

LISTE DES ABREVIATIONS

ATP : Adenosine-Tri-Phosphate

CP : Créatine-Phosphate

CPK : Créatine-Phospho-Kinase

ECG : Electrocardiogramme

**ESSAI DE PHASE I-II DE TRAITEMENT DES CANCERS SPONTANES DU
CHIEN PAR ADMINISTRATION INTRA-VEINEUSE D'UNE TRI-THERAPIE
ASSOCIANT LA CREATINE-PHOSPHATE, LA CREATINE-PHOSPHO-
KINASE ET L'ADENOSINE-TRI-PHOSPHATE**

TABLE DES MATIERES	1
1. INTRODUCTION	3
2. RATIONALE DE L'ETUDE : BASES MOLECULAIRES	4
3. SYSTEME ENZYMATIQUE CREATINE-PHOSPHATE ET CREATINE-PHOSPHO-KINASE	7
4. RATIONALE DE L'ETUDE : PRINCIPE DE LA RECHERCHE	8
5. RECAPITULATIF DES ETUDES EFFECTUEES A CE JOUR	9
5.1. Etude <i>in vitro</i> de l'efficacité anti-tumorale de la tri-thérapie Créatine-Phosphate, Créatine-Phospho-Kinase et Adénosine-Di-Phosphate	9
5.1.1. Modalités de l'étude	9
5.1.2. Résultats de l'étude	9
5.2. Etude de l'efficacité anti-tumorale d'une mono-thérapie par la Créatine- Phosphate	13
5.2.1. Modalités de l'étude	13
5.2.2. Résultats	13
5.2.3. Pharmacocinétique de la Créatine-Phosphate après injection intra- péritonéale	15
5.2.4. Efficacité d'une mono-thérapie par la créatine phosphate	15
5.2.5. Deux arguments supplémentaires en renfort	15
5.2.6. Hypothèse	16
6. ETUDE <i>IN VIVO</i> D'UNE BITHERAPIE ASSOCIANT CREATINE PHOSPHATE ET L'ADENOSINE TRI PHOSPHATE	16
6.1. Modalités de l'étude	16

6.2. Résultats	16
6.2.1. Essai clinique humain de phase I de la Créatine phosphate seule	17
6.2.2. Essai clinique humain de phase I à doses répétées de la Créatine Phosphate seule	18
6.2.3. Etapes ultérieures	18
7. CONDUITE DE L'ESSAI DE PHASE I-II chez le CHIEN	20
7.1. Substances administrées	20
7.2. Pré-expérimentation chez quatre animaux sains	21
7.2.1. Les animaux	21
7.2.2. Le suivi clinique	22
7.2.3. Les méthodes d'analyses	22
7.2.4. Tolérance et pharmacocinétique de la Créatine-Phosphate	23
7.2.5. Tolérance et pharmacocinétique de la Créatine-Phospho-Kinase	26
7.2.6. Tolérance et pharmacocinétique de l'Adénosine-Tri-Phosphate	32
7.2.7. Tolérance et pharmacocinétique de la tri-thérapie Créatine-Phosphate, Créatine-Phospho-Kinase et Adénosine-Tri-Phosphate	35
a) Tri-thérapie 1	35
b) Tri-thérapie 2	45
7.2.8. Discussion	55
7.3. Expérimentation de phase I-II chez le chien atteint de cancer évolué	57
7.3.1. Présentation des animaux	57
a) Nombre d'animaux prévus	57
b) Critères d'inclusion	57
c) Critères d'exclusion	57
d) Présentation des animaux malades	57
7.3.2. Durée du traitement	58
7.3.3. Modalités techniques de l'administration de la tri-thérapie et posologies	58
7.3.4. Dépistage des effets secondaires éventuels et évaluation de la tolérance	59
7.3.5. Résultats biologiques	65
7.3.6. Discussion	77
8. CONCLUSION	80
9. BIBLIOGRAPHIE	81

1. INTRODUCTION

Face à une maladie incurable comme le cancer, l'utilisation expérimentale de chiens présentant des tumeurs spontanées, permet une accélération du processus de mise sur le marché de médicaments en cas de résultats positifs, intéressants ou encourageants sur les animaux. Cette étude a été réalisée dans ce but en collaboration avec les laboratoires pharmaceutiques, le Pr IZRAEL et son équipe, de l'hôpital TENON (PARIS), et le Dr DEVAUCHELLE et son équipe, du Centre de Radiothérapie Scanner de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort.

L'intérêt du protocole repose sur l'activité anti-tumorale *in vitro* de l'Adénosine Tri Phosphate extrinsèque.

