



HAL
open science

Diméthylarginines et mortalité chez des chiens présentés pour tumeur maligne : une étude prospective

Grégoire Bernardo Marques

► **To cite this version:**

Grégoire Bernardo Marques. Diméthylarginines et mortalité chez des chiens présentés pour tumeur maligne : une étude prospective. Médecine vétérinaire et santé animale. 2020. dumas-04795076

HAL Id: dumas-04795076

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04795076v1>

Submitted on 21 Nov 2024

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.

Copyright

Année 2020

**DIMÉTHYLARGININES ET MORTALITÉ CHEZ DES CHIENS
PRÉSENTÉS POUR TUMEUR MALIGNE : UNE ÉTUDE
PROSPECTIVE.**

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le 13 octobre 2020

par

Grégoire, Manuel, Jean BERNARDO MARQUES

sous la direction de

Dr. Christelle MAUREY

et avec la participation en tant qu'invité de **Dr. Jérémy BEGUIN**

Président du jury :	Pr. Pascal GUERET	Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL
1^{er} Assesseur :	Dr. Christelle MAUREY	Maître de Conférences à l'EnvA
2nd Assesseur :	Dr. Matthias KOHLHAUER	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des membres du corps enseignant



Directeur : Pr Christophe Degueurce

Directeur des formations : Pr Henry Chateau

Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Directeurs honoraires : MM. Les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Elevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

<p>Unité pédagogique d'anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Fernandez Parra Rocio, Maître de conférences associée - Pr Verwaerde Patrick* <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespouhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel <p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benckroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Hoummady Sara, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudemann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Fayolle Pascal - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique* <p>Discipline : cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier - Dr Votait Laetitia, Praticien hospitalier
--	---

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Carlier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mûmet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadi - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Maufré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew <p>Rattachée DPASP</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier
--	--

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - Adjoint : Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Boissady Emilie, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Maignac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée 	<p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Briand Amaury, Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel (rattaché au DEPEC) - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticien hospitalier <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié
---	--

* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émérites : Pr Combrisson Hélène, Pr Enriquez Brigitte, Pr Panthier Jean-Jacques, Pr Paragon Bernard.

Remerciements

Au Professeur Pascal Gueret, Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse, hommage respectueux.

Au Docteur Christelle Maurey, Maitre de conférences à l'EnvA,
Pour m'avoir proposé ce travail et l'avoir dirigé.

Sincères remerciements pour vos conseils, votre bienveillance et votre enthousiasme. Merci encore pour avoir recommandé ma candidature pour l'année d'internat.

Au Docteur Matthias Kohlhauer, Maitre de conférences à l'EnvA,
Pour avoir accepté d'être l'assesseur de cette thèse.

Sincères remerciements pour avoir relu le manuscrit de cette thèse, merci pour votre réactivité et vos conseils.

Au Docteur Jérémy Béguin,

Pour avoir pensé à moi pour ce travail.

Merci pour tout le temps que tu as pris pour m'aider dans la réalisation et la rédaction de cette thèse, merci pour ta réactivité et ton aide précieuse tout au long de ce travail.

Au laboratoire IDEXX,

Pour nous avoir permis de réaliser les dosages de SDMA en temps et en heure.

Sincères remerciements pour votre aide dans ce travail et votre professionnalisme.

À ma famille,

Pour votre présence et votre soutien depuis toujours et en toutes circonstances. Avec tout mon amour et ma reconnaissance.

À Camille,

Pour tout ce que tu représentes pour moi. Tu étais là durant ces cinq années d'études qui n'auraient pas été si belles sans toi. Pensées à notre Marley. Je t'aime.

À mes amis,

Pour avoir rendu toutes ces années inoubliables, merci pour tous les bons comme les mauvais moments, ce n'est que le début.

Table des matières

<i>Liste des figures</i>	5
<i>Liste des tableaux</i>	9
<i>Liste des abréviations</i>	11
<i>Introduction</i>	13
<i>Première partie : Étude bibliographique</i>	15
I. MÉTABOLISME DES DIMÉTHYLARGININES	15
A. Description des molécules	15
1. Découverte	15
2. Description.....	16
a. Monométhylarginine (NMMA).....	16
b. Diméthylarginine asymétrique (ADMA)	16
c. Diméthylarginine symétrique (SDMA).....	16
B. Biochimie des diméthylarginines	17
1. Synthèse	17
a. Mise en évidence de l'activité méthyltransférase.....	17
b. La famille des protéines arginine méthyltransférases.....	19
2. Transport à travers la membrane plasmique	22
3. Élimination.....	23
a. Excrétion rénale.....	23
b. Métabolisation intracellulaire	24
C. Diméthylarginines et dysfonction endothéliale : interactions avec le métabolisme du monoxyde d'azote	30
1. Le monoxyde d'azote : synthèse et rôle dans l'organisme.....	30
a. Découverte et présentation de la molécule	30
b. Synthèse par la NO synthase	30
c. Rôles biologiques du NO	31
2. Diméthylarginines et dysfonction endothéliale.....	32
a. ADMA et dysfonction endothéliale	32
b. Conséquences cliniques	36
3. SDMA et dysfonction endothéliale	36
II. DIMÉTHYLARGININES ET CANCER	38
A. Rappels sur l'oncogénèse	38
B. Biochimie des diméthylarginines et cancer.....	40
1. Méthylation de l'arginine et cancer.....	41
a. Mise en évidence.....	41

b.	La dérégulation des PRMTs dans l'oncogenèse : mécanismes d'action	42
2.	DDAHs et cancer	45
C.	Monoxyde d'azote et cancer	46
D.	Conséquences cliniques et paracliniques du dérèglement du métabolisme des diméthylarginines dans le cancer	49
1.	Concentrations sanguines en diméthylarginines chez les individus atteints de cancers	49
2.	Dysfonction endothéliale chez les patients atteints de cancers.....	51
3.	Mortalité chez les patients atteints de cancers.....	54
E.	Implications thérapeutiques	56
1.	Lutter contre l'augmentation des concentrations plasmatiques en ADMA	56
2.	Les enzymes du métabolisme des diméthylarginines comme cibles thérapeutiques	57
F.	ADMA et SDMA : état des connaissances chez les carnivores domestiques.....	58
1.	Méthodes de dosage	58
a.	Méthodes de référence	58
b.	Dosages commercialisés par le laboratoire IDEXX ©	59
c.	Autres alternatives	60
2.	Utilisations pratiques du dosage des diméthylarginines chez les carnivores domestiques	61
a.	Évaluation de la fonction rénale.....	61
b.	Intérêt pronostic.....	63
c.	Diméthylarginines et cancer.....	65
G.	Présentation des différents cancers étudiés dans la partie expérimentale	67
1.	Les lymphomes canins	67
a.	Épidémiologie	67
b.	Principales formes de lymphomes canins et diagnostic.....	68
c.	Traitements	69
d.	Pronostic des chiens atteints de lymphome.....	71
2.	Les leucémies canines.....	72
a.	Épidémiologie	74
b.	Présentation et diagnostic des leucémies	74
c.	Traitements	75
d.	Pronostic des chiens atteints de leucémies.....	76
3.	Les hémangiosarcomes canins	77
a.	Épidémiologie	77
b.	Présentation et diagnostic des hémangiosarcomes.....	77
c.	Traitements	79
d.	Pronostic des chiens atteints d'hémangiosarcomes	80
	Deuxième partie : étude expérimentale.....	81
I.	Introduction	81
II.	Matériels et méthodes.....	82

A.	Animaux de l'étude	82
B.	Critères d'inclusion et d'exclusion.....	83
1.	Critères d'inclusion dans l'étude	83
2.	Critères d'exclusion et de non inclusion dans l'étude	83
C.	Protocole expérimental.....	84
1.	Prélèvements au diagnostic.....	84
2.	Méthodes de dosage	84
3.	Recueil des données	85
D.	Analyses statistiques	85
III.	Résultats	86
A.	Description de la population étudiée	86
1.	Répartition des différents lots	86
2.	Race	87
3.	Sexe.....	87
4.	Âge.....	88
5.	Poids	88
6.	Décès des chiens de l'étude.....	88
B.	Description du dosage de la SDMA chez les chiens inclus dans l'étude.....	89
1.	Lymphomes	89
2.	Hémangiosarcomes	89
3.	Leucémies.....	89
4.	Autres	89
C.	Créatininémie plasmatique de la population d'étude.....	91
D.	Comparaison de la concentration en SDMA au moment du diagnostic chez les individus inclus dans l'étude	92
1.	Comparaison entre les différents groupes	92
2.	Comparaison des chiens atteints de pathologies cancéreuses et les autres.....	93
3.	Autres comparaisons	93
a.	Comparaisons au sein du groupe lymphome	93
b.	Comparaisons au sein du groupe hémangiosarcome.....	93
c.	Comparaisons au sein du groupe « autres »	93
E.	Comparaison de la concentration en SDMA au moment du diagnostic chez les individus inclus dans l'étude	94
F.	Comparaison de la survie des individus inclus dans l'étude selon leur concentration en SDMA au moment du diagnostic	94
1.	Survie des chiens atteints d'hémopathies malignes.....	94
2.	Survie des chiens atteints d'hémangiosarcomes.....	96
IV.	Discussion	97
A.	Concentrations en SDMA chez les chiens atteints de cancers	97
1.	Concentrations en SDMA chez les chiens atteints de tous types de cancers	97

2.	Concentrations en SDMA chez les chiens atteints d'hémopathies malignes	98
3.	Concentrations en SDMA chez les chiens atteints d'hémangiosarcomes	100
a.	Dosage de la SDMA dans le cadre du diagnostic de l'hémangiosarcome	100
b.	Dosage de la SDMA dans le cadre du bilan d'extension des hémangiosarcomes	101
B.	Concentrations en SDMA et mortalité chez les chiens atteints de cancers	101
1.	Mortalité chez les chiens atteints d'hémopathies malignes	101
2.	Mortalité chez les chiens atteints d'hémangiosarcomes.....	102
C.	Limites de l'étude	103
	Conclusion.....	105
	Liste des références bibliographiques	107
	Annexe 1	117
	Annexe 2.....	118

Liste des figures

Figure 1 : Formules semi-développées de la L-arginine et de ses dérivés méthylés	17
Figure 2 : Méthylation des résidus d'arginine par les PRMTs.....	18
Figure 3 : Structure tertiaire d'un monomère de PRMT1	20
Figure 4 : Structures tertiaire (à droite) et quaternaire (à gauche) du complexe PRMT5:MEP50 (Antonyamy <i>et al.</i> , 2012).....	21
Figure 5 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA chez des patients sains et atteints de pathologies rénales	23
Figure 6 : Hydrolyse de l'ADMA par la DDAH.....	25
Figure 7 : Schématisation de la régulation de l'expression et de l'activité enzymatique des deux isoformes de la DDAH (Palm <i>et al.</i> , 2007)	26
Figure 8 : Comparaison des concentrations en dérivés méthylés de l'arginine chez des souris "wild type" et "knockout" pour AGTX2.....	27
Figure 9 : Biochimie des diméthylarginines	29
Figure 10 : Synthèse du NO par la NOS.....	31
Figure 11 : Formation d'un dérivé du NO en présence de L-arginine en fonction de la concentration en ADMA	33
Figure 12 : Physiopathologie de l'ADMA dans la dysfonction endothéliale (Palm <i>et al.</i> , 2007)	35
Figure 13 : Synthèse des actions de la SDMA sur l'endothélium (Schepers <i>et al.</i> , 2014).	37
Figure 14 : "The hallmarks of cancer" (Pecorino Lauren, 2016).....	39
Figure 15 : Schéma de la composition d'un tissu tumoral (Hanahan et Weinberg, 2011) .	40
Figure 16 : Immunohistochimie pour PRMT1 et PRMT6 dans des tissus sains de vessie et des tissus tumoraux de vessie.....	41
Figure 17 : Pluralité des actions des PRMTs sur l'oncogénèse (Jarrold et Davies, 2019)	44
Figure 18 : Implication du NO dans l'oncogénèse à l'échelle cellulaire, d'après Rizi <i>et al.</i> 2017.....	48
Figure 19 : Comparaison des concentrations sériques en ADMA chez des patients atteints de divers cancers comparés à des patients atteints de maladies non cancéreuses, d'après Yoshimatsu <i>et al.</i> 2011	50

Figure 20 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ADMA, SDMA et L-arginine à différentes étapes du protocole de chimiothérapie chez les patients atteints de LLA et un groupe contrôle (Doroszko <i>et al.</i> , 2016).....	52
Figure 21 : Évaluation de la fonction endothéliale chez des patients atteints de LLA à différentes étapes du protocole de chimiothérapie comparés à un groupe de personnes saines (Doroszko <i>et al.</i> , 2016)	53
Figure 22 : Courbes de Kaplan-Meier selon les concentrations plasmatiques en diméthylarginines chez des patients atteints d'hémopathies malignes (Chachaj <i>et al.</i> , 2018)	55
Figure 23 : Établissement d'une valeur de référence limite pour la SDMA canine (Rentko <i>et al.</i> , 2013).....	59
Figure 24 : Comparaison du dosage de la SDMA par le test Catalyst et par LC-MS chez le chien (Bilbrough <i>et al.</i> , 2018).....	60
Figure 25 : Comparaison du dosage de la ADMA par méthode ELISA et par CLHP chez l'Homme (Siroka <i>et al.</i> , 2007).....	61
Figure 26 : DFG en fonction de la concentration sérique en SDMA chez des chiens atteints de néphropathie congénitale (Nabity <i>et al.</i> , 2015)	62
Figure 27 : Influence de la masse corporelle sur les concentrations sériques en créatinine et SDMA chez le chien (Hall <i>et al.</i> , 2015)	63
Figure 28 : Classification IRIS pour la MRC chez les carnivores domestiques (d'après "IRIS Kidney - Guidelines - IRIS Staging of CKD")	63
Figure 29 : Concentration plasmatique en ADMA chez des chiens atteints de pancréatite aiguë comparé à un groupe contrôle et selon la sévérité clinique (Gori <i>et al.</i> , 2020).....	65
Figure 30 : Détail du protocole CHOP (Withrow <i>et al.</i> , 2012)	70
Figure 31 : Schéma de la myélopoïèse chez le chien	73
Figure 32 : Courbe de Kaplan-Meier pour différents chiens atteints de LMA (Davis <i>et al.</i> , 2018).....	76
Figure 33 : Diagrammes de type "boîte à moustaches" des concentrations sanguines en SDMA des chiens de l'étude du groupe lymphome, hémangiosarcome et autres	90
Figure 34 : Diagrammes de type "boîte à moustaches" des concentrations sanguines en créatinine des chiens de l'étude du groupe lymphome, hémangiosarcome et autres	91
Figure 35 : Courbes de Kaplan-Meier de l'analyse de survie des chiens atteints d'hémopathies malignes	95

Figure 36 : Courbes de Kaplan-Meier de l'analyse de survie des chiens atteints de lymphomes..... 96

Figure 37 : Courbes de Kaplan-Meier de l'analyse de survie des chiens atteints d'hémangiosarcomes..... 97

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des concentrations sériques en ADMA, SDMA et L-arginine chez des patients atteints d'hémopathies malignes et des personnes saines (Szuba et al. 2008)	49
Tableau 2 : Comparaison des concentrations plasmatiques en diméthylarginines chez des survivants de LLA et des personnes saines, d'après Sulicka et al. 2012	51
Tableau 3 : Concentrations plasmatiques en SDMA et créatinine chez 52 chiens atteints de lymphomes (Abrams-Ogg et al. 2017)	66
Tableau 4 : Répartition des chiens inclus dans l'étude en différents lots	86
Tableau 5 : Répartition des différentes races des chiens inclus dans l'étude	87
Tableau 6 : Âge moyen des chiens inclus dans l'étude en fonction de leur groupe	88
Tableau 7 : Poids moyens des chiens inclus dans l'étude en fonction de leur groupe	88
Tableau 8 : Nombre de chiens décédés et euthanasiés selon les différents groupes de l'étude.....	88
Tableau 9 : Dosage de la créatinine sérique chez les individus inclus dans l'étude.....	91
Tableau 10 : Procédures de comparaison multiple par paires (méthode de Dunn).....	92

Liste des abréviations

ADMA : Diméthylarginine asymétrique
SDMA : Diméthylarginine symétrique
NMMA : Monométhylarginine
PRMT : Protéine à arginine méthyltransférase
NO : Monoxyde d'azote
CHUVA : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort
SAM : S-adénosylméthionine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
CAT : Transporteur des acides aminés cationiques
MRC : Maladie rénale chronique
DDAH : Diméthylarginine diméthylaminohydrolase
DFG : Débit de filtration glomérulaire
AGTX2 : Alanine-glyoxylate aminotransférase 2
ROS : Composés réactifs de l'oxygène
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
IL : Interleukine
DMGV : Acide diméthylguanidino-valérique
NOS : Oxyde nitrique synthase
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FMN : Flavine mononucléotide
BH4 : Tétrahydrobioptérine
Treg : Lymphocyte T régulateur
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

LLA : Leucémie lymphoïde aiguë

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMA : Leucémie myéloïde aiguë

LNH : Lymphome non Hodgkinien

CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

L-MTP-PE : Muramyl tripeptide-phosphatidyléthanolamine encapsulé dans un liposome

ECVIM : Collège européen vétérinaire de médecine interne

ANOVA : Analyse de la variance

Introduction

Les diméthylarginines asymétrique (ADMA) et symétrique (SDMA) sont des dérivés méthylés de la L-arginine présents naturellement dans le plasma sanguin. Ces deux molécules sont synthétisées lors de la dégradation de protéines contenant des résidus d'arginines préalablement méthylés lors de processus de maturation post-traductionnels. La méthylation de l'arginine est réalisée par la famille des protéines arginines méthyltransférases (PRMT).

Les diméthylarginines font l'objet de recherches récentes du fait de leur lien avec le métabolisme du monoxyde d'azote (NO). Le NO représente à la fois un agent vaso-actif majeur responsable notamment du bon fonctionnement de l'endothélium et possède de multiples cibles dans l'organisme (système nerveux, immunitaire, cycle cellulaire...). L'ADMA est un inhibiteur compétitif de la NO synthase, des études tentent de comprendre l'implication et le rôle de la L-arginine et de ses métabolites dans différentes maladies et notamment en cancérologie.

Avec près de 45 % des causes de décès, le cancer apparaît comme la principale cause de mortalité chez les chiens de plus de dix ans (Davis et Ostrander, 2014). Avec l'augmentation de l'espérance de vie des animaux domestiques, ces dernières années, la découverte de maladies diagnostiquées classiquement chez des chiens âgés, telles que les néoplasies, est devenue de plus en plus fréquente. Les propriétaires étant davantage préoccupés par l'établissement rapide d'un diagnostic précis duquel s'ensuit la mise en place de traitements, la nécessité de développer des méthodes diagnostiques précises, fiables et dans la mesure du possible peu coûteuses, apparaît comme une requête urgente des cliniciens afin de répondre au mieux aux attentes des propriétaires. L'étude de la biologie cellulaire et moléculaire des cancers tente d'apporter des réponses à cette demande.

L'objectif de cette thèse est de déterminer s'il existe, chez le chien, un lien entre les concentrations plasmatiques en diméthylarginines, l'apparition de certaines maladies cancéreuses et la mortalité des patients. Si ce lien est aujourd'hui établi en médecine humaine pour un certain nombre de cancers, les données de médecine vétérinaire sur le sujet sont minces.

L'étude bibliographique de cette thèse présentera dans sa première partie la description du métabolisme des diméthylarginines et de leur intégration dans le métabolisme de la L-arginine et du monoxyde d'azote. Ensuite, la deuxième partie permettra de développer les relations qui existent entre ces voies métaboliques préalablement décrites et les processus tumoraux. La fin de cette deuxième partie permettra de décrire la place de l'utilisation des diméthylarginines en médecine vétérinaire ce jour, et de présenter les principaux types de cancers qui feront l'objet de l'étude expérimentale. Enfin, la partie expérimentale de cette

thèse permettra de présenter et discuter les résultats d'une étude prospective ayant pour ambition de décrire le lien qui existe entre les concentrations sanguines en diméthylarginines. En raison de la crise sanitaire, seul le dosage de SDMA a pu être réalisé dans les temps impartis à la réalisation de cette thèse, le dosage d'ADMA sera réalisé dans un second temps.

Première partie : Étude bibliographique

I. MÉTABOLISME DES DIMÉTHYLARGININES

A. Description des molécules

1. Découverte

En 1970, une étude sur l'isolement de huit nouveaux composés retrouvés dans des prélèvements urinaires de treize hommes sains est publiée (Kakimoto et Akazawa, 1970). Cette étude scinde les molécules découvertes en deux groupes, les hydroxylysines glycosylées et les dérivés de la lysine et de l'arginine. Ce dernier groupe contient notamment la guanido-N,N-diméthylarginine et la guanido-N,N'-diméthylarginine (ou N^G,N^G- et N^G,N'^G-diméthylarginine). Ces composés seront par la suite renommés respectivement diméthylarginine asymétrique (ADMA) et symétrique (SDMA). Leurs concentrations sont semblables d'un individu à l'autre dans cette étude. Ils montrent aussi que les concentrations urinaires en diméthylarginines sont supérieures à celle de l'arginine elle-même et qu'elles ne sont pas modifiées par l'administration orale d'arginine tandis que la concentration de cette dernière s'en trouve augmentée. Enfin, les concentrations urinaires en ADMA et SDMA ont été mesurées chez un unique individu ayant subi une diète sans protéines (amidon et glucose) pendant 32 heures. Celles-ci s'en sont trouvées non significativement modifiées tandis que la concentration en arginine a diminué de moitié. Face à cette absence d'influence de l'alimentation sur les concentrations urinaires en dérivés de l'arginine, Kakimoto et Akazawa émettent l'hypothèse d'une origine endogène.

Dans la même étude, Kakimoto et Akazawa exposent un résultat non publié obtenu par deux chercheurs, Nakajima et Matsuoka, travaillant dans le même laboratoire : une grande quantité de ADMA et SDMA est retrouvée dans la fraction protéique des hydrolysats d'organes de rats. En se rappelant qu'une administration orale d'arginine ne modifie pas les concentrations urinaires en diméthylarginines, il apparaît plus probable que la méthylation de l'arginine ait lieu sur les résidus d'arginine au sein des protéines plutôt que sur l'arginine libre. Cette hypothèse est aussi soutenue par le fait qu'une enzyme de méthylation de l'arginine au sein des histones a été décrite auparavant (Paik et Kim, 1968). Il est de plus décrit que les concentrations sériques de ces dérivés de l'arginine sont faibles comparées aux concentrations urinaires ; Il est donc suggéré que ces substances ne sont pas réabsorbées par les tubules rénaux et qu'elles sont peu réutilisées au sein de l'organisme. Enfin, ils émettent l'hypothèse que les concentrations urinaires en diméthylarginines pourraient être le reflet du degré de méthylation des protéines dans l'organisme et de leur catabolisme, une information potentiellement importante pour l'exploration de certaines maladies.

Un an plus tard, Nakajima, Matsuoka et Kakimoto ont isolé d'une part les diméthylarginines dans différents organes de rats et d'autre part un troisième dérivé méthylé de l'arginine : la N^G-monométhylarginine (NMMA) (Nakajima *et al.*, 1971).

L'arginine est un acide α aminé chargé positivement qui agit comme donneur de nombreuses liaisons hydrogènes (jusqu'à 5), et intervient dans les interactions avec les acides aminés aromatiques. Les deux atomes d'azote terminaux de la fonction guanidine de l'arginine peuvent recevoir un ou deux groupements méthyls lors de la maturation post-traductionnelle d'un polypeptide. (Gary et Clarke, 1998). Les différentes études présentées ci-dessus nous permettent de décrire les différents dérivés méthylés de l'arginine.

2. Description

a. Monométhylarginine (NMMA)

La NMMA possède pour formule brute $C_7H_{16}N_4O_2$ et pour masse molaire $188,231 \text{ g.mol}^{-1}$. Elle possède la même structure que l'arginine avec l'ajout d'un groupement méthyl sur le $-NH_2$ libre de sa fonction guanidine (figure 1).

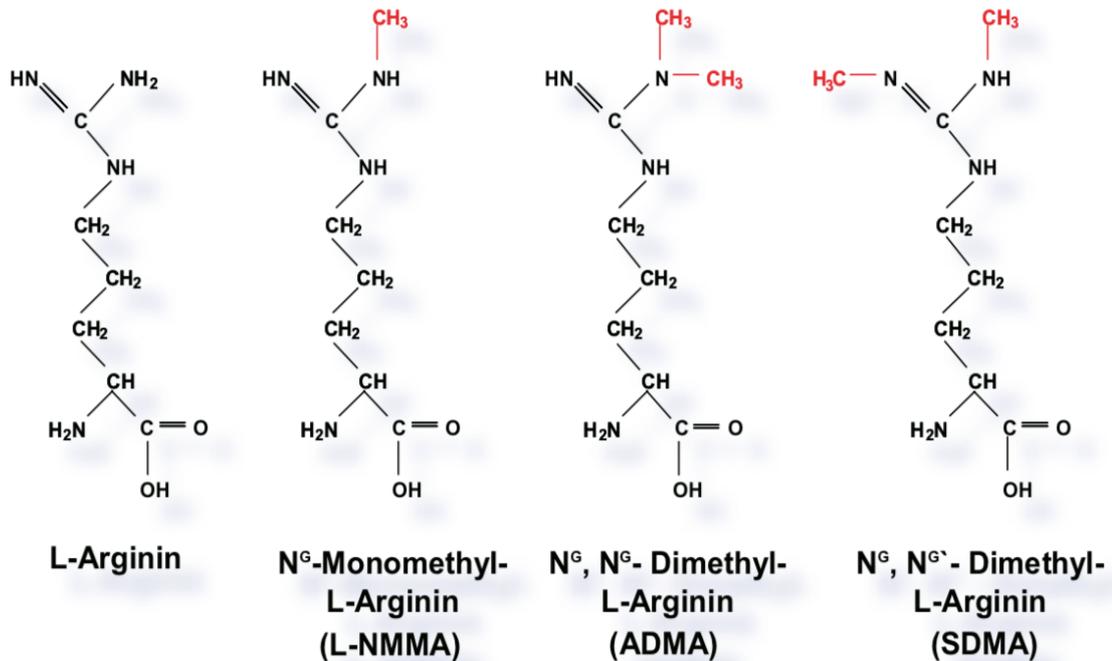
b. Diméthylarginine asymétrique (ADMA)

L'ADMA possède pour formule brute $C_8H_{18}N_4O_2$ et pour masse molaire $202,258 \text{ g.mol}^{-1}$. Elle possède deux groupements méthyls ajoutés au $-NH_2$ libre de la fonction guanidine de l'arginine (figure 1).

c. Diméthylarginine symétrique (SDMA)

La SDMA possède la même formule brute et par conséquent la même masse molaire que l'ADMA. Ce sont des isomères de constitution, plus précisément de position de fonction. À l'instar de l'ADMA, la SDMA possède deux groupements méthyls ajoutés sur deux sites différents : l'un sur le $-NH_2$ libre et l'autre sur le $=NH$ de la fonction guanidine de l'arginine (figure 1).

Figure 1 : Formules semi-développées de la L-arginine et de ses dérivés méthylés



Les groupements méthyls ajoutés sont représentés en rouge. Ainsi la deuxième méthylation est dite asymétrique si elle a lieu sur le même site azoté, elle est dite symétrique sinon (Böger, Rainer H., 2008).

B. Biochimie des diméthylarginines

1. Synthèse

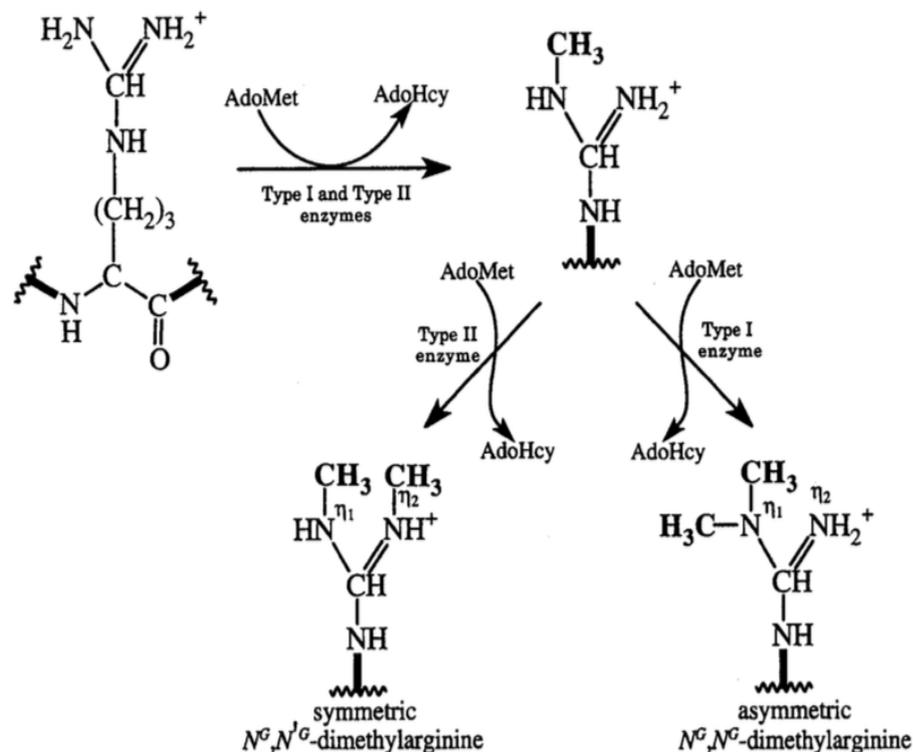
a. Mise en évidence de l'activité méthyltransférase

En 1968, Paik et Kim publient la première étude mettant en évidence l'existence d'une protéine à activité méthyltransférase sur un prélèvement de thymus de veau. Cette protéine est alors nommée « Protein methylase I ». Cette protéine utilise la S-adénosylméthionine (SAM) en tant que donneur de groupe méthyl. Ils observent alors que les histones sont les protéines les plus largement méthylées et parviennent à distinguer deux types de produits issus de cette méthylation. Ces deux produits sont nommés « Unknown I » et « Unknown II » (Paik et Kim, 1968).

Finalement, diverses techniques de chromatographies ont permis d'identifier de manière non-ambiguë les composés impliqués (Kakimoto, 1971). Les produits de la réaction mise en évidence par Paik et Kim sont la L-NMMA, la SDMA et l'ADMA. Le produit « Unknown I » a finalement été identifié comme étant un mixte d'ADMA et de SDMA (les méthodes alors utilisées étaient trop peu performantes pour distinguer ces deux isomères) et le produit « Unknown II », la L-NMMA.

Afin de mieux caractériser les protéines à activité méthyltransférase, de nombreuses études ont ensuite été conduites (Gary et Clarke, 1998). Il est rapidement apparu qu'il existait au minimum deux types d'enzymes à activité méthyltransférase et qu'elles admettaient des substrats différents. Les enzymes de cette famille sont appelées les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs). Il existe une classe d'enzyme de « type I » capable de catalyser la formation de L-NMMA puis d'ADMA et admettant pour substrat préférentiel les histones ainsi qu'une autre classe de « type II » capable de catalyser la formation de L-NMMA puis de SDMA et admettant pour substrat préférentiel la protéine basique de la myéline (MBP). Ces informations sont résumées dans la figure 2.

Figure 2 : Méthylation des résidus d'arginine par les PRMTs



Les PRMTs de type I et II catalysent l'addition d'un groupe méthyl provenant de la SAM sur un résidu d'arginine pour former la NMMA. La SAM devient alors la S-adénosylhomocystéine (SAH). Puis les PRMTs de type I effectuent une seconde méthylation sur le même site azoté selon le même modèle tandis que les PRMTs de type II effectuent la seconde méthylation sur un site azoté différent. La NMMA apparaît donc comme un intermédiaire dans la formation de l'ADMA et la SDMA (Gary et Clarke, 1998).

b. La famille des protéines arginine méthyltransférases

Cette famille de protéines contient aujourd'hui neuf enzymes différentes. Ces enzymes sont nommées PRMT1 à PRMT9. Certaines enzymes ont une activité méthyltransférase spontanée tandis que d'autres nécessitent des coenzymes pour exercer leur activité catalytique. Ce lien avec ces coenzymes peut être permanent ou transitoire, obligatoire ou facultatif (Bedford et Clarke, 2009).

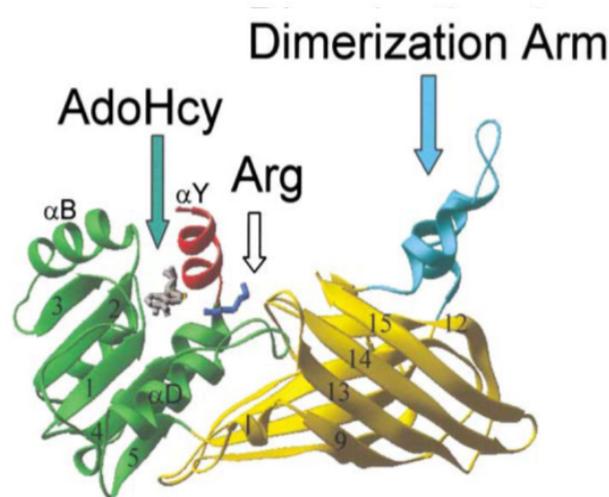
- **Les PRMTs de type I**

L'enzyme majoritaire des PRMTs de type I est la PRMT1. Il s'agit de la PRMT la plus active. Son importance biologique est telle qu'elle est à elle seule responsable d'environ 85 % de l'activité arginine méthyltransférase sur une lignée RAT1 de fibroblastes de souris ou dans un foie de souris (Tang *et al.*, 2000). De la même manière, des expériences de « full-body knockout » ont mis en évidence l'absence de développement embryonnaire lors de suppression de l'activité PRMT1 (Yu *et al.*, 2009), les cellules embryonnaires fibroblastiques de souris présentent un arrêt de prolifération et une instabilité génomique majeure. Ce résultat illustre par ailleurs l'importance biologique des phénomènes de méthylation.

La variété de substrat de cette enzyme est particulièrement large. Une préférence pour les résidus d'arginine entourés de résidus de glycine a été démontrée, en particulier pour les motifs RG et RGG (Thandapani *et al.*, 2013). Son activité co-activatrice de la transcription par méthylation d'histone est reconnue. PRMT1 agit également en méthylant des protéines se liant aux acides ribonucléiques (ARN) ou agissant dans la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Elle joue donc un rôle dans le métabolisme des ARNs et dans la stabilité du génome (Blanc et Richard, 2017).

La PRMT1 se retrouve *in vivo* sous forme d'homodimère. Cette homodimérisation est essentielle pour l'activité de l'enzyme. La structure tertiaire d'un monomère, représentée sur la figure 3, peut se diviser en quatre parties distinctes : une extrémité N-terminale, un site de liaison avec la SAM, un tonneau β et une zone de dimérisation (Zhang et Cheng, 2003).

Figure 3 : Structure tertiaire d'un monomère de PRMT1



On retrouve sur cette figure en rouge l'extrémité N-terminale, en vert le site de liaison avec la SAM – dans la protéine, un atome de soufre agit en tant qu'accepteur du groupe méthyl de la SAM - en jaune le tonneau β et en bleu la zone de dimérisation. Le site actif d'interaction avec les résidus d'arginine se trouve dans une poche profonde entre le site de liaison à la SAM et le tonneau β (Zhang et Cheng, 2003).

Deux autres enzymes à forte activité PRMT type I sont également décrites. Il s'agit des PRMT4 et 6, ces enzymes possèdent une spécificité de substrat plus étroite que la PRMT1. PRMT4 est également dénommée CARM1 pour « coactivator associated arginine methyltransferase 1 », cette enzyme possède un rôle de co-activation de la transcription par méthylation d'histones ou directement de facteurs de transcription. Elle joue également un rôle dans le métabolisme des ARN messagers, notamment l'épissage alternatif (Cheng *et al.*, 2007). La PRMT6 possède une localisation exclusivement nucléaire et méthyle un nombre de substrats restreint : des histones, l'ADN polymérase β ou encore la « protéine d'échafaudage nucléaire » HMGA1 (Bedford et Clarke, 2009).

Les enzymes PRMT3 et 8 sont deux PRMTs de type I minoritaires, dont les caractéristiques sont peu décrites. La PRMT3 a la spécificité de posséder un doigt de zinc dans sa structure tertiaire, elle interagit majoritairement avec des protéines ribosomales. PRMT8 est la seule enzyme de cette famille à avoir une localisation transmembranaire (Bedford et Clarke, 2009).

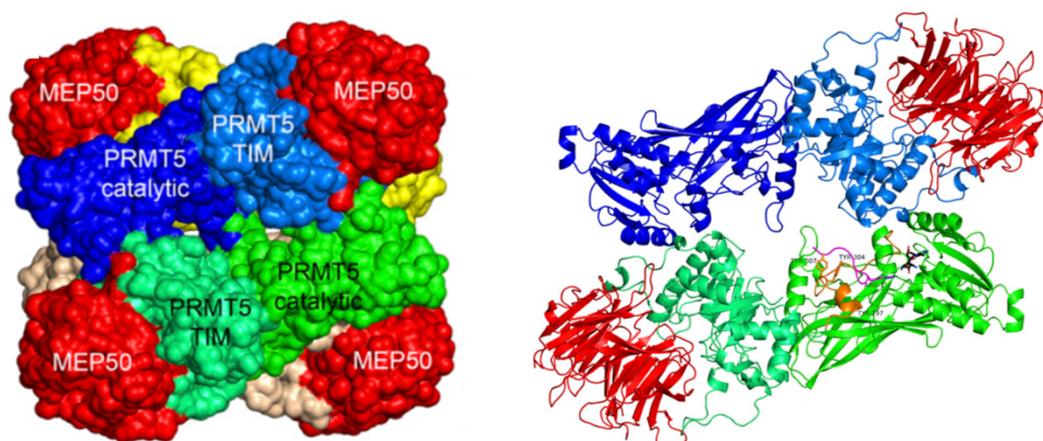
- **Les PRMTs de type II**

Tout comme PRMT1, PRMT5 est l'enzyme majoritaire de type II. À l'instar de son homologue de type I, un « full-body knockout » concernant le gène permettant l'expression de cette protéine entraîne une absence de développement embryonnaire (Tee *et al.*, 2010). En effet, l'activité de PRMT5 est cruciale dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires en tant que répresseur de la transcription de certains gènes de différenciation.

La PRMT5 possède une variété de substrat large. Son activité principale se concentre sur les histones, elle a une activité de corépresseur de la transcription. Elle possède également un rôle dans l'assemblage du spliceosome par méthylation des ribonucléoprotéines impliquées (Blanc et Richard, 2017).

Cette enzyme possède une structure *in vivo* quaternaire hétéro-octamérique, comme illustré dans la figure 4. Quatre monomères de PRMT5 s'associent avec quatre « protéines 50 du méthylosome » (MEP50) pour former l'enzyme active. Chaque monomère possède une structure tertiaire en deux parties : une extrémité N-terminale adoptant une structure de tonneau TIM et l'extrémité C-terminale représentant le site catalytique. Les MEP50 interagissent exclusivement avec les tonneaux TIM dans la structure quaternaire (Antonysamy *et al.*, 2012). Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans son mode d'action, la PRMT5 est distributive et non pas processive. En effet sa structure est de telle sorte qu'elle ne peut pas catalyser l'addition des deux groupements méthyls sans se détacher de son substrat entre ces deux étapes.

Figure 4 : Structures tertiaire (à droite) et quaternaire (à gauche) du complexe PRMT5:MEP50 (Antonysamy *et al.*, 2012)



Sont représentés sur la figure en rouge les MEP50, en bleu, vert, jaune et beige les monomères de PRMT5. Les codes couleurs sont conservés dans les deux parties de la figure. On peut ainsi observer les sites catalytiques en bleu foncé et vert feuillet tandis que les structures en tonneaux TIM apparaissent en bleu clair et vert turquoise.

La PRMT9 possède également une activité de type II. Elle possède néanmoins une spécificité de substrat très étroite. Cette enzyme méthyle la « spliceosome-associated protein 145 » pour réguler l'épissage alternatif (Y. Yang *et al.*, 2015).

Une fois l'activité méthyltransférase réalisée sur les résidus d'arginines, l'ADMA et la SDMA sont relâchées sous forme libre consécutivement à la dégradation non-spécifique des protéines dans lesquelles les résidus méthylés sont présents.

2. Transport à travers la membrane plasmique

Sous leur forme libre, les molécules d'ADMA et de SDMA peuvent avoir une action intracellulaire ou bien être transportées dans le sang. Ces molécules sont sous forme de cations au pH cellulaire, aussi elles ont besoin d'un système de transporteur transmembranaire pour traverser la membrane plasmique.

