder characterized by a state of excessive gas in the intestinal tract.					
Gastric dilatation, volvulus	–	Symptomatic; gastric dilatation without volvulus or malposition	Symptomatic; gastric dilatation and malposition; non-surgical intervention indicated	Life threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death
Definition: Pathologic accumulation of gas and ingesta within gastric lumen, with or without gastric torsion or other malposition.					
Gastric ulceration	Clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Altered GI function; medical intervention indicated	Severely altered GI function; TPN indicated; elective operative or endoscopic intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated; gastric perforation	Death
Definition: A disorder characterized by a circumscribed, inflammatory and necrotic erosive lesion on the mucosal surface of the stomach.					
Ileus, GI	Asymptomatic, radiologic finding only	Symptomatic; altered GI function (eg, altered dietary habits); parenteral (IV or SC) fluids indicated ≤48 h	Symptomatic and severely altered GI function; IV fluids, tube feedings or PPN/TPN indicated >48 h	Life-threatening consequences	Death
Definition: A disorder characterized by failure of the ileum to transport intestinal contents.					
Incontinence, anal	Occasional	Daily	Interfering with ADL; operative intervention indicated	Permanent	Complications of anal incontinence that result in euthanasia
Definition: A disorder characterized by inability to consciously control rectal evacuation.					
Megaesophagus	Clinical or diagnostic observation only; secondary to gastric dilatation; intervention not indicated except for underlying gastric complaint	Mild symptoms; minimal weight loss; medical management indicated	Symptomatic; clinically apparent weight loss; intervention such as gastrotomy tube feeding or hospitalization indicated	Severe symptoms; urgent intervention indicated	Death

GASTROINTESTINAL					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: Generalized dilation and hypomotility of the oesophagus.					
Mucositis/stomatitis	Erythema of the mucosa	Patchy ulcerations or pseudomembranes	Confluent ulcerations or pseudomembranes; bleeding with minor trauma	Tissue necrosis; significant spontaneous bleeding; life-threatening	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the oral mucosa.					
Nausea/ptyalism	Salivation or "smacking of lips" noted; did not require intervention	Salivation or "smacking of lips" required intervention	–	–	–
Definition: A disorder characterized by hypersalivation and sensation or urge to vomit—difficult to assess in companion species.					
Vomiting	Vomiting lasting ≤24 h that resolves with or without the use of medication and/or parenteral (IV or SC) fluids	Vomiting lasting longer than 24 h	Vomiting that requires hospitalization; interfering with ADL	Life-threatening (eg, haemodynamic collapse)	Death
Definition: A disorder characterized by the reflexive act of ejecting the contents of the stomach through the mouth.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

HAEMORRHAGE/BLEEDING					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Haematoma	Minimal signs, invasive intervention not indicated	Minimally invasive evacuation or aspiration indicated	–	–	–
Definition: A disorder characterized by a localized collection of blood, usually clotted, in an organ, space, or tissue, due to a break in the wall of a blood vessel.					
Haemorrhage/bleeding	Minimal; Intervention not indicated	Managed with corrective action and/or fluid therapy but without further consequences or blood product administration	Further non-life-threatening consequences and/or blood product administration	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: Uncontrolled bleeding.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

HEPATOBIILIARY/PANCREAS

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Cholecystitis	Asymptomatic, radiologic (inclusive of radiography, ultrasonography and computed tomography) findings only	Symptomatic, medical intervention indicated	Operative or endoscopic intervention required	Life-threatening (eg, sepsis or perforation)	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation involving the gallbladder. It may be associated with the presence of gallstones.					
Liver dysfunction/failure (clinical signs only)	—	—	Jaundice	Encephalopathy or coma	Death
Definition: A disorder characterized by the inability of the liver to metabolize chemicals in the body. Laboratory test results reveal abnormal plasma levels of ammonia, bilirubin, lactic dehydrogenase and alkaline phosphatase.					
Pancreatic exocrine insufficiency	—	Increase in stool frequency, bulk or odour; steatorrhea	Sequelae of absorption deficiency (eg, weight loss)	Life-threatening	Death
Definition: A disorder characterized by insufficient production of pancreatic exocrine enzymes leading to maldigestion.					
Pancreatitis	Pancreatic lipase enzyme elevation; imaging findings only	Grade 1 or 2 vomiting and or/hyporexia; medical intervention indicated (eg, anti-emetics analgesia, parenteral hydration, nutritional support)	Severe cranial abdominal pain; Grade 3 or higher vomiting; coagulopathy; Grade 1 or 2 hyperbilirubinemia; evidence of SIRS (systemic inflammatory response syndrome) or MODS (multiple organ dysfunction syndrome); plasma transfusion indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated; Unresponsive hypotension; Grade 3/4 hyperbilirubinemia with evidence of extrahepatic biliary obstruction; suppurative abdominal exudate; may require surgical intervention	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the pancreas.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

METABOLIC/LABORATORY

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Acidosis	pH < normal, but ≥7.3	—	pH < 7.3	Life-threatening consequences	Death
Albumin, low	<LLN-2.0 g/dL Dog: >ULN-2.5 × ULN	<2.0-1.5 g/dL Dog: >2.5-5.0 × ULN	<1.5 g/dL Dog: >5.0-20 × ULN	— Dog: >20 × ULN	—

METABOLIC/LABORATORY

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Alkaline phosphatase (ALP), high	Cat: >ULN-1.25 × ULN	Cat: >1.25-1.5 × ULN	Cat: >1.5-2.0 × ULN	Cat: >2 × ULN	—
Alkalosis	pH > normal, but ≤7.5	—	pH > 7.5	Life-threatening consequences	Death
Alanine aminotransferase (ALT), high	Dog: >ULN-1.5 × ULN Cat: >ULN-1.25 × ULN	Dog: >1.5-4.0 × ULN Cat: >1.25-1.5 × ULN	Dog: >4.0-10 × ULN Cat: >1.5-2.0 × ULN	Dog: >10 × ULN Cat: >2 × ULN	—
Amylase	>ULN-1.5 × ULN	>1.5-2.0 × ULN	>2.0-5 × ULN	>5 × ULN	—
Aspartate aminotransferase (AST), high	>ULN-1.5 × ULN	>1.5-2.0 × ULN	>2.0-10 × ULN	>10 × ULN	—
Bile acids, fasting (with normal bilirubin)	—	Values reported above normal reference interval	—	—	—
Bilirubin	>ULN-1.5 × ULN	>1.5-3.0 × ULN	>3.0-10 × ULN	>10 × ULN	—
BUN	>1-1.5 × baseline; >ULN-1.5 × ULN	>1.5-3 × baseline; >1.5-2.0 × ULN	>3 × baseline; >2.0-3 × ULN	>3 × ULN	—
Calcium, low	<LLN-8.0 mg/dL Ionized dog: <LLN-1.1 nmol/L Ionized cat: <LLN-0.9 nmol/L	<8.0-7.0 mg/dL Ionized dog: <1.1-1.0 nmol/L Ionized cat: <0.9-0.8 nmol/L	<7.0-6.0 mg/dL Ionized dog: <1.0-0.9 nmol/L Ionized cat: <0.8-0.7 nmol/L	<6.0 mg/dL Ionized dog: <0.9 nmol/L Ionized cat: <0.7 nmol/L	Death
Calcium, high	>ULN-<12.0 mg/dL Ionized: >ULN-1.5 nmol/L	≥12.0-13.0 mg/dL Ionized: >1.5-1.6 nmol/L, mild clinical signs not requiring immediate intervention	>13.0 mg/dL Ionized: >1.6-1.8 nmol/L with clinical signs and/or sequela requiring medical intervention; hospitalization indicated	Life-threatening, require immediate patient intervention	Death
Creatine phosphokinase (CPK), high	>ULN-2.5 × ULN	>2.5-5 × ULN	>5-10 × ULN	>10 × ULN	—
Creatinine, high	>1-1.5 × baseline; >ULN-1.5 × ULN	>1.5-3 × baseline; >1.5-2.0 × ULN	>3 × baseline; >2.0-3 × ULN	>3 × ULN	—
Glucose, high	Dog: >ULN-160 mg/dL Cat: >ULN-200 mg/dL abnormal glucose above normal with no medical intervention needed	Dog: >160-250 mg/dL Cat: >200-250 mg/dL	Dog: >250-500 mg/dL Cat: >250-500 mg/dL	Dog: >500 mg/dL Cat: >500 mg/dL	—
Glucose, low	<LLN-55 mg/dL	<55-40 mg/dL	<40-30 mg/dL	<30 mg/dL	Death
Potassium, high	>ULN-5.5 mmol/L	>5.5-6.0 mmol/L	>6.0-7.0 mmol/L	>7.0 mmol/L	Death

METABOLIC/LABORATORY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Potassium, low	<LLN-3.0 mmol/L	–	<3.0-2.5	<2.5	Death
Phosphorous, high	>ULN-8.9 mg/dL	9.0-12.9 mg/dL	13.0-18.9 mg/dL	>19.0 mg/dL	Death
Phosphorous, low	<LLN	<LLN with evidence of haemolysis	–	–	–
Sodium, high	≤5 mEq/L above ULN	6-10 mEq/L above ULN; intervention indicated	11-15 mEq/L above ULN; hospitalization indicated	>15 mEq/L above ULN; life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Sodium, low	<LLN-130 mEq/L	125-129 mEq/L, asymptomatic	125-129 mEq/L, symptomatic; 120-124 mEq/L regardless of symptoms	<120 mEq/L; life-threatening consequences	Death
Tumour lysis syndrome	Asymptomatic, clinicopathologic finding	Mild-moderate clinical signs, medical intervention indicated ≤48 h	Medical intervention, hospitalization >48 h indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by metabolic abnormalities that result from a spontaneous or therapy-related cytotoxicity of tumour cells.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
MUSCULOSKELETAL/SOFT TISSUE					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Arthritis, non-septic	Imaging or clinicopathologic finding only	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by inflammation involving a joint.					
Extremity (gait/ambulation) lameness	Clinical signs not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: Inability to walk normally because of an injury or illness affecting the limbs.					
Joint effusion	Imaging or clinicopathologic finding only	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by excessive fluid in a joint.					
Muscle weakness, generalized or specific area	Observation only	Clinical signs evident on examination; limiting ADL	Clinical signs evident on examination; severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
MUSCULOSKELETAL/SOFT TISSUE					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by a reduction in the strength of the muscles.					
Myositis (inflammation of muscle)	Imaging or clinicopathologic finding only	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation involving the skeletal muscles.					
Seroma	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Symptomatic; simple aspiration indicated	Symptomatic; invasive intervention indicated	–	–
Definition: Sterile localized collection of fluid at a site of tissue removal or other surgical manipulation.					
Soft tissue necrosis	Minor signs of soft tissue damage, no intervention indicated	Local wound care; medical intervention indicated	Operative debridement or other invasive intervention indicated	Life-threatening; major invasive intervention indicated (eg, reconstruction, graft)	Death
Definition: A disorder characterized by a necrotic process occurring in the soft tissues.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
NEUROLOGY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Abducens nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the abducens nerve (6th cranial nerve).					
Accessory nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the accessory nerve (11th cranial nerve).					
Apnoea	–	–	Present	Intubation indicated	Death
Definition: A disorder characterized by cessation of breathing.					
Ataxia	Clinical signs not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–

NEUROLOGY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by lack of coordination of muscle movements resulting in the impairment or inability to perform voluntary activities.					
Brachial plexopathy	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by regional motor or sensory dysfunction referable to the brachial plexus.					
Central nervous system necrosis	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by a necrotic process affecting the brain or spinal cord.					
Cerebral oedema	–	New onset; worsening from baseline; affects ADL; outpatient therapy indicated	New onset; worsening from baseline; significantly affects ADL; hospitalization or prolongation of hospitalization indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by swelling due to an excessive accumulation of fluid in the brain.					
Cerebrospinal fluid leakage	Post-procedural; asymptomatic	Post-surgical; moderate clinical signs; medical intervention indicated	Post-surgical; severe clinical signs; medical or surgical intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by loss of cerebrospinal fluid into or through surrounding tissues.					
Cochlear nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated; mild BAER abnormalities such as prolonged peak latencies and decreased wave amplitudes	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL; moderate BAER abnormalities such as isoelectric air conducted BAER with normal or abnormal bone conducted BAER	Severe clinical signs, severely restricted in ADL; severe BAER abnormalities such as isoelectric air and bone conducted BAER	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the cochlear component of the vestibulocochlear nerve (8th cranial nerve).					
Cognitive disturbance	Mild cognitive disability; treatment not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	Euthanized due to cognitive disability
Definition: A disorder characterized by a conspicuous change in cognitive functions.					
Depressed level of consciousness	Decreased level of alertness	Sedate, slow responses to stimuli; Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Difficult to arouse; Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
NEUROLOGY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by a decrease in the ability to receive or respond to stimuli.					
Dizziness	Mild unsteadiness	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: Nausea/motion sickness due to vestibular dysfunction.					
Dysphonia	Dysphonia	–	Aphonia	–	–
Definition: A disorder characterized by a reduced ability to vocalize.					
Encephalitis	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the brain; may be infectious or non-infectious aetiology.					
Encephalopathy	–	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Signs or symptoms interfering with ADL; hospitalization indicated	Life-threatening; disabling	Death
Definition: A disorder characterized by any pathological process involving the brain.					
Facial nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL (includes neurogenic dry eye syndrome)	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the facial nerve (7th cranial nerve).					
Glossopharyngeal nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening	Death
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the glossopharyngeal nerve (9th cranial nerve).					
Head pain	Mild pain	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder manifested by discomfort in various parts of the cranium/head.					
Hydrocephalus	Clinical or diagnostic observation only; Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by abnormal increase of cerebrospinal fluid in the ventricles (internal), subarachnoid space (external) or ex vacuo.					
Hypertensive encephalopathy	–	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

NEUROLOGY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by the presence of encephalopathic clinical signs observed in association with systemic hypertension.					
Hypoglossal nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the hypoglossal nerve (12th cranial nerve).					
Intracranial haemorrhage	Clinical or diagnostic observations only; Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by bleeding within the cranium.					
Ischaemic cerebrovascular accident	Imaging finding only	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL; intervention indicated	Severe clinical signs, severely restricted in ADL; invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by a decrease or absence of blood supply to the brain caused by obstruction of an artery.					
Laryngeal nerve dysfunction	Asymptomatic; clinical exam finding	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by abnormal laryngeal function.					
Leukoencephalopathy	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by T2/FLAIR hyperintensities involving the periventricular white matter, +/- ventriculomegaly or enlargement of the subarachnoid space.					
Meningitis	Asymptomatic or mild signs; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the meninges; may be infectious or non-infectious aetiology.					
Movements involuntary	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–

NEUROLOGY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by uncontrollable and purposeless movements.					
Muscle weakness left-sided	Observation only; no clinical signs present	Clinical signs evident on examination; causing some difficulty with performing ADL	Clinical signs evident on examination; severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by a reduction in the strength of the muscles on the left side of the body.					
Muscle weakness right-sided	Observation only; no clinical signs present	Clinical signs evident on examination; causing some difficulty with performing ADL	Clinical signs evident on examination; severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by a reduction in the strength of the muscles on the right side of the body.					
Myasthenia gravis	–	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by weakness and rapid fatigue of any of the skeletal muscles.					
Myelitis	Asymptomatic or mild signs; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the spinal cord; may be infectious or non-infectious aetiology.					
Oculomotor nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the oculomotor nerve (3rd cranial nerve).					
Olfactory nerve disorder	–	Hyposmia/microsmia	Anosmia	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the olfactory nerve (1st cranial nerve).					
Optic nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the optic nerve (2nd cranial nerve).					
Peripheral neuropathy-motor (including sensorimotor)	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