En favorisant une réaction enzymatique utilisant la Créatine Phosphate (CP) comme substrat, et, catalysée par la Créatine-phospho-kinase (CPK), nous espérons favoriser la formation d'ATP *in vivo*.

Dans un premier temps, l'étude porte sur des essais de tolérance de chaque molécule séparément (ATP, CP et CPK) sur des chiens sains, puis de la tri-thérapie.

Dans un second temps, la tri-thérapie est testée sur des chiens malades, atteints de tumeurs métastasées à un stade avancé de la maladie, afin de vérifier l'efficacité de ce protocole.

2. RATIONALE DE L'ETUDE : BASES MOLECULAIRES

L'ATP est un nucléoside triphosphorylé naturellement produit dans les cellules jouant un rôle central comme source d'énergie dans les réactions cellulaires. La molécule d'ATP est en effet capable de transférer à d'innombrables autres molécules l'énergie qu'elle détient sous forme d'une liaison pyrophosphate. La molécule d'ATP se trouve alors dégradée en une molécule d'Adénosine-Di-Phosphate (ADP), qui sera ensuite « rechargée » par adjonction d'une liaison cellulaire phosphoryle riche en énergie issue des réactions d'oxydo-réduction cellulaire pour reconstituer de l'ATP. La distribution de l'ATP chez le vivant est essentiellement intracellulaire. La concentration intra cytoplasmique de l'ATP est élevée, de 5 à 10 mmol/l ; l'ATP est aussi stocké dans des vésicules intra cytoplasmiques, où la concentration en ATP peut atteindre jusqu'à 1 mol/l (15). Dans certaines circonstances, la cellule peut relarguer dans le stroma péri cellulaire une partie de son ATP déterminant dans l'espace ambiant des concentrations d'ATP relativement élevées, de l'ordre du millimolaire. Ce phénomène est bref car l'ATP disparaît rapidement sous l'action conjuguée des phosphokinasés et des ecto-phosphatases extracellulaires qui transforment l'ATP en ADP (13,4). Dans le plasma circulant, la concentration en ATP chez l'homme est extrêmement faible, de 0,5 à 1 $\mu\text{mol/l}$.

In vivo, l'ATP extracellulaire est impliqué dans la régulation d'une multitude de processus physiologiques mettant en jeu des récepteurs spécifiques situés à la surface des membranes cellulaires, les récepteurs purinergiques P2 (3,5,9).

In vitro, l'ATP extrinsèque possède une activité anti-tumorale à l'encontre de nombreuses lignées de cellules malignes en culture.

Cette activité anti-tumorale *in vitro* a été démontrée :

- sur des lignées transformées murines, en particulier : leucémie L 1210, mastocytose P 815 (4), érythroleucémie (7), fibroblastes 3T3 et L 929 (14,27),
- sur des lignées transformées humaines, en particulier : carcinome mammaire T47, carcinomes mammaires MCF7 (hormono-sensibles) et MDA-MB 231 (hormono-résistant) (31) ; carcinomes prostatiques LNCaP (hormono-sensible), DU 145 et PC-3 (hormono-résistants) (12) ; mélanome B16 ; neuroblastome N2A (10) ; leucémie monocyttaire THP1 (29) ; carcinome ovarien SKOV3 (3) ; gliome C6 (28).

L'addition d'ATP au milieu de culture entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire et une mort cellulaire pour des concentrations d'ATP allant de 50 à 100 $\mu\text{mol/l}$ ou plus.

L'action cytotoxique de l'ATP n'apparaît qu'après une durée de contact minimum avec les cellules en culture de quelques minutes à six heures. Après ce délai, les cellules en culture qui ont été exposées à l'ATP sont définitivement « marquées » et condamnées à mourir par apoptose en quelques heures, même si elles sont repiquées sur un milieu dépourvu d'ATP et recouvrent une apparence normale pendant leur sursis (6).

Pour des concentrations inférieures à 50 $\mu\text{mol/l}$, l'ATP pourrait avoir dans certaines conditions une action mitogène (3,33,19).

Le mécanisme de l'activité anti-tumorale de l'ATP *in vitro* associe (4,35,11,34,26) :

- une dépolarisation des protéines de membrane, qui se traduit par l'ouverture de canaux calciques, entraînant l'afflux intracellulaire immédiat de calcium et un gonflement cellulaire qui peut aboutir à une lyse « colloïdo-osmotique »,
- une activation de récepteurs membranaires spécifiques, les récepteurs purinergiques P2Z ou P2U, dont la stimulation déclenche, via les circuits de la signalisation intracellulaire et le recrutement de certains gènes nucléaires, l'apoptose de la cellule.