Le transport transmembranaire des acides aminés basiques tels que l'arginine, la lysine ou l'ornithine est facilité par deux systèmes de transport distincts. Ces systèmes sont nommés y^+ et y^+L (Teerlink, 2005). Le système y^+ gère le transport des acides aminés cationiques et possède pour effecteurs les transporteurs de la famille des CATs : « cationic amino acid transporters », tandis que le système y^+L permet le transport des acides aminés cationiques et neutres (Mann *et al.*, 2003). Ces transporteurs permettent un transport bidirectionnel des molécules. Les trois transporteurs les plus importants chez les mammifères sont CAT-1, CAT-2A et CAT-2B. CAT-1 est ubiquitaire et est exprimé dans tous les organes à l'exception du foie. À l'inverse, les deux autres transporteurs ont une expression plus restreinte. CAT-2A est exprimé principalement dans le foie : Il possède une faible affinité pour ses substrats et son rôle serait de capter le surplus d'acide aminés cationiques de la circulation porte. CAT-2B possède une expression inductible par des cytokines pro-inflammatoires. Il est exprimé dans beaucoup de tissus différents (Closs *et al.*, 1997a ; Teerlink *et al.*, 2009).

Il a ainsi été démontré que le système y^+ est capable de transporter l'ADMA et la SDMA à travers la membrane plasmique des cellules, notamment *via* l'action du transporteur CAT-2B (Closs *et al.*, 1997b). Plus récemment, il a également été montré que l'ADMA et la SDMA pouvaient être transportées par le transporteur CAT-1 (Strobel *et al.*, 2012). Les diméthylarginines ne possèdent donc aucun transporteur spécifique, décrit à ce jour. Elles empruntent les transporteurs des acides aminés cationiques. Ainsi dans certaines conditions pathologiques, le transport transmembranaire de ces molécules peut interagir et entrer en compétition avec le transport de ces acides aminés, notamment de la L-arginine.

3. Élimination

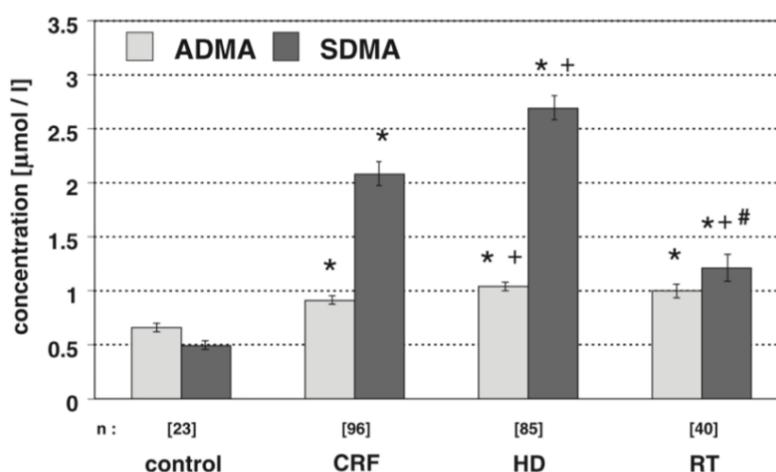
a. Excrétion rénale

Dès 1976, McDermott s'intéresse au devenir des diméthylarginines dans l'organisme des lapins. Un des constats établis dans cette étude est que la SDMA est retrouvée dans les urines de lapins dans des quantités environ 30 fois supérieures à l'ADMA (McDermott, 1976). Il en est déduit que l'ADMA doit subir une métabolisation pré-rénale importante.

En utilisant des isotopes radioactifs, Ogawa *et al.* étudient le catabolisme des diméthylarginines. Ils montrent alors que 75 % de la radioactivité provenant d'une certaine quantité de SDMA injectée se retrouve dans les urines récoltées dans les douze premières heures post-injection contre 13 % pour l'ADMA (Ogawa *et al.*, 1987).

En accord avec les études précédentes, Fleck *et al.* constatent que d'une part les concentrations plasmatiques en diméthylarginines sont basses chez des individus sains, et que d'autre part les concentrations plasmatiques en SDMA chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique sont quatre fois supérieures et 5,5 fois supérieures chez les patients en attente d'hémodialyse. De manière intéressante, les patients ayant subi une transplantation rénale ont des concentrations en SDMA environ deux fois supérieures par rapport au groupe témoin, ce qui est significativement moins élevé que les deux groupes précédemment cités. Ces résultats illustrent la dépendance de l'intégrité de la fonction rénale pour la clairance plasmatique en SDMA. En contraste, les concentrations plasmatiques en ADMA sont augmentées de 38 % chez les patients atteints de maladie rénale chronique (MRC) (Fleck *et al.*, 2003). Ces résultats sont illustrés par la figure 5.

Figure 5 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA chez des patients sains et atteints de pathologies rénales



Le diagramme présente de gauche à droite les concentrations d'ADMA et de SDMA d'individus sains, de patients avec maladie rénale chronique (CRF), en attente d'hémodialyse (HD) et ayant subi une transplantation rénale (RT) par rapport aux individus sains. *, $p < 0.05$ par rapport au groupe témoin; +, $p < 0.05$ par rapport aux groupe CRF (Fleck *et al.*, 2003).

Ces données illustrent les différences qui existent dans les voies d'élimination des deux diméthylarginines. En effet, on estime aujourd'hui que 80 à 90 % de la SDMA est éliminée par voie urinaire. L'évaluation de la concentration sérique de ce biomarqueur est particulièrement bien corrélée au débit de filtration glomérulaire (DFG), si bien que c'est le marqueur de la fonction rénale le plus fiable autant en médecine vétérinaire que médecine humaine (Kielstein *et al.*, 2006 ; Yerramilli *et al.*, 2016a). Les 10-20 % restants sont métabolisés (*cf.* I.B.3.b.). À l'inverse, il est estimé qu'environ 80 % de la clairance plasmatique en ADMA est réalisée liée au métabolisme (*cf.* I.B.3.b.) et que, par conséquent, seulement 20 % de l'ADMA est éliminée sous forme inchangée dans les urines (Achan *et al.*, 2003).

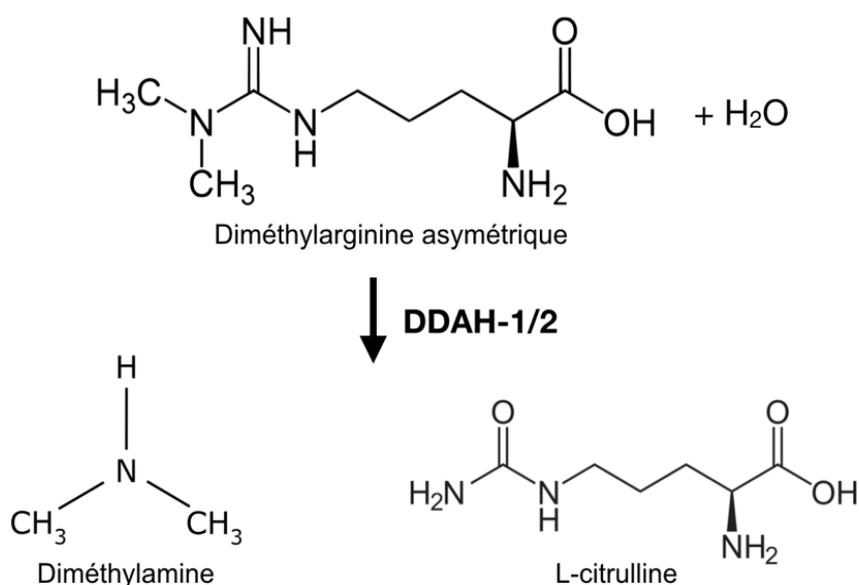
b. Métabolisation intracellulaire

À ce jour, trois enzymes différentes ont été identifiées comme responsables du métabolisme de l'ADMA : les diméthylarginine diméthylaminohydrolase-1 (DDAH-1) et -2 (DDAH-2) ainsi que l'alanine-glyoxylate aminotransférase 2 (AGTX2). À l'inverse des DDAH-1 et -2, l'AGTX2 peut métaboliser l'ADMA et la SDMA (Tain et Hsu, 2017).

- ***Les diméthylarginines diméthylaminohydrolases***

Ces deux enzymes sont les acteurs majoritaires de la dégradation de l'ADMA dans l'organisme, elles ont donc un rôle crucial dans la régulation du métabolisme de l'ADMA. Elles ne dégradent cependant pas la SDMA. La première description de son activité date de 1989 (Ogawa *et al.*, 1989). Il est alors mis en évidence que l'enzyme DDAH catalyse la dégradation par hydrolyse de l'ADMA pour former de la diméthylamine et de la L-citrulline, cette réaction est schématisée sur la figure 6.

Figure 6 : Hydrolyse de l'ADMA par la DDAH



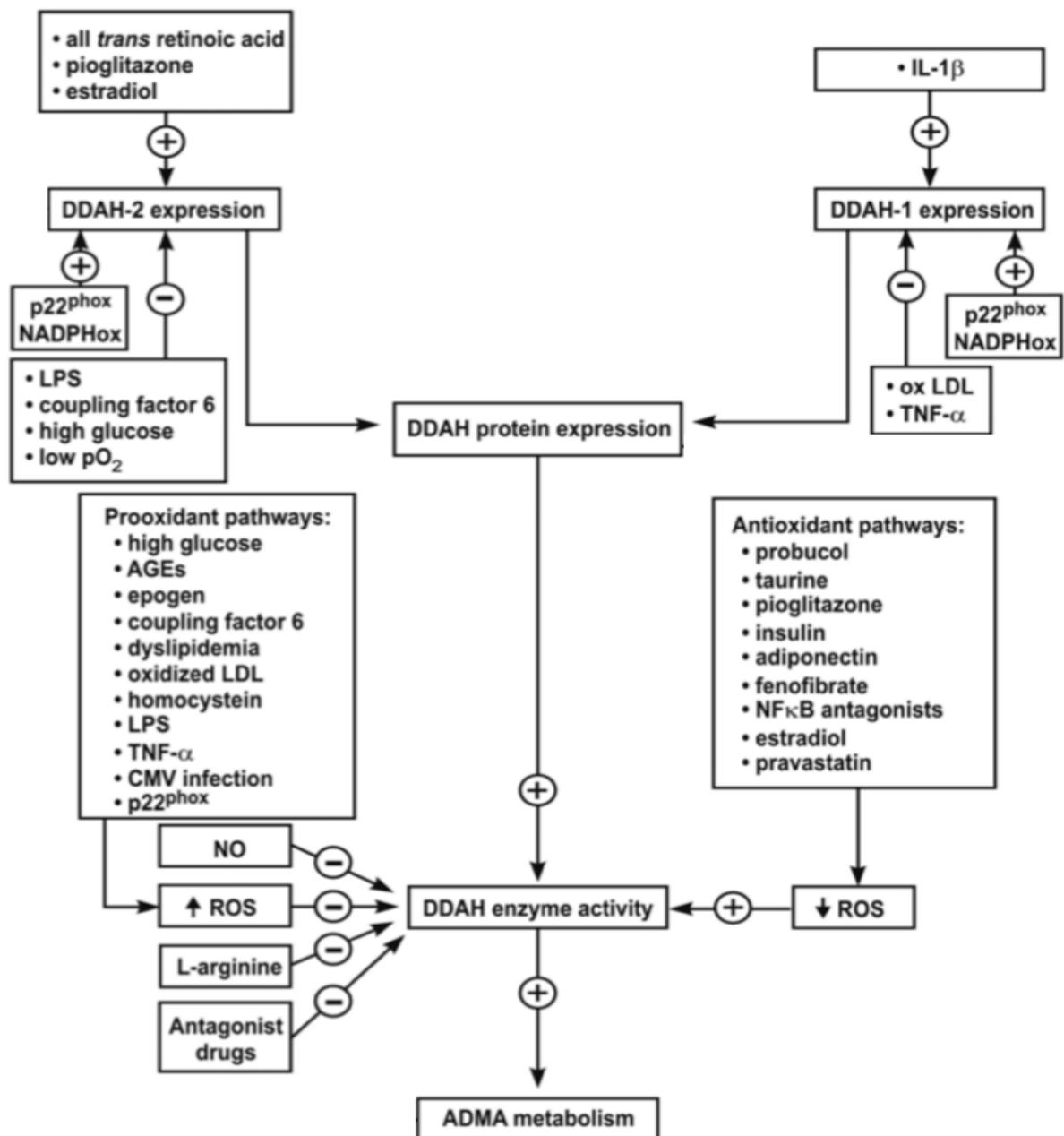
L'activité de l'enzyme est par ailleurs mise en évidence dans plusieurs tissus chez le rat, on la retrouve principalement dans les reins, le pancréas, le foie et le cerveau.

Rapidement, des travaux sur l'isolement de la DDAH humaine sont entrepris. Ces travaux montrent d'abord que la DDAH humaine et celles de mammifères de laboratoire sont identiques à 95 %. L'observation d'une dissociation entre le niveau d'expression de la DDAH et son activité a notamment permis de montrer que cette enzyme existe sous deux isoformes alors dénommées DDAH-1 et DDAH-2 (Leiper *et al.*, 1999). Cette étude montre également une différence dans la distribution tissulaire des deux isoformes : en corrélation avec les résultats observés par Ogawa *et al.*, la DDAH-1 est principalement exprimée dans les reins, le pancréas, le foie et le cerveau, et de manière moindre dans les muscles squelettiques. La DDAH-2 se retrouve majoritairement dans les reins, le cœur et le placenta. De plus faibles niveaux d'expression sont retrouvés dans le pancréas, les poumons et le foie. Pour aller plus loin, il est également montré que la DDAH-2, contrairement à la DDAH-1 est exprimée dans les cellules du système lympho-hématopoïétique (rate, thymus, leucocytes périphériques, nœuds lymphatiques et moelle osseuse). Enfin, l'isoforme DDAH-2 possède également des niveaux d'expression élevés dans les tissus fortement vascularisés car il est présent dans les endothéliums (Tran *et al.*, 2000). De manière intéressante, il est observé dans cette étude qu'il existe une expression conjointe de l'isoforme DDAH-1 et de l'isoforme neuronal de la monoxyde d'azote synthase (NOS) d'une part, et de la DDAH-2 et des isoformes endothélial ou inductible de la NOS.

La régulation de l'expression et de l'activité de ces enzymes est complexe. Concernant la régulation de l'activité des deux isoformes de DDAH, il semble que les composés réactifs de l'oxygène (ROS) puissent induire une baisse du niveau d'activité des deux DDAHs. À l'inverse les molécules anti-oxydantes l'augmentent (Palm *et al.*, 2007). Concernant la

régulation de l'expression de ces enzymes, l'interleukine- β 1 stimule l'expression de la DDAH-1 tandis que le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et la low density lipoprotein oxydée (oxLDL) l'inhibent. Concernant la DDAH-2, les dérivés de la vitamine A, l'œstradiol et la pioglitazone stimulent son expression tandis que les lipopolysaccharides, le coupling factor-6 et l'hyperglycémie l'inhibent. Ces informations sont synthétisées dans la figure 7.

Figure 7 : Schématisation de la régulation de l'expression et de l'activité enzymatique des deux isoformes de la DDAH (Palm *et al.*, 2007)



Les DDAHs, en tant qu'enzymes majoritaires de dégradation de l'ADMA, jouent donc un rôle déterminant dans le métabolisme de l'ADMA et dans la régulation de sa concentration

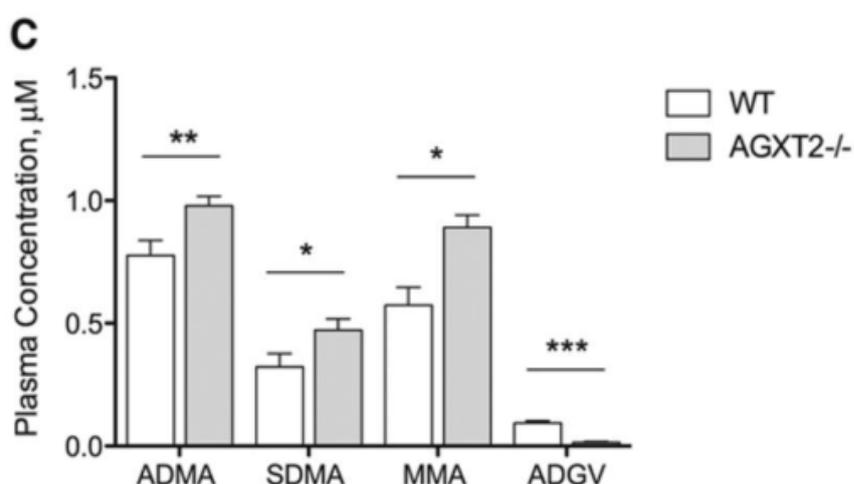
dans le plasma sanguin mais aussi localement au niveau de différents organes ou encore des endothéliums.

- **L'alanine-glyoxylate aminotransférase 2**

L'AGTX2 est capable de métaboliser l'ADMA et la SDMA. L'activité de cette enzyme fut décrite pour la première fois en 1990 (Ogawa *et al.*, 1990). L'AGTX2 catalyse la transamination de l'ADMA ou de la SDMA au glyoxylate pour donner de l'acide α -keto- δ -(N^G, N^G -diméthylguanidino)-valérique (DMGV ou DM'GV si la SDMA est métabolisée). Son action se concentre principalement dans les reins et dans le foie. C'est une enzyme mitochondriale.

Bien que son activité *in vivo* ne soit plus à démontrer (Caplin *et al.*, 2012), l'importance de cette enzyme dans le métabolisme des diméthylarginines est sujet à controverse. Il est montré dans cette étude que des souris « knockout » pour le gène exprimant l'AGTX2 voient leurs concentrations plasmatiques en diméthylarginine significativement augmentées comme illustré dans la figure 8.

Figure 8 : Comparaison des concentrations en dérivés méthylés de l'arginine chez des souris "wild type" et "knockout" pour AGTX2



Les concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA sont significativement plus élevées chez les souris « knockout » pour AGTX2. Par ailleurs, l'ADGV correspondant au DMGV n'est retrouvée que chez les souris « wild type » (Caplin *et al.*, 2012).

Dans une autre étude, des souris reçoivent des injections intrapéritonéales d'ADMA à haute dose ou de solution isotonique saline tous les jours pendant trois jours puis, la moitié d'entre elles subissent une néphrectomie bilatérale 24 heures avant la fin des injections (Rodionov *et al.*, 2014). Cette étude montre que les souris ayant subi une néphrectomie bilatérale avec

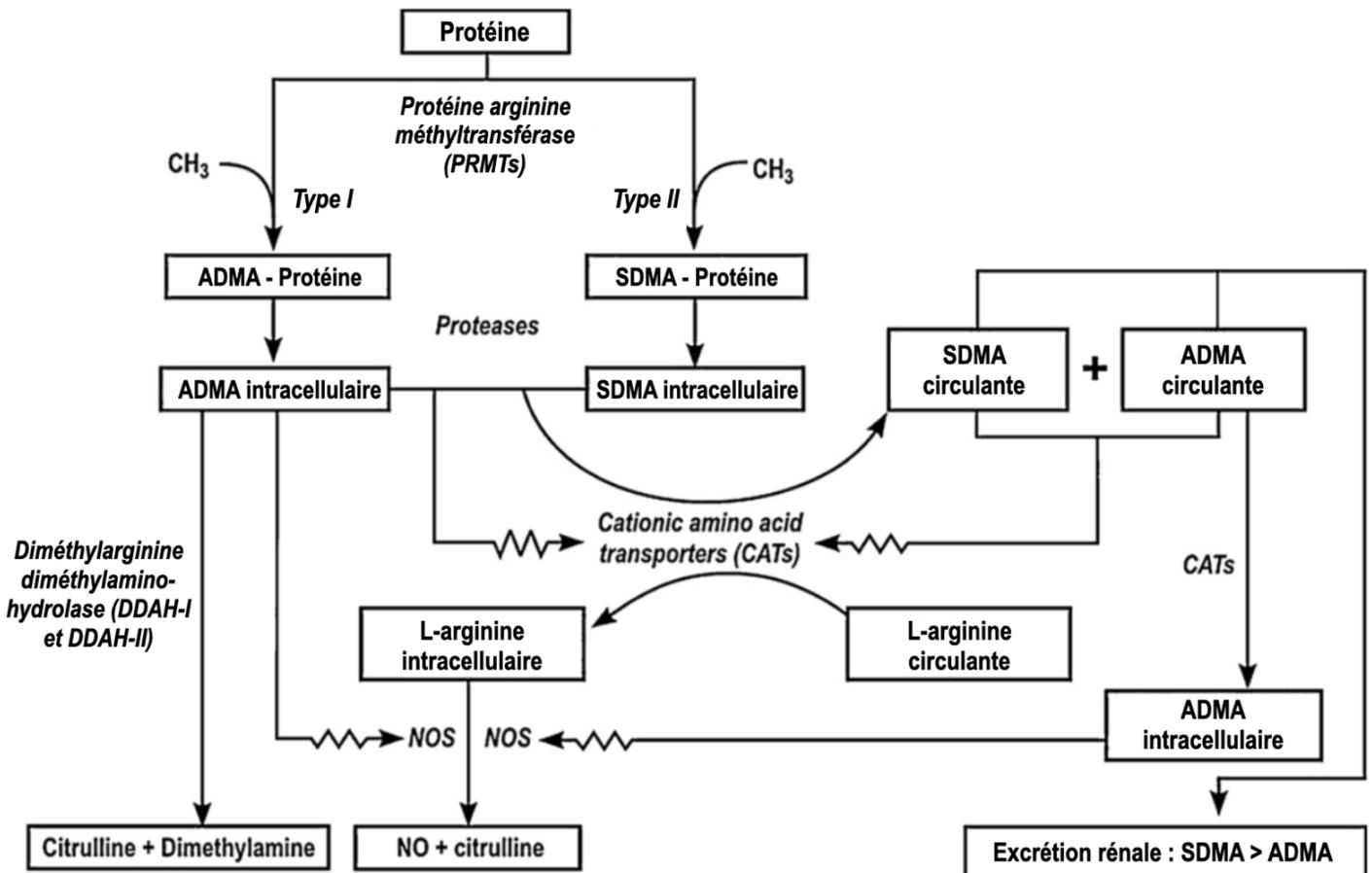
injections de solution saline voient leur concentration plasmatique en ADMA inchangée et leur concentration plasmatique en DMGV grandement augmentée. Cette augmentation est majorée chez les souris ayant subi une néphrectomie bilatérale et des injections d'ADMA : elle est jusqu'à 32 fois supérieure.

Parallèlement, la SDMA était quatre fois augmentée chez les souris ayant subi des injections de solution saline et une néphrectomie bilatérale. Par ailleurs, le niveau d'activité de l'AGTX2 observé dans les différents cas n'est jamais augmenté. Cette étude montre ainsi que l'activité constitutive de l'AGTX2 peut, en concert avec l'activité des DDAHs, participer à maintenir la concentration plasmatique en ADMA dans les normes. Elle montre également que, bien que la SDMA en soit un substrat, l'intégrité du débit de filtration glomérulaire est cruciale pour maintenir une concentration plasmatique en SDMA dans les normes.

Ainsi, bien que le rôle de cette enzyme dans le métabolisme des diméthylarginines ne soit pas entièrement compris et décrit, il semble qu'elle participe à la régulation de leurs concentrations dans l'organisme.

La synthèse de la formation et du devenir des diméthylarginines dans l'organisme est résumé dans la figure 9.

Figure 9 : Biochimie des diméthylarginines



Comme vu précédemment, les diméthylarginines proviennent de la dégradation de protéines contenant des résidus d'arginine méthylés. Cette méthylation peut être asymétrique ou symétrique et est réalisée par les PRMTs respectivement de type I et II. L'ADMA intracellulaire peut par la suite être métabolisée par les DDAHs et les deux diméthylarginines intracellulaires peuvent être prises en charge par l'AGTX2 (n'apparaît pas sur le schéma). L'ADMA et la SDMA peuvent ensuite passer sous forme circulante dans le sang via des transporteurs transmembranaires d'acides aminés cationiques (CATs). Enfin une fois dans le sang, elles peuvent être reprises en charge dans une cellule pour métabolisation, ou subir une excrétion rénale par les urines (Teerlink et al., 2009). Dans ce schéma, on peut observer que l'ADMA peut interagir avec le métabolisme de la L-arginine et du monoxyde d'azote.

C. Diméthylarginines et dysfonction endothéliale : interactions avec le métabolisme du monoxyde d'azote

1. Le monoxyde d'azote : synthèse et rôle dans l'organisme

a. Découverte et présentation de la molécule

Le monoxyde d'azote (NO) est décrit pour la première fois par deux équipes de recherche simultanément en 1987 (Ignarro *et al.*, 1987 ; Palmer *et al.*, 1987). Ils l'identifient alors comme le « facteur relaxant d'origine endothéliale », une molécule inconnue produite par l'endothélium et causant une vasodilatation locale des artères et des veines (Furchgott et Zawadzki, 1980).

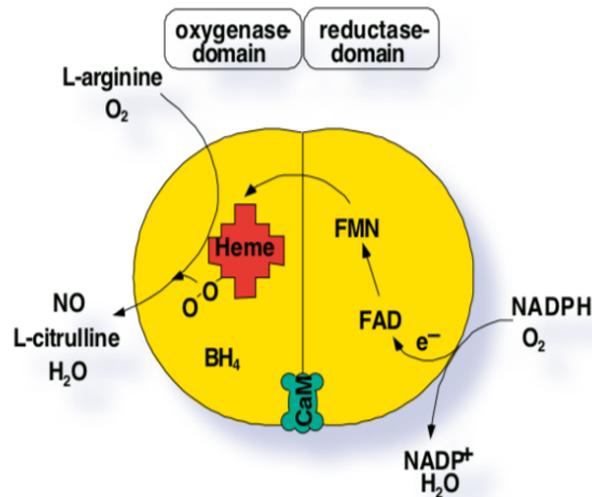
Le monoxyde d'azote est un gaz. Il possède une structure diatomique simple. Sa formule brute est NO. Elle est composée d'un atome d'azote relié à un atome d'oxygène par une double liaison. La demi-vie de cette molécule dans le sang n'est que de quelques secondes (Garcia et Stein, 2006).

b. Synthèse par la NO synthase

La synthèse du NO est catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS), une oxydo-réductase, à partir de la L-arginine selon la réaction suivante : $2 \text{ L-arginine} + 3 \text{ NADPH} + 3 \text{ H}^+ + 4 \text{ O}_2 \rightarrow 2 \text{ L-citrulline} + 2 \text{ NO} + 3 \text{ NADP}^+ + 4 \text{ H}_2\text{O}$.

La forme quaternaire de la NOS est un hétéro-tétramère composée de deux monomères de l'enzyme associés à deux monomères de calmodulines. Globalement, un monomère de la NOS est composé d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase pour catalyser la réaction d'oxydo-réduction. Ces composés nécessitent certaines coenzymes : la tétrahydrobioptérine (BH₄), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), les flavines adénine dinucléotide et mononucléotide (FAD et FMN) et un hème (Alderton *et al.*, 2001). La réalisation de cette réaction est schématisée sur la figure 10.

Figure 10 : Synthèse du NO par la NOS



Les électrons sont donnés par le NADPH dans le domaine réductase. Ils transitent via le FAD et le FMN jusqu'au domaine oxygénase. Ils interagissent ensuite avec l'hème et le BH₄ au niveau du site actif pour catalyser la réaction d'oxygénation de la L-arginine et donner de la L-citrulline et du NO (Böger, Rainer H., 2008).

La NOS reconnaît au moins trois isoformes distinctes : l'isoforme neuronale (nNOS), l'isoforme endothéliale (eNOS) et l'isoforme inducible (iNOS) (Wang et Marsden, 1995). Ces différentes isoformes tiennent leurs noms du tissu dans lequel elles ont été initialement identifiées mais leur distribution dans l'organisme est plus complexe. La nNOS et la iNOS semblent avoir une distribution tissulaire très large, tandis que la eNOS possède une distribution restreinte aux endothéliums. Il est également intéressant de considérer que la nNOS et la eNOS sont synthétisées de manière constitutive, bien que leurs synthèses nécessitent l'intégrité de la voie de signalisation du complexe Ca²⁺/Calmoduline, alors que la iNOS possède une synthèse inducible. Ce sont les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'interféron γ ou encore les lipopolysaccharides qui induisent la synthèse de cette isoforme.

c. Rôles biologiques du NO

Étant donné sa courte demi-vie, le NO ne peut être envisagé qu'en tant qu'acteur paracrine des lieux où il est synthétisé. Son action repose sur une activation de la guanylate cyclase suivie d'une transduction intracellulaire du signal émis, initiée par une augmentation intracellulaire de la concentration en guanosine monophosphate cyclique (Russwurm et Koesling, 2004).

Son rôle le plus important est celui du maintien d'un tonus vasodilatateur. La découverte de cette propriété a notamment été récompensée d'un prix Nobel (Furchgott et Zawadzki, 1980). Cependant le NO possède de nombreuses cibles biologiques : le NO est ainsi produit

notamment par les endothéliums sains et y agit non seulement comme agent vasodilatateur mais également comme antiagrégant plaquettaire. Il limite aussi l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et inhibe la prolifération des muscles lisses de la paroi des endothéliums (Garcia et Stein, 2006). Enfin il inhibe l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). Ces différents rôles au sein de l'endothélium lui ont valu le surnom de « molécule endogène anti-athérosclérose ».

Dans le système nerveux central et périphérique, le NO joue un rôle dans la communication intercellulaire. Le NO possède globalement des propriétés pro-inflammatoires par activation du NF- κ B, il possède également des propriétés anti-infectieuses par formation d'espèces réactives de l'azote comme le peroxy-nitrite (ONOO⁻). L'établissement d'un environnement pro-oxydant peut avoir des effets cependant délétères sur le long terme (Bauer et Sotniková, 2010). Le NO semble de surcroît jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose. Cependant ces effets ne font pas encore l'objet d'un consensus au sein de la communauté scientifique.

Ainsi, le NO est une molécule indispensable au fonctionnement de l'endothélium, et une dysrégulation de sa synthèse engendre une dysfonction endothéliale. L'ADMA étant un inhibiteur compétitif de la NOS et la SDMA pouvant également interagir dans le métabolisme du NO, ces deux molécules peuvent perturber les voies de signalisation du NO et ainsi entraîner une altération de la endothéliale.

2. Diméthylarginines et dysfonction endothéliale

a. ADMA et dysfonction endothéliale

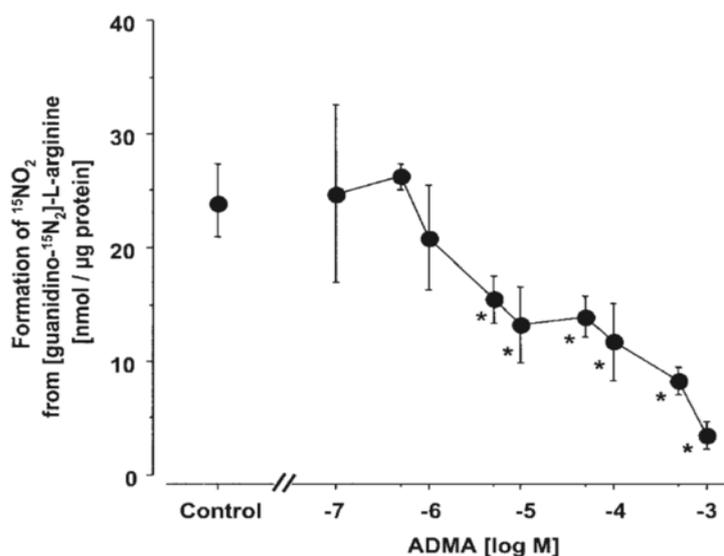
- ***Physiopathologie***

La dysfonction endothéliale se caractérise par un mauvais fonctionnement des endothéliums, se manifestant notamment par une atténuation de la réponse dilatatrice aux *stimuli* qui agissent en libérant du NO ou autres facteurs vasodilatateurs au niveau des endothéliums (Schini-Kerth, 2012).

En 1992, une étude montre que chez des patients atteints de maladie rénale chronique, de l'ADMA s'accumule dans leur plasma jusqu'à atteindre des concentrations pouvant inhiber la synthèse de NO (Vallance *et al.*, 1992 ; Leone *et al.*, 1992).

Plusieurs études confirment cette découverte. L'ADMA est un inhibiteur de la NOS *in vitro* et *in vivo*. Comme montré sur la figure 11, dans des cellules endothéliales humaines, l'ADMA inhibe la formation de ¹⁵NO à partir de L-[¹⁵N₂]-arginine de manière concentration-dépendante (Böger Rainer H. *et al.*, 2000).

Figure 11 : Formation d'un dérivé du NO en présence de L-arginine en fonction de la concentration en ADMA



Conversion du [guanidino- $^{15}\text{N}_2$]-L-arginine au ^{15}N - nitrite (un marqueur d'activité de la NOS) par des cellules endothéliales humaines en absence et en présence d'ADMA (Böger Rainer H. *et al.*, 2000).

Ainsi, l'ADMA est décrit comme un inhibiteur compétitif des isoformes de la NOS. En prenant la place de la L-arginine au niveau du site actif de l'enzyme, l'ADMA inhibe son fonctionnement et diminue la production *in situ* de NO. La conséquence directe de cette diminution de production de NO est un dysfonctionnement de l'endothélium avec une diminution de l'activité vasodilatatrice des artères et artéioles, une hyper-aggrégabilité plaquettaire ou encore une augmentation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Böger, 2005). En ce sens, l'ADMA est désignée comme une molécule pro-athérogène.

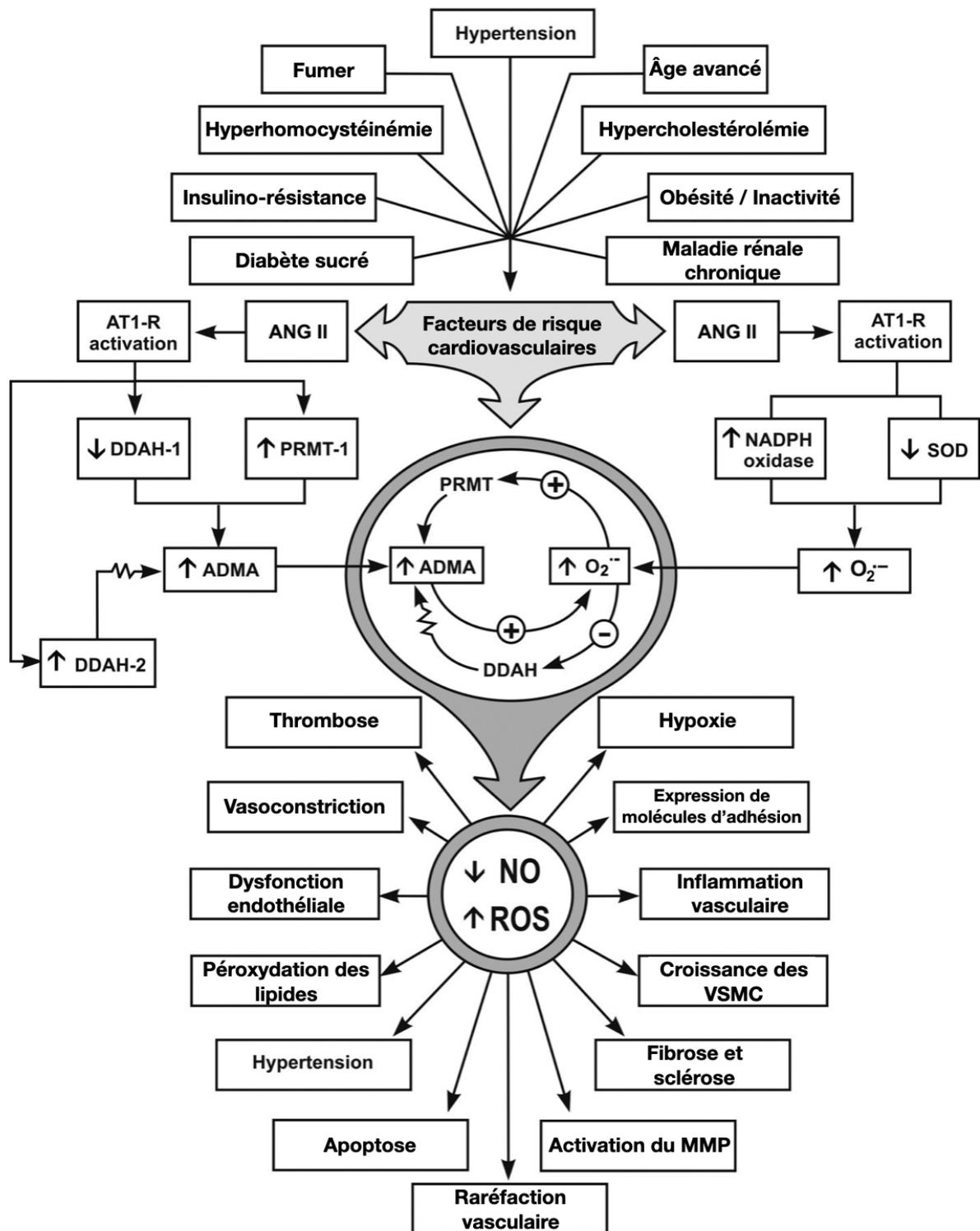
Plusieurs études tendent donc à montrer le rôle de l'ADMA dans le dysfonctionnement endothélial et dans la physiopathologie des accidents cardiovasculaires dans plusieurs maladies. Des injections intraveineuses d'ADMA chez des patients sains entraînent une réduction du débit cardiaque et une augmentation des résistances vasculaires (Kielstein *et al.*, 2004). De manière similaire, des souris « knockout » pour le gène codant la DDAH-1 montrent des concentrations plasmatiques en ADMA environ 20 % supérieures et des signes de dysfonction endothéliale associés à une augmentation des résistances vasculaires et de l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire (Leiper *et al.*, 2007).

Rappelons que la DDAH est une enzyme intracellulaire qui catabolise la ADMA en diméthylamine et L-citrulline, elle est responsable de la majeure partie de l'élimination de la ADMA. Il est intéressant de noter que la DDAH est une enzyme clé dans la synthèse du NO : par exemple, il est montré que les lieux d'expression de la DDAH et de la NOS coïncident. Plus précisément, l'expression de la DDAH-1 est corrélée à celle de la nNOS tandis que l'expression de la DDAH-2 est associée à l'expression des eNOS et iNOS (Leiper

et al., 1999). Des exceptions existent néanmoins, notamment dans la distribution de ces enzymes au sein du rein. Le rôle des DDAHs dans le bon fonctionnement des endothéliums semble donc crucial. Des expériences d'inhibition sélective montrent d'ailleurs qu'elles possèdent des effets différents : la DDAH-1 serait responsable de l'absence d'élévation de la concentration plasmatique en ADMA tandis que la DDAH-2 aurait un rôle plus local au niveau des endothéliums. Son inhibition sélective résulte en une dysfonction endothéliale sans élévation de la concentration plasmatique en ADMA. La dysrégulation des DDAHs a été démontrée dans la plupart des maladies où la concentration plasmatique en ADMA est augmentée (Palm *et al.*, 2007).

De plus, des études montrent qu'en plus d'inhiber la synthèse de NO, le découplage de la NOS par l'ADMA résulte en une augmentation de la synthèse de ROS (Böger *et al.*, 2000 ; Patschan *et al.*, 2006). Ceci participe de surcroît, *via* le stress oxydatif engendré, au dysfonctionnement endothélial mais aussi, *via* l'inhibition de l'activité des DDAHs, accentue l'action locale de l'ADMA sur la NOS et l'endothélium. Les éléments de la physiopathologie de la dysfonction endothéliale par la voie de l'ADMA-NOS-DDAH sont résumés dans la figure 12.

Figure 12 : Physiopathologie de l'ADMA dans la dysfonction endothéliale (Palm et al., 2007)



L'interaction entre ces voies métaboliques et l'angiotensine II (ANG II) n'a pas été détaillée plus haut. L'action de l'ANG II se surajoute à celui de l'ADMA en diminuant l'activité des DDAHs et en promouvant la synthèse de ROS. AT1-R = Récepteur à l'angiotensine 1. SOD = Superoxide dismutase. MMP = matrix metalloproteinase. VSMC = vascular smooth muscle cell (Palm et al., 2007).

b. Conséquences cliniques

Ainsi, une élévation de la concentration plasmatique en ADMA a été observée dans plusieurs maladies cardiovasculaires ou métaboliques associées à des dysfonctionnements de l'endothélium : hypertension artérielle, hypercholestérolémie, diabète sucré, insuffisance cardiaque et insuffisance rénale (Böger, 2005). Le lien entre ces maladies et la physiopathologie au niveau cardiovasculaire de l'ADMA mais aussi de la SDMA a alors rapidement émergé et beaucoup d'études cliniques désignent les diméthylarginines comme des facteurs de risque d'évènements cardiovasculaires. Un précurseur fut Zocalli qui montra que l'ADMA pouvait être retenue comme un facteur de risque de survenue de maladies cardiovasculaires chez des individus atteints de maladie rénale chronique de stade terminal (Zocalli *et al.*, 2001). Plus largement, une méta-analyse de 2016 s'appuyant sur de nombreuses études cliniques prospectives désigne non seulement l'ADMA mais aussi la SDMA comme des facteurs de risque indépendants de toute cause de mortalité et d'accidents cardiovasculaires (Schlesinger *et al.*, 2016).