NEUROLOGY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by damage or dysfunction of peripheral sensory nerves.					
Peripheral neuropathy-sensory	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	—
Definition: A disorder characterized by damage or dysfunction of peripheral motor nerves.					
Personality/behaviour	Change noticed but not adversely affecting patient or family	Change, adversely affecting patient or family	Change is harmful to others or self; affects ADL	—	Complications that result in death or euthanasia
Definition: A change in personality or behaviour regardless of aetiology (structural, functional, etc).					
Proprioceptive deficit	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	—	—
Definition: A deficit in proprioception with or without proprioceptive ataxia.					
Seizure	Single focal seizure	Single generalized seizure; anti-convulsant medication indicated	New onset seizures (focal or generalized); multiple seizures despite medical intervention; hospitalization indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A transient occurrence of signs and/or symptoms due to abnormal excessive or synchronous neuronal activity in the brain.					
Spasticity	Mild increase in muscle tone; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by increased involuntary muscle tone that affects regions interfering with voluntary movement.					
Spinal cord compression	Imaging finding only	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL; intervention indicated	Severe clinical signs, severely restricted in ADL; invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by pressure on the spinal cord.					
Transient ischaemic attack	Neurologic deficit with or without imaging confirmation	Neurological deficit with or without imaging confirmation; limiting ADL	Hospitalization or prolongation of hospitalization indicated	—	—

NEUROLOGY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by a brief attack (<24 h) of brain dysfunction of vascular origin, with no persistent neurological deficits.					
Tremor	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL; intervention indicated	Severe clinical signs, severely restricted in ADL; hyperthermia (use same temp as Grade 3 fever, ie, >104 F)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by the uncontrolled shaking movement of the whole body or individual parts.					
Trigeminal nerve disorder	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	—	—
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the trigeminal nerve (5th cranial nerve).					
Trochlear nerve disorder	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	—	—
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the trigeminal nerve (4th cranial nerve).					
Vagus nerve disorder	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL; intervention indicated	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the vagus nerve (10th cranial nerve); does not include dysfunction of laryngeal nerves.					
Vestibular nerve disorder	Mild signs or symptoms; not interfering with ADL	Moderate clinical signs, causing some difficulty with performing ADL	Severe clinical signs, severely restricted in ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	—
Definition: A disorder characterized by dysfunction of the vestibular component of the vestibulocochlear nerve (8th cranial nerve); clinical manifestations may include head tilt, vestibular ataxia, pathological nystagmus or nausea.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

OCULAR/VISUAL					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Cataract	Asymptomatic, detected on exam only	Symptomatic with moderate decrease in visual acuity	Symptomatic with marked decrease in visual acuity; operative intervention indicated	—	—

OCULAR/VISUAL					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by partial or complete opacity of the crystalline lens of one or both eyes. This results in a decrease in visual acuity and eventual blindness if untreated.					
Conjunctivitis/ocular surface disease	Asymptomatic or minimally symptomatic but not interfering with function	Symptomatic, significant discharge; interfering with function but not ADL; topical antibiotics or other topical intervention indicated	Symptomatic and interfering with ADL; operative intervention indicated	Blindness; enucleation indicated	–
Definition: A disorder characterized by inflammation, swelling and redness to the conjunctiva of the eye.					
Dry eye syndrome	Mild, intervention not indicated	Symptomatic, interfering with function but not ADL; medical intervention indicated	Symptomatic or decrease in visual acuity interfering with ADL	Blindness; enucleation indicated	–
Definition: A disorder characterized by dryness of the cornea and conjunctiva with normal facial nerve function.					
Epiphora	Symptomatic, intervention not indicated	Symptomatic, interfering with function but not ADL	Symptomatic, interfering with ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by excessive watering of the eye.					
Glaucoma	Elevated intraocular pressure (EIOP) with single topical agent for intervention; no visual deficit	EIOP causing early visual field deficit; multiple topical or oral agents indicated	EIOP causing marked visual deficits; operative intervention indicated	EIOP resulting in blindness; enucleation indicated	–
Definition: A disorder characterized by an increase in pressure in the eyeball due to obstruction of the aqueous humour outflow.					
Keratitis (corneal inflammation/corneal ulceration)	Abnormal ophthalmologic changes only; intervention not indicated	Symptomatic and interfering with function, but not ADL	Symptomatic and interfering with ADL; operative intervention indicated	Perforation or blindness, enucleation indicated.	–
Definition: A disorder characterized by inflammation to the cornea of the eye.					
Optic disc oedema (papilledema)	Mild; does not require treatment	Moderate; outpatient treatment required	Severe; inpatient treatment required	Bilateral blindness	–
Definition: A disorder characterized by oedema and swelling of the optic disc.					
Retinal detachment	Exudative; no central vision loss; intervention not indicated	Exudative and some visual acuity loss but intervention not indicated	Rhegmatogenous or exudative detachment; operative intervention indicated	Blindness	–
Definition: A disorder characterized by the separation of the inner retina layers from the underlying pigment epithelium.					
Retinopathy	Asymptomatic	Symptomatic with moderate decrease in visual acuity	Symptomatic with marked decrease in visual acuity; disabling; interfering with ADL	Blindness	–
Definition: A disorder involving the retina.					
Scleral necrosis/melt	Asymptomatic or symptomatic but not interfering with function	Symptomatic, interfering with function but not ADL; moderate decrease in visual acuity; medical intervention indicated	Symptomatic, interfering with ADL; operative intervention indicated	Blindness; painful eye with enucleation indicated	–

OCULAR/VISUAL					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by necrosis of the sclera.					
Uveitis	Asymptomatic	Anterior uveitis; medical intervention indicated	Posterior or pan-uveitis; operative intervention indicated	Blindness	–
Definition: A disorder characterized by inflammation of the uvea of the eye.					
Vitreous haemorrhage	Asymptomatic, clinical findings only	Symptomatic, interfering with function but not ADL; intervention not indicated	Symptomatic, interfering with ADL; intervention indicated	–	–
Definition: A disorder characterized by blood extravasation into the vitreous humour.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

PAIN					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Pain Specify site: _____	Mild pain not interfering with function	Moderate pain; moderately interfering with function or ADL; analgesic therapy indicated	Severe pain; significantly interfering with ADL; multimodal analgesia indicated	Disabling or uncontrollable pain	–
Definition: A disorder characterized by marked discomfort.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

PULMONARY/RESPIRATORY					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Apnea	–	–	Present; medical intervention indicated	Life-threatening respiratory or haemodynamic compromise; intubation or urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by cessation of breathing.					
Aspiration pneumonia	Asymptomatic; radiographic findings	Symptomatic; medical intervention indicated	Clinical or radiographic signs of pneumonia or pneumonitis, hospitalization indicated	Life-threatening respiratory or haemodynamic compromise; intubation or urgent intervention indicated	Death

PULMONARY/RESPIRATORY					
	Grade				
Adverse Event	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by inhalation of solids or liquids into the lungs.					
Bronchospasm, wheezing	Asymptomatic	Symptomatic, not interfering with function	Symptomatic, interfering with function	Life-threatening	Death
Definition: A disorder characterized by a sudden contraction of the smooth muscles of the bronchial wall.					
Cough	Symptomatic, non-narcotic medication only indicated	Symptomatic and narcotic indicated	Symptomatic and interfering with sleep or ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by sudden, often repetitive, spasmodic contraction of the thoracic cavity, resulting in violent release of air from the lungs and usually accompanied by a distinctive sound.					
Dyspnoea	Dyspnoea on exertion, but can walk without tiring	Dyspnoea on exertion and tires upon ambulating	Dyspnoea with ADL	Dyspnoea at rest; intubation/ventilator indicated	Death
Definition: A disorder characterized by discomfort due to difficulty breathing.					
Oedema, larynx	Asymptomatic oedema by exam only	Symptomatic oedema, no respiratory distress	Stridor; respiratory distress; interfering with ADL	Life-threatening; tracheotomy, intubation, indicated	Death
Definition: A disorder characterized by swelling due to an excessive accumulation of fluid in the larynx.					
Hypoxia	–	<O ₂ saturation with exercise	<O ₂ saturation at rest; continuous O ₂ supplementation required	Life-threatening; intubation or ventilation required	Death
Definition: A disorder characterized by a decrease in the level of oxygen in the body.					
Laryngeal collapse	Everted laryngeal sacculles or oedematous mucosa narrowing the laryngeal lumen	Medial collapse of cuneiform processes; impaired cuneiform abduction	Medial or ventral collapse of cuneiform and corniculate processes; paradoxical laryngeal motion	Life-threatening airway obstruction; urgent intervention indicated	Death
Definition: Pathologic distortion of laryngeal anatomy and function secondary to chronic inspiratory pressure.					
Pneumonitis/pulmonary infiltrates	Asymptomatic, radiographic findings only	Symptomatic, not interfering with ADL	Symptomatic, interfering with ADL; O ₂ indicated	Life-threatening; ventilatory support indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation focally or diffusely affecting the lung parenchyma.					
Pulmonary oedema	Radiologic findings only; minimal dyspnoea on exertion	Moderate dyspnoea on exertion; medical intervention indicated	Severe dyspnoea or dyspnoea at rest; oxygen indicated; limiting ADL	Life-threatening respiratory compromise; urgent intervention or intubation with ventilatory support indicated	Death
Definition: A disorder characterized by accumulation of fluid in the lung tissues that causes a disturbance of the gas exchange that may lead to respiratory failure.					
Pulmonary fibrosis	Minimal, estimated lung volume involved <25%	Patchy or bilateral changes with estimated lung volume 25-<50%	Dense or widespread infiltrates/consolidation with estimated involved lung volume ≥50%-75%	Estimated involved lung volume >75%	Death
Definition: A disorder characterized by the replacement of the lung tissue by connective tissue, leading to progressive dyspnoea, respiratory failure, pulmonary hypertension and right heart failure.					
Respiratory distress syndrome (ARDS)	–	–	Present, intubation not indicated	Present, intubation indicated	Death

PULMONARY/RESPIRATORY					
	Grade				
Adverse Event	1	2	3	4	5
Definition: A disorder characterized by progressive and life-threatening pulmonary distress in the absence of an underlying pulmonary condition, usually following major trauma or surgery.					
Tachypnoea (not panting)	Respiratory rate up to 60 bpm	>60 bpm; increased abdominal effort	O ₂ indicated	Life-threatening; ventilatory support indicated	Death
Definition: A disorder characterized by abnormally rapid breathing.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

RENAL/GENITOURINARY					
	Grade				
Adverse Event	1	2	3	4	5
Acute kidney injury (Modified International Renal Interest Society [IRIS] grade)	Creatinine ≤1.6 mg/dL (140 µmol/L) with increase of ≥0.3 mg/dL from baseline	Creatinine 1.7-2.5 mg/dL (141-220 µmol/L); fluid responsive oliguria/anuria within 48 h.	Creatinine 2.6-5.0 mg/dL (221-439 µmol/L); fluid therapy (IV or SC) and/or renal diet indicated	>5.1 (440 µmol/L); renal replacement therapy (RRT) indicated	Death
Definition: A disorder characterized by the acute renal parenchymal injury loss of renal function and is traditionally classified as pre-renal (low blood flow into kidney), renal (kidney damage) and post-renal causes (ureteral or bladder outflow obstruction).					
Chronic kidney disease (International Renal Interest Society [IRIS] stage)	Asymptomatic; blood creatinine persistently increasing with in RR and/or SDMA as below OR SDMA persistently >14 µg/dL	Mild clinical signs, blood creatinine and/or SDMA as below:	Transitional clinical signs, SC or enteral fluid therapy indicated; blood creatinine and/or SDMA as below	Uremic; life-sustaining measures required; blood creatinine and/or SDMA as below	Death
Canine USG <1.030	<1.4 mg/dL (<125 µmol/L); SDMA <18 µg/dL	1.4-2.8 mg/dL (125-250 µmol/L); SDMA 18-35 µg/dL	2.9-5.0 mg/dL (251-440 µmol/L); SDMA 36-54 µg/dL	>5.0 mg/dL (>440 µmol/L); SDMA >54 µg/dL	–
Feline USG <1.035	<1.6 mg/dL (<140 µmol/L); SDMA <18 µg/dL	1.6-2.8 mg/dL (140-250 µmol/L); SDMA 18-25 µg/dL	2.9-5.0 mg/dL (251-440 µmol/L); SDMA 26-38 µg/dL	>5.0 mg/dL (>440 µmol/L); SDMA >38 µg/dL	–
Definition: A disorder characterized by gradual and usually permanent loss of kidney function resulting in renal failure.					
Cystitis (haematuria/pyuria included)	Asymptomatic; microscopic haematuria/pyuria, not requiring attributed drug discontinuation	Symptomatic; transient macroscopic haematuria; pain or antispasmodic medication indicated	Transfusion indicated; pain or antispasmodic medication; bladder irrigation indicated; requiring attributed drug discontinuation	Catastrophic bleeding; non-elective intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation of the bladder which is not caused by an infection of the urinary tract.					
Glucosuria	Present but transient (<2 weeks)	Prolonged (>2 weeks)	–	–	–

Definition: A disorder characterized by the excretion of glucose in the urine.					
Haemoglobinuria	Present	–	–	–	–
Incontinence, urinary	Occasional (eg, with coughing, sneezing, etc)	Spontaneous	Interfering with ADL; medical intervention indicated	Operative intervention indicated	Complications that result in euthanasia
Definition: A disorder characterized by insufficient voluntary control over urination					
Obstruction, urinary	Asymptomatic; radiographic or endoscopic finding	Symptomatic without hydronephrosis or renal dysfunction; urinary catheter placement indicated	Symptomatic, altered organ function; hydronephrosis; operative intervention indicated	Life-threatening; organ failure	Death
Definition: A disorder characterized by blockage of the normal flow of contents of the urinary tract.					
Ureteral obstruction	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Partial obstruction; mild pyelectasia or ureteral dilation; medical management indicated	Symptomatic; moderate to severe pyelectasia or ureteral dilation; invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: a mechanical or functional blockage of urine flow affecting one or both ureters or ureterovesicular junctions.					
Urethral obstruction	–	Partial or intermittent obstruction; medical management, indicated	Hospitalization, invasive intervention indicated (eg, indwelling catheterization, surgery, cystoscopy, voiding hydropropulsion, lithotripsy)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A mechanical or functional blockage of urine flow at the level of the urethra.					
Proteinuria	Urine protein/creatinine ratio 0.2-0.5 for dogs or 0.2-0.4 for cats	Urine protein/creatinine ratio > 0.5 for dogs or > 0.4 for cats but transient (<14 days in duration)	Urine protein/creatinine ratio >0.5 for dogs or >0.4 for cats and prolonged ≥14 days duration)	–	–
Definition: A disorder characterized by laboratory test results that indicate the presence of excessive protein in the urine. It is predominantly albumin, but also globulin.					
Polyuria	–	Present; >50 mL/kg/day; not interfering with ADL	Present; >50 mL/kg/day; interfering with ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by production of abnormally large volumes of dilute urine.					
Pollakiuria	Pet asks to be let out more frequently but <6 times/day; any change in frequency that lasts ≤2 days.	Pet asks to be let out 6-10 times/day; any change in frequency that lasts 2-5 days	Pet asks to be let out >10 times/day; any change in frequency that lasts >5 days; interfering with ADL	–	–
Definition: A disorder characterized by frequent daytime urination.					
Pyometra	–	Metritis or open pyometra without fever; medical management indicated	Open or closed pyometra with fever; IV antimicrobial, operative intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: purulent inflammation of the uterus caused by bacteria or other microbes.					
Stranguria	Minimal straining, attempts to urinate 1-3 times at a urination event, slightly reduced stream, signs persist up to 2 days	Moderate straining, attempts to urinate >3 times at a urination event, moderately reduced stream, signs persist 2-5 days; treatment indicated	Excessive straining, makes repeated attempts to urinate, severely reduced urine stream, signs persist >5 days; medical or surgical intervention required.	Life-threatening, urinary obstruction and post-renal failure result.	–
Definition: A disorder characterized by frequent daytime urination.					
Urinary output—diminished	–	Mild oliguria: <1.0 mL/kg/h in a well hydrated and well perfused patient, responsive to medical diuresis	Oliguria: <0.5 mL/kg/h in a well hydrated and well perfused patient, resistant to medical diuresis	Anuria: absence of urine production	Death
Definition: A disorder characterized by diminished production of urine.					
Urinary retention (including neurogenic bladder)	Hesitancy or dribbling, no significant residual volume	Bladder atony requiring transient indwelling catheter <72 h	Bladder atony requiring indwelling catheter ≥72 h; operative intervention indicated	Life-threatening consequences; organ failure	Death
Definition: A disorder characterized by accumulation of urine within the bladder because of the inability to urinate.					
Urinary tract infection	Asymptomatic diagnostic finding; intervention not indicated	Symptomatic; oral antimicrobial intervention indicated	IV antimicrobial intervention indicated; invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: inflammation of the kidney, ureter, bladder or urethra caused by bacteria or other microbes.					
Urine colour change	Present	–	–	–	–
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
NEOPLASMS BENIGN, MALIGNANT AND UNSPECIFIED (incl cysts and polyps)					
	Grade				
Adverse Event	1	2	3	4	5
Leukaemia secondary to oncology chemotherapy	–	–	–	Present	Death
Definition: A disorder characterized by leukaemia arising as a result of the mutagenic effect of chemotherapy agents.					
Myelodysplastic syndrome	–	–	–	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by insufficiently healthy haematopoietic cell production by the bone marrow.					
Treatment related secondary malignancy (Specify, _____)	–	–	Non-life-threatening benign tumour or malignancy	Acute life-threatening secondary malignancy; blast crisis in leukaemia	Death
Definition: A disorder characterized by development of a malignancy most probably as a result of treatment for a previously existing malignancy.					
Neoplasms benign, malignant and unspecified (including cysts and polyps) Other (specify, _____)	Clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated;	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Other (specify, _____)					Death