Enfin, *in vivo*, la libération extracellulaire d'ATP à partir des cellules immuno-compétentes apparaît aujourd'hui comme un médiateur essentiel de l'action cytotoxique de ces cellules sur les cellules malignes (4,2,24,25,8).

D'après deux études récentes (32,23), deux mécanismes utilisant tous les deux la voie mitochondriale peuvent expliquer le rôle de l'ATP dans la cascade d'événements menant à l'apoptose (fig. 1 et 2).

Le premier mécanisme (fig.1) fait intervenir l'ATP comme inducteur d'une procaspase-9, elle-même agissant sur un apoptosome qui permet l'activation d'une procaspase-3 en caspase-3, protéine responsable de l'apoptose. Tout ce système peut être amplifié grâce à l'apport d'ATP (32).

Le second mécanisme (fig.2) montre deux voies selon la perméabilité mitochondriale :

- dans le cas d'une activation de l'ATPase, cela induit une diminution d'ATP provoquant la nécrose,
- dans le cas d'une activation de la glycolyse, cela induit une augmentation d'ATP provoquant l'apoptose (23).

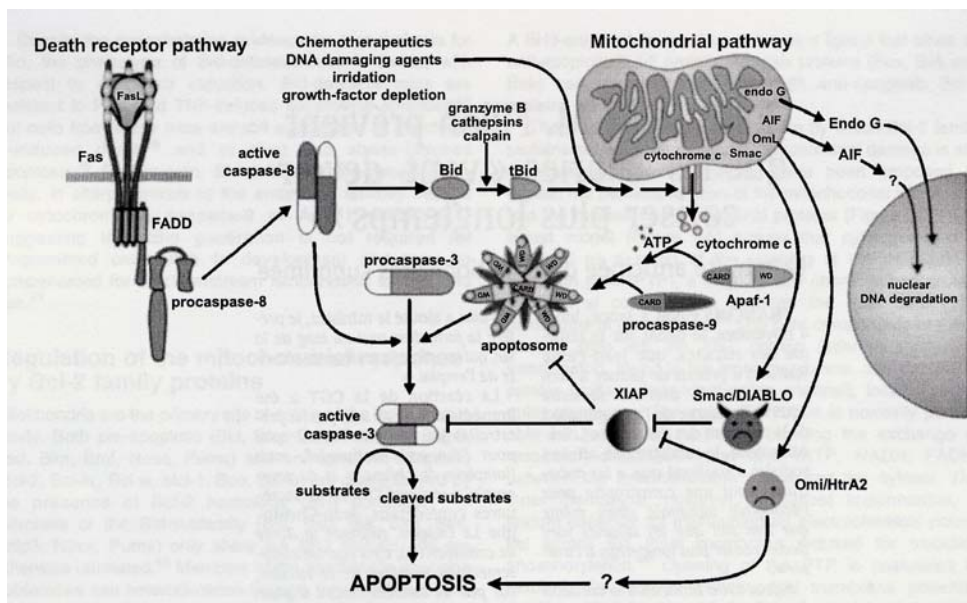


Figure 1 : Différentes voies aboutissant à l'apoptose et intégrant l'utilisation des mitochondries (d'après 32)

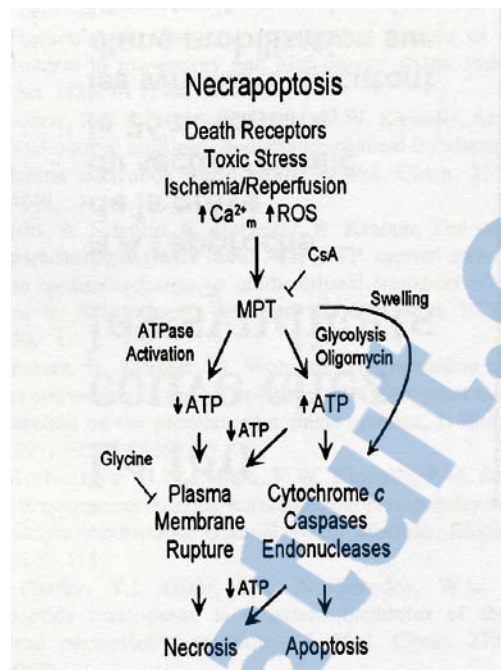


Figure 2 : Balance entre la perméabilité mitochondriale (MPT) permettant l'activation de l'ATPase ou l'utilisation de la glycolyse pour provoquer la nécrose ou l'apoptose (d'après 23)

In vivo, les essais thérapeutiques d'administration de l'ATP à l'homme, en tant qu'agent anti-tumoral potentiel, se sont soldés par un échec.