3. SDMA et dysfonction endothéliale

À l'inverse de l'ADMA, la SDMA n'est pas un inhibiteur compétitif de la NOS. À tort, elle a longtemps été considérée comme une molécule inerte dont la concentration plasmatique représente uniquement un marqueur fiable de la fonction rénale.

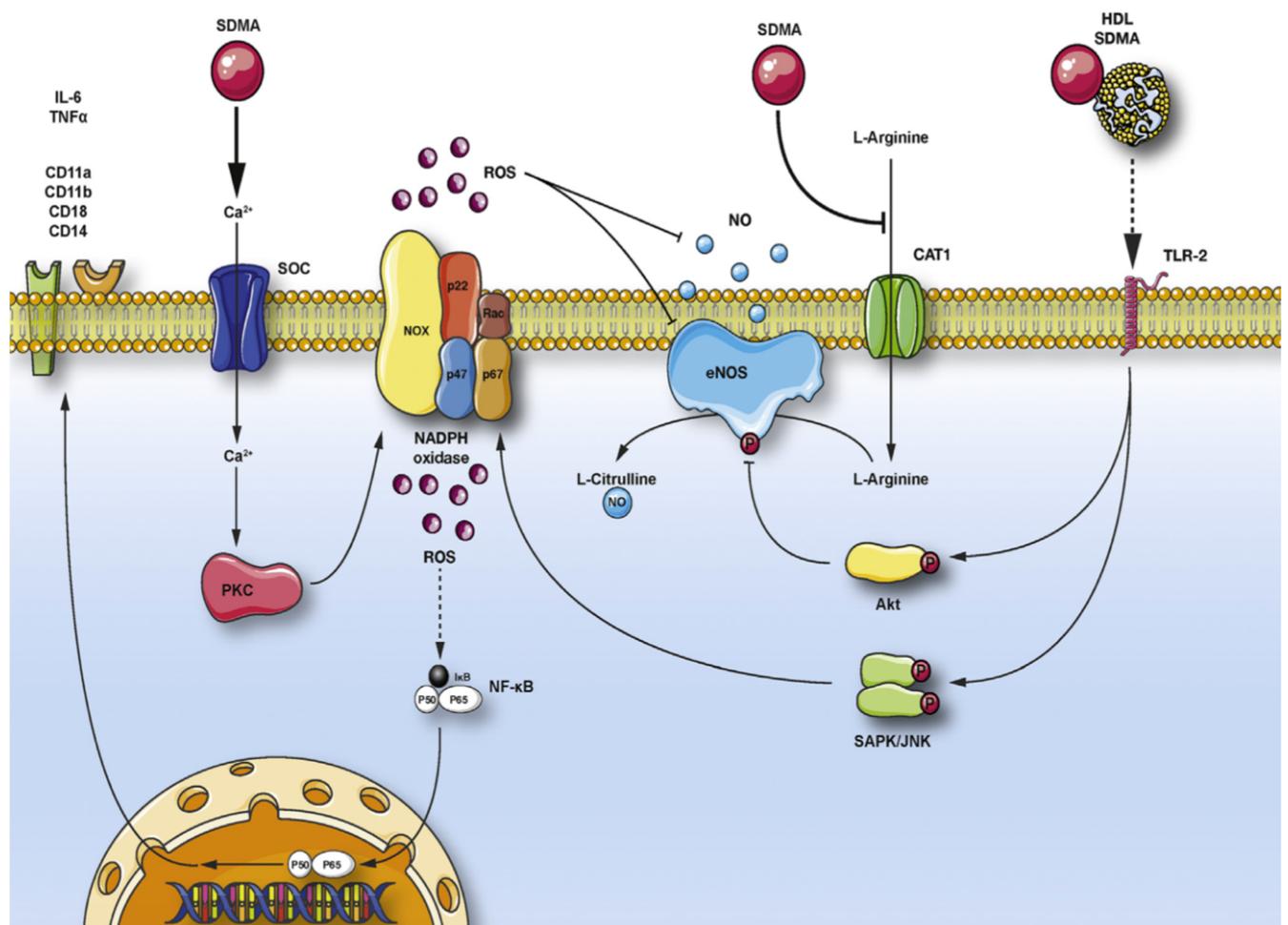
Pourtant, de récentes études montrent que la SDMA joue elle aussi un rôle dans le dysfonctionnement endothélial en agissant, de manière plus indirecte, sur la synthèse de NO. En 2006, une première étude a montré un effet dose-dépendant d'inhibition *in vitro* de la synthèse de NO en présence de SDMA sur des cellules endothéliales (Bode-Böger *et al.*, 2006). Il est également montré que l'incubation des cellules endothéliales par la SDMA induit une augmentation de la production de ROS par ces dernières. Ce mécanisme est mal connu mais pourrait provenir d'une interaction de la SDMA avec des canaux calciques. Il existe également une interaction entre la SDMA et les « high density lipoproteins » : Un complexe peut s'établir entre ces deux entités et causer, *via* un récepteur, une augmentation de la production de ROS (Schepers *et al.*, 2014). Comme vu précédemment, cette augmentation de synthèse des ROS peut être à l'origine de la diminution de la synthèse et de la biodisponibilité du NO. De plus, il avait également été évoqué précédemment que la SDMA interfère avec le transport transmembranaire et la réabsorption rénale de la L-arginine (Closs *et al.*, 1997b ; Tojo *et al.*, 1997). En effet la SDMA, en empruntant le système y+ de transport des acides aminés cationiques, peut entrer en compétition avec la L-arginine pour non seulement sa capture cellulaire mais aussi sa réabsorption rénale au sein de l'anse de Henlé. En réduisant l'utilisation de la L-arginine, la SDMA interfère indirectement avec la synthèse de NO.

La SDMA possède également des propriétés pro-inflammatoires. D'une part, elle agit directement sur les effecteurs de l'inflammation : elle est capable de promouvoir l'action du

N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine dans les monocytes et les granulocytes, ce qui a pour conséquence une activation de ces derniers. De plus, elle est à l'origine de l'expression de différents clusters de différenciation sur la membrane de ces cellules. La SDMA promeut donc la différenciation, l'activation des leucocytes et leur adhésion à l'endothélium (Schepers *et al.*, 2014). D'autre part, la SDMA est capable d'induire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF- α .

Les mécanismes par lesquels la SDMA est responsable de dysfonction endothéliale par diminution de la synthèse de NO et promotion de la synthèse de ROS ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, bien que l'ADMA et la SDMA soient deux molécules structurellement proches, leurs actions endogènes sont bien différentes. La synthèse des actions de la SDMA sur l'endothélium est présentée dans la figure 13.

Figure 13 : Synthèse des actions de la SDMA sur l'endothélium (Schepers *et al.*, 2014).



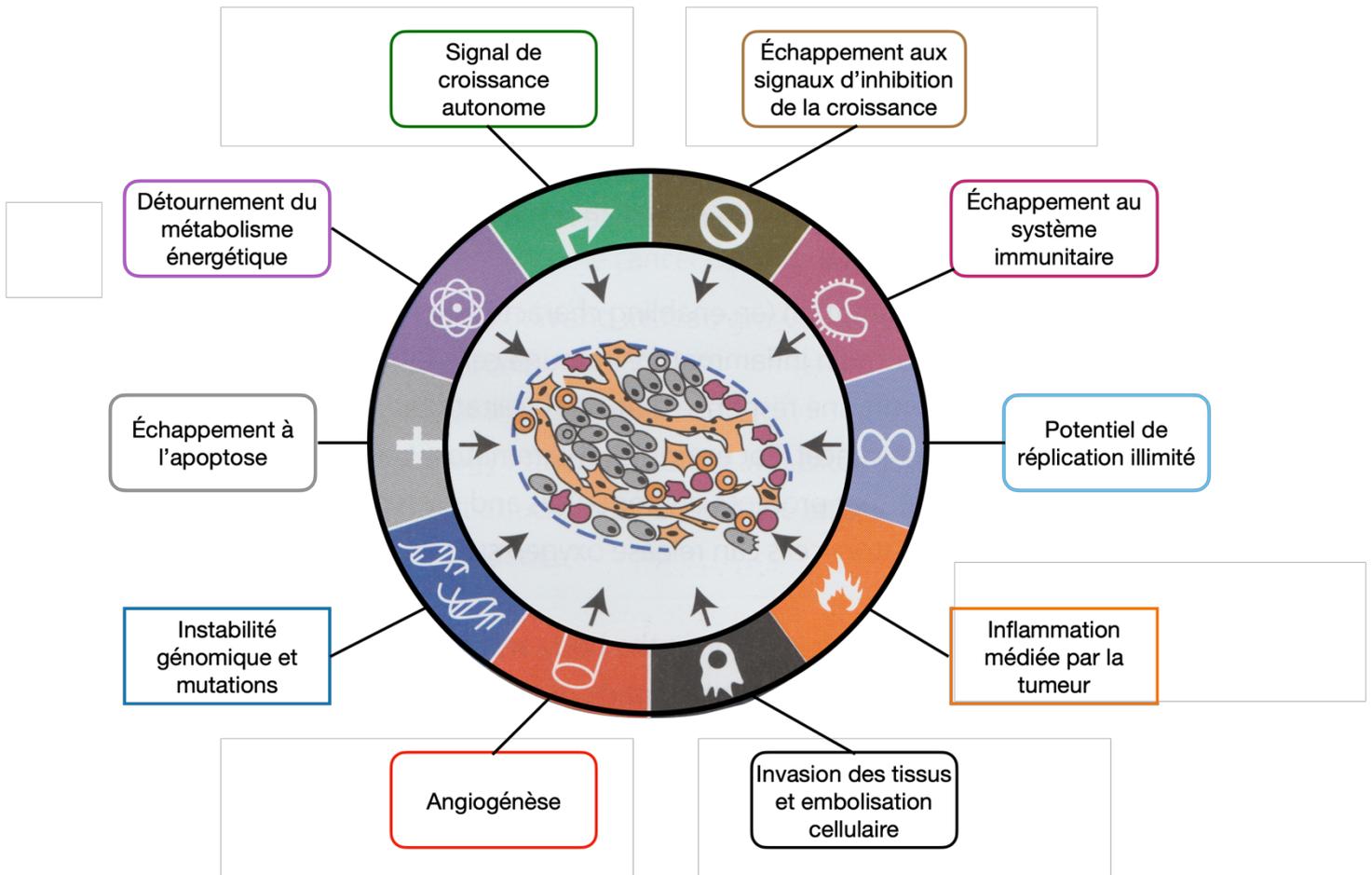
II. DIMÉTHYLARGININES ET CANCER

A. Rappels sur l'oncogénèse

Dans son ouvrage « Molecular Biology of Cancer : 4th Edition », Lauren Pecorino définit le cancer comme un groupe de maladies caractérisées par une dérégulation de la croissance cellulaire et la dissémination de cellules à distance à partir d'un site primaire (Pecorino Lauren, 2016). Pour mieux appréhender ce type de maladies, il est nécessaire d'approfondir cette définition.

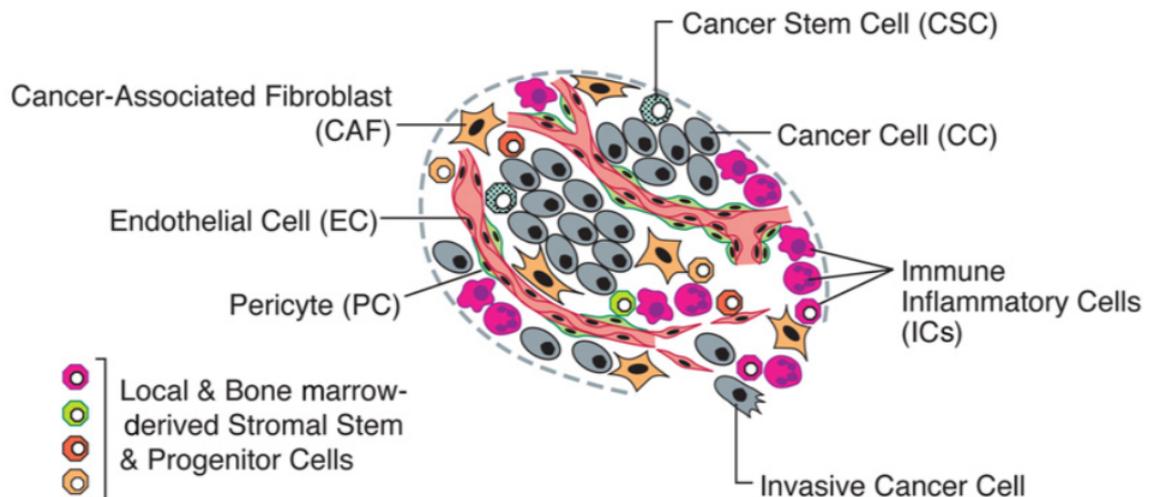
On répertorie aujourd'hui plus de cent cancers affectant l'espèce humaine (Pecorino Lauren, 2016), et bien que souvent les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués soient différents, leurs principales caractéristiques sont souvent similaires. C'est ainsi que dans les années 2000, Hanahan et Weinberg définissent six propriétés qui caractérisent la plupart, si ce n'est la totalité, des cancers : la capacité à croître de manière autonome, l'échappement aux signaux d'inhibition de la croissance, l'échappement à la mort cellulaire (apoptose), un potentiel de réplication infini, l'angiogenèse et la capacité d'envahissement des tissus (Hanahan et Weinberg, 2000). Onze ans plus tard, ce concept est revisité à la lumière de nouvelles connaissances apparues au cours de la décennie. À ces six propriétés s'en rajoutent deux nouvelles : La capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire et l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire de l'hôte. L'ensemble de ces huit propriétés est rendu possible par deux caractéristiques intrinsèques aux cellules cancéreuses : l'instabilité génomique et l'accumulation de mutations, ainsi que le développement d'un environnement pro-inflammatoire au sein des tumeurs (Hanahan et Weinberg, 2011). Ces différentes caractéristiques sont illustrées par la figure 14 (Pecorino Lauren, 2016).

Figure 14 : "The hallmarks of cancer" (Pecorino Lauren, 2016)



Bien que ce concept permette une appréhension simplifiée de la biologie du cancer, il est important de garder à l'esprit la complexité de l'oncogenèse. De plus, les tumeurs malignes ne doivent pas être appréhendées simplement comme un ensemble de cellules qui prolifèrent mais réellement comme un tissu complexe composé de ces mêmes cellules et d'un stroma environnant, la figure 15 schématise cette idée.

Figure 15 : Schéma de la composition d'un tissu tumoral (Hanahan et Weinberg, 2011)



Ainsi cette figure illustre que les tumeurs sont composées majoritairement de cellules cancéreuses, mais que celles-ci croient conjointement à des cellules souches cancéreuses qui possèdent des propriétés particulières (cf. II.B.1.b.) ainsi que des fibroblastes, des vaisseaux et des cellules immunitaires qui agissent contre la tumeur, ou dont la fonction a été détournée pour promouvoir la croissance tumorale.

L'ensemble des caractéristiques présentées ci-dessus s'acquiert progressivement, par modification de la machinerie génomique : par modification de la séquence d'ADN elle-même (mutation) ou par des modifications épigénétiques. La méthylation des protéines, et *a fortiori* de l'arginine, s'inscrit dans cette dernière catégorie.

B. Biochimie des diméthylarginines et cancer

Les modifications post-traductionnelles des protéines sont primordiales au sein d'une cellule pour diversifier son protéome et maintenir l'homéostasie cellulaire. Concernant la génomique, si l'écriture, la lecture ou le renouvellement des modifications du génome sont incontrôlés, un cancer peut se développer. C'est à travers ce spectre que la méthylation de l'arginine, un mécanisme longuement sous-étudié, fait l'objet d'un intérêt grandissant pour certains cancers. Ainsi, en tant qu'effecteurs de la méthylation de l'arginine, les PRMTs (cf. I.B.1.) ont gagné en intérêt ces dernières années.

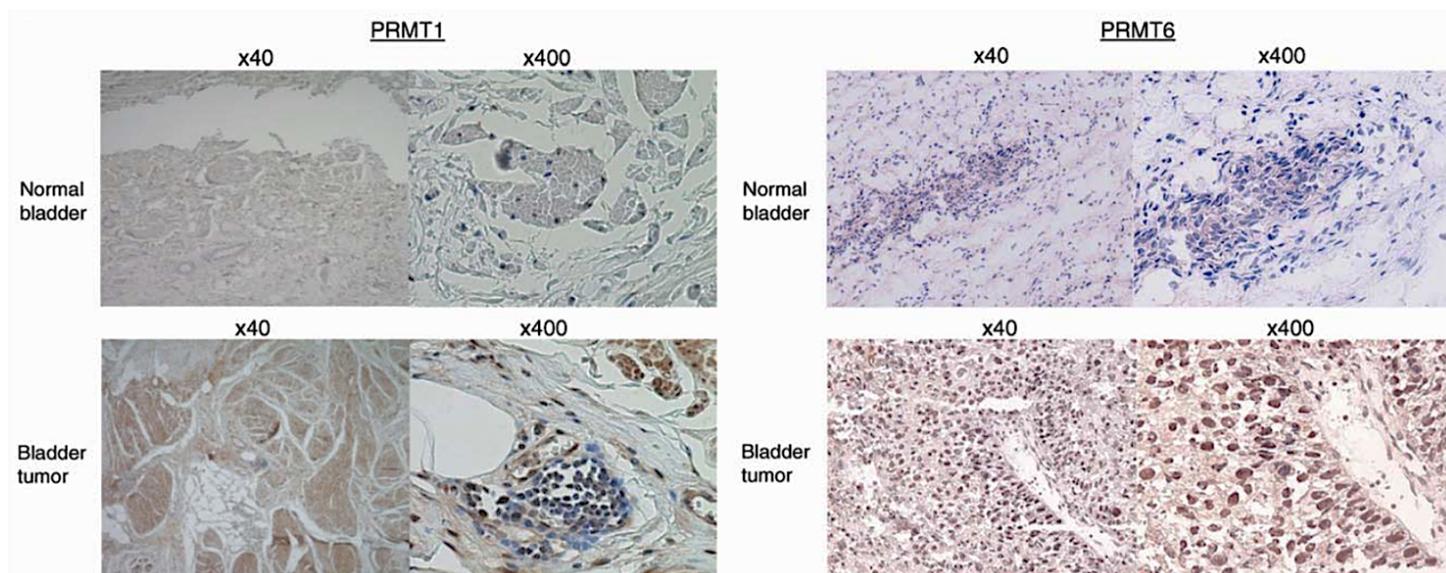
1. Méthylation de l'arginine et cancer

Les modifications post-traductionnelles des protéines ont été largement étudiées ces dernières années à la lumière de différentes maladies. Le cancer ne fait pas exception. Alors que la méthylation de la lysine a rapidement été au centre des recherches, la dernière décennie a été marquée par plusieurs découvertes concernant la méthylation de l'arginine.

a. Mise en évidence

Yoshimatsu *et al.* sont les premiers à mettre en évidence une surexpression de certaines enzymes de la famille des PRMTs pour certains cancers. Comme le montre la figure 16, en utilisant l'immunohistochimie, ils ont prouvé que le niveau d'expression des PRMTs 1 et 6 (deux PRMTs de type I) est significativement augmenté au sein de tissus tumoraux de vessie, comparé à des tissus vésicaux issus de patients sains (Yoshimatsu *et al.*, 2011). Par ailleurs, il démontre dans la même étude, grâce à des petits ARNs interférents (siRNA), que la surexpression de ces enzymes rend possible la croissance excessive des lignées tumorales. Il se pourrait donc que les PRMT1 et 6 jouent directement un rôle dans l'oncogenèse. En effet, il suggère que le mécanisme mis en jeu concerne la réplication de l'ADN et le métabolisme des ARNs.

Figure 16 : Immunohistochimie pour PRMT1 et PRMT6 dans des tissus sains de vessie et des tissus tumoraux de vessie



*Examen immunohistochimique révélant la présence de PRMT1 (à gauche) et PRMT6 (à droite) ; Elle se traduit par une coloration marron sur les photos ci-dessus. En haut, on observe les examens histologiques de vessies saines, en bas ceux de tissu vésical tumoral. À gauche, la présence de PRMT1 est révélée, à droite, celle de PRMT6 (Yoshimatsu *et al.*, 2011).*

Par la suite, de nombreuses études ont évalué le rôle des PRMTs dans certains cancers et démontré une surexpression de ces protéines au sein de tissus tumoraux. Par exemple, PRMT5, la méthyltransférase majoritaire de type II est également surexprimée dans les cancers vésicaux, mais aussi dans les cancers des ovaires, de l'utérus, du poumon, les lymphomes, les leucémies, *etc.* (Stopa *et al.*, 2015)

b. La dérégulation des PRMTs dans l'oncogenèse : mécanismes d'action

Comme expliqué précédemment dans le paragraphe I.B.1., les substrats préférentiels des protéines à activité arginine méthyltransférases sont les histones d'une part, et les protéines exerçant un rôle dans les phénomènes post-traductionnels de l'ADN (maturation des ARNs notamment) d'autre part. Leur rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire est majeur : ainsi une dérégulation de leur activité peut participer à l'oncogenèse.

Les mécanismes mis en évidence aujourd'hui sont multiples. Les effets biologiques produits par ces mécanismes rejoignent les propriétés inhérentes au cancer exposées dans le paragraphe II.A. et illustrées dans la figure 14.

- **Modifications épigénétiques**

L'un des mécanismes principaux concerne l'épigénétique. Par la méthylation des queues d'arginines présentes sur les histones, les PRMTs peuvent modifier l'expression des gènes. De plus, les modifications des histones (appelées aussi « code histone ») sont lues par des complexes protéiques intranucléaires. Par exemple, les méthylations asymétriques des arginines méthylées par la PRMT1 peuvent être lues par des « protéines contenant des domaines Tudor », recrutant elles à leur tour des topoisomérases, facilitant ainsi la réplication et la transcription de l'ADN (Yang *et al.*, 2014). De manière similaire, dans les leucémies myéloïdes aiguës de l'adulte, la surexpression de la PRMT5 entraîne, *via* la méthylation symétrique des histones, une suppression de l'expression du micro-ARN miR-29b. Cette suppression entraîne une accumulation du facteur Sp1, activant *in fine* le promoteur du gène FLT3 (codant pour un récepteur à tyrosine kinase), un gène clé dans l'initiation de la leucémie (Tarighat *et al.*, 2016).

- **Modifications de l'épissage des ARNs**

La modulation de l'épissage des ARNs est un autre mécanisme par lequel l'action des PRMTs aboutit à l'oncogenèse. En effet, les ribonucléoprotéines du splicéosome sont des substrats des PRMTs. Chez les humains atteints de lymphomes mutés pour c-Myc (un proto-oncogène cellulaire), une surexpression concomitante de PRMT5 et de protéines du splicéosome est observée. Il a ainsi été montré que cette surexpression est cruciale pour maintenir la fiabilité de l'épissage des ARNs dans les cellules lymphomateuses et assurer

leur prolifération ainsi que leur survie (Koh *et al.*, 2015). Si bien que la délétion d'un seul allèle du gène codant pour la protéine PRMT5 dans ces cellules compromet sévèrement leur tumorigenèse.

- **Action sur les cellules souches cancéreuses**

Les PRMTs jouant un rôle dans le maintien de la pluripotence des cellules souches saines, elles auraient également un rôle dans le maintien d'un pool de cellules cancéreuses appelées « cellules souches cancéreuses ». Ces cellules partagent des caractéristiques communes avec les cellules souches embryonnaires et seraient responsables en partie des résistances aux traitements, du potentiel métastatique des tumeurs et des récurrences de plusieurs cancers (Vlashi et Pajonk, 2015). Plus précisément, dans le cas des leucémies myéloïdes chroniques, il est démontré que la PRMT5 module l'expression de la protéine DVL3, un activateur de la voie de signalisation Wnt/ β -catenin (Jin *et al.*, 2016). Ce mécanisme est notamment responsable de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches leucémiques. D'autres mécanismes non-élucidés jouent probablement également un rôle.

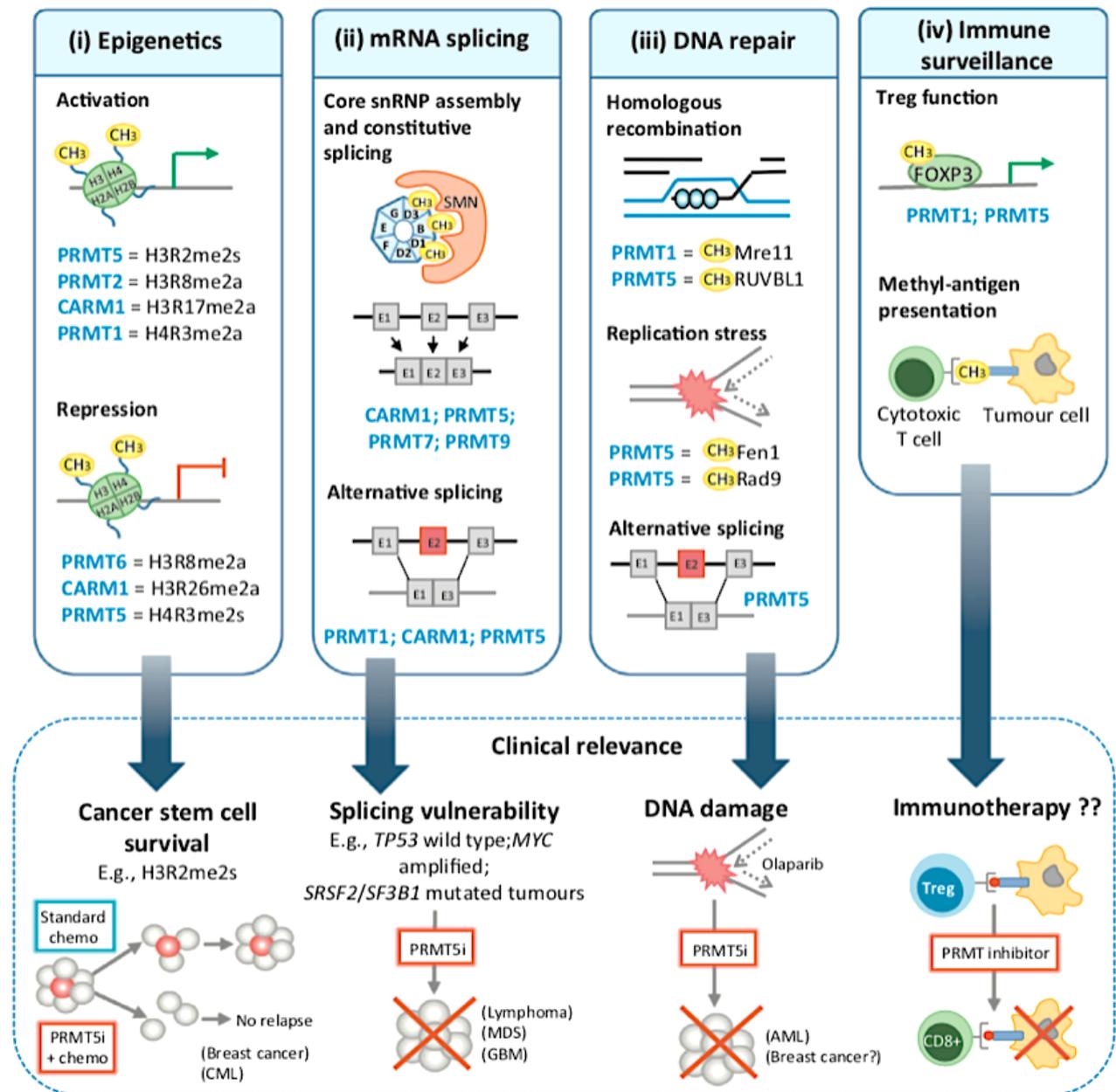
- **Échappement à la réponse immunitaire**

L'échappement à la réponse immunitaire est également un mécanisme qui serait permis par la surexpression des PRMTs. Des études récentes s'intéressant aux rôles des lymphocytes T régulateurs (Treg) ont notamment vu le jour. Il s'agit d'une sous-population de lymphocyte T CD4⁺ ayant la propriété d'inhiber d'autres lymphocytes effecteurs, leur action est indispensable au maintien de la tolérance immunitaire. Dans certains cancers, les tumeurs sont infiltrées de Tregs qui inhibent l'action des lymphocytes effecteurs, diminuant ainsi la réponse immunitaire de l'hôte sur la tumeur (Nishikawa et Sakaguchi, 2010). L'action de ces cellules est dépendante de l'action du facteur de transcription FOXP3 (la délétion du gène codant pour ce facteur mène notamment chez l'humain au syndrome IPEX, un syndrome d'immunodéficiences particulières). Or, la délétion du gène codant pour la PRMT5 dans les Tregs de souris engendrent une immunodéficiences semblable à celle observée dans le syndrome IPEX. L'étude du transcriptome de ces Tregs montrent par ailleurs une dérégulation des gènes influencés par l'action de FOXP3, montrant ainsi le lien entre PRMT5 et FOXP3. Ainsi en méthylant ce facteur de transcription, la PRMT5 augmente l'activité des Tregs et diminue la réponse immunitaire de l'hôte sur les cellules cancéreuses. Il semblerait que les PRMT1 et 6 jouent un rôle complémentaire à ce mécanisme, sans que leurs actions concrètes ne soient à ce jour décrites (Jarrold et Davies, 2019).

Ces exemples illustrent comment la dérégulation des phénomènes de méthylation de l'arginine peut jouer un rôle dans l'apparition d'un cancer. D'autres mécanismes, comme les interférences avec la machinerie de réparation de l'ADN engendrant ainsi une instabilité

génomique, sont également à l'étude (Jarrold et Davies, 2019). Une illustration de la pluralité des actions cellulaires des PRMTs dans le cancer est présentée dans la figure 17.

Figure 17 : Pluralité des actions des PRMTs sur l'oncogenèse (Jarrold et Davies, 2019)



Cette figure illustre de haut en bas : les mécanismes par lesquels les PRMTs participent à l'oncogenèse, les conséquences engendrées par ces actions cellulaires et enfin les possibilités thérapeutiques - PRMT5i = inhibiteur spécifique de la PRMT5 ; chemo = chimiothérapie ; CML = leucémie myéloïde chronique ; AML = leucémie myéloïde aiguë ; MDS = syndrome myélodysplasique ; GBM = glioblastome multiforme.

Les cellules cancéreuses présentent ainsi une surexpression des méthyltransférases de l'arginine et donc des taux de méthylation symétrique et asymétrique de l'arginine

anormalement élevés. Ce phénomène, associé à un catabolisme accru et donc un turn-over protéique plus important, peut conduire à une augmentation de la concentration en diméthylarginines asymétrique et symétrique, dans un premier temps *in situ*, mais aussi dans le plasma.

Nous avons vu dans le paragraphe I.B.3.b. que l'activité des DDAHs était également un élément déterminant de la concentration en ADMA dans les tissus et dans le plasma. Nous pouvons donc nous demander si ces enzymes sont également dérégulées dans les néoplasies.

2. DDAHs et cancer

L'étude de l'activité des DDAHs dans les cancers est moins bien documentée que celle de l'activité arginine méthyltransférase. Cependant certaines études se sont intéressées à ce sujet. Rappelons que l'activité des deux enzymes DDAHs est influencée par divers facteurs (cf. I.B.3.b.) : le stress oxydatif, par la génération de ROS, inhibe l'activité de ces enzymes. Un environnement pro-inflammatoire engendre la même conséquence : par exemple le TNF- α diminue l'activité des deux DDAHs mais diminue aussi le niveau d'expression de la DDAH-2. Ainsi il serait légitime de penser que dans les cancers, *via* l'inflammation et le stress oxydatif généré par le métabolisme des tumeurs, l'activité de ces enzymes soit réduite.

Étant donné le lien entre les DDAHs et la biodisponibilité du NO, ces enzymes, et notamment la DDAH-1, ont été étudiées dans divers cancers. Ainsi il a été montré que la DDAH-1 est fréquemment surexprimée dans les gliomes, les mélanomes, les hépatocarcinomes ou encore les cancers de la prostate (Kostourou *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2014 ; Buijs *et al.*, 2017 ; Reddy *et al.*, 2018). Ces études montrent des augmentations de l'expression de la DDAH-1 dans des lignées de cellules tumorales *in vitro*, ce qui n'est pas pertinent étant donné la dépendance de l'activité de cette enzyme vis à vis de son environnement. Cependant, les études de Buijs *et al.* et Reddy *et al.* montrent également une augmentation de l'expression de la DDAH-1 *in vivo*. Ces études montrent que la DDAH-1 joue alors le rôle d'un facteur pro-angiogénique dans ces cancers en augmentant la biodisponibilité du NO qui à son tour induit la formation de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), un facteur clé nécessaire à l'angiogenèse (le rôle du NO dans les néoplasies est développé dans le paragraphe II.C.). Il est également montré que les tumeurs surexprimant la DDAH-1 possèdent ainsi une croissance plus importante. La surexpression de la DDAH-1 ne proviendrait cependant pas d'une dérégulation génétique ou épigénétique, mais serait secondaire à l'hypoxie tissulaire engendrée par un manque de vascularisation au sein de la tumeur (Buijs *et al.*, 2017). Cette hypothèse n'a cependant pas été formellement explorée.

Une autre étude s'est intéressée à la manière dont la DDAH-1 promeut le développement tumoral (Papaevangelou *et al.*, 2018). Plusieurs lignées de gliomes C6 de rats déficients

pour la synthèse de NO sont étudiées. Les lignées sont modifiées génétiquement pour que l'une des lignées surexprime la DDAH-1 en absence de doxycycline, une autre ne la surexprime pas en présence de doxycycline. Une autre lignée (D27) surexprime la DDAH-1 de manière constitutive indépendamment de la présence ou non de doxycycline. Ces cellules cancéreuses sont ensuite greffées chez des rats et les tumeurs qui en résultent sont étudiées. Cette étude montre que la surexpression de la DDAH-1 n'a aucun effet significatif sur la croissance tumorale en l'absence de synthèse de NO, ce qui montre que son action est NO-dépendante. Leurs résultats montrent également que le niveau d'activité de la DDAH-1 de la lignée D27 est significativement diminuée par rapport aux lignées C6 en l'absence de doxycycline, et ce malgré des niveaux d'expression similaires. Ce résultat, décrit dans aucune autre étude, met en exergue le fait que la régulation de l'activité de la DDAH-1 est complexe et est dépendante de l'environnement cellulaire et de ses conditions physico-chimiques. Enfin, un dernier résultat intéressant dans cette étude nous montre que les tumeurs possédant des niveaux d'activité augmentés pour la DDAH-1 et donc des concentrations locales en NO plus importantes, sont plus nécrotiques. Or des études montrent l'effet cytotoxique du NO à des concentrations élevées, pouvant expliquer cet effet (Bonfoco *et al.*, 1995).

Ces études nous montrent que la DDAH-1 peut être surexprimée dans certains cancers. Son action est pro-angiogénique et dépendante du NO. Cependant, sa surexpression est prouvée dans un nombre restreint de cancers, et la régulation de son activité au sein des tumeurs semble complexe et n'est pas explorée en détail. Sur la base d'une augmentation de l'expression et de l'activité de la DDAH-1, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une diminution des concentrations locales et plasmatiques en ADMA pourrait survenir. La régulation de l'activité de la DDAH-1 étant complexe, cette relation de cause à effet n'apparaît pas si simple. De plus les concentrations en diméthylarginines reposent sur un équilibre entre leur synthèse, leur diffusion et leur élimination, aussi est-il difficile d'en prédire les variations.

Enfin, ces données nous montrent que les effets du NO sur le développement tumoral semble en faveur de sa croissance. Cependant l'étude de Papaevangelou *et al.* montre que le NO peut avoir des effets ambivalents au sein des tumeurs.

C. Monoxyde d'azote et cancer

Nous avons étudié précédemment les divers rôles du monoxyde d'azote dans l'organisme ainsi que son intégration dans le métabolisme des diméthylarginines (partie I.C.). Nous pouvons alors nous demander si le NO possède un rôle particulier au sein des cancers.

La question a été largement étudiée et le rôle du NO dans le cancer est complexe tant il est ambivalent. Le NO possède ainsi, à l'instar de ses nombreux rôles physiologiques, un rôle pléiotrope dans les tumeurs cancéreuses : il agit à la fois sur le microenvironnement

tumoral, la réponse immunitaire ou encore sur les cellules tumorales elles-mêmes (Rizi *et al.*, 2017).

Le monoxyde d'azote participe au métabolisme du microenvironnement tumoral. En effet, le NO produit par les cellules cancéreuses agit sur les cellules stromales pour favoriser le développement tumoral : par exemple, dans les cancers du poumon, le NO produit par les cellules tumorales induit une surexpression de la cavéoline-1 (CAV-1) chez les cellules du stroma, induisant ainsi une augmentation de la migration des cellules tumorales (Sanuphan *et al.*, 2013). De manière similaire, une concentration élevée en NO a été associée à une surexpression du VEGF dans les glioblastomes et les hépatomes, illustrant le rôle du NO dans l'angiogenèse tumorale (Kimura *et al.*, 2000).

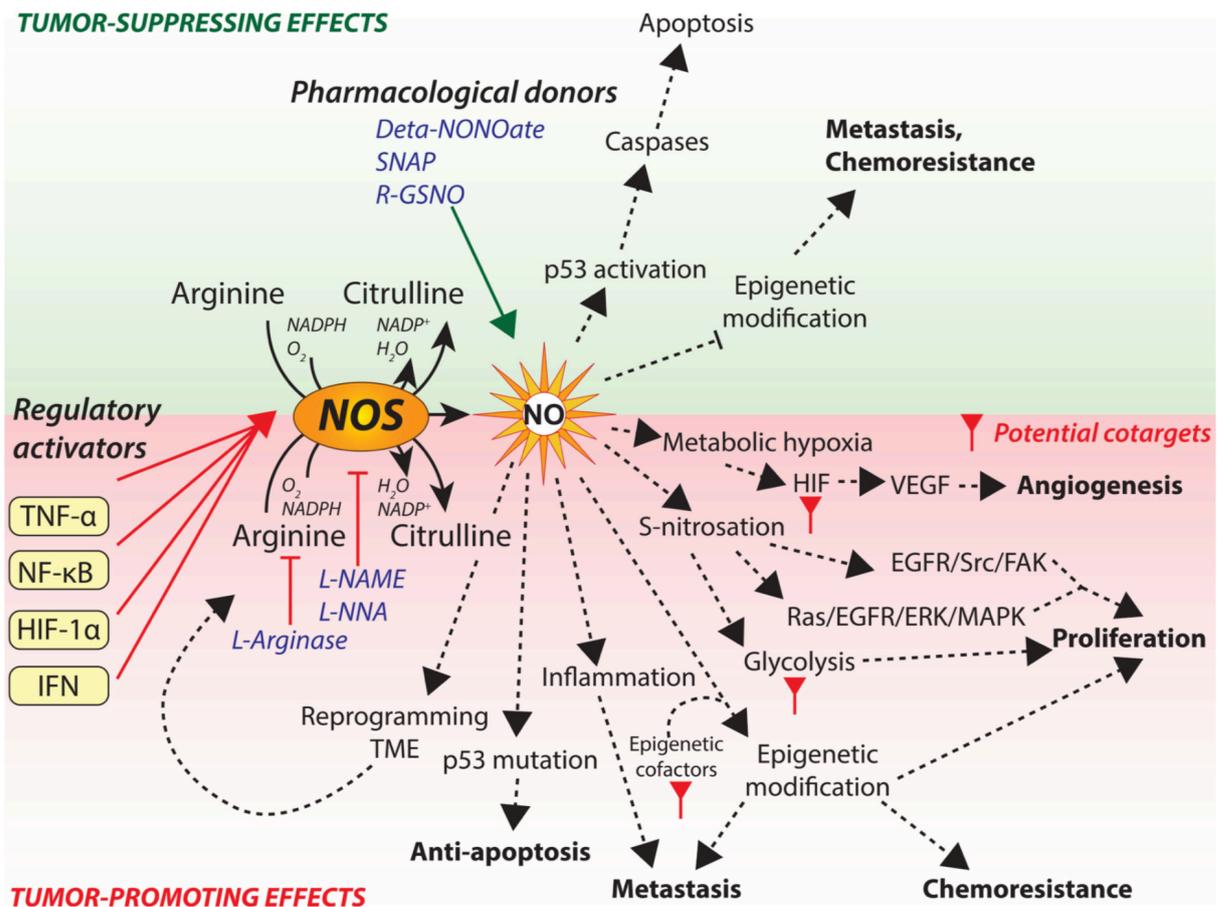
Le NO participe également à la réponse immunitaire de l'hôte contre les cellules cancéreuses. Par exemple, une étude concernant l'immunothérapie sur des lymphomes chez la souris a montré que le NO est indispensable à l'action anti-tumorale et cytotoxique des lymphocytes CD8⁺ (Marigo *et al.*, 2016). Ce NO est par ailleurs produit par les cellules myéloïdes infiltrant la tumeur. Cependant, des effets inverses peuvent être observés : par exemple, une étude portant sur le traitement à base d'imiquimod, un agoniste du Toll-Like-Receptor 7, chez des souris porteuses de lymphomes, a montré que le traitement donne de meilleurs résultats sur les cancers ne pouvant pas exprimer le gène NOS2 (Ito *et al.*, 2015). Ce résultat suggère que la production de NO par les cellules tumorales pourrait participer au mécanisme d'échappement tumoral.