NEOPLASMS BENIGN, MALIGNANT AND UNSPECIFIED (incl cysts and polyps)					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	
SEXUAL/REPRODUCTIVE FUNCTION					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Foetal death	–	–	–	–	Foetal loss at any gestational age
Definition: A disorder characterized by death in utero; failure of the product of conception to show evidence of respiration, heartbeat or definite movement of a voluntary muscle after expulsion from the uterus, without possibility of resuscitation.					
Gynecomastia	Mammary gland enlargement without clinical effect on patient	Mammary gland enlargement with clinical effect on patient	–	–	–
Definition: A disorder characterized by excessive development of the mammary tissue in males.					
Infertility/sterility	–	Male: oligospermia/low sperm count Female: diminished fertility/oestrous	Male: sterile/azoospermia Female: infertile/aneutrous	–	–
Definition: A disorder characterized by inability to reproduce.					
Mammary gland function/lactation	Mammary abnormality, not functionally significant	Mammary abnormality, functionally significant	–	–	–
Definition: A disorder characterized by disturbances in milk production or secretion.					
Vaginal discharge (non-infectious)	Mild	Moderate to heavy	–	–	–
Definition: A disorder characterized by excess vaginal secretions.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
SURGICAL: ANAESTHETIC COMPLICATIONS					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Iatrogenic injury due to anaesthetic procedures	No intervention required; without further consequences for the patient	Intervention required; without further consequences for the patient	Intervention required; further non-life-threatening consequences for the patient	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: Injury to tissues or organs caused by placement or malfunction of anaesthetic equipment or devices, including endotracheal tubes, locoregional analgesic delivery systems and anaesthetic monitoring equipment, whether due to operator error or not.					
Hypotension (anaesthetized patient)	Observation only; intervention not indicated	Non-urgent medical intervention indicated	Moderate, sustained; medical intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A blood pressure that is below the normal expected level for an anaesthetized patient.					
Hypertension (anaesthetized patient)	Observation only; intervention not indicated	Non-urgent medical intervention indicated	Moderate, sustained; medical intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A blood pressure that is above the normal expected level for an anaesthetized patient.					
Hypoxemia (anaesthetized patient)	–	Transient, responsive to mechanical ventilation or inspired oxygen	Sustained, moderate to severe; intervention indicated (eg, PEEP, reintubation, thoracocentesis)	Life-threatening, urgent intervention indicated	Death
Definition: Lower than normal partial pressure of oxygen (PaO ₂ < 60 mm Hg) in the blood of an anaesthetized patient.					
Hypercapnia (anaesthetized patient)	–	Transient, responsive to mechanical ventilation or changing carbon dioxide absorbent	Sustained, moderate to severe; intervention indicated (eg, PEEP, reintubation, thoracocentesis)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: Higher than normal partial pressure of carbon dioxide (PaCO ₂ > 45 mm Hg) in the blood of an anaesthetized patient.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
SURGICAL: INTRA-OPERATIVE COMPLICATIONS					
Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Intra-operative		Incidents managed with change in operative tactics but without further consequences,			Death

SURGICAL: INTRA-OPERATIVE COMPLICATIONS

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
soft tissue injury	Incidents managed with minimal change in operative tactics and without further consequence	for example, primary repair of injured structure	Incidents with further non-life-threatening consequences, for example, resection or reconstruction of injured structure	Incidents with further life-threatening consequences; urgent intervention indicated	
Definition: Injury to soft tissues adjacent or adherent to the intended operative site.					
Incorrect implant placement	Suboptimal placement or positioning that does not substantially impair implant function or result in revision	Suboptimal placement or positioning that results in intra-operative revision or reduced implant function	Incidents with further non-life-threatening consequences; requiring invasive action such as reoperation, endoscopy, etc	Incidents with life-threatening consequences or resulting in major functional impairment	Death
Definition: Surgical introduction of implantable materials in a manner or position inconsistent with the ideal/intended operative plan.					
Intra-operative fracture or bone injury	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Immobilization or other non-operative intervention indicated	Operative intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: Traumatic injury to the bone during surgery in which the continuity of the bone is broken; includes errors in drilling.					
Intra-operative technical or equipment failure	Incidents managed with minimal change in operative tactics and without further consequences for the patient	Incidents managed with changes in operative tactics but without further consequences for the patient	Incidents with further non-life-threatening consequences for the patient	Incidents with further life-threatening consequences for the patient; urgent intervention indicated	Death
Definition: Malfunction of operative equipment, instruments or implantable materials, whether due to operator error or not.					
Tumour capsular disruption	Incidents resulting in minor disruption; minimal contamination of surrounding tissues	Incidents resulting in moderate to severe disruption; gross contamination of surrounding tissues	–	–	–
Definition: Loss of integrity of anatomic barrier structures containing tumour tissues, due to surgical manipulation.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

SURGICAL: POST-OPERATIVE COMPLICATIONS

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Adhesions	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Symptomatic; medical management indicated	Symptomatic; invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

SURGICAL: POST-OPERATIVE COMPLICATIONS

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: An abnormal union of tissues or organs due to inflammation or injury.					
Dental malocclusion	Observation only; no intervention indicated	Local irritation requiring topical care/ lifestyle change	Surgical (tooth extraction) or orthodontic intervention indicated	–	–
Definition: Abnormal alignment of the teeth.					
Implant complications	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Cage-side or non-invasive management indicated, including antibiotics	Invasive intervention indicated to remove, revise or replace implant	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A functional or positional problem with an indwelling medical device or material, such as migration, dislodgement, functional impairment, infection or breakage.					
Mandibular drift	Observation only; no intervention indicated	Local irritation requiring topical care or lifestyle change	Surgical (tooth extraction) or orthodontic intervention indicated	–	–
Definition: Movement of the mandible relative to the maxilla over time, such that the mandible becomes misaligned with the maxilla.					
Oronasal fistula	Observation only; no intervention required	Medical/lifestyle changes indicated (change in diet consistency, outpatient antibiotics to treat bacterial rhinitis/aspiration pneumonia etc)	Surgical intervention indicated; aspiration pneumonia requiring in-hospital management that is, O ₂ , IV antibiotics	–	Death
Definition: Development of a communication between the oral and nasal cavities.					
Prehension difficulties	Occasional dropping of food noted but not interfering with ADL	Change in oral diet type or consistency required; transient weight loss	Transient tube feeding required; supplemental tube feeding required to maintain body weight	Oral intake largely impossible; complete tube feeding required to maintain body weight	Death
Definition: Difficulty in picking up food by mouth, or difficulty in holding food inside the oral cavity.					
Residual flow through an attenuated vessel	Negligible residual flow without clinical consequences; intervention not indicated	Mild residual flow with possible clinical consequences; serial monitoring or medical management indicated	Moderate residual flow with likely clinical consequences; reattenuation indicated if feasible	Complete or near-complete failure of attenuation; life-threatening consequences possible; reattenuation indicated if feasible	–
Definition: Ongoing post-procedural blood flow through a vascular structure deliberately targeted for therapeutic attenuation (such as by surgical placement of ligatures or other attenuating devices, or via intravascular introduction of occlusive materials).					
Surgical site stenosis or stricture	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Symptomatic; medical management or change in lifestyle (eg, diet, exercise) indicated	Symptomatic; invasive intervention indicated (eg, stent, surgery, luminal dilation, tube feeding)	Life-threatening consequences including obstruction, airway compromise; urgent intervention indicated	Death
Definition: Narrowing of a surgically repaired mucosal structure, stoma or anastomosis.					
Visceral perforation	Clinical or diagnostic observation only; intervention not indicated	Symptomatic; medical management indicated	Symptomatic; invasive intervention indicated (eg, stent, surgical repair, diversion or excision)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

SURGICAL: POST-OPERATIVE COMPLICATIONS

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Definition: Loss of integrity of the wall of hollow viscus (eg, trachea, oesophagus, stomach, intestine, rectum, uterus, ureter, urinary bladder, gall bladder) due to direct trauma or ischaemia and necrosis; at an anatomic site not directly involving a surgical repair or incision.					
Wound complication	Observation only; topical intervention indicated	Local care indicated	Operative intervention indicated	Life-threatening consequences	Death
Definition: Development of a new problem at the site of an existing wound; complications that do not meet criteria for wound infection or wound dehiscence.					
Wound dehiscence or anastomotic leakage; biliary	Asymptomatic diagnostic finding; intervention not indicated	Symptomatic; medical intervention indicated	Symptomatic; invasive intervention indicated, (eg, surgical repair, cholecystostomy)	Life threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death
Definition: Bile leakage at the site of previous surgical intervention involving the liver, bile ducts or gall bladder.					
Wound dehiscence or anastomotic leakage; enteric	Asymptomatic diagnostic finding; intervention not indicated	Symptomatic; medical intervention indicated	Symptomatic; invasive intervention indicated	Life threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death
Definition: Enteric leakage at the site of previous surgical intervention involving oesophagus, stomach, intestine or rectum.					
Wound dehiscence or anastomotic leakage; urinary tract	Asymptomatic diagnostic finding; intervention not indicated	Symptomatic; medical intervention indicated, including retrograde placement of indwelling urinary catheter	Symptomatic; Invasive intervention indicated (eg, surgical repair, stent, cystoscopy, cystostomy, nephrostomy or peritoneal drainage catheters)	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death
Definition: Urine leakage at the site of previous surgical intervention involving the kidney, ureter, urinary bladder, prostate or urethra.					
Wound dehiscence; not otherwise specified	Incisional separation, intervention not indicated	Incisional separation managed with local care (cage side suturing or bandaging) or medical intervention	Fascial disruption or dehiscence without evisceration; revision by operative intervention indicated	Life-threatening consequences; symptomatic hernia, evisceration, major reconstruction, resection or amputation indicated	Death
Definition: Separation of the approximated margins of a surgical wound; excludes surgically created wounds specifically categorized as enteric, biliary or urinary tract dehiscence.					
Wound infection	Localized, local intervention indicated	Oral antimicrobial intervention indicated	IV antimicrobial intervention indicated; invasive intervention indicated (eg, debridement, drainage, repair)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: An infectious process involving a traumatic or surgically created wound.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

VASCULAR

Adverse Event	Grade				
	1	2	3	4	5
Capillary leak syndrome	Asymptomatic	Symptomatic; medical intervention indicated	Respiratory compromise or pressor support	Life-threatening; ventilatory support indicated	Death
Definition: A disorder characterized by leakage of intravascular fluids into the extravascular space. This syndrome is observed in patients who demonstrate a state of generalized leaky capillaries following shock syndromes, low-flow states, ischaemia-reperfusion injuries, toxemias, medications or poisoning. It can lead to generalized oedema and multiple organ failure.					
Lymph leakage/lymphedema	Asymptomatic	Symptomatic; medical intervention indicated	Severe symptoms; radiologic, endoscopic or elective operative intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Definition: A disorder characterized by the loss of lymph fluid into the surrounding tissue or body cavity.					
Peripheral arterial ischaemia	–	Brief (<24 h) episode of ischaemia managed non-surgically and without permanent deficit	Recurring or prolonged (>24 h) and/or invasive intervention indicated	Life-threatening, disabling and/or associated with end-organ damage (eg, limb loss)	Death
Definition: A disorder characterized by impaired circulation to an extremity.					
Phlebitis	–	Present	–	–	–
Definition: A disorder characterized by inflammation of the wall of a vein.					
Thrombosis/thrombus/embolism	–	Deep vein thrombosis or cardiac thrombosis; intervention not indicated	Deep vein thrombosis or cardiac thrombosis; intervention indicated (eg, anticoagulation, lysis, invasive procedure)	Embolitic event including pulmonary embolism or life-threatening thrombus	Death
Definition: A disorder characterized by occlusion of a vessel by a thrombus that has migrated from a distal site via the blood stream.					
Vasculitis (not including perivascular injection of drug)	Mild, intervention not indicated	Non-steroidal medical intervention indicated	Steroids indicated	Ischaemic changes; amputation or surgical debridement indicated	Death
Definition: A disorder characterized by inflammation involving the wall of a vessel.					
Ischaemia	–	Brief (<24 h) episode of ischaemia managed medically and without permanent deficit	Prolonged (>24 h) or recurring clinical signs and/or invasive intervention indicated	Life-threatening; disabling; evidence of end-organ damage	Death
A disorder characterized by impaired circulation to an extremity or body tissue/organ.					
Other (specify, _____)	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate; minimal, local or non-invasive intervention indicated; limiting age appropriate ADL	Severe or medically significant but not immediately life-threatening; hospitalization or prolongation of existing hospitalization indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

Annexe 2 : Production de la L-asparaginase par les étudiants ingénieurs



Production de L-Asparaginase par deux systèmes d'expression, *Escherichia coli* Lemo21 (DE3) et des cellules HEK293, dans le cadre du traitement du lymphome canin : clonage, expression et caractérisation

Bousquet Camille, Bousquet Colline, Deleau Clara, Duval Clara, Fautré Estelle, Garcia Julie, Grattard Marie, Juge Alexandre, Le Corre Enora, Lévêque Morgane, Mosnier Alizée, Normand Flavien, Ory Céleste, Vittoz Maëlle, Haddad Nabila, Khalil Ali, Masson Edouard, Mosser Mathilde, Tareb Raouf

Unité MicrobioTech, Département BPSA, site de la Géraudière Oniris, Rue de la Géraudière, CS82225, 44322 Nantes
Juin 2022

Résumé

La L-Asparaginase est une enzyme qui catalyse la conversion de la L-Asparagine en L-Aspartate et ammoniac. Cette molécule est utilisée en médecine vétérinaire pour traiter le lymphome canin. Actuellement, la L-Asparaginase commerciale est produite via un système d'expression bactérien. Son utilisation est limitée par des problèmes de stabilité, d'efficacité et principalement d'immunogénicité. Dans le présent travail, nous rapportons la production de cette enzyme via deux systèmes d'expression. Un premier système exprime le gène bactérien d'*Escherichia coli* dans une souche *E. coli* Lemo21 (DE3), et un second exprime le gène de *Canis lupus familiaris* dans le système eucaryote HEK293. Cette étude a pour but de comparer l'efficacité, l'immunogénicité, ainsi que l'activité de cette enzyme à travers ces deux systèmes d'expression distincts.