Un essai humain de phase II (HASKELL,1996) a porté sur 14 hommes atteints de cancers évolués (18).

L'ATP a été administré en perfusions intraveineuses de 96 heures, à raison d'une perfusion par mois, à des doses de 50 à 100 μ g/kg /minute.

La toxicité s'est avérée importante. Les effets secondaires ont consisté essentiellement en un syndrome cardio-pulmonaire caractéristique, associant une sensation de constriction thoracique (37% des cas), et une dyspnée de grade 1 à 4 (49% des cas). Ont été également notés : hypotension artérielle (33% des cas), signes électriques d'ischémie myocardique (28% des cas), nausées et vomissements (14% des cas), vertiges (16% des cas), réactions locales aux points d'injection (47% des cas). Un patient atteint de cancer oesophagien avec métastases pulmonaires est décédé brutalement par collapsus 48 heures après une troisième perfusion d'ATP à la dose de 50 μ g/kg/minute, sans qu'une relation de cause à effet ait pu être établie.

La Dose Maximale Tolérée (DMT) retenue chez l'homme au terme de cet essai a été de 50 μ g/kg/minute en perfusion de 96 heures.

Aucun effet anti-tumoral n'a été constaté au cours de cet essai.

Un essai thérapeutique humain de phase II a été conduit par les mêmes auteurs (HASKELL,1998) sur une population de 15 patients atteints de carcinomes bronchiques non à petites cellules de stade IIIB ou IV (17).

L'ATP a été délivré à une posologie correspondant à la DMT pré-déterminée lors de l'essai de phase II, soit 50 µg/kg/minute en perfusion de 96 heures, les perfusions étant espacées de quatre semaines.

La toxicité a été très importante, imposant l'interruption du traitement chez 5 patients.

Aucune réponse tumorale objective n'a été enregistrée.

Plus récemment (mars 2000) a été rapporté un essai humain randomisé, au cours duquel l'ATP a été administré non pas en tant qu'agent anti-tumoral potentiel, mais en tant que molécule énergétique susceptible de constituer un traitement palliatif de la dénutrition et de la cachexie cancéreuse (1).

L'essai a concerné 58 patients atteints de carcinome bronchique non à petites cellules de stade IIIB ou IV.

L'ATP a été délivré en perfusion de 30 heures, à la posologie initiale de 20 µg/kg/minute, puis avec augmentation des doses par paliers de 10 µg/kg/minute toutes les 30 minutes jusqu'à apparition des effets secondaires indésirables ou jusqu'au palier maximum de 75 µg/kg/minute. Le protocole comportait 10 perfusions par malade, espacées de deux semaines pour les sept premières et de quatre semaines pour les trois dernières.

Sur un total de 176 perfusions d'ATP administrées à 28 patients, 52 ont été données à une posologie basse (25-40 µg/kg/minute), 47 à une posologie moyenne (45-60 µg/kg/minute) et 77 à une posologie forte (65-75 µg/kg/minute). Dans l'ensemble, 67% des perfusions n'ont pas entraîné d'effets secondaires, et 33% des perfusions ont été responsables d'effets indésirables de grade 1 et 2. Il n'y a eu qu'un seul cas de toxicité (dyspnée) de grade 4. Tous les effets secondaires observés ont été réversibles en quelques minutes après arrêt de la perfusion.

L'essai a conclu à un effet bénéfique modeste sur le statut nutritionnel des patients (poids, force musculaire, qualité de vie), résultats qui demandent cependant à être confirmés (22).

Aucun effet anti-tumoral n'a été constaté et aucun effet significatif sur la survie des patients n'a été signalé.

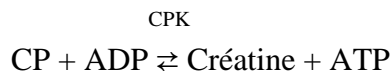
On peut conclure des essais précédents qu'il n'y a guère d'espoir que l'ATP puisse être directement administré à l'homme à des posologies susceptibles de déclencher une action anti-tumorale : sans doute parce que l'administration directe d'ATP résulte en une surcharge en nucléotides, et que l'ATP est très rapidement dégradé dans le plasma (15), sous l'effet des phosphatases sériques, en ADP qui constitue un agent toxique et en particulier un puissant agent agrégant plaquettaire.

3. SYSTEME ENZYMATIQUE CREATINE-PHOSPHATE ET CREATINE-PHOSPHO-KINASE

La créatine-phosphate constitue un réservoir intracellulaire d'énergie.

La molécule de CP est susceptible de transférer sur l'ADP l'énergie qu'elle contient sous forme d'une liaison amidine-phosphate : une molécule d'ATP est ainsi reconstituée à partir d'une molécule d'ADP, alors que la phosphocréatine est dégradée en créatine.