Un autre exemple de la dualité d'action du NO dans les cancers concerne son interaction avec le mécanisme d'apoptose : le NO est capable d'induire le phénomène d'apoptose par l'intermédiaire d'un micro-ARN pro-apoptotique *via* un mécanisme p53-dépendant (le gène codant pour la protéine p53 est considéré comme un gène suppresseur de tumeur). Cependant, les cellules tumorales mutées pour le gène p53 peuvent ainsi échapper à ce mécanisme. Aussi, dans ce contexte, une élévation du NO peut-elle induire une apoptose sélective des cellules saines, permettant ainsi à la tumeur de croître plus rapidement (Li *et al.*, 2015 ; L. Yang *et al.*, 2015).

Le NO joue également divers rôles, notamment dans le détournement du métabolisme des cellules cancéreuses ou encore dans le développement de modifications épigénétiques. Le NO est souvent associé à des effets pro-tumoraux. Cependant ses actions sont ambivalentes concernant la tumorigénèse et dépendent de l'organe principalement atteint par le processus tumoral, du stade de la maladie ou encore de l'interaction qui existe entre les cellules stromales et les cellules cancéreuses (Rizi *et al.*, 2017). Ces interactions complexes sont synthétisées et schématisées dans la figure 18.

Après avoir vu que l'augmentation de la production des diméthylarginines pouvait provoquer des phénomènes de dysfonction endothéliale (cf. I.C.2.), l'action indirecte qu'auraient les diméthylarginines sur l'oncogenèse *via* des modifications du métabolisme du NO, paraissent plus floues et nécessiteraient des études spécifiques pour en déceler les véritables effets.

Figure 18 : Implication du NO dans l'oncogénèse à l'échelle cellulaire, d'après Rizi *et al.* 2017.



Le schéma ci-dessus montre que le NO possède plus d'actions qui promeuvent le développement du cancer que d'actions qui l'inhibent ; Cependant sa dualité d'action est réelle. (TME = Tumor Micro-Environnement)

Les enzymes impliquées dans le métabolisme des diméthylarginines semblent donc dérégulées dans les maladies cancéreuses. D'une part les enzymes de la famille des PRMTs, notamment les PRMT 1 et 5 semblent surexprimées dans une grande variété de cancers et augmentent les taux de méthylation de l'arginine dans les tissus tumoraux. D'autre part, la surexpression de la DDAH-1 a été démontrée dans un nombre plus restreint de cancers. Cependant la régulation de son expression et de son activité au sein des tumeurs semble plus complexe. La dérégulation de ces enzymes joue néanmoins un rôle dans l'oncogénèse : les PRMTs, *via* les méthylations, dérégulent les mécanismes de croissance physiologiques des cellules. La DDAH-1, *via* l'action du NO, aurait des effets pro-oncogènes. L'ambivalence des actions du NO mérite néanmoins que l'on nuance une nouvelle fois ce propos. En somme, on observe dans certains cancers une augmentation de l'activité arginine-méthyltransférase et une augmentation de la dégradation de l'ADMA concomitante.

D. Conséquences cliniques et paracliniques du dérèglement du métabolisme des diméthylarginines dans le cancer

1. Concentrations sanguines en diméthylarginines chez les individus atteints de cancers

La première étude concernant l'exploration des concentrations plasmatiques en diméthylarginines chez les patients atteints de cancers date de 2008 (Szuba *et al.*, 2008). Elle s'intéresse à l'évaluation des concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA chez des patients atteints d'hémopathies malignes. L'étude comprend 43 patients atteints d'hémopathies malignes (Onze leucémies lymphoïdes chroniques, dix lymphomes non Hodgkiniens et cinq Hodgkiniens, sept leucémies myéloïdes aiguës, quatre leucémies lymphoïdes aiguës et une leucémie aiguë mixte ainsi que quatre myélomes multiples et un syndrome lymphoprolifératif). Ces 43 patients sont appariés selon le critère de l'âge et du sexe à 43 patients volontaires en bonne santé, constituant ainsi un groupe « contrôle ». Les concentrations plasmatiques du groupe « hémopathies malignes » étaient en moyenne plus de deux fois plus élevées pour l'ADMA par rapport au groupe contrôle, la différence observée étant par ailleurs significative. Les valeurs les plus importantes observées concernaient les lymphomes non Hodgkiniens et les leucémies aiguës. Aucune différence significative n'est observée concernant les concentrations plasmatiques en SDMA. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des concentrations sériques en ADMA, SDMA et L-arginine chez des patients atteints d'hémopathies malignes et des personnes saines (Szuba et al. 2008)

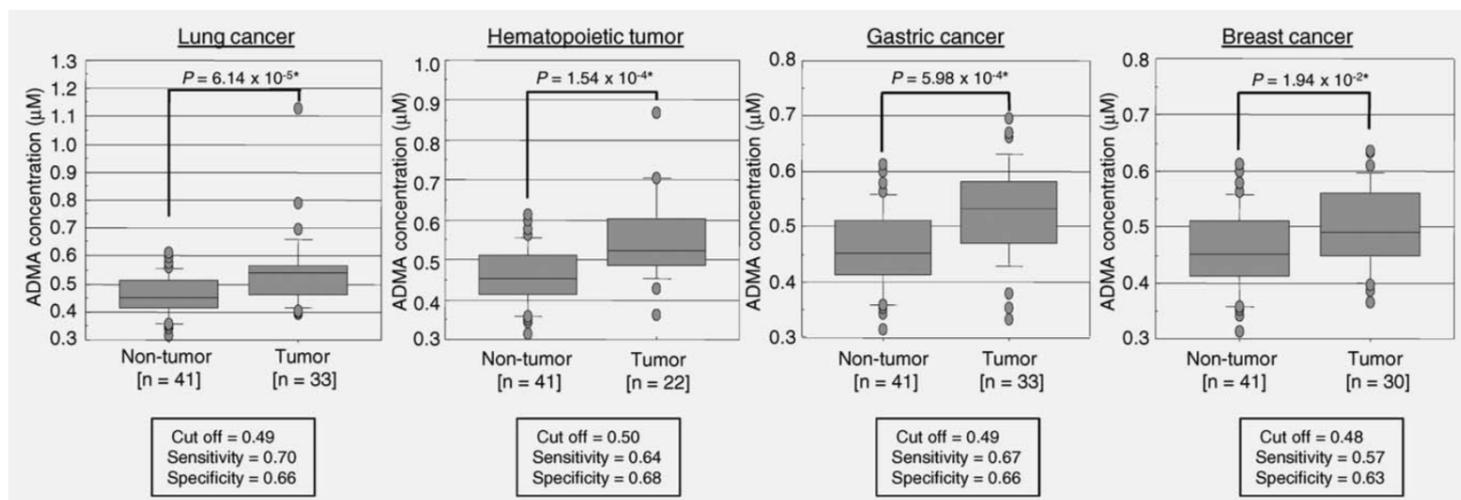
	Mean plasma levels in group with hematological malignancies (SD)*	Mean plasma levels in control group (SD)*	t value	p value
ADMA (µmol/L)	1.59 (±0.79)	0.64 (±0.33)	7.20	<0.001
SDMA (µmol/L)	0.53 (±0.38)	0.48 (±0.60)	0.48	0.637
L-arginine (µmol/L)	34.84 (±17.21)	28.35 (±11.63)	2.05	0.044
L-arginine/ADMA	27.57 (±22.16)	78.52 (±121.62)	-2.70	0.008

Cette étude est la première à montrer un lien entre élévations des concentrations plasmatiques en diméthylarginines (ADMA ici seulement) et cancer.

Yoshimatsu *et al.*, dans la même étude que celle exposée en II.B.1.a., explorent également la relation entre le cancer et les concentrations sériques en ADMA (Yoshimatsu *et al.*, 2011). Ils ont pour cela utilisé des échantillons de *sera* d'une biobanque japonaise : l'étude a alors admis des échantillons de 118 patients atteints de cancers (33 cancers du poumon, 22 tumeurs hématopoïétiques, 33 cancers gastriques et 30 cancers du sein). Ces groupes ont été comparés à un groupe « contrôle » composé de 41 patients atteints de maladies non cancéreuses (22 bronchites asthmatiques et 19 parodontites). Les malades atteints de maladies cardiovasculaires ou de diabète sucré ont été naturellement exclus de l'étude car

une élévation de l'ADMA est attendue chez ces patients. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 19.

Figure 19 : Comparaison des concentrations sériques en ADMA chez des patients atteints de divers cancers comparés à des patients atteints de maladies non cancéreuses, d'après Yoshimatsu *et al.* 2011



Ces résultats montrent ainsi que chez les patients atteints de différents types de cancers, ici des tumeurs pulmonaires, gastriques, mammaires ou hématopoïétiques, une élévation significative de la concentration sérique en ADMA est observée pour chacun de ces cancers par rapport à un groupe contrôle. Il est raisonnable de penser que l'origine de cette élévation est la surexpression des protéines à activité arginine méthyltransférase, bien qu'il se pourrait que cela ne soit pas le seul mécanisme mis en jeu. Une augmentation du catabolisme protéique ou une diminution de l'activité des DDAHs sont des hypothèses crédibles pouvant également expliquer ce phénomène. On peut également remarquer que la sensibilité et spécificité des « cut-offs » ici exposés sont faibles. Ainsi le dosage seul de la ADMA dans le sang ne peut pas être retenu pour le diagnostic des affections cancéreuses.

Ces études nous apprennent donc l'existence d'un lien entre les concentrations sanguines en diméthylarginines et l'existence de différents cancers, un accent particulier étant mis sur les hémopathies malignes. La ADMA étant un inhibiteur compétitif de la L-arginine pour la NOS, et la SDMA inhibant indirectement la synthèse de NO, ces molécules sont considérées comme des facteurs de risque de mortalité (cf. I.C.). Nous pouvons donc nous demander si l'élévation des concentrations sanguines en diméthylarginines est à l'origine d'un dysfonctionnement endothélial chez ces patients atteints de cancers et si un lien existe entre leur augmentation dans le sang et la mortalité chez ces mêmes patients.

2. Dysfonction endothéliale chez les patients atteints de cancers

Il est reconnu que les adultes ayant survécu à une leucémie lymphoïde aiguë (LLA), survenue durant l'enfance ou l'adolescence, ont un risque accru de subir un accident cardiovasculaire même plusieurs années après l'apparition de leur maladie (Oeffinger, 2008). Bien que l'effet de la chimiothérapie soit souvent incriminé, l'exploration du rôle des diméthylarginines n'avait jamais été évoquée.

Pour explorer cette hypothèse, Sulicka *et al.* ont réalisé une étude évaluant la concentration plasmatique en ADMA et SDMA chez des adultes ayant survécu à une LLA (Sulicka *et al.*, 2012). Ainsi, l'étude compare 25 adultes ayant un antécédent de LLA et dont aucune rechute n'a été observée durant les cinq dernières années au minimum et un groupe de 20 personnes saines appariées sur l'âge. Cette étude montre une augmentation significative de la concentration plasmatique en ADMA chez les survivants de LLA. Aucune différence significative n'est observée concernant la SDMA. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Comparaison des concentrations plasmatiques en diméthylarginines chez des survivants de LLA et des personnes saines, d'après Sulicka et al. 2012

Variable	ALL survivors (<i>n</i> = 25)	Controls (<i>n</i> = 20)	<i>p</i> -value
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	0.63 \pm 0.09	0.57 \pm 0.07	0.016
SDMA ($\mu\text{mol/L}$)	0.60 \pm 0.10	0.64 \pm 0.10	0.17
ADMA/SDMA ratio	1.08 \pm 0.22	0.91 \pm 0.16	0.004

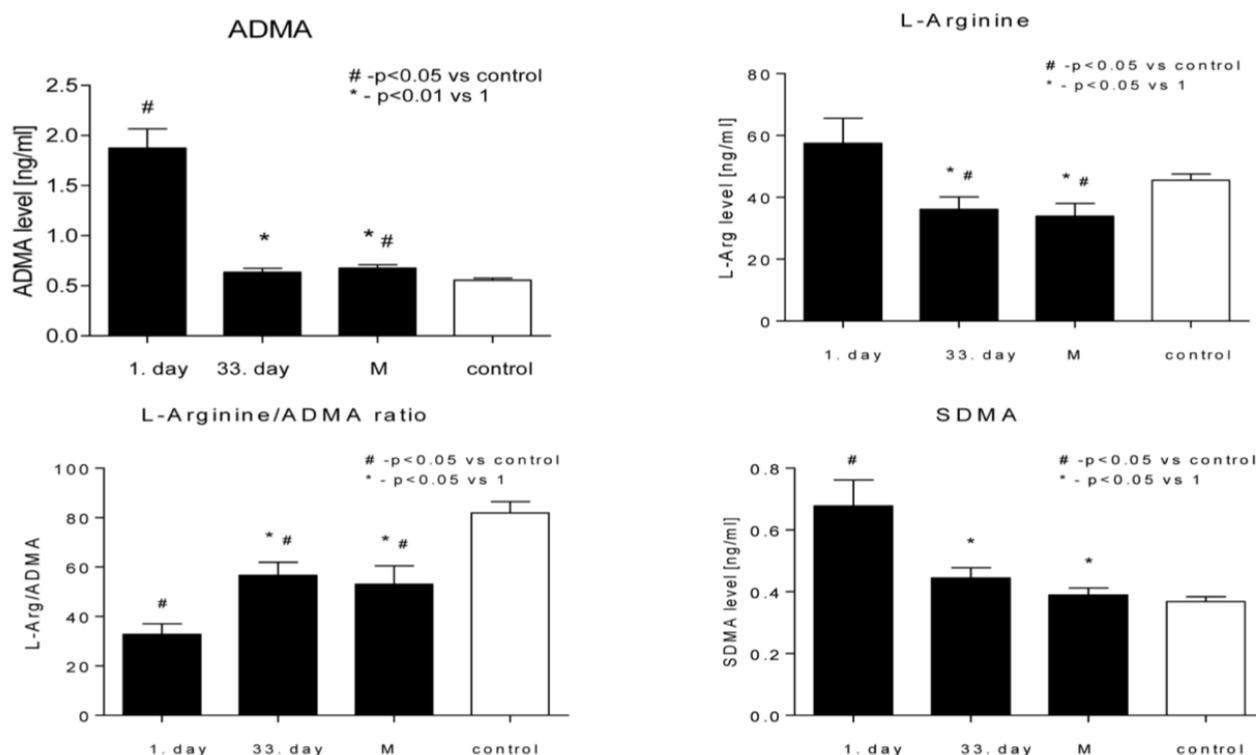
ALL : Leucémie lymphoïde aiguë

La raison pour laquelle la concentration plasmatique en ADMA (sans élévation de la SDMA) reste significativement plus élevée, même plusieurs années après l'épisode de leucémie, n'est pas élucidée. Les hypothèses sont multiples et concernent une persistance de la dérégulation du métabolisme de la ADMA : une suractivité des PRMTs résiduelle, un défaut d'activité des DDAHs dû à un stress oxydatif persistant, un endommagement endothélial persistant secondaire à l'usage de molécules de chimiothérapie... Néanmoins, une élévation persistante de la concentration plasmatique en ADMA peut être un élément explicatif du risque accru d'accident cardiovasculaire chez les survivants de LLA par l'entretien d'une dysfonction endothéliale.

Une autre étude s'est, par la suite, intéressée aux enfants dans la phase active de la même maladie, à savoir la LLA (Doroszko *et al.*, 2016). Cette étude portant sur 18 patients atteints de LLA, comparés à 14 personnes contrôles appariées sur l'âge, a pour objectif de démontrer l'existence d'une dysfonction endothéliale chez les enfants atteints de LLA. Les patients sont évalués le jour du diagnostic (J1), 33 jours (J33) après le début du traitement chimiothérapique et 78 jours (J78) après le début du traitement. L'évaluation comprend le dosage plasmatique de diverses molécules dont les ADMA, SDMA et L-arginine. Elle comprend également une évaluation de la fonction endothéliale par une méthode de

débitmétrie par laser doppler où l'on compare la circulation capillaire avant et après une injection de pilocarpine, un parasympathomimétique direct. Ce sont ainsi les capacités de vasodilatation du réseau capillaire qui sont testées. Les résultats montrent une augmentation significative des concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA chez les patients atteints de LLA comparés au groupe contrôle à J1. Les concentrations plasmatiques en diméthylarginines diminuent au cours du traitement, cependant les concentrations plasmatiques en ADMA restent significativement plus élevées chez les patients leucémiques à J78. Les résultats sont présentés dans la figure 20.

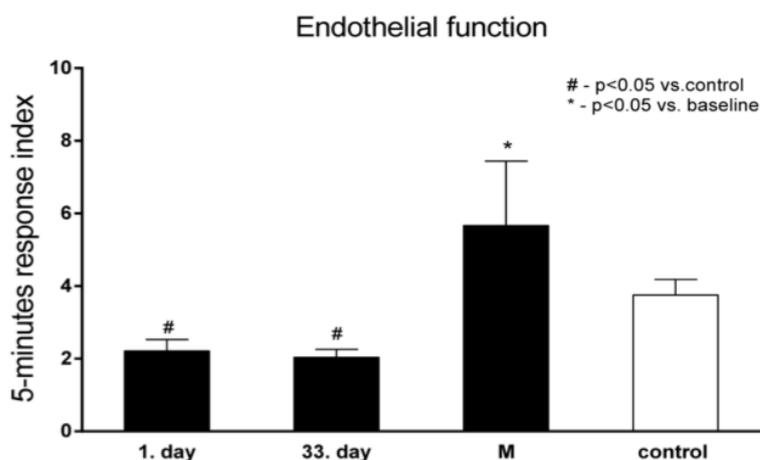
Figure 20 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ADMA, SDMA et L-arginine à différentes étapes du protocole de chimiothérapie chez les patients atteints de LLA et un groupe contrôle (Doroszko et al., 2016)



: différence significative avec le groupe contrôle ; * : différence significative avec J1 ; M : fin du traitement soit J78.

Concernant l'évaluation de la fonction endothéliale, à J1 et J33, les patients leucémiques présentent une réponse significativement plus faible à la pilocarpine comparés au groupe contrôle. Cependant, à J78, une amélioration significative est observée. Les résultats sont présentés dans la figure 21.

Figure 21 : Évaluation de la fonction endothéliale chez des patients atteints de LLA à différentes étapes du protocole de chimiothérapie comparés à un groupe de personnes saines (Doroszko *et al.*, 2016)



Les légendes sont similaires à celles de la Figure 20. La réponse à la pilocarpine est évaluée sur 5 minutes.

Cette étude montre donc, *via* un test fonctionnel, l'existence d'une dysfonction endothéliale chez les patients atteints de LLA. Une des causes de cette dysfonction endothéliale serait ainsi l'élévation des concentrations plasmatiques en ADMA et en SDMA : la Figure 20 nous montre une diminution significative du ratio L-Arginine/ADMA chez les patients atteints de LLA comparés aux personnes saines. Une diminution de ce *ratio* se traduit par une biodisponibilité réduite de la L-arginine, le substrat de la NOS pour former du NO. L'étude montre également une corrélation entre l'augmentation des concentrations plasmatiques en diméthylarginines et l'augmentation de la concentration plasmatique en lactate déshydrogénase (LDH), un marqueur de cytolysse générale. Cette observation suggère ainsi que les diméthylarginines peuvent provenir des cellules tumorales anormales. Enfin, cette étude montre également que les élévations de la concentration plasmatique en SDMA chez les patients leucémiques comparés au groupe contrôle ne sont pas corrélées à une élévation de la créatinine ou une diminution du débit de filtration glomérulaire. Cette observation suggère alors que l'élévation des concentrations en SDMA ne sont pas forcément liée à une diminution de son excrétion par le rein mais bien par un excès de production qui aurait une origine similaire à la ADMA.

Une étude, détaillée en II.D.3 (cf. *infra*), concernant des patients atteints de différentes hémopathies malignes (leucémies lymphoïdes chroniques, leucémies myéloïdes aiguës, leucémies lymphoïdes aiguës et lymphomes non Hodgkiniens), montrent que ces patients possèdent des concentrations anormalement élevées en « molécule d'adhésion aux cellules vasculaires - 1 » (VCAM-1) comparés à un groupe contrôle (Chachaj *et al.*, 2018). Cette molécule a été reconnue comme étant un marqueur de dysfonction endothéliale dans différentes conditions (Blankenberg *et al.*, 2003). Une corrélation positive entre les

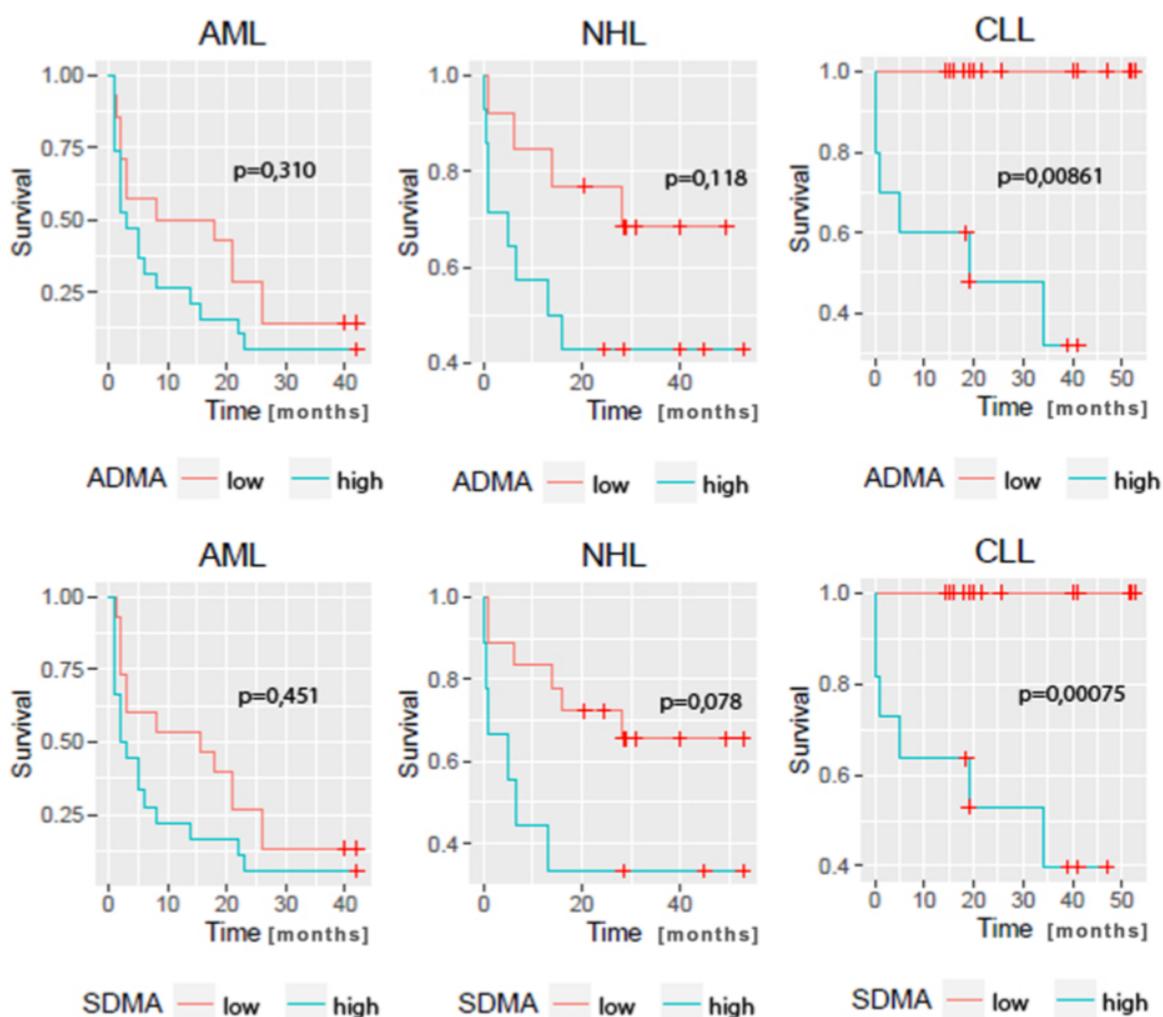
concentrations en ADMA et en VCAM-1 est également démontrée et renforce l'hypothèse selon laquelle une dysfonction endothéliale due à l'ADMA existe chez les patients atteints de cancers. De plus, étant donné que la VCAM-1 peut être augmentée lors d'inflammation, l'étude précise qu'aucune corrélation n'est observée entre les concentrations en VCAM-1 et en protéine C réactive, qui est un marqueur de l'inflammation.

3. Mortalité chez les patients atteints de cancers

En somme, nous savons que les patients atteints de certains types de cancers ont des concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA anormalement élevées et que ces concentrations élevées peuvent être à l'origine d'une dysfonction endothéliale. Des concentrations élevées en ADMA et SDMA sont par ailleurs associées à une mortalité plus élevée (cf. I.C.2.). Quel serait donc l'impact, en termes de mortalité, de concentrations anormalement élevées en ADMA et SDMA, chez des patients atteints de cancers ?

C'est la question que se sont posés Chachaj *et al.* dans une étude prospective de 2018 sur 96 patients atteints d'hémopathies malignes (33 leucémies myéloïdes aiguës (LMA), 32 leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) et 31 lymphomes non Hodgkiniens (LNH)). Ces patients sont comparés à un groupe contrôle de 48 personnes non atteintes de cancers appariées sur l'âge, le sexe et certaines comorbidités (hypertension artérielle systémique, diabète ou obésité) (Chachaj *et al.*, 2018). Ils ont montré que les patients atteints de ces différents cancers possèdent des concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA significativement plus élevées que les patients du groupe contrôle. Les concentrations en ADMA sont en moyenne deux fois plus élevées chez les patients atteints d'hémopathies malignes, l'élévation des concentrations en SDMA étant plus modérée. Ils ont ensuite étudié la relation entre les concentrations plasmatiques en ADMA et SDMA et la mortalité chez les patients atteints d'hémopathies malignes. Les différentes courbes de survie sont présentées dans la figure 22.

Figure 22 : Courbes de Kaplan-Meier selon les concentrations plasmatiques en diméthylarginines chez des patients atteints d'hémopathies malignes (Chachaj *et al.*, 2018)



p a été calculé par régression de Cox. AML = leucémie myéloïde aiguë ; NHL = lymphome non-Hodgkinien ; CLL = leucémie lymphoïde chronique. Les valeurs seuil définissant les groupes « low » et « high » ne sont pas précisées.

Cette analyse de survie montre donc qu'une élévation des concentrations plasmatiques en ADMA et en SDMA chez les patients atteints de LLC est associée à une mortalité plus élevée. Cette relation n'est pas retrouvée chez les patients atteints de LNH et LMA. Ainsi cette étude est la première à démontrer que les concentrations plasmatiques en diméthylarginines peuvent être utilisées comme facteurs pronostiques chez des patients atteints d'hémopathies malignes, ici de LLC. Un manque de puissance statistique est évoqué concernant l'absence de relation significative entre la mortalité et les concentrations en ADMA et SDMA chez les patients atteints de LNH.

Les concentrations plasmatiques en ADMA et en SDMA sont donc anormalement élevées chez les patients atteints de cancers. Cette élévation peut avoir plusieurs origines dont une augmentation de l'activité des PRMTs, une augmentation du catabolisme protéique, une diminution de l'activité des DDAHs. Une dysfonction endothéliale peut être la conséquence de l'augmentation de ces concentrations plasmatiques, notamment chez les patients atteints d'hémopathies malignes, et cette dysfonction endothéliale peut engendrer une augmentation de la mortalité chez ces patients.

E. Implications thérapeutiques

La chimiothérapie représente, avec la chirurgie, un des axes thérapeutiques majeurs lorsque l'on parle de cancer. La chimiothérapie classique, ou à dose maximale tolérée, repose sur la cytotoxicité des molécules utilisées, ces molécules ayant une action plus ou moins sélective sur les cellules cancéreuses ; ce qui explique les nombreux effets secondaires engendrés.

Des différentes données présentées (*cf. II.B-D.*) ci-dessus émergent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre la croissance tumorale.

1. Lutter contre l'augmentation des concentrations plasmatiques en ADMA

Nous avons précédemment vu que de nombreux cancers entraînaient une augmentation de la concentration sanguine en ADMA chez les patients atteints (*cf. II.D.*). Nous avons également vu que cet état peut être associé à une augmentation du risque de décès, probablement secondaire aux phénomènes de dysfonction endothéliale : il paraît ainsi raisonnable de vouloir limiter l'apparition de cette dysfonction en diminuant les concentrations circulantes d'ADMA.

L'ADMA étant un inhibiteur compétitif de la NOS, la biodisponibilité de la L-arginine pour la formation du NO peut s'exprimer par le ratio L-arginine/ADMA. Ainsi, des suppléments en L-arginine ou en L-citrulline (un précurseur de la L-arginine) ont été décrits dans des modèles animaux pour lutter contre la dysfonction endothéliale et augmenter la biodisponibilité du NO (Tain et Hsu, 2017). Cependant, une méta-analyse récente suggère une absence d'efficacité de la supplémentation orale en L-arginine comparée à des placebos notamment sur l'hémodynamique et les concentrations en ADMA des patients atteints de troubles cardiovasculaires ou métaboliques (Rodrigues-Krause *et al.*, 2018). Aucune étude ne s'intéresse néanmoins à l'évolution du risque de décès chez des patients traités avec une supplémentation en précurseur du NO.

2. Les enzymes du métabolisme des diméthylarginines comme cibles thérapeutiques

- **Les PRMTs comme cibles thérapeutiques**

Étant donné que les enzymes de la famille des PRMTs (responsables de la méthylation des résidus d'arginine sur les protéines) se trouvent surexprimées dans un nombre important de cancers, des inhibiteurs sélectifs de ces protéines ont rapidement été retenus comme des molécules d'intérêt dans la thérapeutique cancéreuse.

En médecine humaine, de nombreux inhibiteurs ciblant notamment PRMT1, PRMT5 ou encore CARM1 sont à l'étude. Plus précisément concernant les inhibiteurs de PRMT5, certains ont fait leurs preuves *in vitro* et *in vivo* pour ralentir la croissance de tumeurs (Kim et Ronai, 2020). Différentes molécules sont aujourd'hui en essai clinique de phase I : à titre d'exemple, GSK3326595, un inhibiteur compétitif au site de liaison avec la SAM (le substrat agissant comme donneur de groupe méthyl), est intégré dans deux essais cliniques concernant les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH), les syndromes myélodysplasiques et les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) (Kim et Ronai, 2020). Ces molécules semblent prometteuses dans le traitement des cancers, les inhibiteurs de PRMT5 étant particulièrement étudiés dans le cadre des hémopathies malignes. Ces considérations s'étendent également en médecine vétérinaire (*cf. II.F.2.c.*).

- **Les DDAHs comme cibles thérapeutiques**

Il a également été prouvé que les DDAHs (les enzymes principalement responsables de la métabolisation de la ADMA) étaient surexprimées dans certaines tumeurs (*cf. II.B.2*). Bien qu'il puisse sembler contre-intuitif de vouloir cibler ces enzymes et diminuer la métabolisation de la ADMA, ces protéines semblent jouer un rôle crucial dans les phénomènes vasculaires au sein des tumeurs et notamment favoriser l'angiogenèse et le mimétisme vasculaire (ou *vasculogenic mimicry*) (Hulin *et al.*, 2019). Ce dernier est un phénomène propre aux tumeurs agressives correspondant à la formation rapide de néo-vaisseaux dépourvus d'endothélium.

Notons qu'aujourd'hui, aucune molécule n'est réputée pour augmenter spécifiquement l'activité de la DDAH-1 et -2. Aucune molécule connue inhibe spécifiquement DDAH-2 également, ce qui représente une limite importante dans les recherches pharmacologiques concernant la modulation de ces protéines. La recherche s'axe donc principalement sur les inhibiteurs de la DDAH-1 : à titre d'exemple la molécule DD1E5 inhibe de manière irréversible l'activité de la DDAH-1. Cette molécule s'est montrée efficace *in vitro* pour limiter la prolifération, migration et invasion de lignées cellulaires de cancers prostatiques (Kami Reddy *et al.*, 2019). Dans cette même étude, l'utilisation de cette molécule *in vivo* s'est révélée efficace pour limiter la croissance de ces mêmes cellules xénogreffées. Une diminution des niveaux de VEGF et de NOS dans la tumeur a également été observée, résultant en une diminution de la vascularisation tumorale.

Ainsi, ces différentes molécules se présentent comme de sérieux candidats pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre le cancer. Des efforts de recherche sont encore nécessaires pour aboutir à un traitement efficace et commercialisé.

La littérature de médecine humaine jouit ainsi depuis une décennie de données de plus en plus abondantes concernant les diméthylarginines et leur lien avec différentes pathologies dont le cancer. Qu'en est-il des connaissances disponibles en médecine vétérinaire ?

F. ADMA et SDMA : état des connaissances chez les carnivores domestiques

Afin de pouvoir étudier ces marqueurs chez les carnivores domestiques, il faut dans un premier temps être capable de détecter et quantifier leur présence chez les individus testés. Comme cité auparavant, en médecine humaine les concentrations en diméthylarginines sont quantifiées dans des tissus organiques ou encore dans le sang. En médecine vétérinaire, on s'intéresse encore exclusivement aux concentrations sanguines des diméthylarginines, dont nous allons maintenant détailler les méthodes de dosage.

1. Méthodes de dosage

a. Méthodes de référence

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) a été l'une des premières méthodes de dosage des diméthylarginines. C'est cette méthode qui est utilisée dans l'étude de Kakimoto *et al.* qui décrit la présence de ces composés dans de l'urine humaine (Kakimoto et Akazawa, 1970). Les premières études utilisaient néanmoins la NMMA ou l'homoarginine comme référence interne pour le dosage, or ces molécules sont présentes de manière endogène à des concentrations variables chez l'humain, ce qui diminue fortement la précision du dosage.

L'utilisation de composés exogènes pour référence à la mesure de la ADMA et la SDMA a permis d'améliorer la précision du dosage *via* la CLHP. Cette méthode permet ainsi d'obtenir des concentrations sanguines fiables pour la ADMA et la SDMA (Schwedhelm et Böger, 2011).

Par la suite, des méthodes de spectrophotométrie de masse en association avec la chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse (LC-MS ou GC-MS) ont permis de développer des méthodes possédant une sensibilité telle qu'elles sont aujourd'hui considérées comme les méthodes de référence pour le dosage de la L-arginine et ses métabolites aussi bien chez l'Homme que chez les carnivores domestiques (Schwedhelm *et al.*, 2006 ; Nabity *et al.*, 2015). Ces analyses sont réalisables aujourd'hui en moins de 2 minutes, ce qui rend leur usage possible pour l'étude d'un grand nombre de prélèvements.

b. Dosages commercialisés par le laboratoire IDEXX ©

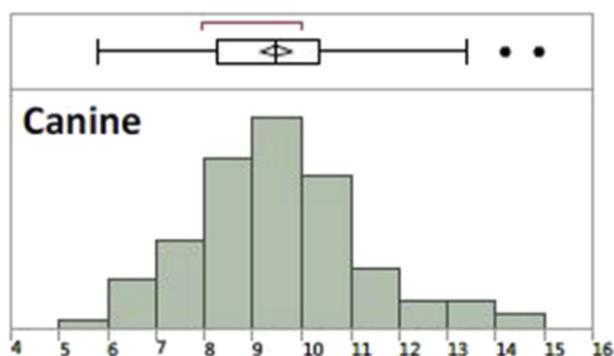
- **Méthode de laboratoire**

Malgré l'existence de méthodes performantes pour le dosage des concentrations sanguines en diméthylarginines, leur manque de disponibilité et leur coût élevé justifient l'existence de méthodes alternatives.

Le laboratoire IDEXX, spécialisé dans le conseil et la vente d'outils diagnostics pour les vétérinaires praticiens, propose un dosage SDMA. Ce dosage, proposé depuis 2015, est basé sur une méthode d' « enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA). Ce dosage est réalisable sur sérum ou plasma EDTA et hépariné. Un prélèvement lipémique ou hémolysé peut diminuer la fiabilité du dosage. Cette méthode donne des résultats équivalents à ceux obtenus par LC-MS et est validée sur des animaux sains ou atteints de MRC (Patch *et al.*, 2015).

Grâce à cette méthode, IDEXX propose le dosage de la SDMA avec les analyses biochimiques réalisées en routine chez les carnivores domestiques. De surcroît, la valeur de référence limite établie par les publications disponibles sur le sujet et le laboratoire se situe à 14 µg/dL (soit 6,93 µmol/L) comme le montre la figure 23 (Rentko *et al.*, 2013).

Figure 23 : Établissement d'une valeur de référence limite pour la SDMA canine (Rentko *et al.*, 2013)



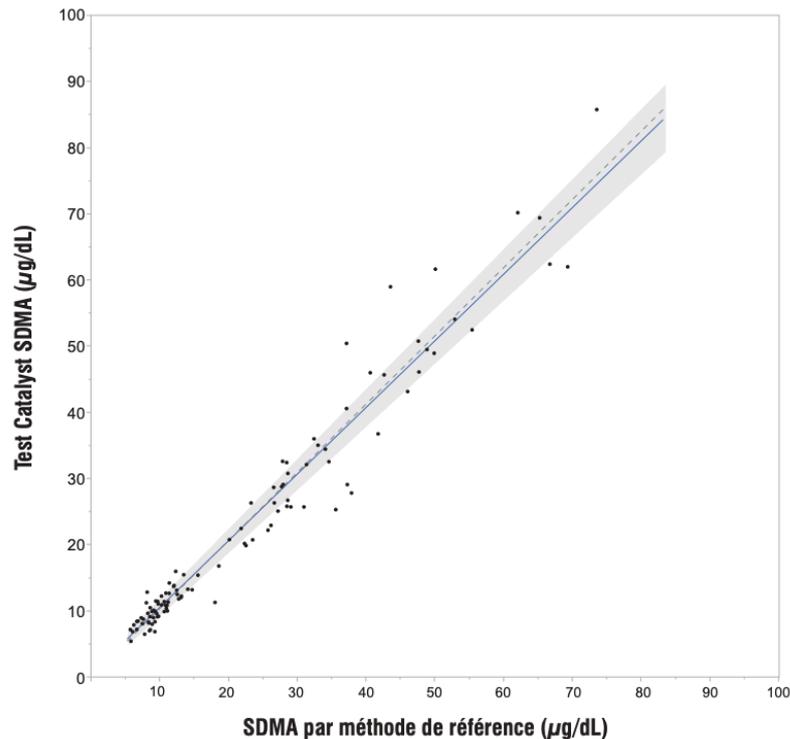
Concentration sérique canine de SDMA (déterminée par LC-MS) en µg/dL tracée sur l'axe des abscisses en fonction de la proportion de la population de référence de chiens adultes en bonne santé ($n = 122$) sur l'axe des ordonnées. L'intervalle de référence a été établi à moins de 14 µg/dL avec une analyse non paramétrique. Le diagramme en boîte à moustaches reflète l'intervalle interquartile, les valeurs aberrantes étant représentées par des points.

- **Méthode au chevet du patient**

Depuis peu, le laboratoire IDEXX a rendu davantage accessible le dosage de la SDMA chez les carnivores domestiques par la commercialisation de tests réalisables au chevet du patient *via* leur dernière génération d'analyseur Catalyst One © : il s'agit d'une méthode de dosage immunologique. Les conditions pré-analytiques sont les mêmes que pour la

méthode réalisée en laboratoire, néanmoins un prélèvement préalablement congelé ne peut pas être dosé par cette méthode. Cette méthode de dosage est validée et fournit des résultats comparables à ceux obtenus par une méthode de référence (LC-MS) comme l'illustre la figure 24 (Bilbrough *et al.*, 2018).