Mots-clés : L-Asparaginase, lymphome, efficacité, immunogénicité, activité, canin

Introduction

Le lymphome est un cancer des cellules du système immunitaire : les lymphocytes. La grande majorité des lymphomes affecte les cellules B (90%), cependant ils peuvent également toucher les cellules T. Ces derniers peuvent être classifiés en deux catégories : les lymphomes Hodgkin (10%) et les non-Hodgkin (90%)¹.

En médecine vétérinaire, le lymphome est très majoritairement diagnostiqué chez les animaux de compagnie, et en particulier chez le chien. Sa prévalence est estimée à 20-100 cas pour 100 000 chiens, ce qui est comparable à celle du lymphome non-Hodgkin chez l'Homme². Au niveau

thérapeutique, le lymphome canin se traite quasiment exclusivement par chimiothérapie. Plusieurs protocoles sont décrits dans la littérature, proposant des thérapies utilisant des combinaisons d'enzymes³.

Parmi elles, se trouve la L-Asparaginase. Cette protéine catalyse l'hydrolyse d'un acide aminé, l'asparagine, en aspartate et ammoniac. Bien que non essentiel, cet acide aminé a un rôle important dans la croissance et la prolifération des cellules. Contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses ne possèdent pas l'asparagine synthétase. De ce fait, elles dépendent uniquement de ressources exogènes de cet acide aminé pour survivre⁴. L'utilisation de la L-Asparaginase dans des traitements anticancéreux permettrait de réduire la

concentration en asparagine circulante, de limiter leur apport et, par conséquent, la croissance des cellules cancéreuses ^{5,6}.

De nombreuses études ont pu mettre en lumière les effets bénéfiques de la L-Asparaginase, notamment dans le traitement des leucémies chez l'être humain ⁷. Ses propriétés anti-cancéreuses sont aussi très largement abordées dans le cadre du lymphome canin ².

A ce jour, la L-Asparaginase conçue à usage thérapeutique est principalement produite via deux systèmes d'expression : *Erwinia chrysanthemi* et *Escherichia coli*. Néanmoins, ces systèmes d'expression étant procaryotes, aucune modification post-traductionnelle n'est effectuée ⁸. Par ailleurs, en plus de réaliser une séquestration de l'enzyme sous forme de corps d'inclusion, le système de production procaryote laisse sur la protéine d'intérêt des résidus bactériens. Ces paramètres peuvent influencer sur l'immunogénicité de la L-Asparaginase recombinante, en conduisant à des réactions d'hypersensibilité, des allergies, voire des chocs anaphylactiques. De même, l'activité et l'efficacité de l'enzyme peuvent être impactées. Son utilisation suscite alors des interrogations quant aux risques pris par le patient et à l'efficacité des techniques de production ⁹.

L'étude menée à Oniris a pour objectif de développer une méthode de production innovante, permettant d'obtenir de la L-Asparaginase moins immunogène que celles produites par un système procaryote. Ainsi, l'équipe s'est tournée vers un

système d'expression eucaryote en utilisant des cellules HEK293. Ce système d'expression sera comparé à une stratégie de production similaire à celle du marché et conduite en parallèle, utilisant un système d'expression bactérien : *E. coli Lemo21* (DE3).

Matériels et Méthodes

Préparation de la L-Asparaginase commerciale

La L-Asparaginase utilisée a été commandée sur le site Merck A3809-100 UN. Cette enzyme est produite par un système *E. coli*, solubilisée dans 90 mL d'eau ultra pure de concentration 2 UI/mL.

Vecteurs d'expression

Les vecteurs d'expression utilisés ont été créés et produits par GenScript (Fig. 1A). Pour la production en système bactérien, la base plasmidique est le pET22b(+) auquel s'ajoutent un gène de résistance à l'ampicilline, une séquence d'adressage dans le périplasma, un Tag (His-Tag), le site de clivage de l'entérokinase associé et le gène d'intérêt. Pour la production en système eucaryote, c'est le vecteur navette pcDNA 3.1 qui a été choisi. Il contient deux origines de réplication, deux gènes de résistance à l'ampicilline et néomycine. Le gène codant la L-Asparaginase de *Canis lupus familiaris* est introduit précédé d'un promoteur CMV et suivi d'un site de clivage et d'un Tag histidine (Fig. 1B). Une partie de ce plasmide sert à la transfection de cellules dès sa réception tandis qu'une autre est amplifiée dans l'organisme bactérien *E. coli* NEB5 α transformé.

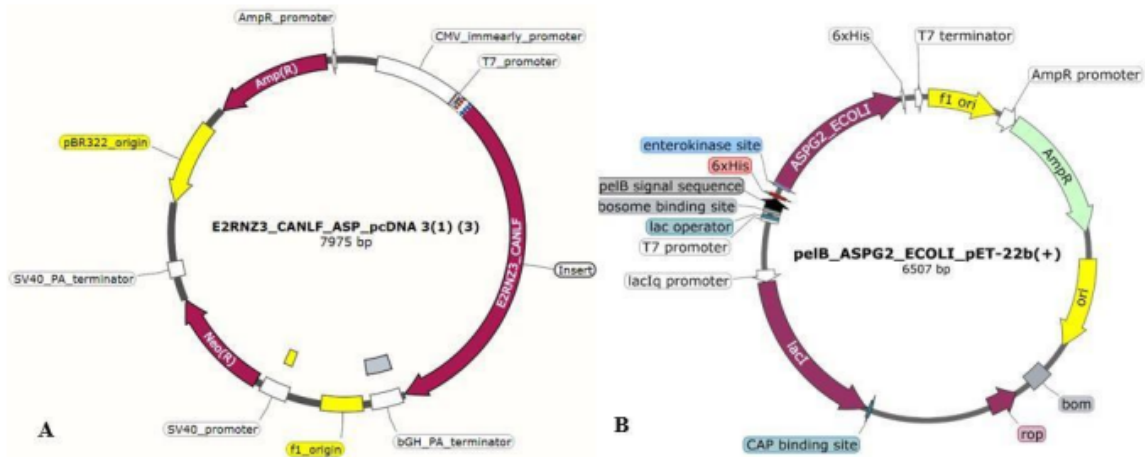


Figure 1 : Carte des vecteurs d'expression canin (A) et bactérien (B) synthétisés par GenScript

Systèmes d'expression

Les systèmes procaryotes peuvent inclure des protéines recombinantes dans des corps d'inclusions, et donc éventuellement impacter l'activité et l'efficacité de la protéine d'intérêt. Ici, la production s'est faite à partir de *Escherichia coli* Lemo21 (DE3) dont la production de la protéine recombinante peut être régulée par l'ajout de L-Rhamnose dans le milieu de culture, et dont l'activité des protéases a été réprimée génétiquement. Le système d'expression eucaryote HEK293 exprime le gène d'intérêt dans son cytoplasme ce qui augmente le risque de protéolyse et pousse à utiliser des inhibiteurs de protéases.

Transformation/Transfection

La transformation des *E. coli* Lemo21 (DE3) a été réalisée selon le mode opératoire du fournisseur (NEB). La transfection des HEK293 a été réalisée selon le mode opératoire du fournisseur (ThermoFisher). Après transfection, les HEK293 sont incubées à 37°C et 8% de CO₂ pendant trois jours, ce qui correspond à la période d'expression transitoire de la L-Asparaginase.

Conditions de culture

Les *E. coli* Lemo21 (DE3) ont été cultivées dans du milieu LB avec de l'ampicilline à 100 µg/mL et du chloramphénicol à 30 µg/mL (particularité de la souche choisie). Afin d'optimiser la production de la protéine d'intérêt, six cultures différentes de 250 mL ont été réalisées avec des concentrations croissantes en L-Rhamnose ainsi que des températures différentes après induction à l'IPTG (400 µM). Les conditions testées sont les suivantes : 0 µM à 37°C, 0 µM à 37°C puis 22-25°C après induction, 50µM à 37°C, 100 µM à 37°C, 250 µM à 37°C et 500 µM à 37°C. Toutes ces cultures ont été agitées à 250 rpm. La durée de culture après induction est de trois heures pour les cultures à 37°C et seize heures pour la culture à 22-25°C. Deux témoins ont également été mis en culture, il s'agit de *E. coli* Lemo21 sans le plasmide recombinant (0 µM à 37°C et 0 µM à 37°C puis 22-25°C). Le choix de la condition de culture optimale est réalisé à la suite d'un Western Blot utilisant des anticorps anti-His-Tag.

Les HEK293 ont été cultivées dans du milieu Expi293 (ThermoFischer, A14635) dans des

erlenmeyer de 125 mL et 250 mL, correspondant à des volumes de culture de 25 mL et 50 mL respectivement. Les HEK293 ont été repiquées toutes les 48 heures, soit 5 repiquages sur neuf jours.

Purification

Lyse

Les HEK293 ont été récoltées après expression transitoire. Les cultures bactériennes ont été centrifugées et les surnageants ont été éliminés pour ne garder que les culots cellulaires. Le culot cellulaire eucaryote a été resuspendu dans du tampon de lyse (500 mM NaCl, 20 mM Na₃PO₄)¹⁰, auquel des inhibiteurs de protéase ont été ajoutés. Les cellules lysées ont été congelées à -20°C. Après 24 heures de congélation, une sonication a été effectuée sur les cellules bactériennes et eucaryotes (5 fois 15 secondes avec 10 secondes de pause entre chaque rafale). L'entièreté de la manipulation a été effectuée sur glace. Le surnageant a été récupéré après centrifugation pour purification.

Chromatographie d'affinité

Les chromatographies d'affinité (CA) ont été effectuées à l'aide de l'appareil ÄKTAPrime plus et une colonne HisTrap FF® (Merck, GE-17-5319-01). Quatre étapes ont été réalisées successivement¹¹ : un rinçage de l'appareil et de la colonne avec de l'eau déminéralisée, une mise sous tampon (tampon de liaison à 500 mM NaCl, 20 mM Na₃PO₄, 20 mM imidazole et tampon d'élution à 500 mM NaCl, 20 mM Na₃PO₄, 500 mM imidazole¹⁰) suivi d'une équilibration de l'appareil et de la colonne, l'introduction de l'échantillon contenant la L-Asparaginase produite, et enfin l'élution avec le tampon d'élution. Le débit a été fixé à 1 mL/min pour chaque étape. Les chromatogrammes ont été visualisés à l'aide du logiciel PrimeView.

Dessalage

Après chaque étape de purification, une étape de dessalage avec des colonnes de dessalage PD-10® 17085101 à été conduite sur les échantillons obtenus (1000 g pendant 2 minutes à 20°C).

Clivage

Les clivages ont été effectués avec le kit Recombinant Enterokinase® (Merck, 69066-3). Trois étapes ont été réalisées successivement¹⁴ : la dilution de l'entérokinase recombinante avec le tampon de stockage présent dans le kit, l'introduction de l'entérokinase diluée dans l'échantillon à cliver (tampon de clivage 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 7.4) et l'incubation

pendant 16 heures à 20°C. Seule une faible fraction des protéines produites a été clivée au vu de la quantité d'entérokinase incluse dans le kit.

Chromatographie échangeuse d'ions

Les chromatographies échangeuse d'ions (CEI) ont été effectuées sur l'appareil AKTA 18110856 avec une résine échangeuse d'anion forte HiTrap QFF® (Merck, GE-17-5053-01). Elle s'est organisée en quatre étapes : le rinçage à l'éthanol 20% et à l'eau pure, le lavage avec une solution tampon (Tris 20mM HCl, pH 7,4), l'injection de l'échantillon contenant la L-Asparaginase produite et l'éluion avec une solution tampon (Tris 20mM HCl, pH 7,4, NaCl 1M). Le débit des quatre étapes a été fixé à 1 mL/min. Les programmes ont été codés sur le logiciel UNICORE.

Concentration

Les échantillons élués ont été récupérés et concentrés par une méthode de centrifugation à l'Amicon Ultra-15® (UFC, 901024). Cette méthode permet d'obtenir une solution avec une concentration en protéine plus importante et une

concentration en NaCl plus faible que dans l'échantillon initial (4000 g pendant 25 minutes à 15°C).

Caractérisation

Test d'activité

Les tests d'activité ont été réalisés avec le kit Asparaginase Activity Assay Kit® (Sigma-Aldrich, MAK007). Ce test mesure l'activité de la L-Asparaginase en dosant la synthèse d'aspartate au cours du temps dans les échantillons. A partir d'une gamme d'étalonnage, la mesure des absorbances des échantillons toutes les 5 minutes avec le lecteur de microplaque ELx800 permet de calculer une activité en nmol/min/mL d'aspartate produite. La lecture est effectuée à 570 nm et la plaque est conservée dans le noir entre chaque mesure.

Test d'efficacité

Les cellules CLBL-1 ont été cultivées dans du milieu RPMI (10% SVF, 2mM glutamine, 1% antibiotique) et repiquées tous les deux jours en flask T75, soit 5 repiquages sur neuf jours. 10⁶ cellules/mL ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits et confrontées

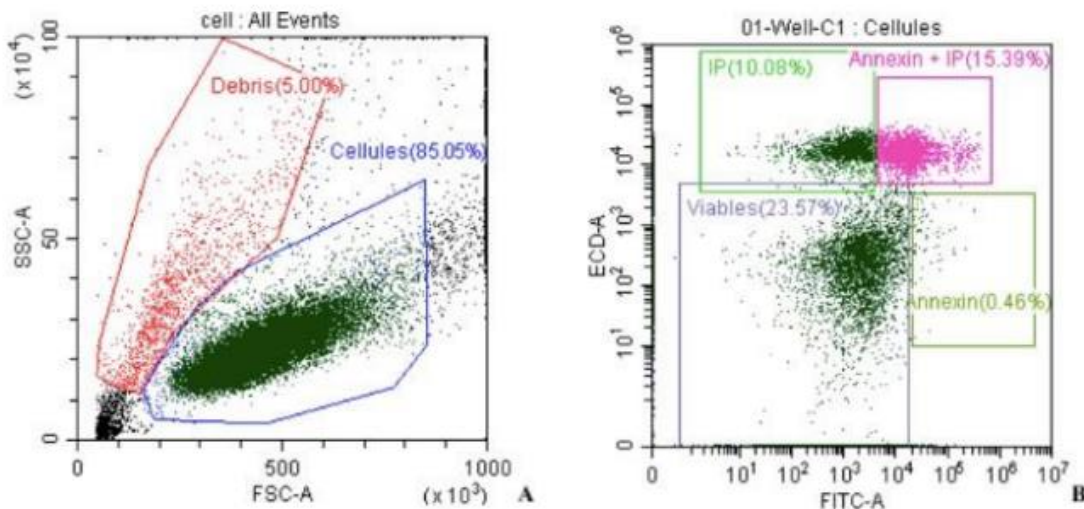


Figure 2 : Observation au Cytoflex Beckman de la morphologie de cellules CLBL-1 à 10⁶ cellules/mL non marquées (A) et marquées (B)

A : Définition de deux gates : débris cellulaires (événements FSC faible et/ou SSC élevé) et cellules (événements FSC élevé et SSC faible, nuage homogène).