La créatine-phospho-kinase (CPK) est l'enzyme intracellulaire qui catalyse le transfert de l'ADP en ATP.



Le système enzymatique CP et CPK associé régénère donc en permanence l'ATP à partir de sa forme naturelle de dégradation, l'ADP.

Ce système enzymatique existe physiologiquement à l'intérieur des cellules, notamment des cellules musculaires. Il n'est pas naturellement présent dans le milieu extracellulaire.

Chez l'homme, il n'y a pas de créatine-phosphate circulante. On note un taux plasmatique basal de CPK, de l'ordre de 25 à 180 Unités/litre, constitué essentiellement de l'iso enzyme CK-MB. Ce taux peut s'accroître de manière considérable au cours de certains états pathologiques comme certains cancers (élévation élective de l'iso enzyme CK-BB) ou l'infarctus du myocarde (élévation prédominante de l'iso enzyme CK-MM).

4. RATIONALE DE L'ETUDE : PRINCIPE DE LA RECHERCHE

Le principe de cette recherche est d'administrer par voie sanguine, donc d'introduire dans le milieu extracellulaire, le couple enzymatique CP et CPK à des concentrations suffisantes pour maintenir le ratio ATP/ADP en faveur de l'ATP et régénérer de manière continue de l'ATP « natif ».

Au couple CP et CPK est ajoutée une provision de nucléotides puriques, sous forme d'ATP, à une posologie non toxique, de manière à amorcer et renforcer l'efficacité du système enzymatique.

L'ensemble est ainsi susceptible de fonctionner à la fois comme régénérateur et pourvoyeur d'ATP *in situ* dans le stroma péri membranaire.

Le but recherché est de déclencher l'apoptose des cellules malignes par un ou plusieurs de trois mécanismes potentiels susceptibles de résulter de l'action d'une production continue d'ATP « natif » au contact des protéines de la surface membranaire :

- Activation de purino-récepteurs spécifiques P2Z ou P2U ;
- Dépolarisation prolongée des récepteurs de surface, aboutissant à une inactivation fonctionnelle partielle ou totale de ces récepteurs équivalent à une situation de déprivation des facteurs de croissance. Il est en effet démontré que des cellules malignes isolées pendant une douzaine d'heures de la stimulation exercée par les facteurs de croissance extra cellulaire entrent en apoptose, celle-ci étant induite par la mise en jeu d'une voie apoptotique dans laquelle intervient l'oncogène c-Myc ;

- Levée d'un mécanisme inhibiteur portant sur un récepteur de surface dont la fonction normale est de déclencher un signal pro apoptotique.

Cette hypothèse de travail a été confortée par la mise en évidence, au niveau de la surface de fibroblastes transformés, d'un blocage de l'interaction du récepteur de surface pro apoptotique FAS avec son ligand naturel CD95L, blocage dans lequel intervient également l'oncogène c-Myc (16).

5. RECAPITULATIF DES ETUDES EFFECTUEES A CE JOUR

5.1. Etude *in vitro* de l'efficacité anti-tumorale de la tri-thérapie Créatine-Phosphate, Créatine-Phospho-Kinase et Adénosine-Di-Phosphate.

Cette étude a été conduite dans le laboratoire de biologie tumorale de l'hôpital TENON.

5.1.1. Modalités de l'étude

Cette étude a porté sur des cellules tumorales humaines ayant quatre origines tissulaires différentes : épidermoïde ORL (lignée KB) ; adénocarcinome mammaire (lignée MCF7) ; adénocarcinome ovarien (lignée IGROV 1) ; leucémie myéloïde chronique (lignée K 562).

Les lignées en culture ont été soumises à la triple association CP, CPK et ADP. Dans les conditions expérimentales, l'ADP, qui n'induit pas d'effet cytotoxique à lui seul aux concentrations utilisées, est très rapidement transformé en ATP.

Pour chaque lignée cellulaire des courbes Dose/Réponse ont été établies, indiquant le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration des substances testées, et la Concentration Inhibitrice 50 a été déterminée, correspondant à la concentration de substance cytotoxique entraînant 50% de mortalité cellulaire *in vitro*.

5.1.2. Résultats de l'étude

- La tri-thérapie induit une inhibition de la croissance cellulaire sur toutes les lignées testées
- L'inhibition de la croissance tumorale :
 - apparaît nettement à partir d'un seuil de concentration de CP de l'ordre de 4 à 5 mmol/l, et croît ensuite rapidement pour être totale ou sub totale à une concentration de l'ordre de 12 mmol/l
 - ne se manifeste qu'après une exposition minimum de 9 à 12 heures à la tri-thérapie.