Figure 24 : Comparaison du dosage de la SDMA par le test Catalyst et par LC-MS chez le chien (Bilbrough *et al.*, 2018)



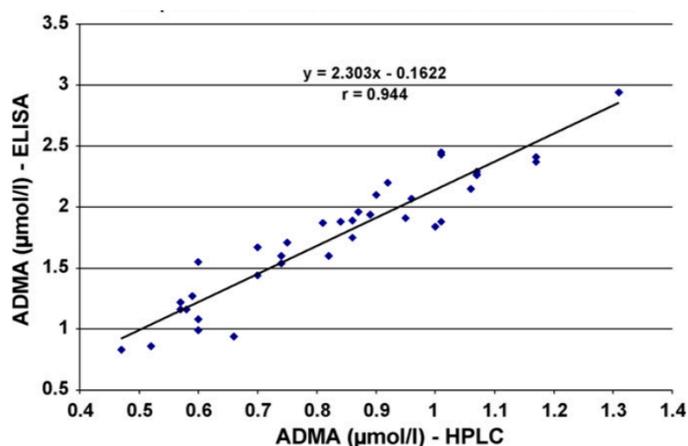
La comparaison concerne les séra de 107 chiens. Le coefficient de corrélation obtenu est de $r = 0,98$ et la pente de $0,98$. La droite de régression apparaît en bleu, les zones grisées correspondent à l'intervalle de confiance à 95 %.

c. Autres alternatives

Le dosage de la SDMA est donc aujourd'hui pleinement accessible aux vétérinaires praticiens. Le dosage de la ADMA ne jouit pas de la même disponibilité car aucun laboratoire vétérinaire ne le propose en routine.

Néanmoins, des alternatives à la spectrophotométrie-chromatographie existent. Par exemple, le laboratoire DLD Diagnostika © commercialise des kits de dosage ADMA. La méthode employée est une méthode ELISA ; ces kits sont reconnus utilisables en recherche clinique et fournissent des résultats comparables aux méthodes de référence (CLHP) comme le montre la figure 25 (Schulze *et al.*, 2004 ; Siroka *et al.*, 2007). Cette méthode a déjà été utilisée en recherche clinique vétérinaire (Li *et al.*, 2012).

Figure 25 : Comparaison du dosage de la ADMA par méthode ELISA et par CLHP chez l'Homme (Siroka *et al.*, 2007)



La comparaison est réalisée sur 80 plasmas différents. Le coefficient de corrélation obtenu étant de $r = 0,944$ et la pente de 2,3.

Aucune étude vétérinaire ne détermine à ce jour un intervalle de référence pour la concentration plasmatique en ADMA chez le chien. Une étude sur les pancréatites aiguës canines explorant le lien entre les concentrations plasmatiques en ADMA, la sévérité de l'atteinte et la mortalité dispose d'une cohorte « contrôle » composée de 28 chiens adultes sains et obtient une concentration moyenne de 48,5 µg/dL avec un intervalle interquartile de 39,8 (Gori *et al.*, 2020).

Après avoir présenté les différentes modalités de dosage des diméthylarginines chez les carnivores domestiques, il est légitime de se demander quelles sont les utilisations pratiques de ces dosages en médecine vétérinaire ?

2. Utilisations pratiques du dosage des diméthylarginines chez les carnivores domestiques

a. Évaluation de la fonction rénale

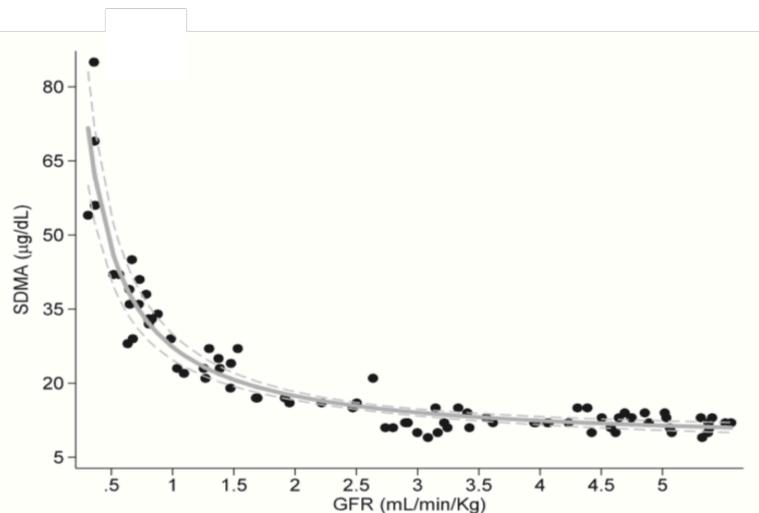
À l'instar de ce qui a été démontré chez l'Homme, le dosage de la SDMA en médecine vétérinaire est principalement utilisé pour évaluer l'efficacité de la fonction rénale chez les patients concernés.

Tatematsu *et al.* sont les premiers à envisager son utilisation en 2007 : par le biais d'un modèle de MRC par néphrectomie partielle sur une cohorte de 18 chiens, ils montrent que la baisse de la clairance de l'inuline est liée à l'augmentation des concentrations sériques en SDMA ($r = -0,851$).

En écho à ces données, en 2015 Nabity *et al.* évaluent l'utilité du dosage de la SDMA chez des chiens atteints de néphropathie héréditaire liée au chromosome X. Les chiens mâles atteints développent dans les mois suivants leur naissance une MRC protéinurique similaire à des MRC de stades terminaux (Nabity *et al.*, 2015). Ainsi, comme l'illustre la figure 26,

cette étude met en évidence une corrélation forte entre la SDMA et le DFG (déterminé par mesure de la clairance de l'iohexol) chez les chiens malades ($r = -0,95$).

Figure 26 : DFG en fonction de la concentration sérique en SDMA chez des chiens atteints de néphropathie congénitale (Nabity *et al.*, 2015)



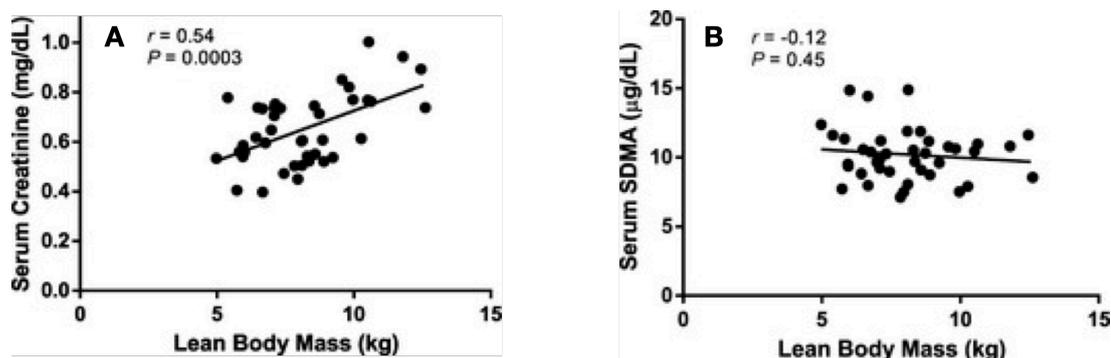
GFR = Débit de filtration glomérulaire. Les données sont issues d'une cohorte de 8 chiens suivis durant 37 semaines.

En outre, cette étude suggère d'une part que l'élévation de la SDMA s'observe durant toute l'évolution de la maladie, de la période pré-clinique au stade terminal, d'autre part que la mise en évidence d'une concentration sérique en SDMA supérieure à 14 µg/dL permet en moyenne de détecter une diminution du DFG d'environ 20 %, ce qui est plus précoce que la détection *via* l'augmentation de la créatinine sérique, quelle que soit la méthode employée.

La précocité de l'augmentation de la concentration sérique en SDMA par rapport à la créatinine sérique dans les MRC est également appuyée par une étude rétrospective de 2016 : sur 19 chiens atteints de MRC, 17 d'entre eux ont montré une augmentation de la concentration sérique en SDMA en moyenne 9,8 mois avant celle de la créatinine sérique (Hall *et al.*, 2016).

Enfin, l'évaluation de la concentration sérique en SDMA présente un avantage supplémentaire par rapport à la créatinine sérique. Hall *et al.* montrent dans une étude sur 41 beagles suivis durant 6 mois qu'à l'inverse de la créatinine sérique, la SDMA sérique n'est pas influencée par la masse corporelle des chiens étudiés (Hall *et al.*, 2015). Ces résultats sont illustrés par la figure 27. Ainsi, un dosage de SDMA peut potentiellement permettre de déceler une diminution du DFG qui pourrait se traduire par une créatinine faussement dans les valeurs usuelles chez un animal cachectique.

Figure 27 : Influence de la masse corporelle sur les concentrations sériques en créatinine et SDMA chez le chien (Hall et al., 2015)



On observe à gauche la masse corporelle en fonction de la créatinine sérique (A) et à droite en fonction de la SDMA sérique (B). Ces résultats révèlent une corrélation positive entre la masse corporelle et la créatinine sérique chez le chien ($r = 0,54$) qui n'existe pas pour la SDMA. Lean Body Mass = Masse corporelle (déterminée par absorptiométrie radiographique).

b. Intérêt pronostic

• Intérêt pronostic de la SDMA

Depuis 2016, le dosage de la SDMA sérique a été intégré à la classification IRIS (*International Renal Interest Society*) pour les carnivores domestiques atteints de MRC. Cette classification a vocation de définir différents stades d'évolution des MRC chez les carnivores domestiques ("IRIS Kidney - Guidelines - IRIS Staging of CKD"). La dernière version de cette classification, datant de 2019, est présentée dans la figure 28.

Figure 28 : Classification IRIS pour la MRC chez les carnivores domestiques (d'après "IRIS Kidney - Guidelines - IRIS Staging of CKD")

					
		Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4
		Pas d'azotémie (créatinine normale)	Azotémie moyenne (créatinine normale ou modérément augmentée)	Azotémie modérée	Azotémie sévère
Créatinine mg/dL	Canine	Moins de 1.4 (125 µmol/L)	1.4–2.8 (125–250 µmol/L)	2.9–5.0 (251–440 µmol/L)	Plus de 5.0 (440 µmol/L)
	Feline	Moins de 1.6 (140 µmol/L)	1.6–2.8 (140–250 µmol/L)	2.9–5.0 (251–440 µmol/L)	Plus de 5.0 (440 µmol/L)
SDMA µg/dL	Canine	Moins de 18	18–35	36–54	Plus de 54
	Feline	Moins de 18	18–25	26–38	Plus de 38

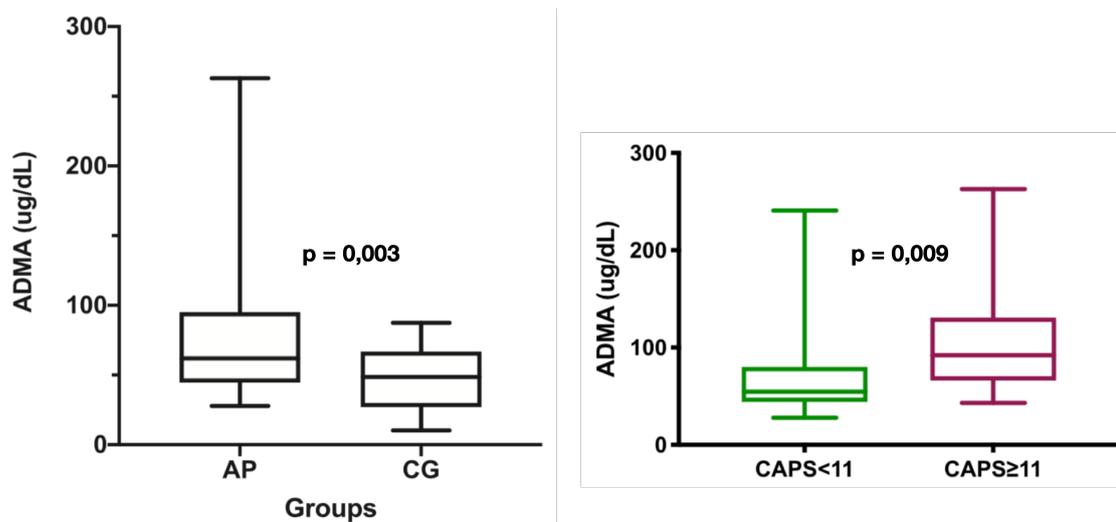
Ainsi, une augmentation chronique de la SDMA sérique chez un chien ou un chat permet de le placer dans cette classification. Comme vu précédemment (*cf. II.E.2.a.*), l'augmentation de la SDMA sérique peut être plus précoce que celle de la créatinine et les mesures de SDMA peuvent mener un vétérinaire praticien à appliquer les recommandations thérapeutiques d'un stade plus élevé plus tôt et potentiellement augmenter l'espérance de vie du patient. Enfin, plus l'animal présente un stade élevé, plus sa fonction rénale est compromise et plus il est probable que l'animal développe des complications liées à sa MRC. Son espérance de vie s'en trouve diminuée : ceci explique qu'un stade plus élevé est associé à un pronostic plus sombre.

Une étude suggère également que l'utilisation du ratio SDMA:créatinine peut s'avérer intéressant pour le pronostic des carnivores domestiques atteints de MRC (Yerramilli *et al.*, 2015). Un ratio SDMA:créatinine supérieur à 10 s'est avéré être de pronostic négatif chez les animaux atteints de MRC. Dans cette étude, plus la SDMA augmente de manière disproportionnée comparée à la créatinine, plus le risque de décès des chiens et chats atteints de MRC est élevé. Néanmoins, il est intéressant de noter qu'un ratio SDMA:créatinine supérieur à 10 n'influence pas la survie à court terme dans cette étude.

- ***Intérêt pronostic de la ADMA***

La diméthylarginine asymétrique est aujourd'hui très peu considérée en médecine vétérinaire. Cependant, une étude récente s'intéresse aux concentrations plasmatiques en ADMA de chiens atteints de pancréatites aiguës (Gori *et al.*, 2020). 54 chiens atteints de pancréatites aiguës sont inclus dans l'étude et comparés à un groupe « contrôle » de 28 chiens adultes sains. L'étude montre ainsi que, non seulement les chiens atteints de pancréatite aiguë possèdent des concentrations plasmatiques en ADMA significativement plus élevées que les chiens sains, mais également que les chiens possédant un score clinique plus élevé présentaient des concentrations plasmatiques en ADMA plus élevées. Ces résultats sont illustrés dans la figure 29.

Figure 29 : Concentration plasmatique en ADMA chez des chiens atteints de pancréatite aiguë comparé à un groupe contrôle et selon la sévérité clinique (Gori *et al.*, 2020)



AP = Pancréatite aiguë, CG = Groupe contrôle, CAPS = Sévérité de la pancréatite aiguë canine (score clinique récemment mis en place, le cut-off de 11 possède la meilleure spécificité (90 %) pour prédire la mort à court terme (Fabrès *et al.*, 2019)).

Enfin, *via* une analyse multivariée, cette étude montre qu'il existe une association significative entre la concentration plasmatique en ADMA et la survie des chiens de l'étude, les chiens décédés possédant une ADMA plus élevée.

c. Diméthylarginines et cancer

- **Études cliniques**

Les données disponibles en médecine vétérinaire sont rares. Une communication lors d'un congrès vétérinaire européen de 2016 étudie les concentrations plasmatiques en SDMA chez des chiens et chats atteints de cancers (Yerramilli *et al.*, 2016b). Dix chiens et neuf chats sont inclus dans l'étude et présentent une grande diversité de types tumoraux. Sept d'entre eux présentent une SDMA au-delà des valeurs usuelles sans élévation de la créatininémie. Ces élévations sont reliées soit à une maladie rénale, soit à une infiltration tumorale des reins. Les deux causes étant objectivées par un examen histopathologique chez ces animaux. Les résultats de l'étude ne sont pas détaillés.

L'année suivante, une étude préliminaire à la fois rétrospective et prospective est également présentée, elle concerne l'élévation de la SDMA chez des chiens atteints de lymphomes et l'évolution de ces concentrations avec l'instauration d'un traitement par chimiothérapie (Abrams-Ogg *et al.*, 2017). Cinquante-deux chiens sont inclus dans l'étude : cinquante présentent un lymphome multicentrique de stade 3 à 5 (les lymphomes dits « indolents » étant exclus de l'étude), un chien présente un lymphome médiastinal et le dernier un lymphome rénal bilatéral. Une différence significative entre les concentrations plasmatiques

en SDMA des chiens non traités pour leur lymphome et les chiens présentant une rémission complète depuis minimum une semaine à plus de deux ans est montrée, tandis qu'aucune différence n'est notée concernant la créatininémie. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Concentrations plasmatiques en SDMA et créatinine chez 52 chiens atteints de lymphomes (Abrams-Ogg et al. 2017)

Status	N	SDMA mean, median (range) [% >RI 0–14 µg/dL]	Creatinine mean, median (range) [% > RI 44–133 µmol/L]	SDMA:Creatinine mean, median (range)
Untreated	36	18, 16 (5–90) [72%]	97, 81 (47–313) [12%]	0.21, 0.19 (0.06–0.53)
CR	19	10, 11 (4–18) [11%]	90, 79 (24–169) [17%]	0.12, 0.11 (0.06–0.24)
PR	6	16, 16 (14–19) [83%]	90, 78 (65–152) [17%]	0.22, 0.20 (0.14–0.35)
Relapse	5	27, 21 (14–39) [80%]	129, 105 (71–216) [40%]	0.21, 0.20 (0.15–0.27)
B-cell	13	20, 15 (5–90)		
T-cell	6	18, 19 (10–24)		

CR : Rémission complète ; PR : Rémission partielle

L'étude précise que quatorze chiens ont eu un dosage pré et post-traitement : onze d'entre eux ont montré une valeur de SDMA au-delà des valeurs usuelles et une normalisation de la SDMA avec une différence significative entre les concentrations pré et post-chimiothérapie. L'étude précise également que l'immunophénotype du lymphome ne semble pas corrélé à l'augmentation des concentrations en SDMA.

- **Implications thérapeutiques**

La littérature vétérinaire est bien moins riche que celle de médecine humaine pour décrire de potentielles nouvelles molécules pour le traitement des cancers.

Cependant, à l'instar de ce que l'on observe en médecine humaine, un intérêt émerge concernant les inhibiteurs de PRMT5. Une récente étude s'intéresse à la PRMT5 comme potentielle cible thérapeutique dans les lymphomes canins (Renaldo *et al.*, 2018). Cette étude montre notamment que PRMT5 est effectivement surexprimée dans les cellules canines lymphomateuses, notamment comparé à des cellules de nœuds lymphatiques hyperplasiques réactifs. Par la suite, il a été démontré que l'utilisation *in vitro* d'un inhibiteur spécifique de PRMT5 (le CMP220) sur des lignées cellulaires lymphomateuses et sur des cellules issues de lymphomes canins entraîne une diminution dose-dépendante de la SDMA sans modification de la ADMA. Enfin, il a été montré que l'utilisation de cette même molécule

sur des lignées de CLBL-1 et 17-71 (des lignées de lymphomes B canins) entraîne une diminution de la croissance tumorale à la fois dose et temps-dépendante. Il est également intéressant de noter que la lignée cellulaire OSW (une lignée de lymphome T canin) semble posséder une profonde résistance à l'action du CMP220 (Renaldo *et al.*, 2018).

Ces données encouragent la poursuite des recherches sur ces voies métaboliques dans le cancer et notamment dans les hémopathies malignes dont le lymphome est le chef de file.

Dans notre étude expérimentale, les lymphomes et leucémies canins sont envisagés ainsi que les hémangiosarcomes. La prochaine partie permettra de présenter les principales caractéristiques de ces différentes maladies.

G. Présentation des différents cancers étudiés dans la partie expérimentale

1. Les lymphomes canins

Les lymphomes chez l'homme sont en constante augmentation, à raison d'environ 5 % du nombre de cas par an et pourraient bientôt figurer parmi les cancers les plus fréquents. Les chiens ne dérogent pas à cette règle où les lymphomes sont diagnostiqués de plus en plus communément et où cette entité est la troisième plus fréquente après les cancers cutanés et mammaires.

Les lymphomes sont un groupe diversifié de cancers qui ont en commun leur origine : les cellules du système lympho-réticulaire. Ils surviennent généralement dans les tissus lymphoïdes, tels que les nœuds lymphatiques, la rate et la moelle osseuse ; cependant, ils peuvent survenir dans presque tous les tissus de l'organisme (Withrow *et al.*, 2012).

Des études vétérinaires récentes caractérisent, à la lumière des données de la médecine humaine, ce type de cancer qui regroupe de nombreuses entités différentes variant par leurs données morphologiques, immunophénotypiques, cliniques, évolutives et génétiques propres. Ainsi, il n'existe pas « un » lymphome mais « des » lymphomes canins et il devient indispensable de caractériser au maximum ces maladies afin d'établir un pronostic précis.

a. Épidémiologie

Le lymphome est l'un des cancers les plus fréquents chez le chien. L'incidence annuelle est estimée de 13 à 24 cas pour 100.000 individus. On l'évalue à environ 7 à 24 % de toutes les néoplasies canines et 83 % des hémopathies malignes chez le chien (Withrow *et al.*, 2012).

Le lymphome atteint préférentiellement des individus d'âge moyen à âgé (médiane d'âge entre 6 et 9 ans). Aucune prédisposition sexuelle n'est formellement identifiée, bien que les femelles entières semblent moins atteintes. Différentes races sont réputées prédisposées : Boxers, Bull Mastiffs, Saint-Bernards, Basset Hounds, Scottish et Airedale Terriers,

Bouledogues (Withrow *et al.*, 2012). D'autres races sont évoquées : Berger Allemand, Rottweilers et les Retrievers.

b. Principales formes de lymphomes canins et diagnostic

La classification du lymphome canin comprend différents éléments comme la localisation anatomique mais également les caractéristiques histologiques et immunophénotypiques.

- ***Localisation anatomique***

La présentation de loin la plus fréquente est la forme multicentrique, elle représente environ 80 % des lymphomes canins. Cette localisation se manifeste par une polyadénomégalie superficielle : elle est indolore, parfois discrète, de consistance ferme mais dépressible. Elle peut être localisée initialement uniquement aux nœuds lymphatiques mandibulaires et pré-scapulaires. Les chiens présentant cette forme sont la plupart du temps asymptomatiques, néanmoins environ 20 à 40 % d'entre eux présentent un historique d'amaigrissement, d'anorexie, de léthargie ou d'épisodes fébriles. La plupart des lymphomes multicentriques sont d'immunophénotype B. (Withrow *et al.*, 2012).

La localisation digestive représente 5 à 7 % des lymphomes canins. À l'instar des observations chez l'homme, les mâles sont plus atteints que les femelles (Priester et McKay, 1980). Les animaux présentent fréquemment un historique de dysorexie et d'amaigrissement, la mise en évidence d'une panhypoprotéïnémie ou de signes de malabsorption digestive sont des signes d'appel. L'infiltration lymphomateuse se présente souvent de manière diffuse ou multifocale, intéressant la sous-muqueuse et la *lamina propria* de l'intestin grêle. Une infiltration transmurale est parfois observée (Withrow *et al.*, 2012).

La forme médiastinale représente également environ 5 % des lymphomes canins. Elle se caractérise par une adénomégalie médiastinale crâniale, une hypertrophie du thymus ou les deux en même temps. Il est intéressant de noter que 20 % des lymphomes multicentriques montrent des signes radiographiques d'élargissement du médiastin crânial (Withrow *et al.*, 2012). L'hypercalcémie est une condition commune dans cette forme (Greenlee *et al.*, 1990). L'immunophénotype T est le plus fréquemment mis en évidence.

La localisation cutanée est également une forme retrouvée fréquemment. Ces formes peuvent s'exprimer parallèlement par une infiltration extra-cutanée : muqueuse buccale, nœuds lymphatiques, foie, rate, moelle osseuse...(McKeever *et al.*, 1982). Une forme particulière est connue en médecine humaine sous le nom de syndrome de Sézary et se caractérise par une infiltration cutanée diffuse associée à une lymphocytose T maligne circulante (Thrall *et al.*, 1984). Les lymphomes cutanés sont souvent des lymphomes T CD8+ (alors qu'il s'agit de lymphocytes T CD4+ le plus souvent chez l'homme).

Une dernière forme qu'il convient de citer est la forme hépatosplénique, relativement rare. Il s'agit d'un lymphome intéressant le foie et la rate, parfois la moelle osseuse sans atteinte des nœuds lymphatiques périphériques. Il s'agit le plus souvent d'un lymphome T à caractère extrêmement agressif et répondant pas ou peu à la chimiothérapie (Weidmann, 2000).

- **Caractéristiques histologiques**

De nombreuses classifications histologiques ont été utilisées pour classer les LNH chez l'homme, certaines de ces classifications ont été appliquées au chien.

Différentes classifications sont ainsi reconnues, notamment la classification de Kiel actualisée, purement morphologique (Greenlee *et al.*, 1990). Cette classification permet de classer les différents lymphomes selon leur profil architectural et leur morphologie (centroblastique, centrocytique, immunoblastique...). L'un des avantages de cette classification est qu'elle intègre également l'immunophénotype (lymphome à cellules B ou T). Les différents sous-types définis sont ensuite séparés en bas grade ou haut grade selon le comportement de la tumeur, un haut grade étant plus agressif.

Un autre exemple de classification est celle du National Cancer Institute of Working Formulation : bien que cette classification n'intègre pas l'immunophénotype, elle a l'avantage de décrire la tumeur selon certains modèles d'expression (folliculaire *versus* diffus) et de la morphologie cellulaire (petites cellules fendues, grandes cellules, cellules blastiques) (Greenlee *et al.*, 1990). À l'instar de la classification de Kiel actualisée, les lymphomes sont de grades bas, haut ou intermédiaire selon l'agressivité de la tumeur.

Plus récemment la classification WHO décrit, comme chez l'homme, différentes entités morphologiques, cliniques et pronostiques (Valli *et al.*, 2011).

c. Traitements

Le traitement de choix du lymphome, *a fortiori* du lymphome multicentrique, reste donc la chimiothérapie. De nombreuses études s'intéressent aux différents protocoles utilisables chez le chien. Le choix du traitement mis en place dépend évidemment du coût, du temps investi par les propriétaires, l'efficacité, la toxicité des molécules utilisées et de l'expérience du clinicien. Il est aujourd'hui reconnu que le protocole présentant la meilleure efficacité est le protocole CHOP (Cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisolone) pour lequel il est obtenu des taux de rémission de 80 à 90 %, un temps médian de survie d'environ 12 mois avec 25 % des chiens encore vivants après 2 ans et certains chiens présentant une guérison complète (Withrow *et al.*, 2012). Le détail de ce protocole est présenté dans la figure 30.

Figure 30 : Détail du protocole CHOP (Withrow *et al.*, 2012)

S 1	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV Prednisone, 2 mg/kg, PO, SID
S 2	Cyclophosphamide, 250 mg/m ² , IV* Prednisone, 1.5 mg/kg, PO, SID
S 3	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV Prednisone, 1 mg/kg, PO, SID
S 4	Doxorubicin, 30 mg/m ² , IV† Prednisone, 0.5 mg/kg, PO, SID
S 6	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV
S 7	Cyclophosphamide, 250 mg/m ² , IV*
S 8	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV
S 9	Doxorubicin, 30 mg/m ² , IV†
S 11	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV
S 12	Cyclophosphamide, 250 mg/m ² , IV*
S 13	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV
S 14	Doxorubicin, 30 mg/m ² , IV†
S 16	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV
S 17	Cyclophosphamide, 250 mg/m ² , IV*
S 18	Vincristine, 0.7 mg/m ² , IV
S 19	Doxorubicin, 30 mg/m ² , IV†

*S = semaine ; IV = voie intraveineuse ; * = administration concomitante de furosémide à 1 mg/kg pour éviter une cystite hémorragique stérile ; † = pour les animaux ayant un poids inférieur à 15 kg, une dose de 1 mg/kg est utilisée.*

Une alternative à ce traitement multi-drogues est un traitement mono-agent à base de doxorubicine à 30 mg/m² par voie intraveineuse toutes les 3 semaines injectée à cinq reprises. Ce traitement permet d'obtenir des taux de rémission compris entre 50 et 75 % avec une médiane de survie d'environ 6 à 8 mois (Carter *et al.*, 1987).

Si les propriétaires ne désirent pas engager une chimiothérapie, l'usage de prednisolone seule à 2 mg/kg par voie orale et par jour permet d'obtenir des temps de survie courts, de l'ordre d'un à deux mois (Withrow *et al.*, 2012).

Le rôle de la radiothérapie dans le traitement des lymphomes chez le chien reste peu précis. Les indications sont surtout une atteinte encore régionale (stade I ou II) ou un traitement ciblé palliatif pour l'animal (par exemple sur une adénomégalie mandibulaire entraînant une dysphagie) (Meleo, 1997).

De la même manière, la chirurgie est rarement envisagée, le lymphome étant une atteinte systémique de l'organisme. L'utilité de la splénectomie est néanmoins sujette à débat. Elle peut s'avérer bénéfique surtout lors d'anémie hémolytique incontrôlée ou de thrombocytopénie (Brooks *et al.*, 1987).

d. Pronostic des chiens atteints de lymphome

Comme l'illustre le paragraphe précédent, il est finalement réducteur de résumer les différentes maladies déclinées selon différentes classifications en une seule et même entité pathologique appelée « lymphome ». Cette approximation prive notamment les cliniciens d'informations précieuses concernant le pronostic de l'animal et la réponse de la tumeur à la chimiothérapie.

De nombreux facteurs pronostics sont aujourd'hui connus chez le chien dans le cadre du lymphome. L'histopathologie fournit des informations intéressantes : un grade plus haut est associé à une meilleure réponse de la tumeur à la chimiothérapie. Néanmoins un haut grade est associé à un taux de survie plus faible (Teske *et al.*, 1994 ; Ponce *et al.*, 2004). La classification WHO peut fournir des informations pronostiques, par exemple un lymphome de sous-type centroblastique polymorphe est associé, avec un traitement adapté, à une survie globale moyenne de 17 mois. A l'inverse un lymphome de Burkitt présente une très mauvaise réponse au traitement et possède un comportement très agressif, la survie moyenne n'étant que de 15 jours (Ponce, 2016). L'immunophénotype fournit également des informations pronostiques : un immunophénotype T est associé à une réduction de la survie chez le chien (Greenlee *et al.*, 1990 ; Teske *et al.*, 1994 ; Ruslander *et al.*, 1997 ; Ruslander *et al.*, 1997).

Le stade clinique est faiblement associé au pronostic chez le chien : un stade I ou II (atteinte d'un ganglion ou atteinte régionale de plusieurs ganglions) est néanmoins associé à un pronostic favorable, tandis qu'un stade V (infiltration de la moelle osseuse) est associé à un pronostic sombre (Carter *et al.*, 1987). Le sous-stade clinique est néanmoins fortement associé à la survie : un sous-stade b (atteinte clinique généralisée : syndrome fébrile, léthargie, dysorexie, amaigrissement...) est associé à une réduction de la survie (Greenlee *et al.*, 1990 ; Teske *et al.*, 1994 ; Valerius *et al.*, 1997).

La localisation clinique est également associée à la survie : les formes leucémiques, cutanées diffuses, hépatospléniques et digestives (à l'exception du lymphome rectal) sont associées à un pronostic sombre chez le chien (McKeever *et al.*, 1982 ; Couto *et al.*, 1989 ; Weidmann, 2000). Quelle que soit la localisation, une atteinte cranio-médiastinale est également associée à une diminution de la survie (Starrak *et al.*, 1997).

L'existence d'une hypercalcémie paranéoplasique est également associée à un mauvais pronostic (Weller *et al.*, 1982).

Certaines études suggèrent que les femelles possèdent des médianes de survie supérieures aux mâles (MacEwen *et al.*, 1987).

La mise en place d'un traitement de longue durée à base de corticostéroïdes précédant le diagnostic diminue également significativement la réponse de la tumeur à la chimiothérapie et assombrit le pronostic ; la période seuil au-delà de laquelle la réponse est diminuée est inconnue (Khanna *et al.*, 1998).

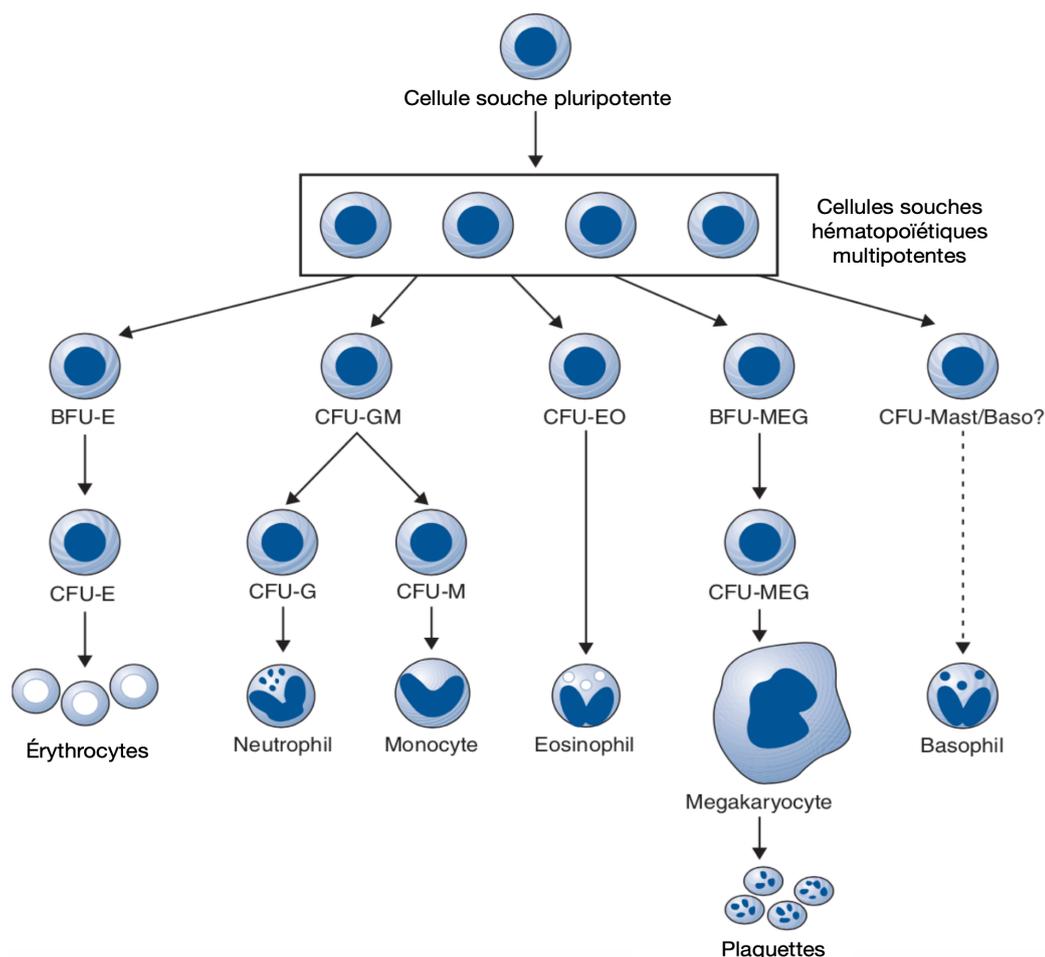
2. Les leucémies canines

Les leucémies sont des cancers où les cellules tumorales sont des cellules issues de la moelle osseuse et sont retrouvées dans la moelle et le sang. Le terme « aiguë » est employé lorsque les cellules blastiques (des cellules de la moelle précurseurs, indifférenciées) sont présentes en grande quantité dans la moelle (plus de 20 %). Les leucémies aiguës sont souvent associées à une clinique sévère, une évolution rapide et un pronostic sombre. À l'inverse, le terme « chronique » est utilisé lorsque les cellules tumorales sont bien différenciées (on observe alors souvent entre 5 et 20 % de cellules blastiques dans la moelle). Les leucémies chroniques sont plus volontiers associées à une clinique plus silencieuse, une évolution plus lente, un pronostic meilleur (Lagrange, 2017).

Selon le précurseur qui se multiplie de manière incontrôlée, on distingue ainsi les leucémies myéloïdes, où le précurseur est issu de la lignée myéloïde, des leucémies lymphoïdes où le précurseur est issu de la lignée lymphoïde (les lymphocytes).

Étant donné la plus grande variété de cellules issues de la lignée myéloïde, comme l'illustre la figure 31, la classification des leucémies myéloïdes est plus complexe.

Figure 31 : Schéma de la myélopoïèse chez le chien



BFU = Burst Forming Unit; CFU = Colony-forming unit; E = erythrocytic; GM = granulocytic-monocytic; MEG = megakaryocytic; EO = eosinophilic. Ainsi la lignée myéloïde est à l'origine de la formation des hématies, des granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles, des monocytes, des plaquettes et des mastocytes.

Une classification inspirée de la médecine humaine apparaît en 1991 pour les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) (Jain *et al.*, 1991). Sept formes différentes de LMA sont décrites : les plus fréquemment rencontrées sont les formes M1 et M2 ou leucémies myéloblastiques aiguës et les formes M4 et M5 leucémies myélomonocytiques aiguës (ces dernières représentent d'ailleurs 94 % des cas dans une étude rétrospective de 35 chiens atteints de LMA (Davis *et al.*, 2018)). La forme M7 mégacaryoblastique s'observe également classiquement chez le chien. Les formes monocytiques pures M5 et érythroblastiques M6 sont décrites. La forme promyélocytaire M3 n'est pas décrite chez le chien (Withrow *et al.*, 2012). La description des formes chroniques suit une logique similaire, on y distingue la *polycythemia vera* et le thrombocythémie essentielle qui correspondent respectivement à des leucémies chroniques d'origine érythrocytaire et mégacaryocytaire. Les leucémies myélogènes chroniques correspondent à une prolifération de neutrophiles. Enfin, les leucémies éosinophiliques et basophiliques sont décrites (Withrow *et al.*, 2012).

a. Épidémiologie

Les leucémies lymphoïdes sont plus fréquentes que les leucémies myéloïdes. De manière générale les syndromes myéloprolifératifs sont 10 fois moins fréquents que les syndromes lymphoprolifératifs (Withrow *et al.*, 2012). Bien qu'une prédisposition pour les grandes races se dégagent, il est difficile d'obtenir des informations fiables concernant l'épidémiologie des leucémies myéloïdes.

Une série de 30 cas de leucémies lymphoïdes aiguës (LLA) rapporte 27 % de Bergers Allemands, avec un sexe ratio M : F de 3 : 2. L'âge médian est de 5,5 ans dans cette étude (de 1 à 12 ans) (Matus *et al.*, 1983).

Les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) semblent moins fréquentes que les LLA mais plus fréquentes que les leucémies myéloïdes. Les individus atteints sont typiquement plus âgés avec une médiane rapportée de 10 à 12 ans. Sur une étude de 73 chiens atteints, les leucémies à lymphocytes B ne présentent pas de prédisposition sexuelle, tandis que les leucémies à lymphocytes T présentent une prédisposition en faveur des femelles 1 : 1,7 (Vernau et Moore, 1999). Dans cette même étude, 26 % des individus présentent un immunophénotype B tandis que 74 % possèdent un immunophénotype T, la plupart ayant un phénotype CD8+ (à cellules granulaires).

b. Présentation et diagnostic des leucémies

Les chiens atteints de LLA ou de LMA ont typiquement une atteinte prononcée de l'état général : anorexie, léthargie, amaigrissement, polyuro-polydypsie, etc. La splénomégalie, l'hépatomégalie ainsi que des lymphadénopathies sont fréquentes. Une anémie arégénérative potentiellement sévère est communément rencontrée ainsi qu'une thrombocytopénie et une leucocytose : des cellules blastiques circulantes augmentent la numération des leucocytes. Contre intuitivement certains chiens présentent une leucopénie (Withrow *et al.*, 2012).

À l'inverse, les chiens atteints de LLC sont souvent asymptomatiques. De la léthargie est parfois rapportée. Une splénomégalie et polyadénomégalie modérées peuvent être observées. Les chiens sont discrètement anémiés, thrombocytopéniques et présentent une leucocytose prononcée à très sévère. Les granulocytes sont souvent dans les valeurs usuelles. Il est d'ailleurs très fréquent que la LLC soit diagnostiquée de manière fortuite par le vétérinaire en recherchant une autre pathologie (Withrow *et al.*, 2012).

Les animaux atteints de LMC peuvent également être asymptomatiques. Néanmoins, les clones de granulocytes s'accumulent dans la moelle mais également dans divers organes comme la rate, les espaces périportaux et les sinusoides hépatiques, parfois les nœuds lymphatiques. Plus rarement le cœur, les reins, les poumons sont infiltrés. Les chiens atteints décèdent des complications relatives à la dysfonction des neutrophiles ou par hémorragie secondairement à la thrombocytopénie parfois observée (Withrow *et al.*, 2012). Une transformation blastique des clones lors de LMC, appelée « blastic crisis » est

également bien documentée chez le chien et peut entraîner une mort rapide (Pollet *et al.*, 1978).