B : L'échelle FITC correspond à l'Annexine. L'échelle ECD correspond à l'Iodure de Propidium (IP). Définition de quatre gates. Gate 1 : Événements avec FITC élevé et ECD faible, cellules marquées Annexine + (gate 1). Gate 2 : Événements avec FITC faible et EDC élevé, cellules marquées IP+. Gate 3 : Événements avec FITC et EDC élevés, cellules marquées Annexine et IP. Gate 4 : Événements avec FITC et ETC faibles, cellules viables. Les cellules marquées à l'Annexine correspondent à l'apoptose précoce. Les cellules imprégnées d'Annexine et d'IP correspondent à l'apoptose tardive.

à : de la saponine 2 mg/mL, de la L-Asparaginase (A3809-100 UN) à 0,05 UI, 0,005 UI, 0,0025 UI et $<10^{-3}$ UI, de la L-Asparaginase bactérienne, de la L-Asparaginase issue de HEK293. La plaque a été incubée 24 heures à 37°C avec 8% de CO₂. Après centrifugation, les surnageants sont conservés au réfrigérateur pour le test LDH et les culots ont été marqués à l'Annexine et l'Iodure de Propidium (IP). Une dernière condition contenant du PBS et de l'eau distillée a été mise en œuvre dans 4 puits : Annexine seule, IP seul, Annexine et IP, et tampon du kit. La plaque a été lue au CytoflexBekman. Les événements ont été analysés après définition des gates (Fig. 2).

La viabilité cellulaire a ensuite été évaluée par un test LDH sur les surnageants. Chacun a été dilué au 1/10e et au 1/20e avec du PBS et une solution de

titrage (LDH Roche, 11644793001) dans une plaque de 96 puits. Après 40 minutes d'incubation, la plaque a été analysée au lecteur microplaque ELx800 (mesures de DO à 630 nm et 490 nm).

Test d'immunogénicité

Le test d'immunogénicité a été réalisé à partir de monocytes de la lignée THP-1. Les cellules ont été cultivées en milieu RPMI (10% SVF, 2 mM glutamine, 1% antibiotique). Elles ont été repiquées tous les deux jours en flask T25. Pour un test d'immunogénicité, les cellules doivent être utilisées entre le troisième et le quinzième passage. Les cellules ont été placées pendant 24 heures dans un milieu RPMI (2% SVF) afin de pouvoir synchroniser les cellules. Puis, elles ont été placées en milieu RPMI sans SVF et 50 µL de la suspension est placée dans une plaque 96 puits. La

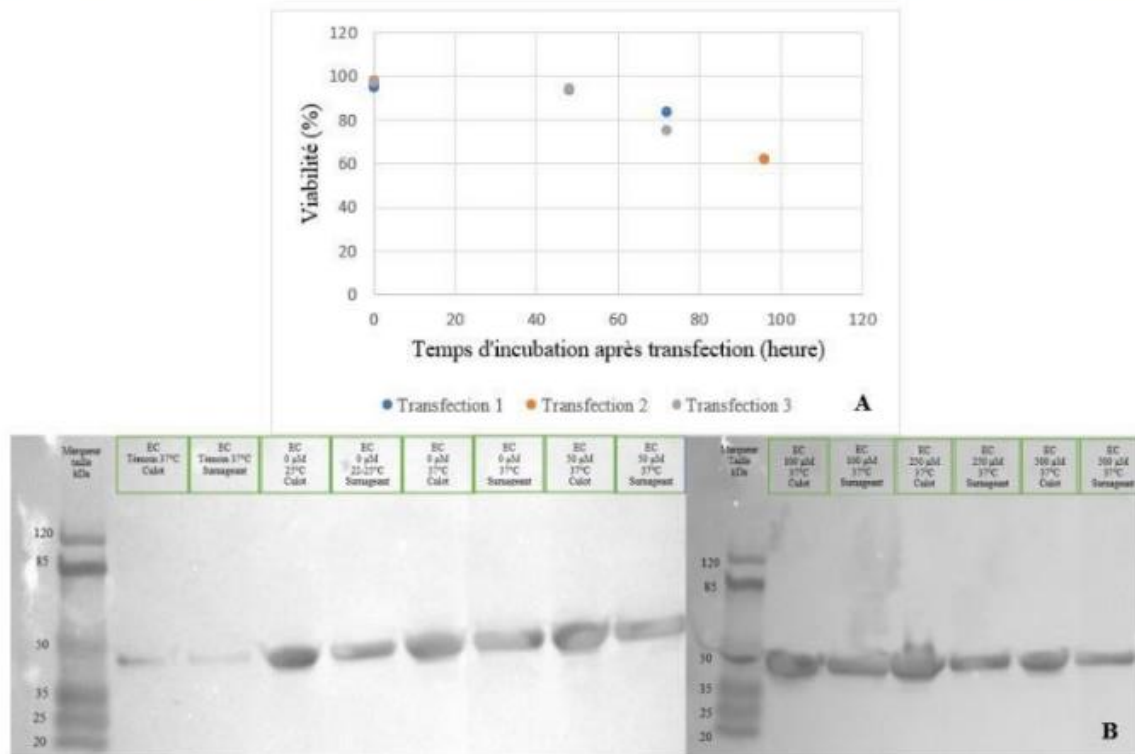


Figure 3 : Evolution de la viabilité cellulaire des cellules HEK293 après transfection et durant l'expression transitoire (A) et Western Blot réalisé sur les cultures de *E. coli* dans différentes conditions (B), permettant la sélection des conditions d'expression transitoire et de culture

EC : *E. coli*.

B : Culots : Cultures ayant subi centrifugation/retrait surnageant/reprise culot dans tampon Laemmli 1X+β-mercaptoéthanol/chauffage 5 minutes à 95°C. Surnageants : Cultures ayant subi centrifugation/retrait surnageant/reprise culot dans tampon lyse/sonication/centrifugation/récupération surnageant/ajout tampon Laemmli 4X+β-mercaptoéthanol. Révélation avec des anticorps Anti-His-Tag, le His-Tag étant présent sur la protéine recombinante.

différenciation des cellules en macrophage a été réalisée en ajoutant une solution de PMA ¹². La culture a été incubée pendant 24 heures. Après la différenciation, le surnageant a été retiré et les différents échantillons ont été testés (L-Asparaginase commerciale, L-Asparaginase produite par les deux groupes, lipopolysaccharides (LPS) et contrôle négatif). Après 72 heures d'incubation, le surnageant a été récupéré et la concentration en TNF- α déterminée avec un kit ELISA (Thermo Fisher Scientific, BMS223-4). La viabilité a également été mesurée par le biais d'un kit LDH (Roche, 11644793001) ¹³.

Dosage des protéines

De l'extraction des protéines des organismes producteurs à l'obtention d'une L-Asparaginase purifiée, doser les protéines totales des échantillons d'intérêt permet de définir la présence ou non de protéines et de calculer des rapports de masses protéiques encadrant chaque étape. Pour ce faire, le kit Pierce BCA Protein Assay® (Thermo Scientific, 23227) est utilisé. A partir d'une plaque 96 puits et d'une gamme étalon, il permet de mesurer la concentration en protéines d'échantillons de 50 μ L .

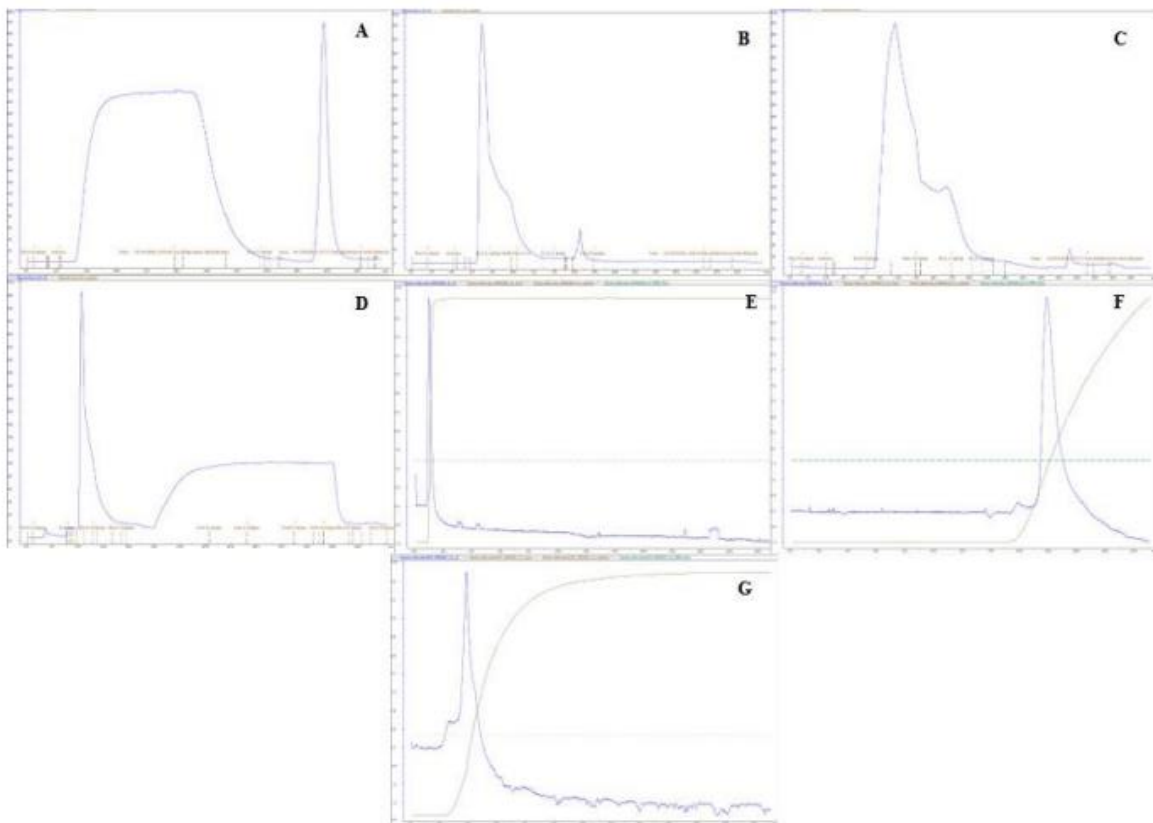


Figure 4 : Chromatogrammes obtenus lors de la chromatographie d'affinité avec colonne HisTrap FF® (Merck) à un débit de 1 mL/min (A-D) et obtenus lors de la chromatographie échangeuse d'ions avec une colonne résine HiTrap QFF® (Merck) à un débit de 1 mL/min (E-G)

A : L-Asparaginase recombinante de *E. coli*. B : L-Asparaginase recombinante de HEK293 (T1). C : L-Asparaginase recombinante de HEK293 (T2). D : L-Asparaginase recombinante de HEK293 (T3). E : L-Asparaginase commerciale (A3809-100 UN) dilué au centième. F : L-Asparaginase recombinante de *E. coli* après chromatographie d'affinité, clivage et dessalage. G : L-Asparaginase recombinante de HEK293 (T1 et T2) après chromatographie d'affinité clivage, et dessalage. Ti correspond à la transfection n°i.

Tableau 1 : Résultats des chromatographie d'affinité (HisTrap FF®, colonne de longueur 2,5 cm) et échangeuse d'ions (HiTrap QFF®, colonne de longueur 2,5 cm) pour les L-Asparaginases produites via *E. coli* et HEK293

L : longueur de la colonne, Ve : Volume d'échantillon, D : Débit colonne, tr : Temps de rétention, Vr : Volume rétention, ω : Largeur à la base du pic, σ : Largeur du pic à mi-hauteur, N: Nombre de plateau théorique, A : Aire du pic, T_i : Transfection n^oi.

		L (cm)	V _e (mL)	D (mL/min)	t _r (min)	V _r (mL)	ω (cm)	σ (cm)	N	Pureté (%)
Affinité	<i>E. coli</i>	2,5	24	1	49,28	49,28	8,15	2,04	585	
	HEK293 (T1)		1		16,51	16,51	1,62	0,41	1662	
	HEK293 (T2)		4		31,11	31,11	2,15	0,54	3350	
	HEK293 (T3)		1		Pas de pic distinct					
Echangeuse d'ions	<i>E. coli</i> commerciale	2,5	5	1	2,00	2,00	0,76	0,19	111	71,41
	<i>E. coli</i>				17,88	17,88	2,25	0,56	1010	92,10
	HEK293 (T1 et T2)				3,85	3,85	1,93	0,48	64	55,86

Résultats

Choix des conditions d'expression et de culture

Le Western Blot (Fig. 3B) met en évidence la présence de la protéine recombinante (entre 35 et 50 kDa) pour toutes les conditions de culture. Une diminution de la taille des bandes lorsque la concentration en L-Rhamnose augmente et une taille plus importante pour les culots que pour les surnageants sont observés. La présence de bandes au niveau des cultures témoins témoignent d'une contamination des puits ou des cultures. Pour la suite des expériences, le choix a été de réaliser l'ensemble de la purification et des tests de caractérisation sur la culture à 100 μ M et à 37°C, car c'est pour cette condition de culture que la différence de taille entre les bandes du culot et du surnageant est la plus minimale (L-Asparaginase surtout sous forme soluble). Pour les cultures eucaryotes, une diminution de la viabilité cellulaire avec le temps d'expression transitoire est mise en évidence (Fig. 3A). Ainsi, pour la troisième transfection, le temps d'expression transitoire retenu est de trois jours (quatre jours d'expression transitoire diminuent de 25% la viabilité cellulaire par rapport à celle obtenue après trois jours).

Efficacité de la purification

Les chromatogrammes (Fig. 4) représentent le temps en abscisse (minutes) et l'UV en ordonnée (milli Arbitrary Unit). Pour la CA, le premier pic UV correspond à la sortie de toutes les protéines produites par les cellules hormis la L-Asparaginase recombinante (fractions non retenues), car le His-

Tag de l'enzyme recombinante s'accroche à la colonne et la retient, ce qui fait qu'elle ne sort pas en même temps que les autres protéines. Le deuxième pic UV correspondrait donc à la sortie de la L-Asparaginase recombinante produite par les deux systèmes d'expression (*E. coli* et HEK293). Cependant, cette hypothèse ne peut être vérifiée avec l'échantillon commerciale car elle ne possède pas de His-Tag.

Le chromatogramme de *E. coli* (Fig. 4A) comporte un deuxième pic, débutant 8 minutes après le début de l'élution. Concernant la stratégie employant des cellules animales, pour la première transfection (Fig. 4B), un pic distinct de la courbe UV apparaît environ 3 minutes après le début de l'élution, alors que pour la deuxième transfection (Fig. 4C), le pic démarre au bout de 7 minutes d'élution. Pour la troisième transfection (Fig. 4D), le pic commence lui aussi à apparaître après 7 minutes d'élution, mais au lieu de former un pic étroit, la courbe UV a l'allure d'un plateau.