Ces caractéristiques suggèrent que la cytotoxicité est liée à un mécanisme apoptotique.

- L'action anti-tumorale observée est bien liée à une production d'ATP natif

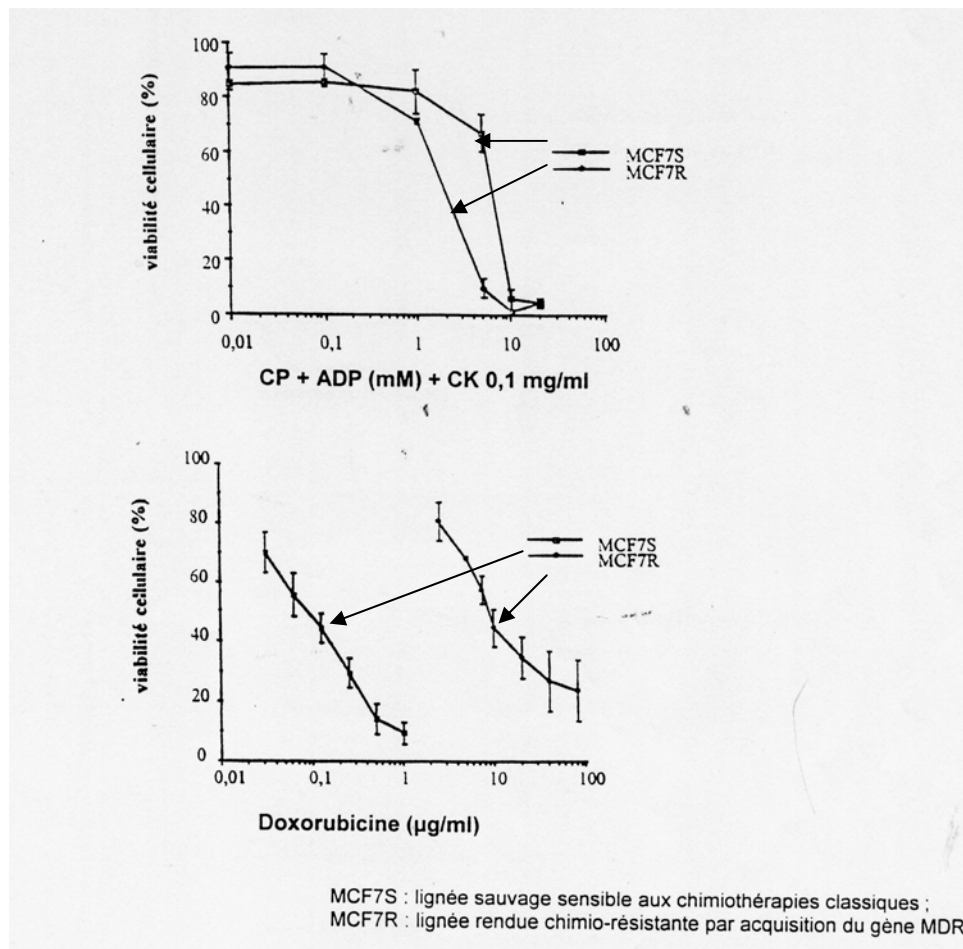


Figure 3 :Activité anti-tumorale *in vitro* de la triple association Créatine-Phosphate (CP), Créatinine-Phospho-Kinase (CPK) et Adénosine-Di-Phosphate (ADP), sur une culture d'adénocarcinome mammaire humain MCF7 ; Comparaison avec l'activité de la Doxorubicine (d'après 20).

Ni CP seule, ni CPK seule, ni ADP seule, ni les associations deux à deux de ces substances, n'induisent une activité anti-tumorale. Pour qu'une activité cytotoxique apparaisse, il faut que les trois constituants de la réaction enzymatique de régénération de l'ATP soient réunis.

Par ailleurs, le système enzymatique associant Phospho Enol Pyruvate (PEP), Pyruvate Kinase (PK), et ADP a été testé *in vitro* dans les mêmes conditions expérimentales que le système CP, CPK et ADP. Il exprime une activité cytotoxique anti-tumorale dont les paramètres sont rigoureusement superposables à ceux du système CP, CPK et ADP (fig.4).