La visualisation de cellules lymphoïdes néoplasiques dans la circulation générale ou la moelle osseuse *via* un myélogramme par un vétérinaire anatomo-pathologiste expérimenté est essentielle pour le diagnostic des leucémies lymphoïdes. Des méthodes d'immunomarquage et de cytométrie de flux peuvent aider à préciser le diagnostic. Les marqueurs typiquement utilisés sont CD3 pour les lymphocytes T, CD79a pour les lymphocytes B et CD34 pour les cellules blastiques (le CD34 est exprimé par les cellules blastiques myéloïdes et lymphoïdes). La présence de ce dernier permet notamment de différencier une LLA d'un lymphome de stade V. D'autres marqueurs sont disponibles chez le chien, le CD11b ou la myeloperoxydase (MPO) sont présents sur les cellules myéloïdes, le CD41 est utilisé pour caractériser les mégacaryoblastes (Withrow *et al.*, 2012).

Le diagnostic et la classification d'une LMA est particulière et nécessite l'étude d'un myélogramme et d'un frottis sanguin avec une coloration de Romanowsky (Jain *et al.*, 1991).

c. Traitements

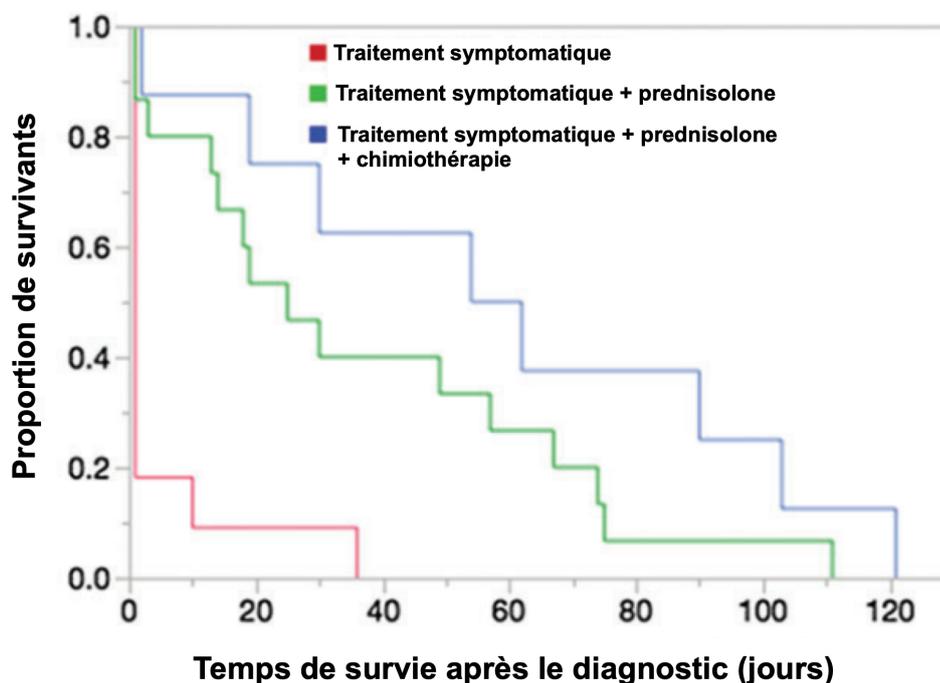
Les LLA nécessitent une chimiothérapie agressive afin de supprimer rapidement les cellules clonales de la moelle osseuse et permettre la reprise de l'hématopoïèse. L'efficacité des protocoles de chimiothérapie est difficile à établir en médecine vétérinaire. Des protocoles CHOP similaires aux lymphomes peuvent être utilisés (Withrow *et al.*, 2012). Une étude décrit l'utilisation de vincristine et de prednisolone avec un taux de rémission complète de 20 % et rémission partielle de 20 % également (Matus *et al.*, 1983).

Les animaux atteints de LLC étant souvent asymptomatiques, la question de savoir s'il faut les traiter ou non reste controversée. Certains oncologues s'accordent à dire qu'il faut traiter lorsque l'animal est anémié, thrombocytopénique ou que son comptage leucocytaire est particulièrement élevé (supérieur à 60 000 lymphocytes/ μ L). Une splénomégalie, hépatomégalie ou polyadénomégalie sont également des arguments pour traiter la LLC. Le chlorambucil semble être une molécule de choix dans le traitement de la LLC : un dosage de 0,2 mg/kg pendant 7 à 14 jours puis de 0,1 mg/kg en maintenance, associé à de la prednisolone à 3 mg/kg pendant 7 jours, puis 2 mg/kg les 7 jours suivants, puis 1 mg/kg en maintenance. Le traitement est principalement palliatif et les rémissions complètes ne sont quasiment jamais atteintes, néanmoins ce traitement permet d'offrir aux chiens une qualité de vie satisfaisante pendant 1 à 3 ans (Leifer et Matus, 1986).

Aucune chimiothérapie n'est réputée efficace pour lutter contre les leucémies aiguës non lymphoïdes, la tentative de traitement peut se révéler frustrante pour le vétérinaire et les propriétaires. Dans l'étude rétrospective citée plus haut, différents protocoles sont cités ; ils incluent des molécules telles que : la doxorubicine, L-asparaginase, cytosine arabinoside, vincristine, chlorambucil, cyclophosphamide et la lomustine associées à la prednisolone.

Bien que l'instauration d'une chimiothérapie augmente significativement la médiane de survie des patients, celle-ci reste médiocre (58 jours) comme le montre la figure 32.

Figure 32 : Courbe de Kaplan-Meier pour différents chiens atteints de LMA (Davis *et al.*, 2018)



La médiane de survie des chiens traités symptomatiquement ($n = 11$) est de 1 jour, celle des chiens traités avec de la prednisolone ($n = 15$) est de 25 jours, celle des chiens traités avec de la chimiothérapie ($n = 8$) est de 58 jours. La différence de survie entre les différents groupes est significative.

Il est conseillé de traiter les chiens atteints de LMC afin d'éviter les risques de complications et de « blastic crisis ». Le traitement de choix de la phase chronique est l'hydroxyurée par voie orale à la dose initiale de 20 à 25 mg/kg. Ce traitement est maintenu tant que le comptage leucocytaire ne tombe pas en dessous de 15 à 20 000 cellules/ μ L. Le dosage peut ensuite être diminué de 50 % avec administration quotidienne ou une dose de 50 mg/kg peut être administré de manière bi ou trihebdomadaire (Fine et Tvedten, 1999 ; Withrow *et al.*, 2012).

d. Pronostic des chiens atteints de leucémies

Les chiens atteints de LLA possèdent un pronostic sombre. Dans une étude de 21 chiens traités par de la vincristine et la prednisolone, les chiens atteignant une rémission partielle ou complète (29 % seulement) possèdent une médiane de survie de 120 jours (Matus *et al.*, 1983).

Étant donné que l'évolution de la LLC est bien plus lente, le pronostic est meilleur et certains animaux ne nécessitent aucun traitement. Un chien a survécu environ 2 ans sans traitement (Harvey *et al.*, 1981). Une normalisation de la numération leucocytaire est attendue dans environ 70 % des cas. Dans une série de 17 chiens traités à la vincristine, chlorambucil et prednisolone la médiane de survie de 12 mois avec 30 % de chiens vivants à 2 ans (Leifer et Matus, 1986).

Peu d'informations sont disponibles concernant le pronostic des syndromes myéloprolifératifs. En règle général, les atteintes aiguës sont de pronostics sombres, une étude rétrospective de 35 cas de LMA rapportent une médiane de survie de 19 jours (Davis *et al.*, 2018). Les atteintes chroniques sont de meilleurs pronostics, néanmoins le risque d'apparition de « blastic crisis » peut assombrir rapidement le pronostic des animaux atteints (Withrow *et al.*, 2012).

3. Les hémangiosarcomes canins

Le dernier type de cancer envisagé ici sera l'hémangiosarcome. Il s'agit d'un groupe de tumeur maligne dont l'origine est les cellules de l'endothélium vasculaire.

a. Épidémiologie

Il s'agit d'une tumeur fréquente chez le chien, plus que chez n'importe quelle autre espèce. Les hémangiosarcomes représentent 5 % de tous les cancers non-cutanés et 12 à 21 % des tumeurs mésoenchymateuses (Withrow *et al.*, 2012). L'hémangiosarcome splénique représente 45 à 51 % des tumeurs spléniques (Spangler et Culbertson, 1992).

L'hémangiosarcome est une tumeur typiquement rencontrée chez le chien d'âge moyen ou chez le chien âgé. Une surreprésentation des bergers allemands et des retrievers est observée (Day *et al.*, 1995).

b. Présentation et diagnostic des hémangiosarcomes

La localisation la plus fréquente des hémangiosarcomes chez le chien est la rate. D'autres localisations fréquemment rencontrées sont l'atrium droit du cœur, la peau ou le tissu sous-cutané et le foie. Des hémangiosarcomes ont été décrits dans les poumons, les reins, les muscles, la cavité buccale, les os, la vessie, le ventricule gauche, l'utérus et le rétropéritoine (Withrow *et al.*, 2012).

Une règle empirique des « deux tiers » chez le chien semble se vérifier : deux tiers des chiens avec une masse splénique présenteront un diagnostic de tumeur maligne, et deux tiers de ces tumeurs malignes seront des hémangiosarcomes (Spangler et Culbertson, 1992). Néanmoins, lorsqu'un hémobdomen est mis en évidence chez un chien n'ayant subi aucun traumatisme et qu'une échographie met en évidence une masse splénique, cette

dernière se révèle être un hémangiosarcome dans 70 % des cas (Pintar *et al.*, 2003) ; le diagnostic différentiel inclut notamment les hématomes, les hémangiomes ou d'autres sarcomes : un examen histopathologique est nécessaire pour les différencier.

Peut-être en raison de son rapport intime avec le système vasculaire facilitant l'angiogenèse et la dissémination de clones métastatiques, l'hémangiosarcome canin se caractérise par un comportement biologique très agressif : les métastases s'installent rapidement et de manière étendue. Les métastases sont hématogènes ou secondaires à une implantation abdominale suite à la rupture de la tumeur primitive. Dans une étude rétrospective sur 25 chiens, les sites métastatiques les plus fréquents sont le foie, l'épiploon, le mésentère et les poumons (Waters *et al.*, 1988). Cette dernière étude suggère que 25 % des chiens présentant un hémangiosarcome splénique auront aussi une atteinte de l'atrium droit, néanmoins empiriquement, ce pourcentage semble bien plus faible (15 % ou moins) (Withrow *et al.*, 2012). L'hémangiosarcome est également considéré comme le sarcome métastasent le plus fréquemment au cerveau, une étude sur 85 chiens relève la présence de métastases cérébrales chez 12 d'entre eux (14 %) (Waters *et al.*, 1989).

Les signes cliniques d'un chien atteint d'hémangiosarcome dépendent fortement de sa localisation. Les seuls signes peuvent être non spécifiques (abattement, anorexie, léthargie...). À l'inverse, une mort subite par choc hypovolémique et hémorragie interne est également possible. Une distension abdominale peut être objectivée lors d'une atteinte viscérale avec la présence ou non d'un signe du flot. On peut également observer une tachycardie, une pâleur des muqueuses, un pouls de faible intensité, un temps de recoloration capillaire prolongé... Lors d'atteinte de l'atrium droit, des signes de tamponnade cardiaque peuvent être observés : intolérance à l'effort, dyspnée, ascite... associé à un assourdissement des bruits cardiaques et un pouls paradoxal (Withrow *et al.*, 2012).

Suite à la mise en évidence d'une masse viscérale suspecte d'être un hémangiosarcome à l'échographie abdominale, la recherche de métastases est primordiale avant d'envisager toute chirurgie. Des radiographies thoraciques doivent être réalisées : une étude rapporte que l'obtention de trois vues diminue le risque de faux négatifs avec une sensibilité de 78 % et une valeur prédictive négative de 74 % (Holt *et al.*, 1992). L'échographie abdominale permet de rechercher d'éventuelles métastases viscérales. L'échographie est sensible mais non spécifique pour la recherche de métastases. L'aspect échographique classique d'un hémangiosarcome est une masse mal délimitée, hétérogène, cavitaire anéchogène à hyperéchogène, parfois « en cocarde » (Wrigley *et al.*, 1988). Il est également intéressant de noter que dans un contexte d'hémangiosarcome viscéral ou cutané/sous-cutané, la recherche de métastase cardiaque est rarement fructueuse si aucune métastase n'est mise en évidence ailleurs (Withrow *et al.*, 2012).

Si un hémangiosarcome cardiaque ou un épanchement péricardique est suspecté, une échocardiographie est l'examen de choix. La masse auriculaire sera visualisée dans 65 à 90 % des cas. Ainsi ne pas visualiser de masse ne permet pas d'exclure l'existence d'un hémangiosarcome cardiaque. La visualisation d'une masse n'est également pas

pathognomonique d'un hémangiosarcome : des caillots dans le péricarde peuvent en mimer l'aspect (Fruchter *et al.*, 1992). Malgré cette nuance, la mise en évidence d'une masse à l'échocardiographie est associée à un pronostic sombre dans un contexte d'épanchement péricardique. D'autres facteurs pronostics négatifs sont la présence d'ascite et un historique de syncopes (Stafford Johnson *et al.*, 2004).

Le diagnostic définitif d'hémangiosarcome repose sur une analyse histologique sur biopsie chirurgicale. La cytoponction à l'aiguille fine, bien que simple et peu coûteuse, est souvent décevante en raison de l'hémodilution qui accompagne le prélèvement. Certaines études s'intéressent à la recherche de marqueurs pour établir un diagnostic pré-chirurgical plus précis : une étude prouve que les chiens atteints d'hémangiosarcome cardiaque possèdent des concentrations sanguines en troponine I plus élevées que les chiens présentant des épanchements péricardiques idiopathiques (Shaw *et al.*, 2004). Il a également été démontré que les chiens atteints d'hémangiosarcomes possédaient des concentrations sanguines en VEGF plus importantes que des témoins sains (Clifford *et al.*, 2001).

c. Traitements

La chirurgie représente un moyen obligatoire pour agir efficacement sur un hémangiosarcome. Cette chirurgie se veut agressive pour retirer autant de tissus localement affectés que possible. Dans le cadre d'un hémangiosarcome splénique, une splénectomie est obligatoire. Pour un hémangiosarcome cutané ou sous-cutané les règles d'exérèse des sarcomes des tissus mous s'appliquent de manière similaire. Une intervention chirurgicale est également décrite dans le traitement de l'hémangiosarcome cardiaque primaire. Les masses auriculaires droites peuvent être réséquées grâce à un système d'agrafes ou par suture manuelle ; des procédures de reconstruction sont également décrites si la résection doit être plus extensive (Brisson et Holmberg, 2001). La mortalité péri-opératoire est de 13 % et une étude rétrospective suggère que les chiens opérés pour un hémangiosarcome cardiaque survivant à la période péri-opératoire ont un pronostic similaire aux chiens atteints d'hémangiosarcomes viscéraux (Aronsohn, 1985).

Étant donné le potentiel métastatique important de l'hémangiosarcome et des mauvais résultats obtenus avec une chirurgie seule, une chimiothérapie adjuvante à la chirurgie est toujours indiquée, à l'exception des tumeurs cutanées pures de petites tailles. Un traitement mono-agent à base de doxorubicine est le plus souvent employé. Il s'agit de procéder à une injection de doxorubicine à 30 mg/m² par voie intraveineuse toutes les 2 à 3 semaines à 5 reprises (Withrow *et al.*, 2012). Des combinaisons avec de la vincristine et du cyclophosphamide existent également mais leur supériorité par rapport au traitement mono-agent n'est pas démontrée.

L'utilisation de chimiothérapie métronomique est également décrite ; l'utilisation d'un inhibiteur de la cyclo-oxygénase 2, enzyme probablement impliquée dans l'angiogenèse, est le plus communément observée. Une étude sur un petit nombre de chiens montre des

survies similaires chez les animaux traités par chimiothérapie métronomique et chimiothérapie à dose maximale tolérée (Lana *et al.*, 2007). Le niveau de preuve de ces données étant encore faible, cette alternative peut être proposée en seconde intention lorsque la chimiothérapie conventionnelle est refusée par les propriétaires. Néanmoins, le cadre d'utilisation de la chimiothérapie métronomique mérite d'être mieux défini : une étude récente montre que les chiens recevant un protocole de chimiothérapie métronomique à la suite de la chimiothérapie classique avaient des survies significativement plus longues que les chiens recevant uniquement la chimiothérapie classique (Finotello *et al.*, 2017).

Une étude a testé l'efficacité d'une immunothérapie adjuvante à la thérapie classique : elle étudie l'utilisation du muramyl tripeptide-phosphatidyléthanolamine encapsulé dans un liposome (L-MTP-PE), une molécule dérivée de la paroi des mycobactéries qui est un puissant activateur des monocytes/macrophages. Le temps de survie médian des chiens traités par traitement classique et immunothérapie était alors significativement plus grand que celui des chiens traités uniquement par thérapie classique (5,7 contre 9,1) et 40 % des chiens traités avec le L-MTP-PE ont montré des temps de survie longs (Vail *et al.*, 1995). Bien que ces résultats soient prometteurs, l'utilisation du L-MTP-PE reste compliquée, le traitement étant peu disponible en médecine vétérinaire.

d. Pronostic des chiens atteints d'hémangiosarcomes

Le traitement mis en place face à un hémangiosarcome influence la durée de survie des patients. Le pronostic des chiens traités uniquement par chirurgie est mauvais : la médiane de survie varie de 19 à 86 jours selon les études, avec moins de 10 % de survivants à 1 an (Withrow *et al.*, 2012). L'ajout d'une chimiothérapie adjuvante à la chirurgie permet d'obtenir des médianes de survie de 141 à 179 jours, néanmoins elle ne permet pas d'obtenir plus de survie à 1 an (Ogilvie *et al.*, 1996).

Certaines études tendent à montrer qu'une tumeur splénique non rompue est de meilleure pronostic qu'une tumeur rompue lorsqu'une chimiothérapie est mise en place (Brown *et al.*, 1985 ; Vail *et al.*, 1995).

Une autre étude ayant utilisé un schéma de classification histologique a montré que les chiens ayant des tumeurs de bas grades, bien que rares, présentent un pronostic plus favorable que les chiens atteints de tumeurs de grade intermédiaire ou haut (Ogilvie *et al.*, 1996).

Concernant l'hémangiosarcome cardiaque, le pronostic semble tout aussi mauvais que pour l'hémangiosarcome splénique. Même lorsqu'une chirurgie est réalisée, la médiane de survie n'excède pas 4 mois (Aronsohn, 1985).

Deuxième partie : étude expérimentale

I. Introduction

Les diméthylarginines asymétrique (ADMA) et symétrique (SDMA) sont des dérivés méthylés de la L-arginine présents naturellement dans le plasma sanguin des hommes et des carnivores domestiques. Ces deux molécules sont synthétisées lors de la dégradation des protéines cellulaires contenant des résidus d'arginines méthylés. La méthylation de l'arginine est catalysée par la famille des arginines méthyltransférases (PRMT). L'ADMA est un inhibiteur compétitif de la NO-synthase, elle possède donc un effet inhibiteur direct sur la synthèse de NO. La SDMA n'interfère pas avec l'activité de la NOS mais possède un effet inhibiteur indirect sur la synthèse de NO. Le NO est un agent vasoactif majeur responsable du bon fonctionnement des endothéliums, mais il possède également de nombreuses cibles au sein de l'organisme, il possède notamment un rôle dans de nombreux mécanismes de régulation de la croissance et de la multiplication cellulaire.

C'est pourquoi de nombreuses études tentent de comprendre l'implication et le rôle de la L-arginine et de ses métabolites dans différentes maladies et notamment dans les cancers. À ce titre, il est aujourd'hui établi que les PRMT jouent un rôle déterminant dans les phénomènes d'oncogenèse et particulièrement dans les hémopathies malignes. Une des conséquences de la surexpression de ces enzymes dans certains cancers est l'élévation des concentrations sanguines en diméthylarginines asymétrique et symétrique comme montré à différentes reprises en médecine humaine, tout particulièrement chez les individus atteints d'hémopathies malignes (Szuba *et al.*, 2008 ; Doroszko *et al.*, 2016 ; Chachaj *et al.*, 2018).

Les données vétérinaires sont plus rares sur le sujet. Néanmoins, en 2017 une étude évalue les concentrations plasmatiques en SDMA de chiens atteints de lymphomes multicentriques (Abrams-Ogg *et al.*, 2017). Cette étude montre non seulement qu'il existe une augmentation significative des concentrations plasmatiques en SDMA, sans augmentation concomitante de la créatinine chez ces chiens, mais également une diminution significative des concentrations plasmatiques en SDMA, observée chez les chiens traités par chimiothérapie et montrant une rémission totale. De plus, il est montré que les chiens en rechute présentent des concentrations en SDMA à nouveau augmentées.

Des concentrations sanguines élevées en ADMA et SDMA sont réputées comme étant des facteurs de risque de mortalité chez l'homme. Cette mortalité accrue serait notamment due à l'inhibition de la synthèse de NO, aboutissant à un phénomène appelé dysfonction endothéliale. En 2018, une étude en médecine humaine montre d'ailleurs que les élévations des concentrations sanguines en ADMA et en SDMA peuvent être retenues comme des facteurs pronostiques de mortalité chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (Chachaj *et al.*, 2018).

En plus des hémopathies malignes, étant donnée la forte relation entre les diméthylarginines et le bon fonctionnement de l'endothélium, notre étude portera également sur des cancers vasculaires. L'hémangiosarcome, un cancer possédant une prévalence particulièrement élevée chez le chien, est donc une pathologie intéressante à étudier dans ce cadre.

Pour ces différents types de cancers, un diagnostic précoce est souvent associé à un meilleur pronostic. De plus, il existe à ce jour peu voir pas de marqueurs permettant de prédire la rechute après un traitement ayant permis une rémission partielle ou complète. L'établissement de tels marqueurs apparaît aujourd'hui comme un enjeu majeur en oncologie vétérinaire.

Cette étude prospective s'inscrit dans la continuité des éléments exposés dans la partie bibliographique et souhaite établir des données encore inexistantes en médecine vétérinaire à savoir :

- Évaluer si les concentrations sanguines en diméthylarginines sont plus élevées chez les chiens atteints de différents types de cancers : lymphomes, leucémies et hémangiosarcomes.
- Évaluer si ces marqueurs peuvent être envisagés comme facteurs pronostiques chez des chiens atteints de lymphomes, leucémies et hémangiosarcomes.

II. Matériels et méthodes

A. Animaux de l'étude

Les chiens atteints d'hémangiosarcome, d'un lymphome ou d'une leucémie ont été inclus prospectivement au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort (CHUVA) en Décembre 2018 et Juillet 2020.

Les chiens de l'étude ont été inclus après l'obtention d'un consentement par le propriétaire (cf. fiche de consentement en Annexe n°1). Au moment de faire signer le consentement, une lettre d'information récapitulant les points importants de l'étude est également donnée au propriétaire (cf. lettre d'information en Annexe n°2).

B. Critères d'inclusion et d'exclusion

1. Critères d'inclusion dans l'étude

L'étude porte sur des chiens de propriétaires présentant un diagnostic de lymphome, de leucémie ou d'hémangiosarcome, métastasés ou non.

Le diagnostic des différents types de cancers a été établi par un examen cytologique ou histologique. Les lames sont lues par un anatomo-pathologiste spécialisé vétérinaire.

Afin de préciser le statut du cancer (métastasé ou non) et le stade, des bilans d'extension ont été réalisés :

- Pour les lymphomes multicentriques : un examen tomодensitométrique du thorax et de l'abdomen ou des radiographies thoraciques et une échographie abdominale ont été réalisés. Des cytoponctions d'organes (foie, rate et nœuds lymphatiques modifiés aux examens d'imagerie) ont été pratiquées. Si l'examen hématologique présentait des anomalies, un myélogramme était réalisé.
- Concernant les hémangiosarcomes : des radiographies thoraciques et une échographie abdominale ont été proposées, un examen tomодensitométrique de thorax et d'abdomen pouvait se substituer à ces examens. L'échographie a été associée à des cytoponctions d'organes (notamment foie et rate) si ces derniers apparaissaient modifiés. Concernant les hémangiosarcomes cardiaques, un examen échocardiographique mettant en évidence une masse auriculaire droite est considéré comme suffisant pour inclure le chien dans l'étude. En cas de contexte évocateur, une échocardiographie cardiaque peut être pratiquée pour rechercher des métastases cardiaques d'un hémangiosarcome extracardiaque.
- Enfin, les chiens atteints de leucémies ont subi systématiquement un myélogramme ainsi que des radiographies thoraciques et une échographie abdominale. Les examens d'imagerie permettaient la réalisation de cytoponctions d'organes sur les organes présentant des anomalies.

2. Critères d'exclusion et de non inclusion dans l'étude

L'insuffisance rénale peut être diagnostiquée tardivement. La créatinine est élevée lorsque 75% de la fonction rénale est altérée. La SDMA est justement un marqueur précoce de la baisse du débit de filtration glomérulaire. Ainsi pour exclure les animaux qui ont une insuffisance rénale, nous avons :

- Exclu les animaux avec une créatinine supérieure aux valeurs usuelles de l'analyseur (critères d'inclusion).
- Procédé à une relecture des dossiers incluant les symptômes cliniques, les analyses urinaires (en particulier la densité urinaire), les examens d'imagerie. Cette lecture a

été réalisée par un spécialiste en médecine interne (diplômé ECVIM) pour exclure les animaux qui pourraient présenter une maladie rénale à un stade précoce.

Les animaux présentant une maladie concomitante sévère (insuffisance organique (cardiaque, hépatique,...), dysendocrinie non stabilisée, une maladie inflammatoire à répercussion systémique ont été exclus de l'étude.

Les chiens ayant reçu un traitement anti-cancéreux (chimiothérapie ou radiothérapie) il y a moins d'un mois n'ont pas été inclus dans cette étude. La présence d'une autre affection néoplasique concomitante aux trois cancers envisagés était également un critère d'exclusion.

Enfin, les animaux présentant une hypertension systémique supérieure à 160 mmHg mesurée par oscillométrie à plusieurs reprises ont été exclus de l'étude.

C. Protocole expérimental

1. Prélèvements au diagnostic

Un prélèvement de sang veineux au moment du diagnostic, avant tout traitement de chimiothérapie ou chirurgical, a été réalisé. Deux échantillons d'environ 2 millilitres de sang chacun ont été prélevés : l'un sur tube EDTA, l'autre sur tube sec ou hépariné. Le prélèvement est effectué à la veine jugulaire ou la veine saphène externe.

Une fois prélevé, le sang a été centrifugé à froid (cinq minutes à 5 000 tours, à 4°C), le sérum ou le plasma obtenus ont été ensuite immédiatement séparés en différents aliquots d'un volume minimal de 200 µl et placé au congélateur à -20°C. Les prélèvements ont ensuite été transférés à -80°C dans un délai maximal d'un mois jusqu'au moment des dosages. Cette méthode de congélation permet une bonne conservation du prélèvement jusqu'à 24 mois post-congélation (d'après DLD Diagnostika, Hamburg).

2. Méthodes de dosage

Les *sera* ou plasmas héparinés ont été utilisés pour le dosage des concentrations sanguines en SDMA chez les individus de l'étude. Deux méthodes de dosage ont été employées : les dosages SDMA ont été réalisés sur des *sera* par le laboratoire IDEXX par méthode ELISA ou sur plasmas EDTA par le test Catalyst® SDMA (méthode de dosage immunologique *via* l'analyseur Catalyst One (laboratoire IDEXX)).

Les plasmas EDTA étaient réservés aux dosages des concentrations sanguines en ADMA. La méthode employée était une méthode ELISA proposée par le laboratoire DLD Diagnostika GmbH. Des kits utilisables en recherche clinique sont disponibles et fournissent des résultats comparables aux méthodes de référence (HPLC) (Schulze *et al.*, 2004 ; Siroka

et al., 2007). Cette méthode a déjà été utilisée en recherche clinique vétérinaire (Li *et al.*, 2012). Pour rappel, ce dosage ne sera pas présenté dans la partie résultats mais sera réalisé ultérieurement.

3. Recueil des données

Pour chaque animal inclus dans l'étude : la race, l'âge, le sexe et le poids au moment du diagnostic sont référencés. Les concentrations sanguines en SDMA et en créatinine au moment du diagnostic sont également référencées.

Un suivi le plus précis possible est établi. Les informations sur les chiens de l'étude sont récoltés lors de consultations de suivis ou par mail. Le suivi se termine au 15 Août 2020. Il est ainsi référencé si les animaux inclus dans l'étude sont vivants ou décédés, s'ils sont décédés leur date de décès est également précisée. Si une euthanasie a été pratiquée, celle-ci est également précisée.

D. Analyses statistiques

Les données suivant une distribution normale comme l'âge ont été représentées sous la forme de moyenne \pm écart-type. Les données à distribution non normale comme les valeurs de SDMA ont été représentées sous la forme d'une médiane et d'un intervalle interquartile. La normalité des variables a été testée par un test de Shapiro-Wilk.

Les concentrations plasmatiques en SDMA et la créatininémie dans les différents groupes ont été comparées par une analyse de la variance (ANOVA) non paramétrique à un facteur (Kruskal-Wallis) suivie d'un test post-hoc de Dunn's.

Les analyses en sous-groupe des concentrations de SDMA ont été réalisées à l'aide d'un test de Mann-Whitney.

Les données de survie ont été représentées par une courbe de Kaplan-Meier et les différences de survies entre les groupes ont été analysées par un test du log-rank pour l'ensemble des chiens atteints d'hémopathie maligne ou pour les chiens atteints de lymphomes ou d'hémangiosarcome.

Pour l'ensemble des tests statistiques, le seuil de significativité a été fixé à $p=0.05$.

III. Résultats

A. Description de la population étudiée

1. Répartition des différents lots

Trente-quatre chiens ont été inclus durant la période de recrutement au CHUVA. Ces 34 chiens ont été répartis selon différents lots : lymphome, leucémie, hémangiosarcome et autres. Le détail de la répartition dans les différents lots est présenté dans le tableau 4.

Tableau 4 : Répartition des chiens inclus dans l'étude en différents lots

Groupes	Lymphomes	Hémangiosarcomes	Leucémies	Autres	Total
Nombre de chiens	12	13	3	6	34

Les 12 chiens atteints de lymphomes comprenaient 10 lymphomes multicentriques (83,3 %), un lymphome médiastinal (8,3 %) et un lymphome osseux (8,3 %). Parmi les 10 lymphomes multicentriques diagnostiqués, deux ont été classés en lymphome de bas grade (20 %) et huit en lymphome de haut grade (80 %). Huit de ces lymphomes ont été immunophénotypés, on décompte ainsi cinq lymphomes B (62,5 %) et trois lymphomes T (37,5 %).

Parmi les hémangiosarcomes, 10 d'entre eux avaient une localisation splénique (77 %), un avait une localisation cardiaque (7,7 %) et deux avaient une localisation cutanée ou sous-cutanée (15,3 %). Sept de ces chiens présentaient des métastases au bilan d'extension (53,8 %) et six ont été considérés non métastasés (46,2 %). L'un des chiens inclus dans l'étude présentait une récurrence d'un hémangiosarcome anciennement traité par chirurgie et chimiothérapie, un autre avait déjà été traité plusieurs mois auparavant pour un lymphome multicentrique de bas grade, il était en rémission complète.

Les leucémies diagnostiquées comprenaient une leucémie lymphoïde aiguë B, une leucémie lymphoïde chronique T et une leucémie mixte lymphoïde et myéloïde aiguë B.

Enfin, on décomptait dans le lot « autres » les chiens initialement suspectés d'être atteints d'un des trois cancers considérés mais ne présentant finalement aucune des pathologies citées ci-dessus une fois le diagnostic établi. Ce lot contenait ainsi trois chiens présentant des masses spléniques qui se sont révélées être des hématomes à l'examen histologique. On décomptait également un chien présentant un nodule fibro-histiocytaire splénique, un chien présentant un hématome splénique mais présentant également un adénocarcinome pancréatique diagnostiqué de manière concomitante ainsi qu'un chien présentant une masse cardiaque étant le plus probablement une métastase d'ostéosarcome.

2. Race

La répartition des différentes races des chiens inclus dans l'étude est détaillée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Répartition des différentes races des chiens inclus dans l'étude

Races	Lymphome	Hémangiosarcome	Leucémie	Autres
Loulou de Poméranie		1		
Berger Australien	1	2		
Bouledogue Français	1			
Berger Allemand		3		
Parson Russel Terrier				1
Cocker Anglais	1	1		
Golden Retriever	1			
Galgo espagnol			1	
Labrador Retriever			1	1
Setter Anglais		1		
Bull Terrier	2			
Husky Sibérien	1	1		
Drathaar				1
Jack Russel Terrier	1			
Boxer				1
Beauceron	1			
Dogue de Bordeaux	1			
Croisé	2	4	1	2

Hormis un nombre plus important de bergers allemands dans le groupe « hémangiosarcomes », aucune prédisposition raciale ne semble ressortir de cette répartition.

3. Sexe

On observait dans le groupe « lymphome » un total de cinq mâles pour sept femelles. Aucun mâle n'était castré tandis que parmi les sept femelles, trois étaient stérilisées.

Dans le groupe « hémangiosarcome », on retrouvait huit mâles pour cinq femelles. Parmi les huit mâles, trois étaient castrés et toutes les femelles de ce groupe étaient stérilisées.

Dans le groupe « leucémie », on dénombrait deux mâles castrés et une femelle stérilisée.

Dans le groupe « autres », on comptait quatre mâles tous castrés et deux femelles dont une était stérilisée.

4. Âge

Le détail des moyennes d'âge et des âges extrêmes pour les différents groupes de l'étude est présenté par le tableau 6. Les âges extrêmes observés étaient de deux ans pour le plus jeune chien atteint (lymphome) et de 18 ans pour le chien le plus âgé (leucémie lymphoïde chronique).

Tableau 6 : Âge moyen des chiens inclus dans l'étude en fonction de leur groupe

	Lymphomes	Hémangiosarcomes	Leucémies	Autres	Total
Âge (moyenne +/- écart type)	8,14 +/- 2,74	9,68 +/- 2,25	11,69 +/- 6,38	10,99 +/- 2,33	9,55 +/- 3,03
Âges extrêmes [min - max]	[2 - 12]	[6 - 13,5]	[5 - 18]	[8 - 14]	[2 - 18]

5. Poids

Le détail des moyennes de poids des chiens inclus dans l'étude en fonction de leur groupe est présenté dans le tableau 7.

Tableau 7 : Poids moyens des chiens inclus dans l'étude en fonction de leur groupe

Groupes	Lymphome	Hémangiosarcome	Leucémie	Autres	Total
Poids (moyenne +/- écart type)	28,20 +/- 11,98	25,52 +/- 9,27	18,67 +/- 13,48	27,85 +/- 9,81	26,27 +/- 10,58

6. Décès des chiens de l'étude

Le nombre d'animaux décédés à l'issue de la période de suivi définie dans l'étude ainsi que si une euthanasie a été pratiquée sont synthétisés en fonction des groupes dans le tableau 8.

Tableau 8 : Nombre de chiens décédés et euthanasiés selon les différents groupes de l'étude

Groupes	Lymphome	Hémangiosarcome	Leucémie	Autres
Nombre de chiens décédés	6	7	2	1
Nombre de chiens euthanasiés	2	6	2	1

B. Description du dosage de la SDMA chez les chiens inclus dans l'étude

1. Lymphomes

Les 12 chiens atteints de lymphomes inclus dans l'étude possédaient une concentration sanguine moyenne en SDMA de 20,75 µg/dL et une concentration médiane de 13,5 µg/dL [12,75 - 25,75]. Ces résultats sont illustrés par la figure 33.

Parmi ces 12 chiens, six (50 %) possédaient une concentration sanguine en SDMA supérieure ou égale à la limite supérieure des valeurs usuelles du laboratoire IDEXX, à savoir 14 µg/dL.

2. Hémangiosarcomes

Les 13 chiens inclus dans l'étude et présentant un hémangiosarcome possédaient une concentration sanguine moyenne en SDMA de 15,77 µg/dL et une concentration médiane de 13 µg/dL [10 - 20]. Ces résultats sont illustrés par la figure 33.

Parmi ces 13 chiens, six (46,1 %) possédaient une concentration sanguine en SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL.

3. Leucémies

Le groupe « leucémies » ne comprenait que trois individus dont les dosages en SDMA étaient les suivants : 19 et 19 µg/dL pour les deux leucémies aiguës et 10 µg/dL pour la leucémie chronique.

Ces données nous permettent donc de calculer une moyenne de 16 µg/dL et une médiane de 19 µg/dL [14,5 – 19].

4. Autres

Le groupe « autres » contenait six chiens dont trois ont été diagnostiqués de masses spléniques bénignes et trois ont été diagnostiqués de pathologies néoplasiques n'étant pas un lymphome, une leucémie ou un hémangiosarcome.

Chez ces chiens, la moyenne des dosages de SDMA était égale à 8,17 µg/dL pour une médiane égale à 8,5 µg/dL [7,25 – 9,75]. Ces données sont illustrées par la figure 33.

Parmi ces six chiens, aucun ne possédait une concentration sanguine en SDMA strictement supérieure à 10 µg/dL.

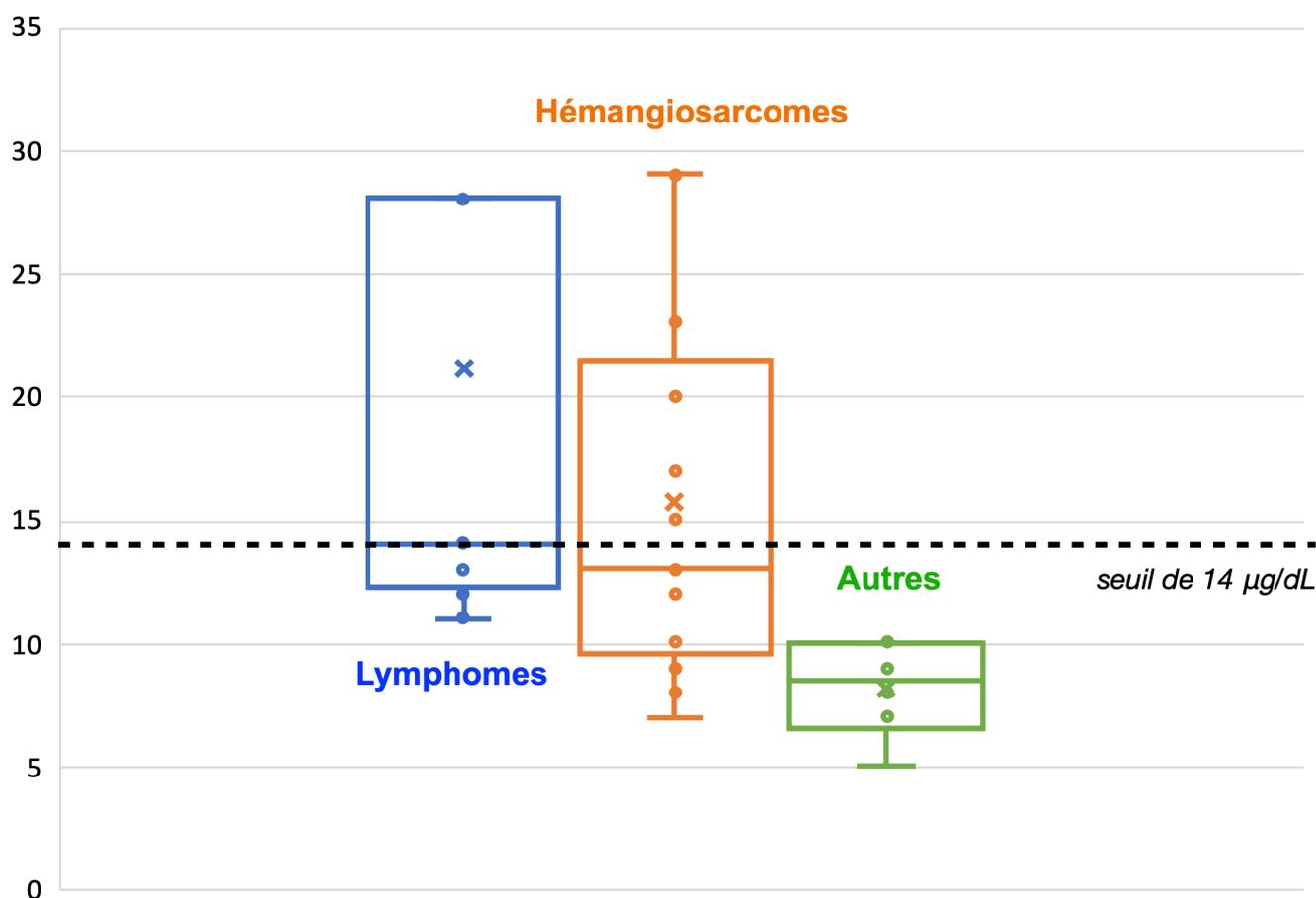
Considérons désormais que l'on scinde le groupe « autres » en deux groupes distincts : « autres non néoplasies » pour les individus diagnostiqués de masse splénique bénigne et

« autres néoplasies » pour les chiens atteints d'un cancer autre que lymphome, leucémie et hémangiosarcome.