Le pic UV correspondant à la L-Asparaginase produite via le système *E. coli* a un maximum d'absorbance de 420 mAU (Fig. 4A), plus élevé que pour celles produites via le système HEK293, qui sont de 45 mUA et 30 mUA (Fig. 4B et Fig. 4C respectivement). Le plateau de la dernière transfection est quant à lui à 95 mUA (Fig. 4D). Pour les chromatogrammes de la CEI (Fig. 4E à 4G), le temps de rétention de la L-Asparaginase commerciale (2 minutes) est plus court que celui de la L-Asparaginase recombinante bactérienne (17,88 minutes), et eucaryote (3,85 minutes). De la même manière, on observe une différence significative de la hauteur des pics. La protéine produite par *E. coli* a un

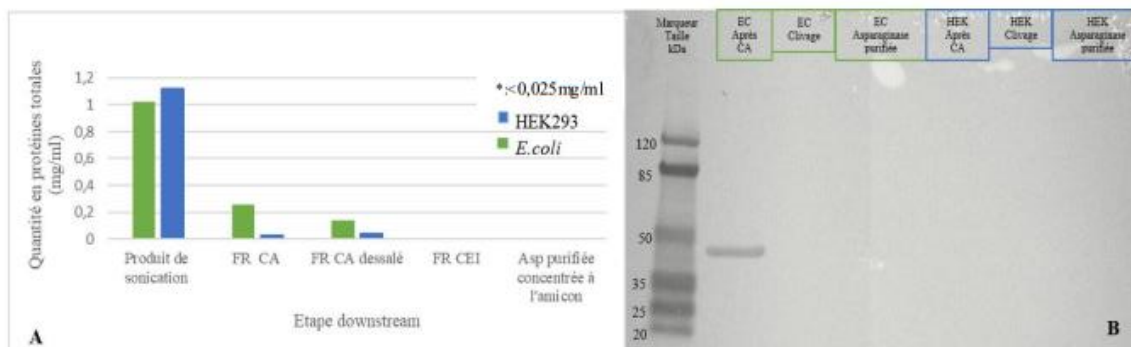


Figure 5 : Suivi de la concentration en protéines totales (A) et Western Blot permettant de suivre la présence de la protéine (B) au cours du procédé downstream

EC : *E. coli*, HEK : HEK293, FR : Fraction retenue, CA : Chromatographie d’Affinité, CEI : Chromatographie Échangeuse d’Ions, Asp : L-Asparaginase. Les échantillons utilisés pour le Western Blot ont été ajoutés à une solution de Laemmli (4X) avec du β -mercaptoéthanol. Les échantillons des puits “Clivage” ont subi un clivage puis un dessalage. Le Western Blot est réalisé avec des anticorps Anti-His-Tag, le His-Tag étant présent sur la protéine recombinante.

maximum d’absorbance autour de 7,21 mAU, tandis que le pic HEK293 a un maximum d’absorbance à 4,77 mAU. Pour la L-Asparaginase commerciale, le maximum d’absorbance atteint 5,63 mAU.

Enfin, la protéine recombinante d’origine bactérienne a une pureté environ 1,6 fois supérieure à l’enzyme eucaryote et 1,3 fois supérieure à la commerciale (Tab. 1).

Une nette diminution de la quantité de protéines totales au fil des étapes de purification des échantillons est notable (Fig. 5A). La CA divise par

deux la quantité de protéines présente dans les échantillons issus d’*E. coli* et par dix celle des échantillons issus de la transfection de HEK293 avec le plasmide amplifié. Les dessalages modifient peu cette quantité de protéines totales tandis que la chromatographie échangeuse d’ions la fait diminuer drastiquement, jusqu’à atteindre des concentrations inférieures au seuil de détection de 0,25 mg/ml. Ces résultats s’additionnent à ceux du Western Blot (Fig. 5B) réalisé à chacune des étapes majeures de la purification. Ce gel met en évidence la présence de

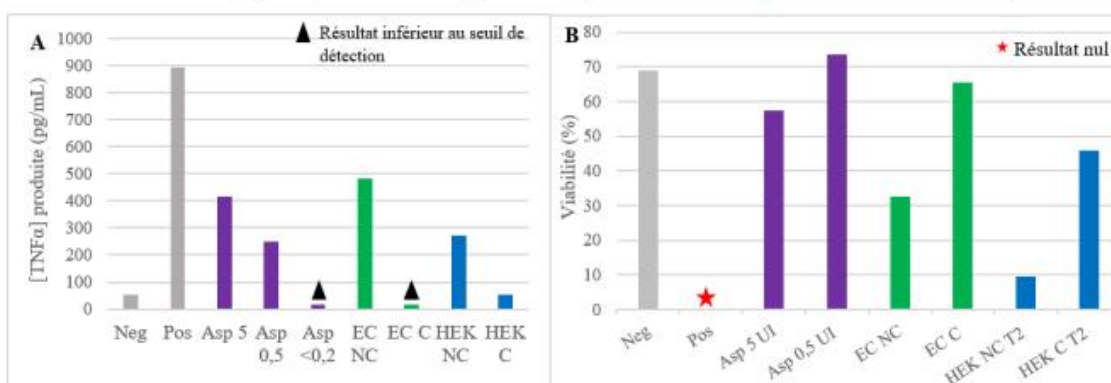


Figure 6 : Evaluation de l’immunogénicité de plusieurs échantillons de L-Asparaginase par quantification du TNF- α produit (A) et comparaison de la viabilité (B) de macrophages issues de monocytes THP-1 différenciées par suite du contact pendant 72 heures avec les différents échantillons testés

Asp : L-Asparaginase commerciale A3809-100 UN (5 UI/mL et 0,5 UI/mL), EC : L-Asparaginase *E. coli* (1 ng/mL), HEK : L-Asparaginase HEK293 (0,1 ng/mL), Pos : contrôle positif (LPS à 1000 ng/mL), Neg : contrôle négatif (RPMI 2% SVF), T2 : Transfection à partir du plasmide amplifié par une culture *E. coli* NEB 5 α , C : Clivée, NC : Non clivée. Des tests ont été faits avec une dilution au dixième des molécules actives mais les résultats ne sont pas illustrés sur ce graphique (viabilité comprise entre 43 et 67%). Les tests LDH et ELISA sont réalisés sur les surnageants récupérés après centrifugation.

protéines recombinantes dans l'échantillon bactérien après la CA (entre 35 et 50 kDa). Aucune autre bande n'est visible sur la membrane du Western Blot.

Evaluation de l'immunogénicité

Le contrôle positif et le contrôle négatif ont induit une production de TNF- α par les cellules. La L-Asparaginase commerciale conduit à une production de TNF- α en quantité variable (1,5 fois plus importante pour la L-Asparaginase à 5 UI comparé à celle à 0,5 UI). Concernant la L-Asparaginase produite, pour les échantillons non clivés, la production de TNF- α est plus importante avec la L-Asparaginase produite via *E. coli* que celle produite via HEK293. Pour les échantillons de L-

Asparaginase produite via HEK293, l'échantillon clivé T2 produit moins de TNF- α que sa version non clivée (Fig. 6A). La viabilité des cellules THP-1 différenciées en macrophages est globalement bonne (entre 42 et 73 %). Cependant, pour les échantillons où la L-Asparaginase produite n'est pas clivée, la viabilité des cellules est plus faible par rapport aux échantillons clivés. Seul le contrôle négatif présente une viabilité nulle (Fig. 6B).

Evaluation de l'activité et de l'efficacité

Les activités de la L-Asparaginase commerciale mesurées sont beaucoup plus faibles qu'attendues. Après la sonication des cellules, l'activité de l'enzyme est environ neuf fois plus élevée lorsqu'elle est produite via *E. coli* que via HEK293. Dans le tampon d'élu

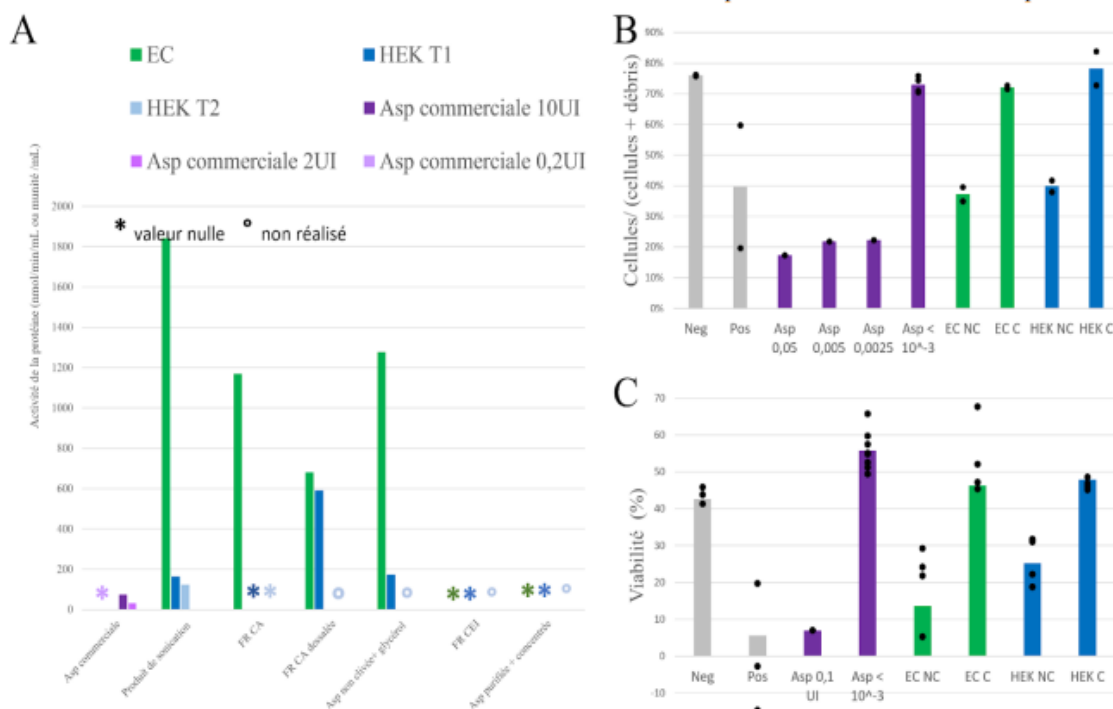


Figure 7 : Test d'activité de la L-Asparaginase (A), pourcentage de cellules CLBL-1 totales par rapport au nombre de cellules CLBL-1 totales et de débris cellulaires des différents échantillons après traitement (B), et test LDH sur les surnageants des échantillons utilisés pour la cytométrie en flux (C)

EC : *E. coli*. Neg : témoin négatif (PBS + eau déionisée). Pos : témoin positif (solution de saponine à 2 mg/mL). ASP : traitement des cellules à la L-Asparaginase à différentes concentrations (0,05 UI, 0,005 UI, 0,0025 UI et < à 10⁻³ UI). HEK : cellules HEK293. NC : Non Clivée. C : Clivée . T2 : transfection à partir du plasmide amplifié par une culture *E. coli* NEB 5 α .

A : Tests par colorimétrie à une longueur d'onde de 570 nm, avec lecteur de plaque 96 puits après établissement d'une gamme d'étalonnage (cf. Annexe 1). Le kit utilisé est Asparaginase Activity Assay Kit® (Sigma-Aldrich, MAK007). **B** : Résultats bruts obtenus avec le cytomètre Cytofex Beckman. Les cellules CLBL-1 sont concentrées à 1.10⁶ cell/mL. **C** : Les échantillons sont les surnageants récupérés suite aux tests cellulaires avant de faire le test de cytométrie en flux. Les cellules CLBL-1 sont diluées au 1/10e, correspondant à une concentration de 10⁵ cellules/mL.

de la CA, aucune activité n'est décelée pour les L-Asparaginases obtenue via HEK293 bien que celle issue d'*E. coli* atteigne 1200 mU/ μ L. Une fois dessalée, la L-Asparaginase issue de la transfection de HEK293 avec le plasmide commercial regagne une activité d'environ 700 mU/ μ L quasiment similaire à celle issue d'*E. coli*. L'ajout de glycérol dans les échantillons augmente l'activité de la L-Asparaginase d'*E. coli* et diminue celle de HEK293. Enfin à partir du clivage et de la CEI, les mesures d'activité sont trop faibles pour être mesurées par le kit utilisé. Par ailleurs aucune activité n'a été décelée dans les échantillons issus de la transfection de HEK293 avec le plasmide amplifié dans *E. coli* NEB5 α après son dessalage suivant la CA.

Les tests d'efficacité montrent un effet dose de la L-Asparaginase qui ne semble plus active quand elle est inférieure à 10^{-3} UI car la viabilité ainsi que les pourcentages de cellules totales sont comparables à celui du témoin négatif (Fig. 7B et 7C). Ces tests permettent de s'assurer que la L-Asparaginase induit bien la mort cellulaire. Ceci est vérifié puisque les échantillons traités avec la L-Asparaginase commerciale donnent des résultats similaires au contrôle positif, c'est-à-dire aux cellules traitées avec la saponine. De plus, l'efficacité des L-Asparaginases, produites selon les différentes méthodes, est analysée. Celle-ci semble beaucoup plus efficace quelle que soit la méthode lorsque la molécule n'est pas clivée. Néanmoins, les deux protéines recombinantes clivées semblent tout de même beaucoup moins efficaces que la L-Asparaginase commerciale, puisque le pourcentage de cellules est comparable à celui du témoin négatif (Fig. 7B). De même, pour la viabilité, celle des deux L-Asparaginases produites est plus élevée que celle du contrôle positif. Pour finir, il n'y a pas de différences significatives observées entre les deux méthodes.

Discussion

La différence entre les temps de rétention sur les chromatogrammes pourrait être due en partie aux conditions opératoires, ainsi qu'aux différentes conformations prises par la protéine. En effet, les étapes de purification n'ont pas eu lieu sur une seule journée, ni sur le même matériel (colonne pour CEI). De même, la nature des échantillons étant différente

(lyophilisée pour la commerciale et dissoute dans du tampon Tris HCl pour les recombinantes lors de la CEI), cela a pu influencer la conformation de la protéine. Les modifications post-traductionnelles de la protéine en système eucaryote peuvent également aboutir à un changement de conformation et donc avoir des conséquences sur la fixation de la protéine à la colonne. Cette hypothèse pourrait être testée en réalisant un essai avec des conditions opératoires identiques. Concernant la différence de hauteur des pics entre CA et CEI pour le système eucaryote, ceci est cohérent au vu de l'absence de facteur de sélection (néomycine) lors de la transformation. Il serait donc pertinent de réaliser un second essai avec cette fois-ci le facteur de sélection afin de comparer la hauteur des pics.

Le nombre de plateaux théoriques N (Tab. 1) de la CEI est plus important pour la stratégie bactérienne (1010) que pour l'eucaryote (64) et la commerciale (111). Ceci démontre une meilleure efficacité de la protéine bactérienne, qui se confirme avec une pureté très importante (92,10 %). Pour les L-Asparaginases commerciale et eucaryotes, les N sont faibles, signifiant que la colonne de purification n'est pas optimale pour ces protéines. Cela se confirme également par une pureté moyenne pour la stratégie HEK293 (55,86 %) et pour la L-Asparaginase commerciale (71,41 %), d'où la nécessité de combiner les deux chromatographies.

Concernant les résultats du Western Blot (Fig. 5), ils ne révèlent pas la protéine pour la stratégie eucaryote après la CA, ce qui signifie qu'elle est présente dans une quantité trop faible pour pouvoir être révélée. La protéine recombinante bactérienne n'est, quant à elle, plus observée après l'étape de clivage et de dessalage. Cependant, il n'est pas possible de conclure sur l'efficacité du clivage ou du dessalage en se basant uniquement sur le Western Blot. En effet, la quantité de protéines recombinantes issues de la CA utilisée pour le clivage est faible et l'absence de bande peut être due à la trop faible concentration. De plus, le pic obtenu pour la CEI témoigne d'une purification inefficace pour HEK293, notamment par la présence d'un autre pic potentiellement dû aux His-Tag résiduels et/ou à l'entérokinase.