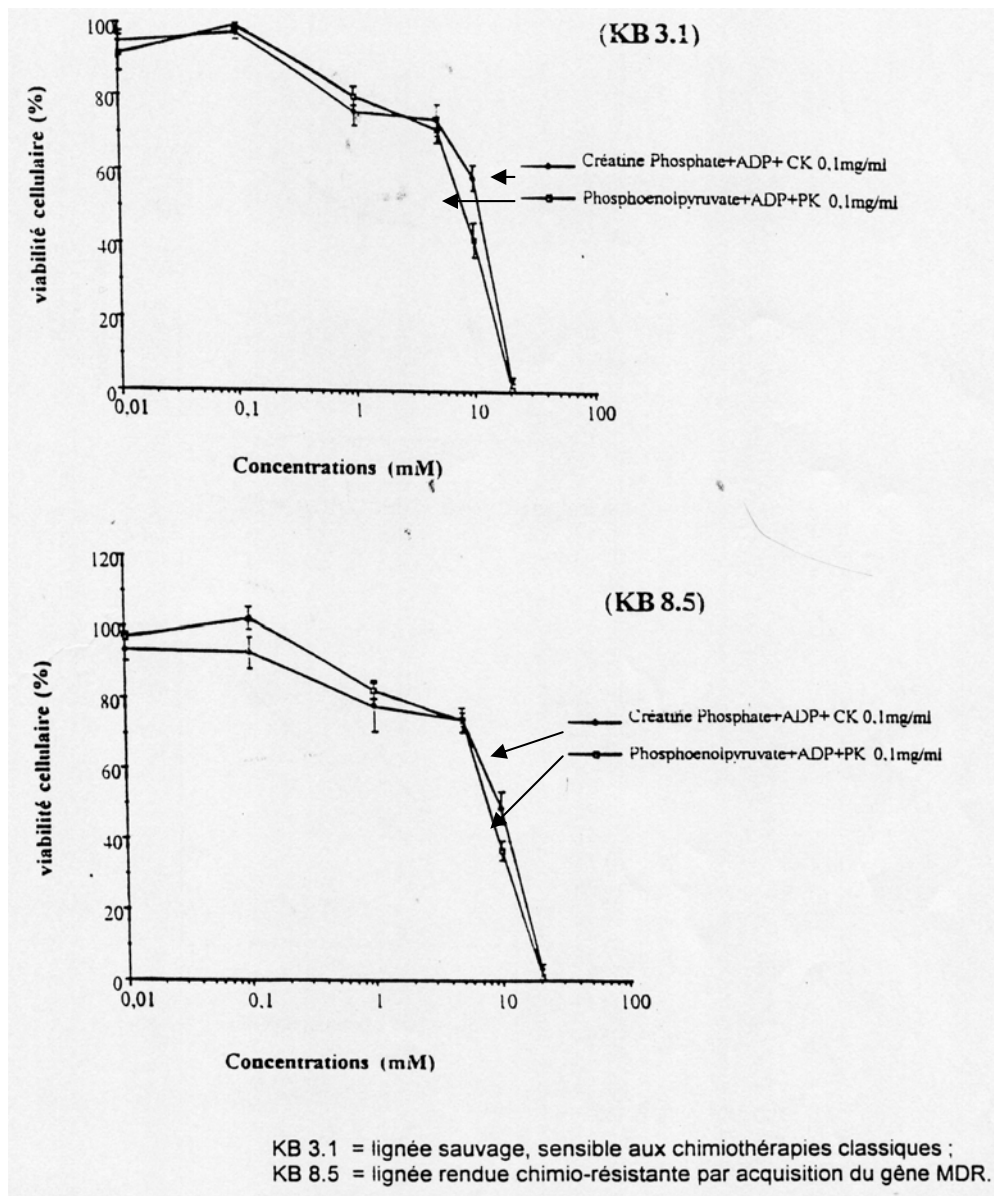


Figure 4 : Comparaison de l'activité anti-tumorale *in vitro* de la triple association CP, CPK et ADP, et de la triple association Phospho-Enol-Pyruvate (PEP), Pyruvate-Kinase (PK) et Adénosine-Di-Phosphate (ADP) sur une culture de carcinome épidermoïde ORL humain KB (d'après 32).

- L'action cytotoxique de la tri-thérapie s'exerce non seulement sur les quatre lignées testées, mais aussi avec la même efficacité sur les quatre lignées dérivées des précédentes et rendues multi résistantes aux chimiothérapies classiques par acquisition du gène de résistance MDR1 (fig.4 et 5).