Le sous-groupe « autres non néoplasie » était donc composé de trois chiens dont les dosages de SDMA sont : 7, 8 et 10 $\mu\text{g/dL}$. Ces valeurs donnaient une valeur moyenne égale à 8,33 $\mu\text{g/dL}$ et une valeur médiane égale à 8 $\mu\text{g/dL}$ [7,5 - 9].

De la même manière, le sous-groupe « autres néoplasies » était constitué de trois chiens dont les dosages de SDMA sont égaux à : 5, 9 et 10 $\mu\text{g/dL}$. Ces valeurs donnaient une valeur moyenne égale à 8 $\mu\text{g/dL}$ et une valeur médiane égale à 9 $\mu\text{g/dL}$ [9 – 9,5].

Figure 33 : Diagrammes de type "boîte à moustaches" des concentrations sanguines en SDMA des chiens de l'étude du groupe lymphome, hémangiosarcome et autres



La moyenne de la série de données est figurée par une croix, la médiane par la barre horizontale qui coupe la boîte en deux. Les valeurs du premier et du troisième quartiles sont respectivement représentées par l'arrête inférieure et supérieure de la boîte. Il est à noter qu'une valeur « aberrante » n'apparaît pas sur ce graphique : un des chiens atteint de lymphome présentait une SDMA de 67 $\mu\text{g/dL}$.

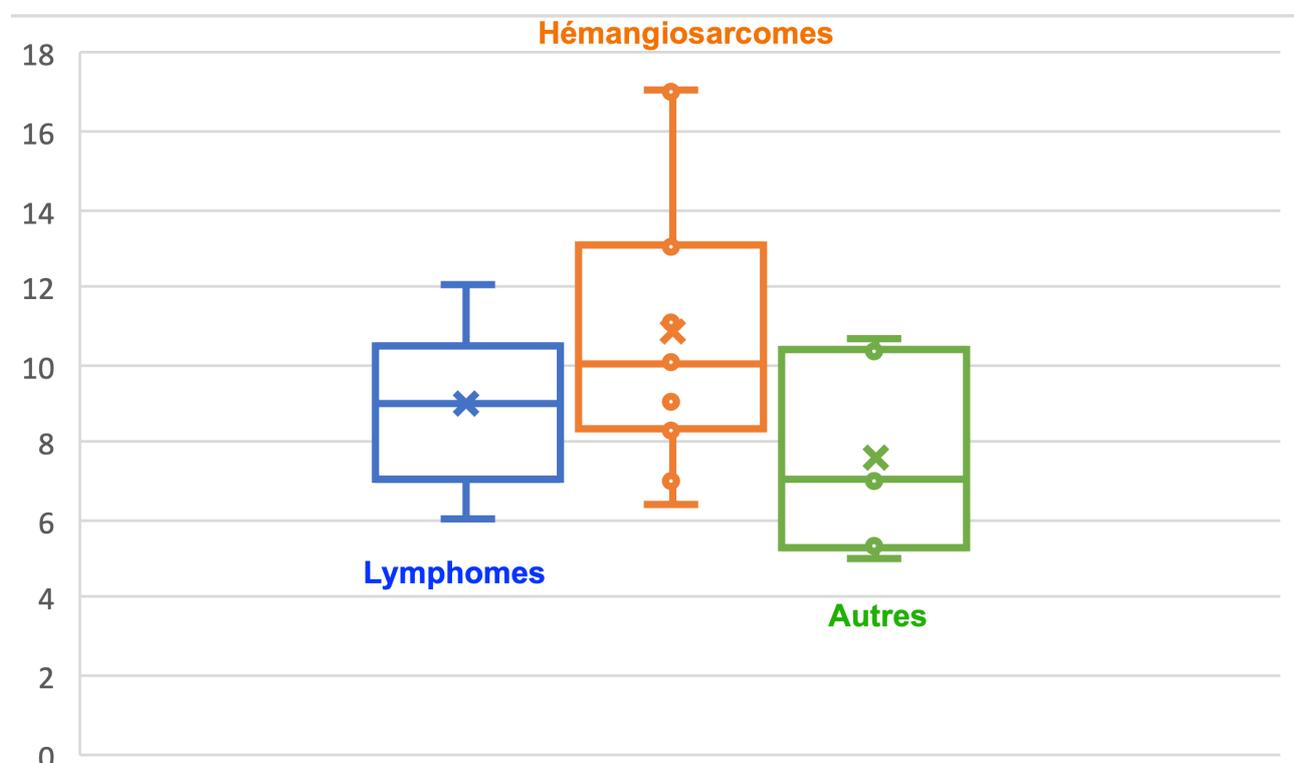
C. Créatininémie plasmatique de la population d'étude

Le détail de la description du dosage de la créatinine sérique chez les individus inclus dans l'étude apparaît dans le tableau 9 et la figure 34.

Tableau 9 : Dosage de la créatinine sérique chez les individus inclus dans l'étude

Groupes	Lymphome	Hémangiosarcome	Leucémie	Autres
Créatinine moyenne (en mg/dL)	8,89 +/- 1,86	10,76 +/- 3,62	12 +/- 4	7,53 +/- 2,41
Créatinine médiane (en mg/dL)	9	9,5	12	7

Figure 34 : Diagrammes de type "boîte à moustaches" des concentrations sanguines en créatinine des chiens de l'étude du groupe lymphome, hémangiosarcome et autres



La moyenne de la série de données est figurée par une croix, la médiane par la barre horizontale qui coupe la boîte en deux. Les valeurs du premier et du troisième quartiles sont respectivement représentées par l'arrête inférieure et supérieure de la boîte.

Aucune différence significative n'était observée dans les concentrations sanguines en créatinine au moment du diagnostic entre les chiens des différents groupes.

D. Comparaison de la concentration en SDMA au moment du diagnostic chez les individus inclus dans l'étude

1. Comparaison entre les différents groupes

Un test de Kruskal-Wallis à deux degrés de liberté a été réalisé pour comparer les concentrations sanguines en SDMA au moment du diagnostic des chiens atteints de lymphomes, d'hémangiosarcomes et des chiens du groupe « autres ». Le résultat de ce test était $H = 10,229$, correspondant à un $p = 0,006$. Ainsi, il existe une différence significative dans les concentrations sanguines en SDMA chez les chiens de ces différents groupes.

Un test *post-hoc* de Dunn a pour la suite été réalisé dans le but de déterminer entre quels groupes existent une différence significative. Les résultats apparaissent dans le tableau 10.

Tableau 10 : Procédures de comparaison multiple par paires (méthode de Dunn)

Comparaisons	Différence des rangs	Q	p < 0,05
Lymphomes vs Autres	13,72	3,07	Oui
Lymphomes vs Hémangiosarcomes	2,05	0,57	Non
Hémangiosarcomes vs Autres	11,66	2,68	Oui

Le groupe « leucémies » n'a pas été intégré dans ce test étant donné son effectif trop faible ($n = 3$). En réalisant un test de Mann-Whitney pour comparer les concentrations en SDMA chez ces individus au moment du diagnostic aux chiens du groupe « autres », un $p = 0,048$ est obtenu.

Ainsi, ces résultats nous apprennent qu'il existe une différence significative dans les concentrations sanguines en SDMA au diagnostic entre les chiens appartenant au groupe « autres » et les chiens atteints de lymphomes ou d'hémangiosarcomes. Il est intéressant d'observer qu'une différence significative est également observée entre les chiens atteints de leucémies et les chiens du groupe « autres », malgré le faible effectif du groupe « leucémies ».

Les chiens atteints de lymphomes, leucémies et hémangiosarcomes possédaient donc des concentrations en SDMA significativement plus élevées que les chiens du groupe « autres ».

2. Comparaison des chiens atteints de pathologies cancéreuses et les autres

Un test de Mann-Whitney a été réalisé entre le sous-groupe « autres non néoplasie » et tous les autres chiens de l'étude (c'est-à-dire tous les chiens inclus présentant une pathologie cancéreuse). Le résultat donnait $p = 0,031$.

Ainsi, les chiens atteints de cancers inclus dans l'étude possédaient des concentrations sanguines en SDMA significativement plus élevées au moment du diagnostic que les chiens atteints de maladies non cancéreuses.

3. Autres comparaisons

a. Comparaisons au sein du groupe lymphome

Nous avons par la suite comparé de manière similaire les concentrations sanguines en SDMA des individus diagnostiqués lymphome de haut grade ($n = 8$) et lymphome de bas grade ($n = 2$). Il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes ($p = 0,070$). De même, il n'existait pas de différence significative entre le groupe lymphome B ($n=4$) et lymphome T ($n=4$) ($p = 0,766$).

b. Comparaisons au sein du groupe hémangiosarcome

Nous avons comparé au sein du groupe « hémangiosarcomes » les chiens présentant des métastases lors du bilan d'extension ($n = 7$) et ceux n'en présentant pas ($n = 6$). Nous avons ainsi montré que les chiens atteints d'hémangiosarcomes métastasés possédaient en moyenne des concentrations sanguines en SDMA significativement plus élevées ($p = 0,042$) que les chiens atteints d'hémangiosarcomes non métastasés.

Enfin, nous avons comparé les chiens présentant une masse splénique qui s'est avérée être un hémangiosarcome splénique ($n = 10$) et ceux diagnostiqués avec une autre affection splénique ($n=4$, trois hématomes et un nodule fibro-histiocytaire). Cette analyse révèle que les chiens atteints d'hémangiosarcomes spléniques possédaient en moyenne des concentrations en SDMA au moment du diagnostic significativement plus élevées ($p = 0,0028$) que les chiens atteints d'une pathologie splénique différente d'un hémangiosarcome.

c. Comparaisons au sein du groupe « autres »

Nous avons comparé les valeurs de SDMA au sein du groupe autre pour évaluer si une différence existait entre les animaux du sous-groupe « autres non néoplasie » et « autres néoplasie » contenant des chiens présentant un cancer autre que lymphome, hémangiosarcome ou leucémie. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre ces deux sous-groupe ($p = 1$) suggérant que les néoplasies autres que

lymphomes, leucémies ou hémangiosarcome ne sont donc pas associées à une élévation de la concentration en SDMA.

E. Comparaison de la concentration en SDMA au moment du diagnostic chez les individus inclus dans l'étude

Un test ANOVA a été réalisé pour évaluer si une différence significative existait dans les concentrations en créatinine au moment du diagnostic chez les chiens du groupe « lymphomes », « hémangiosarcomes » et « autres ».

Les différences entre les valeurs moyennes des groupes ne sont pas suffisamment importantes pour exclure la possibilité que la différence soit due à la variabilité de l'échantillonnage aléatoire ; il n'y a pas de différence statistiquement significative ($p = 0,069$).

F. Comparaison de la survie des individus inclus dans l'étude selon leur concentration en SDMA au moment du diagnostic

1. Survie des chiens atteints d'hétopathies malignes

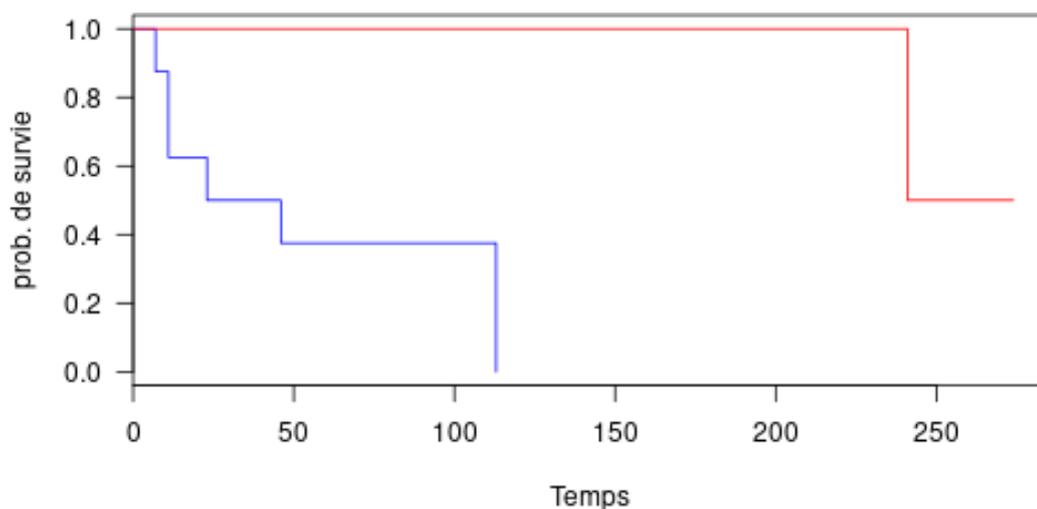
Les chiens atteints de leucémies étant trop peu nombreux dans cette étude pour effectuer une analyse de survie, nous les avons dans un premier temps intégrés avec les chiens atteints de lymphomes pour former un groupe « hétopathies malignes ». Nous avons étudié la survie des chiens inclus dans ce groupe en fonction de leur concentration en SDMA au moment du diagnostic. Puis nous avons étudié la survie uniquement des chiens atteints de lymphomes.

Nous avons comparé la survie des animaux ayant une concentration en SDMA sanguine strictement inférieure à 14 $\mu\text{g/dL}$ au moment du diagnostic et ceux ayant une SDMA supérieure ou égale à 14 $\mu\text{g/dL}$. Le nombre 14 a été choisi sur la base de la valeur médiane en SDMA observée chez les chiens atteints de lymphomes, il en est de même pour les chiens atteints d'hémangiosarcomes.

Parmi les 15 chiens atteints de leucémies ou de lymphomes inclus dans l'étude, un chien était perdu de vue et aucun suivi n'a pu être établi après le jour du diagnostic, un autre a été suivi pendant deux mois et demi puis aucune nouvelle n'avait pu être obtenue. Tous les autres chiens ont été suivis.

L'analyse de survie du groupe « hétopathies malignes » concernait donc 14 chiens séparés en deux sous-groupes comme expliqué ci-dessus. Huit chiens appartenaient au groupe « SDMA supérieure ou égale à 14 $\mu\text{g/dL}$ » et six chiens appartenaient au groupe « SDMA strictement inférieure à 14 $\mu\text{g/dL}$ ». Les courbes de Kaplan-Meier sont présentées dans la figure 35.

Figure 35 : Courbes de Kaplan-Meier de l'analyse de survie des chiens atteints d'hémopathies malignes

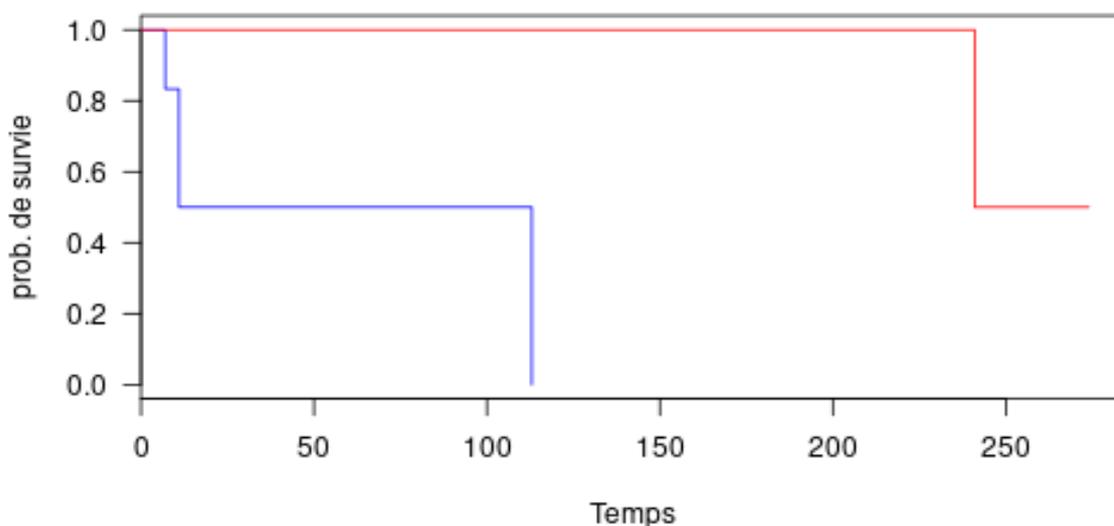


Les chiens du sous-groupe « SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL au moment du diagnostic » sont représentés par la courbe rouge, ceux du sous-groupe « SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL au moment du diagnostic » sont représentés par la courbe bleue.

Le test du log-rank permettant la comparaison des deux courbes de Kaplan-Meier présentées dans la figure 36 donnait un $p = 0,010$. Ainsi, les chiens atteints d'hémopathies malignes possédant une SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL au moment du diagnostic possédaient une survie significativement plus faible que les chiens possédant une SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL.

En considérant uniquement les chiens atteints de lymphomes, 11 chiens présentant un suivi ont été inclus dans l'analyse de survie. Sur ces 11 chiens, six appartenaient au groupe « SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL » et cinq appartenaient au groupe « SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL ». Les courbes de Kaplan-Meier sont présentées dans la figure 36.

Figure 36 : Courbes de Kaplan-Meier de l'analyse de survie des chiens atteints de lymphomes



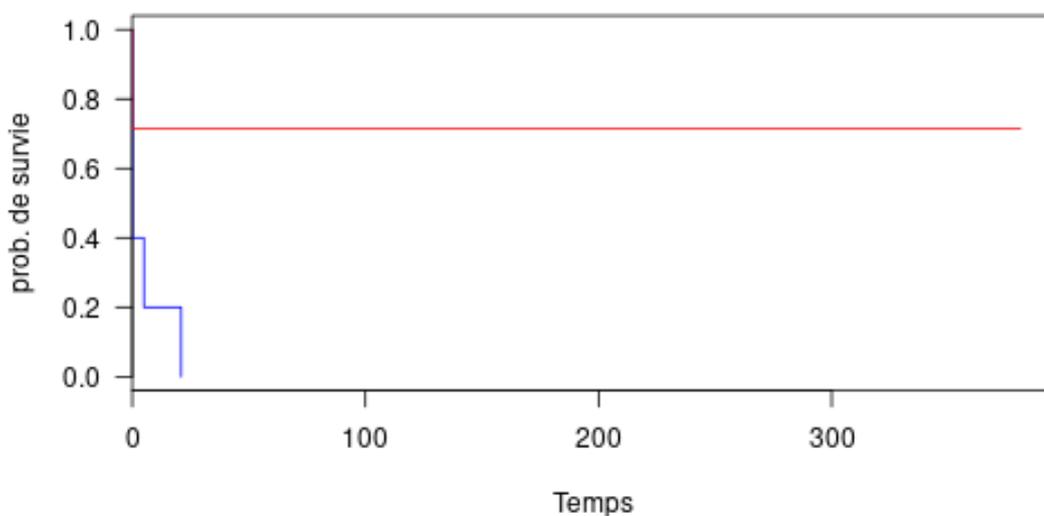
Les chiens du sous-groupe « SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL au moment du diagnostic » sont représentés par la courbe rouge, ceux du sous-groupe « SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL au moment du diagnostic » sont représentés par la courbe bleue.

Le test du log-rank permettant la comparaison des deux courbes de Kaplan-Meier présentées dans la figure 36 donnait un $p = 0,034$. Les chiens atteints de lymphomes possédant une SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL au moment du diagnostic possédaient une survie significativement plus faible que les chiens possédant une SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL.

2. Survie des chiens atteints d'hémangiosarcomes

Parmi les 13 chiens inclus dans ce groupe, un chien ne présentait aucun suivi après le diagnostic et un chien était perdu de vue un mois et demi après le diagnostic. 12 chiens ont donc été inclus dans cette analyse de survie. Le sous-groupe « SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL » comptait sept individus et le sous-groupe « SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL » comptait cinq individus. Les courbes de Kaplan-Meier sont présentées dans la figure 3.

Figure 37 : Courbes de Kaplan-Meier de l'analyse de survie des chiens atteints d'hémangiosarcomes



Les chiens du sous-groupe « SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL au moment du diagnostic » sont représentés par la courbe rouge, ceux du sous-groupe « SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL au moment du diagnostic » sont représentés par la courbe bleue.

Le test du log-rank permettant la comparaison des deux courbes de Kaplan-Meier présentées dans la figure 36 donnait un $p = 0,022$. Les chiens atteints d'hémangiosarcomes possédant une SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL au moment du diagnostic possédaient une survie significativement plus faible que les chiens possédant une SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL.

IV. Discussion

À l'exception de l'utilisation de la SDMA dans le cadre de l'évaluation de la fonction rénale chez les carnivores domestiques, très peu d'études de médecine vétérinaire s'intéressent aux diméthylarginines. Néanmoins, un intérêt semble émerger ces dernières années concernant ces marqueurs. Cette étude prospective s'inscrit dans ce contexte.

A. Concentrations en SDMA chez les chiens atteints de cancers

1. Concentrations en SDMA chez les chiens atteints de tous types de cancers

Notre étude a montré que les chiens atteints de cancers possédaient des concentrations en SDMA sanguines significativement supérieures aux chiens atteints de maladies bénignes ($p = 0,031$).

Plus précisément, cette étude démontre que les chiens atteints de lymphomes, de leucémies et d'hémangiosarcomes possédaient des concentrations sanguines en SDMA significativement plus élevées que les chiens atteints d'autres maladies. En effet, environ 50 % des chiens inclus dans l'étude et présentant une des trois maladies citées ci-dessus possédaient une SDMA supérieure aux valeurs usuelles classiquement reconnues en médecine vétérinaire. Rappelons que ces chiens ne présentaient pas de maladie rénale détectable par des examens sanguins et d'imagerie classiques, en effet la mise en évidence d'une maladie rénale était un critère d'exclusion dans notre étude.

Cette étude nous a également suggérée qu'il n'existait pas de différence dans les concentrations sanguines de SDMA observées chez les individus atteints de lymphomes, d'hémangiosarcomes et de leucémies. Néanmoins, les chiens atteints d'autres types de cancers et inclus dans l'étude (un adénocarcinome pancréatique, un ostéosarcome et un nodule fibro-histiocytaire) présentaient des concentrations sanguines en SDMA semblables aux chiens atteints de maladies bénignes. Il se pourrait donc que l'augmentation de la SDMA sanguine ne s'observe pas pour tous les types de cancers. Cette donnée devra néanmoins être vérifiée sur un plus grand nombre d'individus.

2. Concentrations en SDMA chez les chiens atteints d'hémopathies malignes

Notre étude a démontré que les chiens atteints de lymphomes et de leucémies possédaient des concentrations sanguines en SDMA significativement plus élevées que les chiens atteints d'autres pathologies et notamment de pathologies non cancéreuses.

En comparant nos résultats à ceux de l'étude de Abrams-Ogg *et al.* de 2017, les moyennes et médianes en SDMA des chiens atteints de lymphomes inclus dans notre étude sont comparables à celles rapportées dans l'étude de 2017 (en moyenne 20,75 µg/dL dans notre étude contre 18 µg/dL dans celle d'Abrams-Ogg et 13,5 µg/dL de médiane contre 16). L'étendue des concentrations sanguines en SDMA observées sont également semblables, la SDMA maximale rapportée dans l'étude de 2017 étant de 90 µg/dL contre 67 µg/dL dans notre étude. La principale différence réside dans le fait qu'une plus grande proportion d'individus possédaient une SDMA en dehors des valeurs usuelles (72 % contre 50 %), néanmoins cette différence peut s'expliquer par le fait que les individus avec une créatininémie plasmatique au-delà des valeurs usuelles n'étaient pas exclus de l'étude (ce qui correspondait à 12% des individus) (Abrams-Ogg *et al.*, 2017).

L'origine de cette augmentation n'est pas clairement élucidée bien que différentes hypothèses soient formulées :

Il est reconnu que les cancers sont le plus souvent accompagnés d'un état hypercatabolique. L'augmentation du catabolisme des protéines pourrait expliquer une augmentation des niveaux de diméthylarginines qui sont des molécules issues de la dégradation de protéines contenant des résidus d'arginine méthylés. En revanche si

l'augmentation de SDMA ne concernait que les hémopathies malignes ou dérivées de l'endothélium vasculaire, cette hypothèse serait ainsi réfutée, l'augmentation du catabolisme protéique est en effet attendu quel que soit le type tumoral.

Il a également été démontré que des lignées cellulaires de lymphomes canins sur-expriment l'enzyme PRMT5 responsable de la méthylation symétrique des résidus d'arginine (Renaldo *et al.*, 2018). Cette surexpression peut donc être à l'origine de l'augmentation des niveaux de SDMA observée chez les chiens atteints de lymphomes. Parallèlement, cette surexpression de PRMT5 est prouvée sur des tissus d'individus atteints de cancers en médecine humaine, et notamment sur des individus atteints d'hémopathies malignes (Yoshimatsu *et al.*, 2011 ; Vlashi et Pajonk, 2015 ; Koh *et al.*, 2015 ; Jin *et al.*, 2016). La surexpression d'autres enzymes de la famille des PRMT telles que PRMT1 ou CARM4 est également démontré dans divers types de cancers (Yoshimatsu *et al.*, 2011). De telles données n'existent pas encore chez le chien mais motivent l'exploration de l'ADMA dans les maladies cancéreuses.

Bien qu'aucun des chiens inclus dans notre étude ne présente d'azotémie, une modification du DFG non détectable par le dosage de la créatinine pourrait également expliquer une augmentation de la SDMA. La mesure du DFG parallèlement à la mesure de la SDMA pour exclure de manière certaine une MRC débutante serait donc appropriée pour limiter ce risque de faux positifs. Cependant ce risque semble faible à la lumière des données cliniques, biologiques et d'imagerie. Enfin, le risque d'avoir une maladie rénale débutante était le même dans le groupe « autres » qui présentait un âge et une créatinine comparable avec le groupe « néoplasie », pourtant dans ce groupe la SDMA était dans des valeurs usuelles.

Enfin, certaines études de médecine humaine suggère qu'un dysfonctionnement hépatique pourrait également influencer le métabolisme des diméthylarginines, bien que ces données sont encore sujettes à débat (Ferrigno *et al.*, 2015). Nous n'avons pas éliminé de manière certaine une insuffisance hépatique toutefois aucun argument clinique ou biologique ne permettait de suspecter cette entité dans la population étudiée.

Notre étude s'intéresse également, pour les chiens atteints de lymphomes, au lien entre le grade histologique de la maladie et les concentrations en SDMA observées. La différence observée entre les chiens atteints de lymphome de haut grade et ceux de bas grade était non significative. Néanmoins, les chiens atteints de haut grade possédaient des concentrations sanguines en SDMA supérieures en moyenne, il est raisonnable de penser qu'un manque de puissance statistique est à l'origine de cette observation. Aucune donnée similaire n'a été rapporté en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Un lymphome de haut grade se caractérise par une agressivité supérieure et une maladie évoluant plus rapidement. Classiquement on observe ainsi une prolifération plus intense des cellules cancéreuses présentant un métabolisme plus actif et une dissémination accrue, comparé à un lymphome de bas grade. Toutes ces caractéristiques pourraient expliquer une production

accrue en SDMA : catabolisme des protéines accrue et surexpression de PRMT5 plus importante notamment. Ces hypothèses n'ont cependant jamais été explorées.

À l'inverse, l'immunophénotype du lymphome ne semblait pas avoir d'influence sur les concentrations en SDMA observées.

Dans cette étude, les patients atteints de leucémies aiguës possédaient des concentrations en SDMA supérieures à ceux atteints de leucémies chroniques, néanmoins le faible nombre de chiens leucémiques inclus dans l'étude ne permettait pas d'obtenir une différence significative. Rappelons que dans l'étude de Chachaj *et al.* de 2018, les individus atteints de LMA possédaient des concentrations sanguines en SDMA en moyenne plus élevées que les individus atteints de LLC (Chachaj *et al.*, 2018).

3. Concentrations en SDMA chez les chiens atteints d'hémangiosarcomes

a. Dosage de la SDMA dans le cadre du diagnostic de l'hémangiosarcome

Notre étude a démontré que les chiens atteints d'hémangiosarcomes possédaient des concentrations sanguines en SDMA significativement plus élevées que les chiens atteints d'autres pathologies et notamment de pathologies non cancéreuses.

Notre étude soulève également une donnée très intéressante : il existait une différence significative dans les concentrations sanguines en SDMA entre les chiens atteints d'hémangiosarcomes spléniques et ceux atteints de pathologies spléniques bénignes ($p = 0,0028$). Face à une masse splénique, il est parfois difficile pour le clinicien de distinguer une lésion maligne d'une lésion bénigne, les examens pré opératoires (imagerie, cytoponction à l'aiguille fine) ne sont pas parfaitement fiables. Ainsi le dosage des diméthylarginines et donc de la SDMA pourraient donner des informations intéressantes aux cliniciens pour différencier une atteinte tumorale ou bénigne lors de la découverte d'une masse splénique chez un chien. Le faible nombre d'animaux ($n=3$) inclus dans le groupe « masse splénique bénigne » doit cependant nous amener à être prudent dans cette interprétation et un nombre plus important d'animaux devra être envisagé pour confirmer ce résultat.

Aucune étude à ce jour ne s'intéresse au lien entre les hémangiosarcomes et les diméthylarginines. Les hémangiosarcomes, notamment spléniques, possèdent une incidence plus importante chez le chien que chez l'homme. Néanmoins, ce cancer de l'endothélium semble être parfaitement concerné par la dysrégulation du métabolisme de la L-arginine et la dysfonction endothéliale, comme le suggère cette augmentation de la SDMA chez les individus atteints. En effet, les hémangiosarcomes sont des tumeurs de l'endothélium, il est raisonnable de penser que le métabolisme physiologique de ces cellules est détourné et aboutit à des modifications dans l'équilibre du monoxyde d'azote, cet équilibre crucial pour le fonctionnement normal des endothéliums étant rompu, engendrant

ainsi une dysfonction endothéliale. La mise en évidence d'une augmentation de l'ADMA sanguine (un inhibiteur compétitif de la NO-synthase) chez les chiens atteints d'hémangiosarcomes serait un argument supplémentaire pour statuer de l'existence d'une dysfonction endothéliale chez ces individus.

b. Dosage de la SDMA dans le cadre du bilan d'extension des hémangiosarcomes

Notre étude a également démontré que les chiens présentant un hémangiosarcome dont les métastases étaient détectables au bilan d'extension possédaient des concentrations sanguines en SDMA significativement plus élevées que les chiens présentant un bilan d'extension négatif ($p = 0,042$). Aucune donnée en médecine vétérinaire et humaine ne fait le lien entre l'existence de métastases et les concentrations sanguines en diméthylarginines. L'existence de métastases témoignent le plus souvent d'une maladie plus avancée et d'une tumeur plus agressive. Une maladie déjà disséminée et plus agressive et donc plus active pourrait par conséquent engendrer des concentrations en SDMA plus élevées. À l'instar de l'intérêt potentiel du dosage de la SDMA dans le cadre du diagnostic différentiel d'une masse splénique, cette donnée pourrait être très intéressante pour le clinicien, cette donnée mérite d'être confirmée sur une population plus importante.

B. Concentrations en SDMA et mortalité chez les chiens atteints de cancers

1. Mortalité chez les chiens atteints d'hémopathies malignes

Nous avons mis en évidence dans cette étude une différence significative dans la survie des chiens atteints d'hémopathies malignes inclus selon leur concentration sanguine en SDMA au diagnostic. Les chiens atteints d'hémopathies malignes présentant une SDMA supérieure à 14 $\mu\text{g/dL}$ au moment du diagnostic présentaient une survie significativement plus faible que les chiens présentant une SDMA strictement inférieure à 14 $\mu\text{g/dL}$ ($p = 0,010$). *A fortiori*, la conclusion est similaire en considérant uniquement les chiens inclus dans l'étude atteints de lymphomes ($p = 0,034$).

Cette valeur seuil a été obtenue sur la base de la valeur médiane en SDMA dans les deux groupes lymphomes et hémangiosarcome. Il est intéressant de noter que cette valeur de 14 est la valeur limite haute des valeurs usuelles chez le chien adulte pour suspecter une maladie rénale. Cette valeur de référence a été validée par le laboratoire IDEXX (Rentko *et al.*, 2013). Cette observation renforce l'idée que, même sur une population d'individus âgés, des valeurs supérieures à la limite de l'intervalle de référence ne sont pas attendues chez des individus dont la fonction rénale n'est pas altérée. Le fait que les individus atteints de maladies bénignes possédaient tous des concentrations en SDMA inférieures ou égales à 10 $\mu\text{g/dL}$ va également en ce sens.

Chez l'homme, l'étude de Chachaj *et al.* en 2018 s'intéresse à la survie des individus atteints d'hémopathies malignes en fonction de leurs concentrations en ADMA et en SDMA. Ils démontrent qu'une concentration sanguine en ADMA et en SDMA élevée au moment du diagnostic peut être retenue comme un facteur pronostique négatif chez les individus atteints de leucémies lymphoïdes chroniques. Ils ne parviennent néanmoins pas à la même conclusion pour les individus atteints de lymphomes non Hodgkiniens, un manque de puissance statistique est évoqué (Chachaj *et al.*, 2018). Notre étude montre donc que la concentration sanguine en SDMA au diagnostic chez les chiens atteints d'hémopathies malignes (leucémies et lymphomes au sens large) et chez les chiens atteints de lymphomes pourrait être retenu comme un facteur pronostic négatif.

Comme évoqué précédemment, les chiens de l'étude atteints d'un lymphome de haut grade semblaient avoir des concentrations moyennes en SDMA plus élevées que les chiens diagnostiqués de lymphomes de bas grade, bien qu'aucune différence significative ne soit mise en évidence. De la même manière, les chiens atteints de leucémies aiguës possédaient également des concentrations sanguines en SDMA supérieures aux chiens atteints de leucémies chroniques bien que le faible nombre d'animaux inclus ne permettent pas d'obtenir une différence statistique. Ces données permettent d'expliquer en partie la survie diminuée des chiens ayant une SDMA plus élevée. Nous pouvons également supposer qu'au sein d'une même entité pathologique (lymphome de haut ou bas grade, leucémie aiguë ou chronique...), une concentration en SDMA pourrait être associée à une maladie davantage agressive et invasive, assombrissant le pronostic des chiens atteints. La mise en évidence d'une valeur en SDMA augmentée chez ces chiens pourrait donc être une information supplémentaire intéressante en terme de pronostic pour le clinicien.

2. Mortalité chez les chiens atteints d'hémangiosarcomes

Notre étude a mis en évidence une différence significative dans la survie des chiens atteints d'hémangiosarcomes inclus dans l'étude selon leur concentration sanguine en SDMA au diagnostic. Les chiens atteints d'hémangiosarcomes présentant une SDMA supérieure ou égale à 14 µg/dL au moment du diagnostic présentaient une survie significativement plus faible que les chiens présentant une SDMA strictement inférieure à 14 µg/dL ($p = 0,022$).

Notre étude a également démontré que les chiens atteints d'un hémangiosarcome métastatique au moment du diagnostic possédaient des concentrations sanguines en SDMA significativement plus élevées que les chiens atteints d'un hémangiosarcome dont le bilan d'extension est négatif. La mise en évidence de métastases au bilan d'extension est associée à une survie significativement diminuée chez le chien atteint d'hémangiosarcome. Cette dernière donnée est un élément susceptible d'expliquer que les chiens présentant une SDMA plus élevée au diagnostic possèdent une survie significativement diminuée.

Néanmoins, la recherche de métastases chez des chiens atteints d'hémangiosarcomes est parfois peu aisée, cette information est pourtant un critère crucial en terme de pronostic

pour l'animal (la médiane de survie des chiens atteints d'un cancer métastasé n'excède pas une semaine tandis qu'une médiane de survie d'environ 6 mois est envisageable pour des chiens atteints d'hémangiosarcome splénique non métastasé et pris en charge de manière exhaustive (Withrow *et al.*, 2012)). Si des études confirment nos résultats, la mesure de la concentration sanguine en SDMA pourrait ainsi être une méthode supplémentaire pour le clinicien de distinguer les chiens atteints d'un hémangiosarcome de stade avancé et métastasé et les chiens atteints d'un hémangiosarcome non métastasé.

C. Limites de l'étude

Notre étude présente différentes limites qu'il convient d'énoncer. Tout d'abord, la limite la plus importante de cette étude réside dans le faible nombre d'individus recrutés. Ceci s'explique par le fait qu'il s'agisse d'une étude prospective qui nécessite d'être poursuivie, et nous pouvons déplorer le fait qu'un grand nombre d'hémangiosarcomes spléniques suspectés n'aient pas été recrutés par manque d'analyses anatomo-pathologiques confirmant ou infirmant qu'il s'agisse d'une affection néoplasique. Face au mauvais pronostic associé à une masse splénique ayant provoqué un hémobdomen chez un chien, les propriétaires ne souhaitent parfois pas engager de frais pour obtenir un diagnostic définitif. Un recrutement plus large permettra d'obtenir des données plus fiables et précisera ainsi les contours possibles de l'utilisation de la SDMA comme biomarqueur diagnostic et pronostic dans cette affection.

Il serait d'ailleurs à ce titre intéressant de recruter une réelle cohorte d'individus témoins pour pouvoir les comparer aux individus atteints de cancers. Cette cohorte n'est néanmoins pas aisée à recruter, étant donné l'âge avancé des individus inclus dans l'étude il apparaît plus difficile de trouver des chiens âgés ne présentant aucun critère d'exclusion de l'étude.

La perte du suivi de quelques chiens est également une limite de l'étude car elle consiste en une perte d'information. Par ailleurs, dans la continuité de cette étude, il serait intéressant de suivre l'évolution des concentrations en ADMA et en SDMA chez les chiens subissant des chirurgies de splénectomie pour les hémangiosarcomes ou des traitements de chimiothérapie pour les lymphomes et les leucémies. Il semblerait d'ailleurs que les chiens présentant une rémission complète suite à un traitement par chimiothérapie pour un lymphome retrouvent des concentrations en SDMA normales et que la SDMA est de nouveau augmentée lors de rechutes, d'après l'étude de Abrams-Ogg (Abrams-Ogg *et al.*, 2017). Un des chiens de notre étude présente une récurrence d'un hémangiosarcome splénique traité auparavant par splénectomie et chimiothérapie : ce chien présente une SDMA supérieure aux valeurs usuelles (17 µg/dL) lors du diagnostic de sa rechute. Il serait ainsi intéressant de suivre l'évolution de la cinétique des diméthylarginines pour confirmer et étayer ces informations.

Il est également important de garder à l'esprit que le diagnostic d'une maladie rénale à un stade précoce est difficile et repose le plus souvent sur la mesure du débit de filtration

glomérulaire. Chez le chien, il est rapporté que la SDMA peut augmenter dès une perte de 40% du DFG (Nabity *et al.*, 2015). Ainsi, nous ne pouvons pas rigoureusement exclure que l'augmentation de SDMA chez nos animaux puissent être aussi due à une diminution modérée du DFG avant l'apparition des autres signes d'une maladie rénale. Seule la mesure du DFG chez ces animaux permettrait de statuer sur cette hypothèse.

Notre étude n'explore également pas le lien entre les concentrations en diméthylarginines et d'autres marqueurs sanguins chez les individus atteints. L'étude de Gori *et al.* sur les pancréatites aiguës canines, suggère notamment un lien entre l'ADMA et l'existence d'un état inflammatoire chez le chien (Gori *et al.*, 2020). Chachaj *et al.* étudient également le lien entre les concentrations en ADMA et SDMA et les numérations leucocytaires, les concentrations sanguines en LDH, un marqueur de lyse cellulaire ou encore avec les marqueurs de la coagulation (Chachaj *et al.*, 2018). Une exploration plus exhaustive chez ces animaux permettraient de mieux préciser l'origine et le rôle de la dysrégulation du métabolisme de la L-arginine dans ces cancers chez le chien. Enfin, si les concentrations sanguines en ADMA se trouvent également augmentées chez les chiens atteints d'hémopathies malignes et d'hémangiosarcomes - ce qui est probable, à la lumière des données de médecine humaine et de cette étude - il sera intéressant d'étudier de manière plus précise la dysfonction endothéliale qui existe également chez ces chiens. L'évaluation de la réponse à la pilocarpine, le dosage des endothélines ou le dosage des métabolites du NO sont des méthodes utilisées en médecine humaine pour évaluer la santé endothéliale, et sont autant de pistes pour l'exploration de la dysfonction endothéliale chez les chiens.

Conclusion

Les diméthylarginines symétrique et asymétrique sont des produits de la dégradation des protéines contenant des résidus d'arginine méthylée. Ces molécules se sont révélées être responsable, directement ou indirectement, d'un dysfonctionnement endothélial en interférant dans le métabolisme du monoxyde d'azote, véritable garant de la santé endothéliale. C'est dans ce contexte que ces deux molécules ont été étudiées en médecine humaine. Il a ainsi été démontré que la ADMA et la SDMA sont des facteurs de risques de mortalité, toute cause confondue, notamment chez les individus présents en unité de soins intensifs. En réalité, il a été démontré que la ADMA et la SDMA sont des molécules dont les concentrations sanguines augmentent dans un nombre important de pathologies en médecine humaine : dysendocrinies, maladies cardiovasculaires et particulièrement, les cancers.