Au vu des résultats du test d'immunogénicité, il est possible de conclure que la totalité des échantillons ont induit la production de TNF- α . La production de TNF- α dans le cadre du contrôle positif montre que les cellules sont capables de sécréter cette cytokine en

présence de molécules immunogènes. Ceci permet donc de valider le choix du modèle cellulaire ainsi que le protocole de différenciation des monocytes en macrophages. La différence de concentration en TNF- α produite entre les deux concentrations de L-Asparaginase commerciale (5 et 0,5 UI) présage un effet dose. Ainsi, la comparaison des échantillons produits avec la L-Asparaginase commerciale est rendue impossible car les concentrations ne sont pas identiques. De plus, les unités de mesures diffèrent. Aucune conclusion sur l'immunogénicité de la L-Asparaginase recombinante bactérienne ne peut être faite car la concentration en TNF- α est inférieure au seuil de détection. Cependant, il y a une production de TNF- α pour la protéine recombinante eucaryote, témoignant d'un effet immunogène de cette dernière. La présence du His-Tag entraîne une immunogénicité beaucoup plus élevée de la protéine, d'où l'importance de le cliver.

Les faibles valeurs d'activité mesurées pour la L-Asparaginase commerciale sont probablement liées au nombreux cycles de congélation/décongélation pour les différents tests, qui ont pu diminuer cette activité. L'absence de détection d'activité et d'efficacité pour les échantillons après la CEI peut s'expliquer par des quantités trop faibles d'enzymes obtenues en fin de purification. La présence d'une activité pour la protéine recombinante eucaryote après lyse et son absence après la CEI démontre que la quantité de protéine diminue au cours de la purification, jusqu'à devenir indétectable pour les tests d'activité. Les différences d'activité entre les protéines recombinantes bactériennes et eucaryotes peuvent avoir plusieurs origines : soit les transformations post-traductionnelles chez HEK293 entraînent une baisse de l'activité, soit l'enzyme est produite en plus grande quantité en système bactérien qu'eucaryote, ce qui rejoint les résultats des différents Western Blot.

Les tests d'efficacité semblent montrer une efficacité de la part des L-Asparaginases produites non clivées via les deux stratégies, contrairement après clivage du His-Tag où l'efficacité est nulle, par rapport à celle qui provient du commerce. Il existe un effet dose de la L-Asparaginase, il serait ainsi intéressant de mieux connaître la concentration des deux échantillons produits via les deux méthodes afin d'injecter une dose justifiée aux cellules de la lignée

CLBL-1 afin d'avoir des résultats sans biais dû à cette incertitude.

Conclusion

Cette étude a permis de démontrer la possibilité de produire la L-Asparaginase à partir du gène canin en système eucaryote. Il s'agit d'une innovation sur le marché. Cependant, l'objectif initial de comparaison des deux stratégies est impossible. En effet, les tests n'ont pas été effectués dans les mêmes conditions (concentrations différentes). Ainsi, les efficacités similaires relevées entre les deux méthodes et les trop faibles activités et immunogénicité relevées ne permettent aucune comparaison pertinente. Néanmoins, plusieurs constats ont pu être faits. Dans un premier temps, quelle que soit la stratégie de production, l'activité, tout comme la quantité de protéines, diminue fortement après l'étape de clivage et décline jusqu'à la fin du procédé. Ces diminutions s'expliquent par la faible quantité d'échantillons utilisée pour le clivage, soit une faible concentration pour la suite des étapes. Ensuite, il a été mis en évidence l'existence d'un effet dose de la protéine pour obtenir une efficacité de cette dernière sur les cellules CLBL-1. Finalement, la présence du His-Tag sur les protéines recombinantes bactérienne et eucaryote entraîne une immunogénicité plus élevée.

Dans un futur projet, il serait intéressant de produire à plus grande échelle afin d'obtenir une quantité de protéines recombinantes plus importante pour les étapes de purification. De plus, une quantité plus élevée d'entérokinase permettrait d'augmenter le volume d'échantillon clivé et donc le rendement final de production. Finalement, dans l'optique d'une comparaison entre les deux stratégies, il serait pertinent de mettre en place un dosage protéique plus adapté afin de connaître les concentrations des différents échantillons et réaliser les tests de caractérisation avec des conditions de réalisation identiques.

Remerciements

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide pour mener à bien ce projet de recherche.

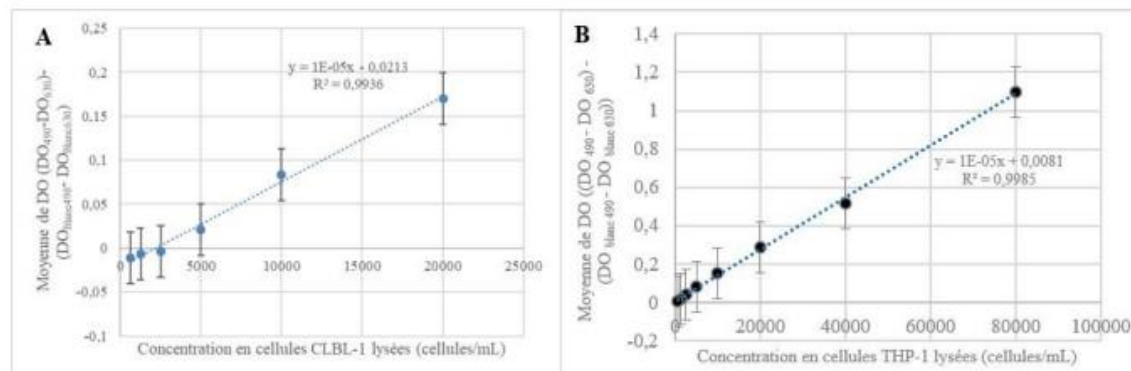
Nous tenons à remercier particulièrement Mathilde Mosser, porteuse du projet Asparaginase, qui s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de notre projet. Nos remerciements

s'étendent également à toute l'équipe encadrante, Raouf Tareb, Ali Khalil et Nabila Haddad pour tous leurs judicieux conseils et leur motivation qui ont contribué à la réussite du projet. Enfin, une attention particulière est retenue pour l'équipe de techniciens d'Oniris, Edouard, Sylvie et Isabelle, que l'on remercie pour l'aide et tout le temps qu'ils ont bien voulu nous consacrer.

Références

1. Mugnaini E. N., Ghosh N., 2016. Lymphoma. *Prim Care* **43**, 661–675.
2. Zandvliet M., 2016. Canine lymphoma: a review. *Vet Q* **36**, 76–104.
3. Alliance Clinique Vétérinaire, 2015. Lymphome chien. <https://www.veterinaire-alliance.fr/le-lymphome-du-chien/>
4. Muneer F. *et al.*, 2020. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. *Arch Microbiol* **202**, 967–981
5. Fonseca M. H. G., Fiúza T.D.S., Morais S B., Souza T.A.C.B., Trevizani R., 2021. Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **139**, 111616
6. Ueno T., *et al.*, 1997. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* **11**, 1858–1861
7. Beckett A., Gervais D., 2019. What makes a good new therapeutic L-asparaginase? *World J Microbiol Biotechnol* **35**, 152
8. Kim H. J., *et al.*, 2018. Comparison of Native Escherichia coli L-Asparaginase versus Pegylated Asparaginase, in Combination with Ifosfamide, Methotrexate, Etoposide, and Prednisolone, in Extranodal NK/T-Cell Lymphoma, Nasal Type. *Cancer Res Treat* **50**, 670–680
9. Asselin B., Rizzari C., 2015. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 2273–2280
10. NEB, [S.D]. NEBExpress® Ni Spin Column Reaction Protocol (NEB #S1427) <https://international.neb.com/protocols/2019/08/28/nebexpress-ni-spin-column-reaction-protocol-neb-s1427>.
11. GE Healthcare. Instructions 71-5027-68 AF HisTrap affinity columns - HisTrap HP, 1 ml and 5 ml.
12. Park E. K., *et al.*, 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* **56**, 45–50
13. Wen Y., *et al.*, 2021. Comparability study of monocyte derived dendritic cells, primary monocytes, and THP1 cells for innate immune responses. *J Immunol Methods* **498**, 113147
14. Novagen. Recombinant Enterokinase User Protocol TB150 Rev. C 0107. 5.

Annexe



Annexe 1 : Parties linéaires des courbes étalons des tests LDH sur les cellules CLBL-1 (A) et sur les cellules THP-1 (B)

Courbes étalons représentant la moyenne de densité optique obtenue en fonction de la concentration en cellules CLBL-1 lysées par puits (A) et en fonction de la concentration en cellules THP-1 lysées (B). L'ensemble des échantillons utilisés pour construire la courbe ont été dilués au 1/100 correspondant à une concentration comprise entre $1,6 \cdot 10^5$ cellules/mL et $0,00625 \cdot 10^6$ cellules/mL.

Annexe 3 : Fiche d'information à l'attention du propriétaire

Madame, Monsieur, votre chien est atteint d'une maladie appelée lymphome malin multicentrique. Ce cancer est caractérisé par la prolifération de cellules malignes dans les ganglions, mais aussi la rate, le foie, et parfois la moelle osseuse.

COMMENT VOUS DECIDER ?

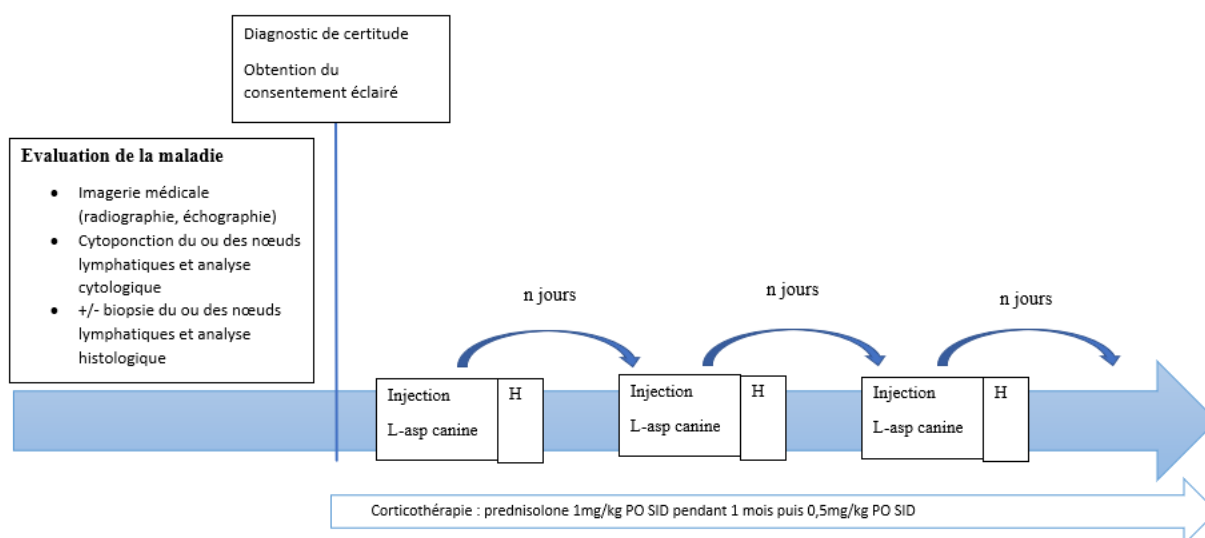
Le vétérinaire qui vous a proposé l'étude vous a donné des explications. Elles sont résumées dans ce document intitulé « LETTRE D'INFORMATION AU PROPRIETAIRE ». Nous vous invitons à le lire attentivement avant de vous décider : vous disposez d'un délai de réflexion de plusieurs jours avant de donner votre réponse. Si vous décidez de faire participer votre animal à cette recherche, il vous sera demandé de signer une attestation de consentement, qui sera également signée par le vétérinaire qui vous a proposé l'étude. Cette signature confirmera que vous êtes d'accord pour que votre animal participe à la recherche. Même après avoir signé pour donner votre accord de participation, vous garderez le droit d'interrompre à tout moment la participation de votre animal sans avoir à vous justifier.

QUEL EST LE BUT DE CETTE RECHERCHE

La L-asparaginase est une molécule usuellement employée dans le traitement des lymphomes canins. Cependant, la limite majeure des traitements composés de L-asparaginase est son inactivation silencieuse par les anticorps de l'animal qui entraîne la perte de son activité et donc une diminution de l'efficacité du traitement. Dans le but de limiter cette inactivation, une L-asparaginase homologue à celle de l'espèce canine a priori moins immunogène a été produite. Cette recherche vise à étudier l'efficacité de cette nouvelle asparaginase canine sur des animaux atteints d'un lymphome malin multicentrique.

QU'ARRIVERA-T-IL PENDANT LA RECHERCHE ? QU'AUREZ-VOUS A FAIRE ?

Votre animal recevra une injection de L-asparaginase canine tous les n jours. Afin de pouvoir suivre l'évolution du lymphome de votre chien, votre animal sera hospitalisé 24h après l'injection. Tout au long du traitement, une corticothérapie sera mise en place et devra être administrée quotidiennement. A la maison, une feuille de suivi sera à compléter entre les injections.



H : hospitalisation pendant 24h après l'injection de L-asparaginase : examen clinique, analyse biochimique et numération formule, test d'activité de la L-asparaginase, examen échographique

Si une rémission complète est observée, les animaux seront suivis pendant 36 mois. Tous les mois pendant 6 mois puis tous les 3 mois. Lors de ces suivis, un examen clinique, une analyse biochimique et une numération formule sanguine sera réalisée. Ainsi qu'un examen d'imagerie (échographie ou scanner).

QUELS SONT LES RISQUES ?

Les effets secondaires attendus lors des injections de L-asparaginase canine sont les suivants : une réaction allergique, une pancréatite aiguë, un trouble de la coagulation, une cytolysé hépatique, un syndrome de lyse tumorale, une hyperglycémie et une atteinte cérébrale pouvant entraîner des démangeaisons, de l'érythèmes, une douleur abdominale, des vomissements, de la diarrhée, de l'anorexie, une hyperglycémie, la formation de thrombus et une léthargie ou une somnolence.

QUELS SONT LES BENEFICES QUE VOUS POUVEZ ESPERER POUR VOTRE ANIMAL ?

Le vétérinaire vous a proposé de faire participer votre animal à cette étude parce qu'il pense que cela peut lui être bénéfique : une diminution ou une stabilisation de ses tumeurs pourraient être observées. La participation à cette recherche est pour votre animal une alternative au schéma de traitement usuellement employé. Cette étude offre la possibilité à l'animal d'accéder à un traitement expérimental dans de bonnes conditions de sécurité.

QUE SE PASSERA-T-IL A LA FIN DE LA RECHERCHE, SI LA RECHERCHE S'ARRETE

La recherche peut s'interrompre à tout moment :

- du fait des autorités de santé
- du fait du chargé de coordination : si un élément nouveau survient, le vétérinaire-investigateur en sera informé et il vous transmettra alors les éléments susceptibles de modifier votre participation.
- du fait du vétérinaire investigateur, pour des raisons médicales concernant votre chien : il peut décider à tout moment d'arrêter l'administration du produit à l'étude (par exemple à cause d'un effet secondaire ou d'une évolution de l'état de santé de votre animal) et vous en informera
- par vous-même : si vous décidez de faire participer votre animal à cette recherche, il s'agira d'un acte volontaire. Vous pourrez à tout moment décider d'arrêter la participation de votre animal sans pénalité ni préjudice. Dans ce cas, vous devez informer le vétérinaire-investigateur de votre décision. Quelle que soit la raison de l'interruption, le vétérinaire investigateur vous informera alors des mesures à suivre.

Vous êtes libre de décider si vous voulez que votre animal participe ou non à cette étude. Vous disposez d'un délai de réflexion n'excédant pas 15 jours. Vous êtes libre de retirer votre animal quand vous le voulez et sans donner de raison. La qualité des soins qui lui seront dispensés ne sera pas affectée si vous décidez de retirer votre animal de l'étude ou de ne pas le faire participer.