Cette thèse s'inscrit dans ce cadre. Elle souhaite explorer le lien encore peu envisagé en médecine vétérinaire entre les maladies néoplasiques et les dérivés de la L-arginine. En effet, de nombreuses études de biologie fondamentale interrogent depuis une dizaine d'années la place du métabolisme de la L-arginine dans la physiopathologie du cancer. Ces études, encore récentes, tendent à démontrer qu'il existe un lien fort entre la méthylation de l'arginine et l'apparition de certains cancers. Parallèlement, des études cliniques démontrent une augmentation de la concentration des diméthylarginines chez les patients atteints de divers cancers. Les hémopathies malignes semblent être des maladies privilégiées en médecine humaine dans ces études. Nous avons choisi d'étudier une hémopathie maligne très fréquente chez le chien : le lymphome, à cette maladie sont ajoutées les leucémies. Les hémangiosarcomes, cancer de l'endothélium, semblaient être aussi des candidats de choix étant donné le lien étroit entretenu par la L-arginine et ses métabolites avec le système endothélial.

Notre étude prospective cherchait à mettre en évidence le lien entre les diméthylarginines et le cancer chez le chien. Elle posait ainsi comme question : est-ce que les chiens atteints de lymphomes, de leucémies et d'hémangiosarcomes ont des concentrations sanguines en SDMA augmentées ? Y a-t-il un lien entre la mortalité de ces chiens et leur concentration en SDMA ?

Notre étude montre ainsi qu'il existe une différence significative entre les concentrations sanguines en SDMA des chiens atteints de lymphomes, de leucémies et d'hémangiosarcomes et des chiens atteints de pathologies différentes et notamment bénignes. Les chiens atteints de cancers, *a priori* sans maladie rénale, possèdent des concentrations en SDMA supérieures. Parallèlement, notre étude montre que chez les chiens atteints de lymphomes et d'hémangiosarcomes, la concentration sanguine en SDMA au moment du diagnostic est corrélée à la survie des chiens : les chiens possédant une

concentration en SDMA plus élevée possèdent une espérance de vie significativement plus faible.

Néanmoins, notre étude possède de nombreuses limites. Ainsi une étude avec de plus grandes cohortes d'individus malades et non atteints de cancers pourrait confirmer ces résultats. Par ailleurs, il serait intéressant d'explorer de manière plus précise la mécanistique à l'origine de la dysfonction endothéliale chez ces chiens.

Ces données sont inédites en médecine vétérinaire et ont pour vocation d'amorcer la recherche clinique sur l'utilisation diagnostique et pronostic des diméthylarginines dans les pathologies cancéreuses et de suggérer des pistes thérapeutiques.

Liste des références bibliographiques

- ABRAMS-OGG A., BRONWYN R., PHILIPPE L., ALLSION M., DOROTHEE B., ALEX ZUR LINDEN D. et al. (2017) "Lymphoma and Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs : A Preliminary Study." 2017 ACVIM Forum Research Report Program. *J Vet Intern Med.* 2017;31(5):1572-1604.
- ACHAN V., BROADHEAD M., MALAKI M., et al. (2003) Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23(8), 1455-1459
- ALDERTON W.K., COOPER C.E., KNOWLES R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(Pt 3), 593-615
- ANTONYSAMY S., BONDAY Z., CAMPBELL R.M., et al. (2012) Crystal structure of the human PRMT5 : MEP50 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(44), 17960-17965
- ARONSOHN M. (1985) Cardiac hemangiosarcoma in the dog: a review of 38 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187(9), 922-926
- BAUER V., SOTNÍKOVÁ R. (2010) Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen. Physiol. Biophys.* 29(4), 319-340
- BEDFORD M.T., CLARKE S.G. (2009) Protein arginine methylation in mammals : who, what, and why. *Mol. Cell* 33(1), 1-13
- BILBROUGH G., EVERT B.A., HATHAWAY K.L., et al. (2018) IDEXX Catalyst SDMA Test for in-house measurement of SDMA concentration in serum from dogs and cats Materials and methods. <https://idexxcom-live-b02da1e51e754c9cb292133b-9c56c33.aldryn-media.com> (consulté le 17/06/2020).
- BLANC R.S., RICHARD S. (2017) Arginine Methylation : The Coming of Age. *Mol. Cell* 65(1), 82-94
- BLANKENBERG S., BARBAUX S., TIRET L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170(2), 191-203
- BODE-BÖGER S.M., SCALERA F., KIELSTEIN J.T., et al. (2006) Symmetrical Dimethylarginine : A New Combined Parameter for Renal Function and Extent of Coronary Artery Disease. *J Am Soc Nephrol.* 17(4), 1128-1134
- BÖGER R.H., BODE-BÖGER S.M., TSAO P.S., et al. (2000) An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36(7), 2287-2295
- BÖGER R.H. (2005) Association of Asymmetric Dimethylarginine and Endothelial Dysfunction. *Clin Chem Lab Med.* 41(11), 1467-1472
- BÖGER R.H., SYDOW K., BORLAK J., et al. (2000) LDL Cholesterol Upregulates Synthesis of Asymmetrical Dimethylarginine in Human Endothelial Cells. *Circ Res.* 87(2), 991-1005
- BÖGER R. H. (2008) "All about ADMA. A Novel Risk Factor." DLD Diagnostika GmbH © GermediQ GmbH, Hamburg, Germany 2nd completely revised edition.
- BONFOCO E., KRAINIC D., ANKARCRONA M., NICOTERA P., LIPTON S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(16), 7162-7166
- BRISSEON B.A., HOLMBERG D.L. (2001) Use of pericardial patch graft reconstruction of the right atrium for treatment of hemangiosarcoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218(5), 723-725

- BROOKS M.B., MATUS R.E., LEIFER C.E., PATNAIK A.K. (1987) Use of splenectomy in the management of lymphoma in dogs: 16 cases (1976-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191(8), 10081010
- BROWN N.O., PATNAIK A.K., MACEWEN E.G. (1985) Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186(1), 5658
- BUIJS N., OOSTERINK J.E., JESSUP M., *et al.* (2017) A new key player in VEGF-dependent angiogenesis in human hepatocellular carcinoma: dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1. *Angiogenesis* 20(4), 557565
- CAPLIN B., WANG Z., SLAVIERO A., *et al.* (2012) Alanine-glyoxylate aminotransferase-2 metabolizes endogenous methylarginines, regulates NO, and controls blood pressure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32(12), 28922900
- CARTER R.F., HARRIS C.K., WITHROW S.J., VALLI V.E.O., SUSANECK S.J. (1987) Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 23(1), 587-596
- CHACHAJ A., WIŚNIEWSKI J., RYBKA J., *et al.* (2018) Asymmetric and symmetric dimethylarginines and mortality in patients with hematological malignancies-A prospective study. *PLoS One* 13(5), 197148
- CHENG D., CÔTÉ J., SHAABAN S., BEDFORD M.T. (2007) The Arginine Methyltransferase CARM1 Regulates the Coupling of Transcription and mRNA Processing. *Molecular Cell* 25(1), 7183
- CLIFFORD C.A., HUGHES D., BEAL M.W., *et al.* (2001) Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 15(2), 131135
- CLOSS E.I., GRÄF P., HABERMEIER A., CUNNINGHAM J.M., FÖRSTERMANN U. (1997a) Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 36(21), 64626468
- CLOSS E.I., BASHA F.Z., HABERMEIER A., FÖRSTERMANN U. (1997b) Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1(1), 6573
- COUTO C.G., RUTGERS H.C., SHERDING R.G., ROJKO J. (1989) Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J. Vet. Intern. Med.* 3(2), 7378
- DAVIS L.L., HUME K.R., STOKOL T. (2018) A retrospective review of acute myeloid leukaemia in 35 dogs diagnosed by a combination of morphologic findings, flow cytometric immunophenotyping and cytochemical staining results (2007-2015). *Vet Comp Oncol.* 16(2), 268275
- DAVIS B.W., OSTRANDER E.A. (2014) Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. *ILAR J* 55(1), 5968
- DAY M.J., LUCKE V.M., PEARSON H. (1995) A review of pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies. *J Small Anim Pract* 36(10), 426433
- DOROSZKO A., NIEDZIŁSKA E., JAKUBOWSKI M., *et al.* (2016) Elevated plasma ADMA contributes to development of endothelial dysfunction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Postępy Hig Med Dosw (Online)* 70(0), 562571
- FABRÈS V., DOSSIN O., REIF C., *et al.* (2019) Development and validation of a novel clinical scoring system for short-term prediction of death in dogs with acute pancreatitis. *J Vet Intern Med.* 33(2), 499
- FERRIGNO A., DI PASQUA L.G., BERARDO C., RICHELMI P., VAIRETTI M. (2015) Liver plays a central role in asymmetric dimethylarginine-mediated organ injury. *World J. Gastroenterol.* 21(17), 51315137

- FINE D.M., TVEDTEN H.W. (1999) Chronic granulocytic leukemia in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214(12), 18091812, 1791
- FINOTELLO R., HENRIQUES J., SABATTINI S., *et al.* (2017) A retrospective analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed, biologically aggressive canine haemangiosarcoma. *Vet Comp Oncol* 15(2), 493503
- FLECK C., SCHWEITZER F., KARGE E., BUSCH M., STEIN G. (2003) Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin Chim Acta* 336(1), 112
- FRUCHTER A.M., MILLER C.W., O'GRADY M.R. (1992) Echocardiographic results and clinical considerations in dogs with right atrial/auricular masses. *Can Vet J* 33(3), 171174
- FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789), 373376
- GARCIA X., STEIN F. (2006) Nitric Oxide. *Semin Pediatr Infect Dis., Infection and Critical Care-Part II*, 17(2), 5557
- GARY J.D., CLARKE S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 65131
- GORI E., PIERINI A., LIPPI I., *et al.* (2020) Evaluation of asymmetric dimethylarginine as an inflammatory and prognostic marker in dogs with acute pancreatitis. *J Vet Intern Med* 34(3), 11441149
- GREENLEE P.G., FILIPPA D.A., QUIMBY F.W., *et al.* (1990) Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66(3), 480490
- HALL J.A., YERRAMILLI Maha, OBARE E., *et al.* (2015) Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29(3), 808814
- HALL J.A., YERRAMILLI M., OBARE E., *et al.* (2016) Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 30(3), 794802
- HANAHAN D., WEINBERG R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 5770
- HANAHAN D., WEINBERG R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5), 646674
- HARVEY J., TERRELL T., HYDE D., JACKSON R. (1981) Well-differentiated lymphocytic leukemia in a dog. *Vet Pathol.* 18(1), 3747
- HOLT D., VAN WINKLE T., SCHELLING C., PRYMAK C. (1992) Correlation between thoracic radiographs and postmortem findings in dogs with hemangiosarcoma: 77 cases (1984-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200(10), 15351539
- HULIN J.-A., GUBAREVA E.A., JARZEBSKA N., *et al.* (2019) Inhibition of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH) Enzymes as an Emerging Therapeutic Strategy to Target Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Cancer. *Front Oncol* 9, 1455
- IGNARRO L.J., BUGA G.M., WOOD K.S., BYRNS R.E., CHAUDHURI G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84(24), 92659269
- INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY LTD. 2019. "IRIS Kidney - Guidelines - IRIS Staging of CKD." <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>. (Consulté le 08/08/2020).
- ITO H., ANDO T., OGISO H., ARIOKA Y., SEISHIMA M. (2015) Inhibition of induced nitric oxide synthase enhances the anti-tumor effects on cancer immunotherapy using TLR7 agonist in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 64(4), 429436
- JAIN N.C., BLUE J.T., GRINDEM C.B., *et al.* (1991) Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 20(3), 6382

- JARROLD J., DAVIES C.C. (2019) PRMTs and Arginine Methylation : Cancer's Best-Kept Secret? *Trends Mol Med* 25(11), 9931009
- JIN Y., ZHOU J., XU F., *et al.* (2016) Targeting methyltransferase PRMT5 eliminates leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 126(10), 39613980
- KAKIMOTO Y. (1971) Methylation of arginine and lysine residues of cerebral proteins. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Protein Structure* 243(1), 3137
- KAKIMOTO Y., AKAZAWA S. (1970) Isolation and Identification of Ng,Ng- and Ng,N'g-Dimethylarginine, Nε-Mono-, Di-, and Trimethyllysine, and Glucosylgalactosyl- and Galactosyl-δ-hydroxylysine from Human Urine. *J. Biol. Chem.* 245(21), 57515758
- KAMI REDDY K.R., DASARI C., VANDAVASI S., *et al.* (2019) Novel Cellularly Active Inhibitor Regresses DDAH1 Induced Prostate Tumor Growth by Restraining Tumor Angiogenesis through Targeting DDAH1/ADMA/NOS Pathway. *ACS Comb. Sci.* 21(4), 241256
- KHANNA C., LUND E.M., REDIC K.A., *et al.* (1998) Randomized controlled trial of doxorubicin versus dactinomycin in a multiagent protocol for treatment of dogs with malignant lymphoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213(7), 985990
- KIELSTEIN J.T., IMPRAIM B., SIMMEL S., *et al.* (2004) Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 109(2), 172177
- KIELSTEIN J.T., SALPETER S.R., BODE-BOEGER S.M., COOKE J.P., FLISER D. (2006) Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21(9), 24462451
- KIM H., RONAI Z.A. (2020) PRMT5 function and targeting in cancer. *Cell Stress* 4(8), 199215
- KIMURA H., WEISZ A., KURASHIMA Y., *et al.* (2000) Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95(1), 189197
- KOH C.M., BEZZI M., LOW D.H.P., *et al.* (2015) MYC regulates the core pre-mRNA splicing machinery as an essential step in lymphomagenesis. *Nature* 523(7558), 96100
- KOSTOUROU V., ROBINSON S.P., CARTWRIGHT J.E., WHITLEY G.S.J. (2002) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer* 87(6), 673680
- LAGRANGE I. (2017) Hématopathologie. Polycopié. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Biopôle Unité Biologie Clinique
- LANA S., U'REN L., PLAZA S., *et al.* (2007) Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 21(4), 764769
- LEIFER C.E., MATUS R.E. (1986) Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-1984). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189(2), 214217
- LEIPER J.M., SANTA MARIA J., CHUBB A., *et al.* (1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.* 343 Pt 1, 209214
- LEIPER J., NANDI M., TORONDEL B., *et al.* (2007) Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat. Med.* 13(2), 198203
- LEONE A., MONCADA S., VALLANCE P., CALVER A., COLLIER J. (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet* 339(8793), 572575

- LI J., XIA W., FENG W., QU X. (2012) Effects of rosuvastatin on serum asymmetric dimethylarginine levels and atrial structural remodeling in atrial fibrillation dogs. *Pacing Clin Electrophysiol* 35(4), 456464
- LI W., HAN W., MA Y., *et al.* (2015) P53-dependent miRNAs mediate nitric oxide-induced apoptosis in colonic carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 85, 105113
- MACEWEN E.G., HAYES A.A., MATUS R.E., KURZMAN I. (1987) Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190(5), 564568
- MANN G.E., YUDILEVICH D.L., SOBREVIA L. (2003) Regulation of Amino Acid and Glucose Transporters in Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Physiological Reviews* 83(1), 183252
- MARIGO I., ZILIO S., DESANTIS G., *et al.* (2016) T Cell Cancer Therapy Requires CD40-CD40L Activation of Tumor Necrosis Factor and Inducible Nitric-Oxide-Synthase-Producing Dendritic Cells. *Cancer Cell* 30(3), 377390
- MATUS R.E., LEIFER C.E., MACEWEN E.G. (1983) Acute lymphoblastic leukemia in the dog: a review of 30 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183(8), 859862
- MCDERMOTT J.R. (1976) Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem. J.* 154(1), 179184
- MCKEEVER P., GRINDEM C., STEVENS J., OSBORNE C. (1982) Canine cutaneous lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 180(5), 531536
- MELEO K.A. (1997) The Role of Radiotherapy in the Treatment of Lymphoma and Thymoma. *Vet Clin North Am : Small Anim Practice.* 27(1), 115129
- NABITY M.B., LEES G.E., BOGGESS M.M., *et al.* (2015) Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med.* 29(4), 10361044
- NAKAJIMA T., MATSUOKA Y., KAKIMOTO Y. (1971) Isolation and identification of N-G-monomethyl, N-G, N-G-dimethyl- and N-G,N' G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta* 230(2), 212222
- NISHIKAWA H., SAKAGUCHI S. (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* 127(4), 759767
- OEFFINGER K.C. (2008) Are survivors of acute lymphoblastic leukemia (ALL) at increased risk of cardiovascular disease? *Pediatr Blood Cancer* 50(2 Suppl), 462467; discussion 468
- OGAWA T., KIMOTO M., WATANABE H., SASAOKA K. (1987) Metabolism of NG,NG- and NG,NG-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys* 252(2):526-527
- OGAWA T., KIMOTO M., SASAOKA K. (1989) Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J. Biol. Chem.* 264(17), 1020510209
- OGAWA T., KIMOTO M., SASAOKA K. (1990) Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2. *J. Biol. Chem.* 265(34), 2093820945
- OGILVIE G.K., POWERS B.E., MALLINCKRODT C.H., WITHROW S.J. (1996) Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 10(6), 379384
- PAIK W.K., KIM S. (1968) Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 243(9), 21082114
- PALM F., ONOZATO M.L., LUO Z., WILCOX C.S. (2007). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(6), 32273245
- PALMER R.M., FERRIGE A.G., MONCADA S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122), 524526

- PAPAEVANGELOU E., BOULT J.K.R., WHITLEY G.S., ROBINSON S.P., HOWE F.A. (2018) Assessment of the direct effects of DDAH I on tumour angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 21(4), 737749
- PATCH D., OBARE E., XIE H. (2015) High throughput immunoassay that correlates to gold standard liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) assay for the chronic kidney disease (CKD) marker symmetrical dimethylarg arginine (SDMA). *J Vet Intern Med.* 29(4), 1216
- PATSCHAN S., LI H., BRODSKY S., *et al.* (2006) Probing lipid rafts with proximity imaging: actions of proatherogenic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(6), 22102219
- PECORINO L. (2016) *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics.* 4th Edition. Oxford, United Kingdom, Oxford University Press
- PINTAR J., BREITSCHWERDT E.B., HARDIE E.M., SPAULDING K.A. (2003) Acute nontraumatic hemoabdomen in the dog: a retrospective analysis of 39 cases (1987-2001). *J Am Anim Hosp Assoc* 39(6), 518522
- POLLET L., HOVE W.V., MATTHEEUWS D. (1978) Blastic crisis in chronic myelogenous leukaemia in a dog. *J Small Anim Pract.* 19(112), 469475
- PONCE F., MAGNOL J.-P., LEDIEU D., *et al.* (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.* 167(2), 158166
- PONCE F. (2016) Les lymphomes du chien. Polycopié Certificat d'études approfondies vétérinaires, Unité Oncologie clinique, VetAgro Sup, Marcy l'Étoile.
- PRIESTER W.A., MCKAY F.W. (1980) The occurrence of tumors in domestic animals. *Natl Cancer Inst Monogr* n°54, 1210
- REDDY K.R.K., DASARI C., DUSCHARLA D., *et al.* (2018) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 (DDAH1) is frequently upregulated in prostate cancer, and its overexpression conveys tumor growth and angiogenesis by metabolizing asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Angiogenesis* 21(1), 7994
- RENALDO K., SLOAN S., CHUNG J., *et al.* (2018) Exploring PRMT5 As a Potential Therapeutic Target in Canine Lymphomas. *Blood* 132(Supplement 1), 41824182
- RENTKO V., NABITY M., YERRAMILI M. (2013) Determination of serum symmetric dimethylarginine reference limit in clinically healthy dogs. *J Vet Intern Med* 27
- RIZI B.S., ACHREJA A., NAGRATH D. (2017) Nitric oxide - the forgotten child of tumor metabolism. *Trends Cancer* 3(9), 659672
- RODIONOV R.N., MARTENS-LOBENHOFFER J., BRILLOFF S., *et al.* (2014) Role of alanine:glyoxylate aminotransferase 2 in metabolism of asymmetric dimethylarginine in the settings of asymmetric dimethylarginine overload and bilateral nephrectomy. *Nephrol Dial Transplant* 29(11), 20352042
- RODRIGUES-KRAUSE J., KRAUSE M., DA ROCHA I.M.G., UMPIERRE D., FAYH A.P.T. (2018) Association of L-Arginine Supplementation with Markers of Endothelial Function in Patients with Cardiovascular or Metabolic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 11(1)
- RUSLANDER D.A., GEBHARD D.H., TOMPKINS M.B., GRINDEM C.B., PAGE R.L. (1997) Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 11(2), 169172
- RUSSWURM M., KOESLING D. (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J* 23(22), 44434450
- SANUPHAN A., CHUNHACHA P., PONGRAKHANANON V., CHANVORACHOTE P. (2013) Long-term nitric oxide exposure enhances lung cancer cell migration. *Biomed Res Int.*, 186972 doi: 10.1155/2013/186972

- SCHEPERS E., SPEER T., BODE-BÖGER S.M., FLISER D., KIELSTEIN J.T. (2014) Dimethylarginines ADMA and SDMA: the real water-soluble small toxins? *Semin. Nephrol.* 34(2), 97105
- SCHINI-KERTH V. (2012) La dysfonction endothéliale: caractérisation, mécanismes impliqués et conséquences potentielles sur la fonction vasculaire. *Journal des Maladies Vasculaires* 37(2), 39
- SCHLESINGER S., SONNTAG S.R., LIEB W., MAAS R. (2016) Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine as Risk Markers for Total Mortality and Cardiovascular Outcomes : A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS One* 11(11) e0165811 doi: 10.1371/journal.pone.0165811
- SCHULZE F., WESEMANN R., SCHWEDHELM E., *et al.* (2004) Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42(12), 13771383
- SCHWEDHELM E., MAAS R., TAN-ANDRESEN J., *et al.* (2006) High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 851(12), 211219
- SCHWEDHELM E., BÖGER R.H. (2011) The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol* 7(5), 275285
- SHAW S.P., ROZANSKI E.A., RUSH J.E. (2004) Cardiac troponins I and T in dogs with pericardial effusion. *J. Vet. Intern. Med.* 18(3), 322324
- SIROKA R., TREFIL L., RAJDL D., RACEK J., CIBULKA R. (2007) Asymmetric dimethylarginine-comparison of HPLC and ELISA methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 850(1-2), 586587
- SPANGLER W.L., CULBERTSON M.R. (1992) Prevalence, type, and importance of splenic diseases in dogs: 1,480 cases (1985-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200(6), 829834
- STAFFORD JOHNSON M., MARTIN M., BINNS S., DAY M.J. (2004) A retrospective study of clinical findings, treatment and outcome in 143 dogs with pericardial effusion. *J Small Anim Pract* 45(11), 546552
- STARRAK G.S., BERRY C.R., PAGE R.L., JOHNSON J.L., THRALL D.E. (1997) Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound* 38(6), 411418
- STOPA N., KREBS J.E., SHECHTER D. (2015) The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* 72(11), 20412059
- STROBEL J., MIETH M., ENDRESS B., *et al.* (2012) Interaction of the cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine (ADMA) with the human cationic amino acid transporter 1 (CAT1). *J Mol Cell Cardiol* 53(3), 392-400
- SULICKA J., SURDACKI A., STRACH M., *et al.* (2012) Elevated asymmetric dimethylarginine in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia : a preliminary report. *Dis. Markers* 33(2), 6976
- SZUBA A., CHACHAJ A., WRÓBEL T., *et al.* (2008) Asymmetric dimethylarginine in hematological malignancies: a preliminary study. *Leuk Lymphoma.* 49(12), 23162320
- TAIN Y. L., HSU C. N. (2017) Toxic Dimethylarginines : Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). *Toxins (Basel)* 9(3), 92
- TANG J., FRANKEL A., COOK R.J., *et al.* (2000) PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 275(11), 77237730
- TARIGHAT S.S., SANTHANAM R., FRANKHOUSER D., *et al.* (2016) The dual epigenetic role of PRMT5 in acute myeloid leukemia: gene activation and repression via histone arginine methylation. *Leukemia* 30(4), 789799

- TEE W.W., PARDO M., THEUNISSEN T.W., *et al.* (2010) Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. *Genes Dev* 24(24), 2772-2777
- TEERLINK T. (2005) ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med.* 10(1), S73-S81
- TEERLINK T., LUO Z., PALM F., WILCOX C.S. (2009) Cellular ADMA : regulation and action. *Pharmacol Res.* 60(6), 448-460
- TESKE E., VAN HEERDE P., RUTTEMAN G.R., *et al.* (1994) Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205(12), 1722-1728
- THANDAPANI P., O'CONNOR T.R., BAILEY T.L., RICHARD S. (2013) Defining the RGG/RG Motif. *Mol Cell.* 50(5), 613-623
- THRALL M.A., MACY D.W., SNYDER S.P., HALL R.L. (1984) Cutaneous lymphosarcoma and leukemia in a dog resembling Sézary syndrome in man. *Vet. Pathol.* 21(2), 182-186
- TOJO A., WELCH W.J., BREMER V., *et al.* (1997) Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int.* 52(6), 1593-1601
- TRAN C.T.L., FOX M.F., VALLANCE P., LEIPER J.M. (2000) Chromosomal Localization, Gene Structure, and Expression Pattern of DDAH1: Comparison with DDAH2 and Implications for Evolutionary Origins. *Genomics* 68(1), 101-105
- VAIL D.M., MACEWEN E.G., KURZMAN I.D., *et al.* (1995) Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial. *Clin. Cancer Res.* 1(10), 1165-1170
- VALERIUS K.D., OGILVIE G.K., MALLINCKRODT C.H., GETZY D.M. (1997) Doxorubicin alone or in combination with asparaginase, followed by cyclophosphamide, vincristine, and prednisone for treatment of multicentric lymphoma in dogs: 121 cases (1987-1995). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210(4), 512-516
- VALLANCE P., LEONE A., CALVER A., COLLIER J., MONCADA S. (1992) Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 12, S60-S62
- VALLI V.E., SAN MYINT M., BARTHEL A., *et al.* (2011) Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet. Pathol.* 48(1), 198-211
- VERNAU W., MOORE P.F. (1999) An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 69(24), 145-164
- VLASHI E., PAJONK F. (2015) Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Semi Cancer Biol.* 31, 2835
- WANG Y., HU S., GABISI A.M., *et al.* (2014) Developing an Irreversible Inhibitor of Human DDAH-1, an Enzyme Upregulated in Melanoma. *ChemMedChem* 9(4), 792-797
- WANG Y., MARSDEN P.A. (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv. Pharmacol.* 34, 71-90
- WATERS D.J., CAYWOOD D.D., HAYDEN D.W., KLAUSNER J.S. (1988) Metastatic pattern in dogs with splenic haemangiosarcoma : Clinical implications. *J Small Anim Pract.* 29(12), 805-814
- WATERS D.J., HAYDEN D.W., WALTER P.A. (1989) Intracranial Lesions in Dogs With Hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med.* 3(4), 222-230
- WEIDMANN E. (2000) Hepatosplenic T cell lymphoma. A review on 45 cases since the first report describing the disease as a distinct lymphoma entity in 1990. *Leukemia* 14(6), 991-997

- WELLER R.E., THEILEN G.H., MADEWELL B.R. (1982) Chemotherapeutic responses in dogs with lymphosarcoma and hypercalcemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181(9), 891893
- WITHROW S.J., VAIL D.M., PAGE R.L. (2012) Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5th Ed. St Louis Edinburgh, Saunders-Elsevier.
- WRIGLEY R.H., PARK R.D., KONDE L.J., LEBEL J.L. (1988) Ultrasonographic features of splenic hemangiosarcoma in dogs: 18 cases (1980-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192(8), 11131117
- YANG Y., MCBRIDE K.M., HENSLEY S., *et al.* (2014) Arginine Methylation Facilitates the Recruitment of TOP3B to Chromatin to Prevent R Loop Accumulation. *Molecular Cell* 53(3), 484497
- YANG Y., HADJIKYRIACOU A., XIA Z., *et al.* (2015) PRMT9 is a Type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAP145. *Nat Commun* 6(1), 112
- YANG L., WANG Y., GUO L., *et al.* (2015) The Expression and Correlation of iNOS and p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2015, 637853
- YERRAMILLI M., YERRAMILLI M., OBARE E. (2015) Prognostic value of symmetric dimethylarginine (SDMA) to creatinine ratio in dogs and cats with chronic kidney disease (CKD). *J Vet Intern Med* 2015(29), 11221256
- YERRAMILLI Murthy, FARACE G., QUINN J., YERRAMILLI Maha (2016a) Kidney Disease and the Nexus of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury: The Role of Novel Biomarkers as Early and Accurate Diagnostics. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 46(6), 961993
- YERRAMILLI M, YERRAMILLI M, FARACE G, *et al.* "Symmetric dimethylarginine (SDMA) as kidney biomarker in canine and feline cancer." *26th Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals*;September 8–10, 2016; Gothenburg, Sweden.
- YOSHIMATSU M., TOYOKAWA G., HAYAMI S., *et al.* (2011) Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int. J. Cancer* 128(3), 562573
- YU Z., CHEN T., HÉBERT J., LI E., RICHARD S. (2009) A Mouse PRMT1 Null Allele Defines an Essential Role for Arginine Methylation in Genome Maintenance and Cell Proliferation. *Mol Cell Biol.* 29(11), 29822996
- ZHANG X., CHENG X. (2003) Structure of the Predominant Protein Arginine Methyltransferase PRMT1 and Analysis of Its Binding to Substrate Peptides. *Structure* 11(5), 509520
- ZOCCALI C., BODE-BÖGER S., MALLAMACI F., *et al.* (2001) Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 358(9299), 21132117

Annexe 1

Consentement éclairé signé par les propriétaires en amont du prélèvement sanguin :

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ

Je soussigné(e), Madame, Monsieur (rayer la mention inutile), _____
demeurant _____
propriétaire du chien _____
accepte de participer à l'étude intitulée : **Évaluation des diméthylarginines arginines (SDMA et ADMA) comme biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des hémangiosarcomes, lymphomes et leucémies chez le chien.**

Je déclare avoir été informé par, le Dr _____
responsable de l'étude et exerçant à l'École nationale vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du
général de Gaulle, 94700 Maisons Alfort, France :

- de l'objectif de l'étude, son déroulement, ses avantages, des effets indésirables attendus, des risques et contraintes éventuels,
- de son caractère non obligatoire et entièrement volontaire,
- de la possibilité de retirer mon chien de l'étude à tout moment quelle qu'en soit la raison,
- que le fait de ne pas participer à l'étude ou de retirer mon chien en cours d'étude n'influencera ni le suivi ni les soins qui lui seront apportés.

Je confirme avoir lu et compris l'ensemble de ce document, avoir pu poser des questions et obtenir des réponses compréhensibles.

Je m'engage à suivre toutes les prescriptions faites par mon vétérinaire et à présenter mon chien à tous les examens prévus par le protocole.

Je m'engage à signaler au Dr Béguin toute modification de l'état de santé de mon animal, ainsi que tout traitement qui lui aurait été administré au cours du protocole.

J'accepte le traitement informatisé des données collectées dans le cadre de l'étude en conformité avec la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. Je pourrais exercer mes droits d'accès, de rectification et d'opposition directement auprès du Vétérinaire qui suit mon animal dans le cadre de l'étude.

Fait à _____, le _____ (en 2 exemplaires, dont un m'a été remis)

Nom: _____

Dr BEGUIN Jérémy

Signature : *précédée de la mention lue et approuvée*

Annexe 2

Lettre d'information fournie aux propriétaires au même moment que le consentement éclairé.

LETTRE D'INFORMATION

Madame, Monsieur,

La présence d'une tumeur maligne vient d'être diagnostiquée chez votre chien. L'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort représenté par le Dr Jérémy Béguin vous propose de faire participer votre chien à une étude clinique intitulée : **Évaluation des diméthylarginines arginines (SDMA et ADMA) comme biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des hémangiosarcomes, lymphomes et leucémies chez le chien.**

Il vous revient de décider si vous souhaitez que votre chien y participe ou non. Vous trouverez dans ce document toutes les informations concernant cette étude.

Le comité d'éthique à la recherche clinique de l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort s'est réuni et a donné un avis favorable à la réalisation de cette étude.

Selon la directive 2001/82/CE de la commission du 6 novembre 2001 amendée par les directives 2004/28/CE du 31 mars 2004 et 2009/9/CE du 10 février 2009, une confirmation écrite de votre accord est nécessaire pour l'inclusion de votre chien dans l'étude.

Votre participation est entièrement libre et volontaire. Avant de vous décider, prenez le temps de lire cette fiche d'information et de poser toutes les questions à votre vétérinaire.

Vous avez la possibilité de refuser cette étude ou de retirer votre chien de l'étude à tout moment, même si vous avez déjà donné votre consentement écrit. Quoi que vous décidiez (participer ou non à l'étude), votre chien continuera à recevoir toute l'attention et les soins de votre vétérinaire.

Les données médicales de votre chien associées à l'étude, ainsi que celles vous concernant dans la mesure où ces données sont nécessaires à l'étude, seront réunies sur un fichier informatique permettant un traitement automatisé des données générées par cette étude en vue d'analyser les résultats de l'étude au regard de l'objectif de cette dernière. Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès, de rectification, et d'opposition à la transmission de ces données susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette étude et d'être traitées. Vous pourrez exercer vos droits directement auprès du Vétérinaire qui suit votre animal dans le cadre de l'étude.

1. Objectif(s) de l'étude

L'étude décrite ci-après a pour but d'évaluer des marqueurs sanguins (nommés SDMA et ADMA) dans le diagnostic et le suivi de cancers hématopoïétiques (lymphome et leucémies) et vasculaires (hémangiosarcome) chez le chien.

2. Protocole d'étude

- Évaluation de la SDMA et de l'ADMA comme biomarqueurs de cancer au diagnostic

Si votre animal participe à l'étude, une prise de sang (2ml) sera réalisée afin de déterminer la concentration sanguine en SDMA et ADMA.

- Évaluation de la SDMA et de l'ADMA comme biomarqueur de suivi dans la prise en charge du cancer de votre animal

Si votre animal est pris en charge par chimiothérapie, une prise de sang sera réalisée régulièrement au cours du protocole.

Les chiens atteints de lymphomes sont traités par chimiothérapie (protocole CHOp). Une prise de sang sera alors réalisée à intervalle régulier (toutes les 5 séances). Si le traitement arrive à son terme, une prise de sang sera réalisée lors des consultations de suivi (tous les 3 mois).

Les chiens atteints d'hémangiosarcomes recevront 6 séances de doxorubicine espacées de 3 semaines. Une prise de sang sera réalisée avant chaque séance de chimiothérapie puis, si le traitement arrive à son terme lors des suivis cliniques des chiens atteints (tous les 3 mois).

3. Aspect financier

La participation à cette étude n'engendrera aucun frais supplémentaire à la charge du propriétaire comparé à la prise en charge d'un patient ne participant pas à l'étude. Ainsi, les dosages sanguins de l'ADMA et de la SDMA ne sont pas à la charge des propriétaires.

DIMÉTHYLARGININES ET MORTALITÉ CHEZ DES CHIENS PRÉSENTÉS POUR TUMEUR MALIGNE : UNE ÉTUDE PROSPECTIVE.

AUTEUR : Grégoire BERNARDO MARQUES

RÉSUMÉ :

Les diméthylarginines sont des molécules issues du catabolisme de protéines contenant des résidus d'arginine méthylés. Le domaine de la cancérologie développe un intérêt croissant pour ces molécules, les phénomènes de méthylation y jouant un rôle prépondérant. La littérature vétérinaire est mince à ce sujet. L'objectif de cette thèse est de faire un point sur les connaissances actuelles concernant ces molécules et le cancer en médecine humaine et vétérinaire, ainsi que d'explorer le lien entre ces molécules, en particulier la diméthylarginine symétrique (SDMA), et certains cancers chez le chien. Sur la base des données bibliographiques, les cancers étudiés dans ce travail sont les lymphomes, les leucémies et les hémangiosarcomes.

L'étude réalisée sur des chiens recrutés au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort (CHUVA), a permis de montrer que les chiens atteints de lymphomes possèdent des concentrations en SDMA significativement plus élevées au moment du diagnostic que les chiens atteints de d'autres maladies, notamment bénignes. Cette étude suggère également un intérêt du dosage de la SDMA lors de la mise en évidence d'une masse suspecte d'être un hémangiosarcome : les chiens atteints d'hémangiosarcomes spléniques avaient une concentration sanguine en SDMA au moment du diagnostic significativement ($p = 0,0028$) plus élevée que les chiens atteints d'une masse splénique d'une différente origine. Les chiens atteints d'un hémangiosarcome métastasé ont également des concentrations sanguines en SDMA significativement supérieures à ceux présentant un hémangiosarcome non métastasé ($p = 0,042$). De plus, les chiens atteints de lymphomes et d'hémangiosarcomes possédant des concentrations en SDMA supérieures ou égales aux valeurs de référence inclus dans l'étude possèdent une survie significativement plus faible que ceux possédant une SDMA dans les valeurs usuelles (respectivement $p = 0,034$ et $p = 0,022$). La concentration en SDMA au diagnostic pourrait donc être un facteur pronostique négatif chez le chien atteints de lymphome et d'hémangiosarcome.

Une étude réalisée sur un nombre plus important de chiens et incluant un groupe contrôle plus important permettrait de confirmer ces premiers résultats. Néanmoins, les résultats de cette étude sont encourageants et soulignent l'existence d'un lien entre la dysrégulation du métabolisme de la L-arginine et certains cancers chez le chien. Chez l'homme, cette dysrégulation s'accompagne d'une dysfonction endothéliale, délétère pour l'individu atteint. L'évaluation de cette dysfonction chez le chien est un domaine qu'il convient d'envisager pour des études futures, à commencer par le dosage de l'ADMA.

MOTS CLÉS :

**CANCÉROLOGIE / LYMPHOME / HÉMANGIOSARCOME / DIMÉTHYLARGININE
MORTALITE / MÉDECINE VÉTÉRINAIRE / MOLÉCULE / THÉRAPEUTIQUE / DOSAGE
CARNIVORE DOMESTIQUE / CHIEN / CHUVA**

JURY :

Président : Pr. Pascal Gueret

1^{er} Assesseur : Dr. Christelle Maurey

2nd Assesseur : Dr. Matthias Kohlhauer

DIMETHYLARGININES AND MORTALITY IN DOGS PRESENTED FOR MALIGNANCY: A PROSPECTIVE STUDY.

AUTHOR: Grégoire BERNARDO MARQUES

SUMMARY:

Dimethylarginines are small molecules resulting from the catabolism of proteins which contains methylated arginine residues. These molecules are the subject of a significant amount of research in human medicine. The field of oncology is developing a growing interest in these molecules, with methylation phenomena playing a predominant role. The veterinary literature is thin on this subject. The objective of this project is to review the current knowledge about these molecules and cancer in human and veterinary medicine, and to explore the link between these molecules, in particular symmetrical dimethylarginine (SDMA), and cancers in dogs. Based on bibliographical data, the cancers evaluated in this study are lymphomas, leukemias and hemangiosarcomas.

The study conducted on dogs recruited at the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort (CHUVA), showed that dogs with lymphomas had significantly higher concentrations of SDMA at the time of diagnosis than dogs with other diseases, including benign diseases. This study also suggests that dogs with splenic hemangiosarcomas had significantly ($p = 0.0028$) higher blood SDMA concentrations at diagnosis than dogs with a splenic mass of a benign origin. Dogs with metastatic hemangiosarcoma also had significantly higher blood concentrations of SDMA than dogs with non-metastatic hemangiosarcoma ($p = 0.042$). In addition, dogs with lymphomas and hemangiosarcomas with SDMA concentrations greater than or equal to the reference values included in the study had significantly lower survival than those with SDMA in the usual values ($p = 0.034$ and $p = 0.022$, respectively). The concentration of SDMA at diagnosis could therefore be a negative prognostic factor in dogs with lymphoma and hemangiosarcoma.

A study conducted on a larger number of dogs, including a larger control group, would confirm these initial results. Nevertheless, the results of this study are encouraging and underline the existence of a link between dysregulation of L-arginine metabolism and the appearance of some cancers in dogs. In humans, this dysregulation goes along with endothelial dysfunction, which is injurious for the individual. The evaluation of this dysfunction in dogs is an area that should be considered for future studies, starting with the dosage of ADMA in affected dogs.

KEYWORDS:

ONCOLOGY / LYMPHOMA / HEMANGIOSARCOMA / DIMETHYLARGININE
MORTALITY / VETERINARY MEDICINE / MOLECULE / THERAPEUTIC / DOSAGE
DOMESTIC CARNIVORS / DOG / CHUVA

JURY:

Chairperson: Pr Pascal Gueret

1st Assessor: Dr Christelle Maurey

2nd Assessor: Dr Matthias Kohlhauer