PROPRIETAIRE :

Date :
Lieu :
Nom – prénom :
Signature :

VETERINAIRE INVESTIGATEUR :

Date :
Lieu :
Nom – prénom :
Signature :

Annexe 4: Déclaration de consentement éclairé (étude de l'efficacité)

Etude pré-clinique prospective de l'efficacité de la L-asparaginase canine

Merci de compléter et d'envoyer ce formulaire par mail dans les 24 heures à l'investigateur coordonnateur : xxxx@onirus-nantes.fr

Nom – Prénom du propriétaire :

Nom de l'animal :

Identification de l'animal :

Je reconnais avoir reçu et lu le document « Lettre d'information au propriétaire » concernant le protocole sus-cité qui est un protocole de recherche.

Je reconnais avoir été informé par le Docteur....., et avoir eu la possibilité de lui poser toutes les questions nécessaires à mon information.

J'accepte de faire participer mon animal dans les conditions décrites par la lettre d'information qui m'a été remise. La décision de faire participer mon animal à cette étude relève de mon libre choix, sans que puisse être exercée aucune pression morale ou physique. Je pourrai à tout moment interrompre la participation de mon animal à cette étude sans que cela ne modifie la qualité des soins qui lui seront apportés. De même, je sais que le vétérinaire investigateur peut à tout moment décider d'arrêter la participation de mon animal à cette étude s'il le juge nécessaire.

Les données recueillies durant cette étude resteront confidentielles. J'accepte toutefois que les résultats de cette étude puissent être publiés à visée médicale et scientifique pourvu que mon identité ne soit pas révélée. Je n'autorise la consultation des données me concernant et concernant mon animal que par les vétérinaires investigateurs et les responsables de cet essai, sans violer la confidentialité et dans les limites autorisées par les lois et réglementations. En signant la feuille de consentement, j'autorise un tel accès au dossier médical de mon animal.

J'ai été informé(e) que le CHUV d'Oniris, Nantes se déchargeait de tout préjudice ou de toute incapacité que pourrait entraîner l'administration de la L-asparaginase canine étudiée en conformité avec le protocole approuvé de l'étude.

Je reconnais avoir pu disposer d'un délai de réflexion avant de donner mon accord.

Je sais qu'en cas de besoin et pendant tout le déroulement de cette étude, nous pouvons moi-même ou le vétérinaire habituel de mon animal, contacter l'un des vétérinaires responsables du protocole, le Dr.....au numéro suivant :

Je reconnais avoir reçu un exemplaire du présent document. J'ai également bien pris note que mon consentement ne dégageait en rien, les organisateurs de cette recherche et conserve tous mes droits garantis par la loi.

Fait à, le.....

Signature du propriétaire

Signature de l'investigateur

Annexe 5 : Dossier de saisine CERVO

Projet de recherche clinique et/ou épidémiologique vétérinaire n°

(Cadre réservé au CERVO)

Titre du projet de recherche clinique et/ou épidémiologique vétérinaire

Etude préclinique prospective de l'efficacité de la L-asparaginase canine

Investigateur principal Catherine IBISCH

Durée estimée du projet : 4 ans

Date souhaitée de début du projet :

INVESTIGATEUR PRINCIPAL (nom, prénom) : IBISCH Catherine

Téléphone : 02 40 68 77 81

Télécopie : 02 40 68 76 65

E-mail : catherine.ibisch@oniris-nantes.fr

INSTITUTION : Oniris

UNITE DE RECHERCHE ou SERVICE DU CHUV :

Unité AMaROC, service d'oncologie du CHUV

Signature de l'investigateur principal :

Signature du Directeur d'Unité de recherche ou du chef de service ou du chef de département (rayer les mentions inutiles) :

CO-INVESTIGATEUR (si nécessaire) (nom, prénom):

Téléphone :

Télécopie :

E-mail :

INSTITUTION :

UNITE DE RECHERCHE ou SERVICE DU CHUV :

Signature du co-investigateur éventuel :

Signature du Directeur d'Unité de recherche ou du chef de service ou du chef de département (rayer les mentions inutiles) :

RESUME NON TECHNIQUE DU PROJET

(résumé de type « grand public » devant comprendre *a minima* l'espèce et le nombre maximal d'animaux inclus dans l'étude)

En médecine vétérinaire, le lymphome multicentrique est le lymphome malin que l'on retrouve le plus fréquemment dans la race canine. Les lymphomes malins sont principalement traités par chimiothérapie. L'objectif de la chimiothérapie pour ce type de tumeur est palliatif, il s'agit d'utiliser une dose efficace la plus faible possible sur la période la plus courte possible afin d'obtenir une rémission qui permet de redonner un confort de vie à l'animal. Différents protocoles de chimiothérapies sont employés dans le traitement des lymphomes malins. Les plus employés sont les protocoles CHOP et COPLA. La L-asparaginase est une enzyme permettant d'induire la mort des lymphocytes tumoraux en les privant de leur apport exogène en L-asparagine. Cette enzyme est incorporée dans de nombreux protocoles de chimiothérapie dirigés contre les tumeurs lymphoïdes, car elle permet une réponse thérapeutique rapide. La L-asparaginase peut être employée lors de la phase d'induction des protocoles de polychimiothérapie, en association avec des corticoïdes ou bien en cas de rechute. Lorsqu'elle est employée en monothérapie, la L-asparaginase est soit injectée de façon isolée, soit administrée de façon répétée à une fréquence d'une fois par mois.

En médecine humaine, la L-asparaginase est employée lors du traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques. L'objectif de la chimiothérapie étant la guérison des patients, la L-asparaginase est employée plus fréquemment et à une dose plus importante. Cependant, la limite majeure des traitements composés de L-asparaginase est son inactivation silencieuse par les anticorps du patient. Un monitoring de l'activité de la L-asparaginase est alors employé afin de contrôler l'efficacité du traitement.

Afin de limiter son inactivation silencieuse, une L-asparaginase vétérinaire, homologue à l'espèce canine a été produite. Des études sur sa tolérance et sur son immunogénicité ont déjà été réalisées et ont permis de déterminer une dose et une fréquence d'administration permettant de maintenir une déplétion en L-asparagine ainsi que de prévoir les effets secondaires.

Objectifs :

L'objectif de cette étude est de tester l'efficacité de la L-asparaginase canine vétérinaire ainsi que du nouveau schéma thérapeutique déterminé lors de la phase d'étude précédente.

Souhaitez-vous récuser un ou plusieurs rapporteurs du collège des membres internes? Si oui le(s)quel(s) ? Non

Retombées attendues pour la médecine vétérinaire

La L-asparaginase canine a été produite dans l'objectif de réduire son immunogénicité et donc a priori l'immunisation silencieuse de la molécule lors des traitements. La dose et la fréquence d'administration déterminées lors de la phase 1, pourraient permettre une déplétion en L-asparagine plus durable dans le temps et donc obtenir une rémission comparable à celle d'un protocole de chimiothérapie complet (CHOP par exemple).

Retombées éventuelles pour la médecine humaine

La mise en évidence d'une meilleure efficacité de l'asparaginase vétérinaire pour le traitement de l'espèce canine pourrait permettre d'envisager le même type de production en médecine humaine afin de réduire l'inactivation silencieuse de la L-asparaginase.

Essai réalisé sur des :

Animaux malades Animaux malades pour lesquels Animaux sains
l'objet de la recherche est sans
rapport avec leur état pathologique

Espèce : Canine

Race : toutes races

Essai pilote OUI NON

Essai thérapeutique OUI NON

Essai randomisé OUI NON

Essai prospectif OUI NON

Essai rétrospectif OUI NON

Nombre total de sujets prévus et répartition (en séparant les populations de sujets étudiés et les sujets témoins de l'étude) : x animaux seront inclus dans l'étude.

Dans le cas d'un essai thérapeutique, y-a-t-il une perte de chance pour l'animal par rapport au « gold standard » du traitement ?
OUI NON

Si vous avez répondu OUI à la question précédente, quel(s) est(sont) le(s) avantage(s) attendus de ce traitement par rapport au gold standard ?

Le gold standard de la prise en charge thérapeutique des lymphomes malins est la chimiothérapie (protocole COPLA ou CHOP). Sans traitement la médiane de la survie globale est de 1 à 2 mois, contre 2 à 4 mois lors de la mise en place d'une corticothérapie seule et 10 à 12 mois lors d'un traitement par chimiothérapie (CHOP).

CAS DES ANIMAUX NAIFS DE TOUT TRAITEMENT :

Les propriétaires ne souhaitant pas (ou ne pouvant pas financièrement) entreprendre un protocole de chimiothérapie complet (CHOP ou COPLA), se dirigent le plus souvent vers une corticothérapie seule ou une association L-asparaginase/corticothérapie. La L-asparaginase canine de cette étude représente alors une véritable option thérapeutique et doit pouvoir apporter un bénéfice clinique à l'animal.

Toutefois, si l'animal ne répond pas au traitement (au bout de 10 jours). La mise en place d'un protocole standard peut être mis en place selon la décision du propriétaire.

CAS DES ANIMAUX EN RECHUTE APRES UNE PREMIERE CHIMIOOTHERAPIE :

Pour ces animaux, la L-asparaginase est déjà une option thérapeutique couramment employée.

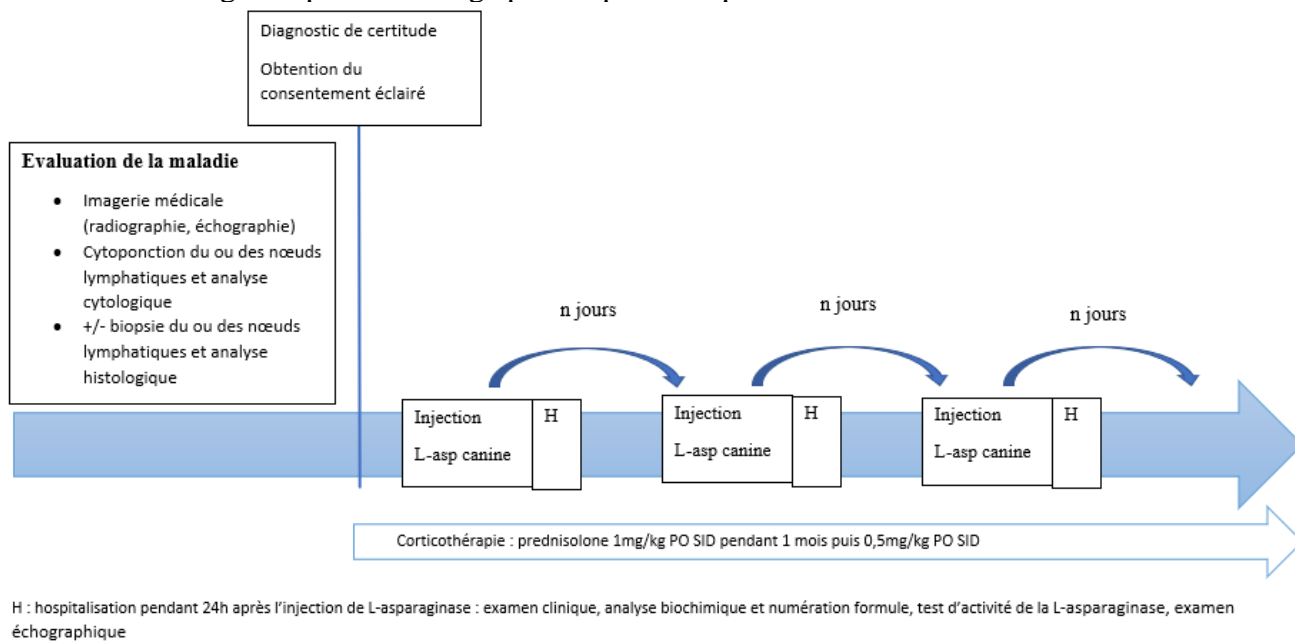
Comment ce projet de recherche prend-il en compte les impératifs éthiques ?

Les animaux inclus sont :

- des animaux naïfs de tout traitement pour leur lymphome multicentrique.

Il s'agit d'une étude d'efficacité en comparaison avec un protocole classique : L-asparaginase administré 1 fois par mois et une corticothérapie (prednisolone 1 mg/kg PO SID pendant 1 mois puis 0,5 mg/kg PO SID)

Voici la chronologie de prise en charge prévue pour chaque animal inclus :



La L-asparaginase sera administrée tous les n jours. Une hospitalisation pendant 24h après l'injection sera mise en place afin de réaliser des examens cliniques, des analyses biochimiques et de numérations formules sanguines. Des tests d'activité de la L-asparaginase seront réalisés afin de détecter une potentielle inactivation silencieuse. L'efficacité du traitement sera déterminée par une mesure des nœuds lymphatiques par échographie.

Si une rémission complète est observée, les animaux seront suivis pendant 36 mois. Tous les mois pendant 6 mois puis tous les 3 mois. Lors de ces suivis, un examen clinique, une analyse biochimique et une numération formule sanguine sera réalisée. Ainsi qu'un examen d'imagerie (échographie ou scanner).

Comment votre projet prend-il en compte le respect de la règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner » ?

Remplacer

Il s'agit d'un essai préclinique pour le chien, portant sur des animaux spontanément malades : cette étude permet de contourner l'utilisation d'animaux d'expérimentation.

Réduire

Les animaux malades recevant la L-asparaginase canine sont des animaux qui auraient reçu dans tous les cas un traitement similaire avec une L-asparaginase humaine.

Raffiner

Pour limiter le stress, il a été décidé de ne pas réaliser d'examen tomodensitométrie à chaque contrôle afin de ne pas anesthésier l'animal. La durée d'hospitalisation sera réduite au minimum : 24h . Si l'animal est trop stressé en hospitalisation, cette durée pourra être réduite.

Solène RIQUE

Elaboration d'un protocole d'essai pré-clinique concernant une L-asparaginase vétérinaire innovante pour le traitement des lymphomes canins

Development of a pre-clinical trial protocol for an innovative veterinary L-asparaginase for the treatment of canine lymphoma

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 07/10/2022

RESUME

La L-asparaginase est une enzyme utilisée dans le traitement des lymphomes canins en médecine vétérinaire et des leucémies aiguës lymphoblastiques en médecine humaine. Cette enzyme induit la mort de certaines cellules cancéreuses en les privant de leur apport exogène en L-asparagine qui est un acide aminé essentiel à leur survie. La limite majeure des traitements composés de L-asparaginase est son inactivation silencieuse par les anticorps du patient. Fin 2020, une tension d'approvisionnement empêche l'accès à la L-asparaginase pour les traitements des carnivores domestiques. La production d'une L-asparaginase vétérinaire est alors entreprise en collaboration avec une équipe d'étudiants ingénieurs d'ONIRIS. Dans le but de limiter son inactivation silencieuse, cette production est réalisée avec la volonté de diminuer l'immunogénicité de l'enzyme. Une séquence canine est alors employée à la place des séquences bactériennes d'*E.coli* ou d'*E.chrysanthemi* habituellement utilisées dans les médicaments commercialisés. Le succès de la production de cette nouvelle L-asparaginase canine par l'équipe d'ingénieurs nous a permis d'envisager un essai pré-clinique sur les chiens. Afin d'étudier la nouvelle molécule, dans un premier temps, un protocole visant à tester sa tolérance et son immunogénicité est élaboré en vue d'une expérimentation sur des chiens de laboratoire. Ces tests permettront de prévoir les effets indésirables et de déterminer la dose et la fréquence d'administration à employer afin de garantir une déplétion en L-asparagine la plus durable possible. Dans un second temps, son efficacité sera étudiée sur des animaux atteints de lymphomes malins multicentriques.

MOTS CLES :

- L-asparaginase
- Chien
- Lymphome
- Essai préclinique
- Thérapeutique médicamenteuse

DATE DE SOUTENANCE : 07/10/22