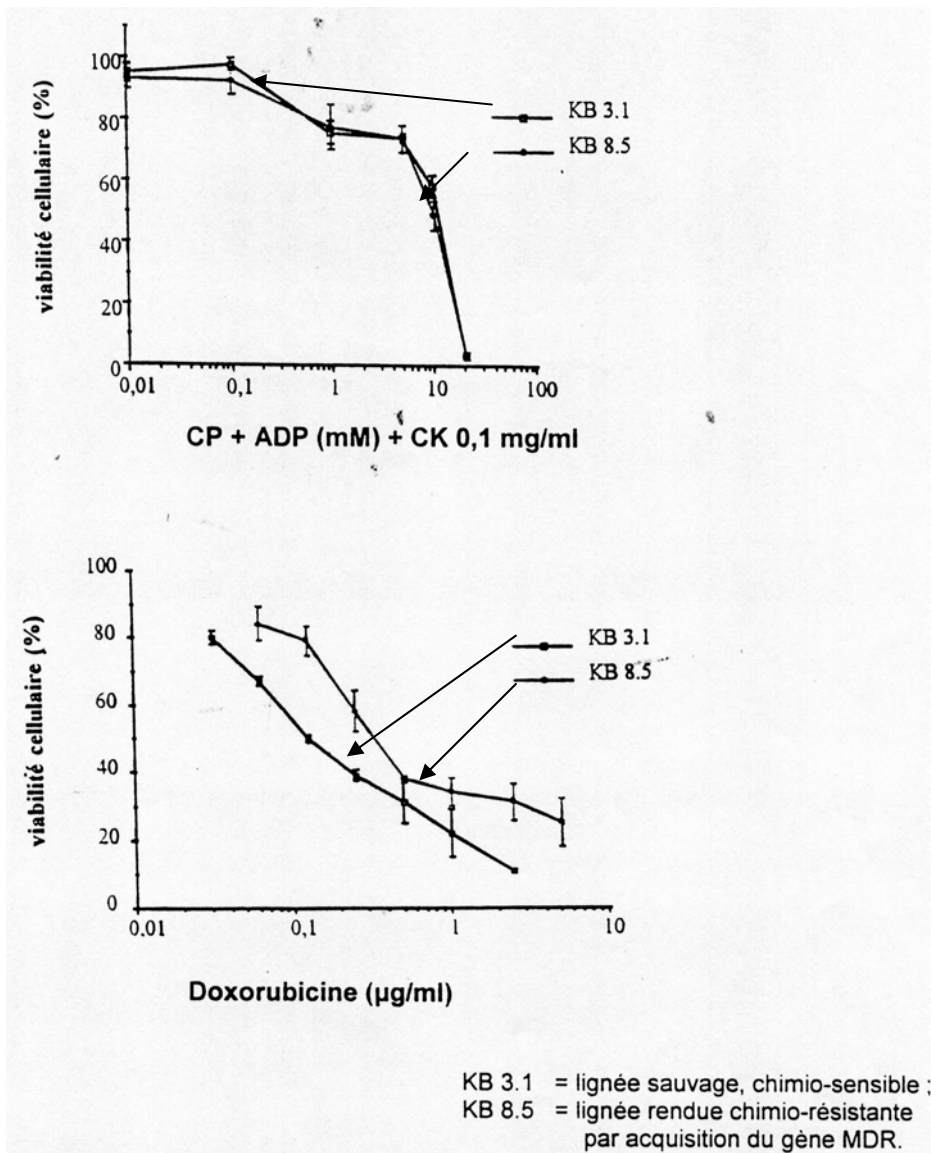


Figure 5 : Comparaison de l'activité anti-tumorale *in vitro* de la triple association CP, CPK et ADP et de l'activité anti-tumorale *in vitro* d'une anthracycline (Doxorubicine) sur une culture d'un carcinome épidermoïde ORL humain KB (d'après 20).

Cette activité cytotoxique sur des tumeurs devenues réfractaires aux chimiothérapies conventionnelles comporte potentiellement un intérêt majeur pour une application thérapeutique humaine.

5.2. Etude de l'efficacité anti-tumorale d'une monothérapie par la Créatine-Phosphate

Cette étude a été conduite en collaboration avec le centre de recherches des laboratoires UPSA et cherche à évaluer l'efficacité anti-tumorale après injection intra-péritonéale chez la souris nude.

5.2.1. Modalités de l'étude

Le pouvoir inhibiteur de la CP sur la croissance tumorale de diverses xénogreffes de tumeurs humaines a été évalué chez la souris athymique nude.

La CP a été administrée par voie intra-péritonéale, en solution dans du sérum physiologique (1ml par injection, sur des souris dont le poids moyen était de 22 g) à un rythme quotidien. Des essais comparatifs ultérieurs ont montré qu'une administration bi hebdomadaire entraîne des effets identiques à ceux d'une administration quotidienne.

5.2.2. Résultats

L'expérimentation a permis de conclure que la créatine phosphate à elle seule, administrée par voie intra-péritonéale répétée, est capable d'inhiber la croissance tumorale (20).

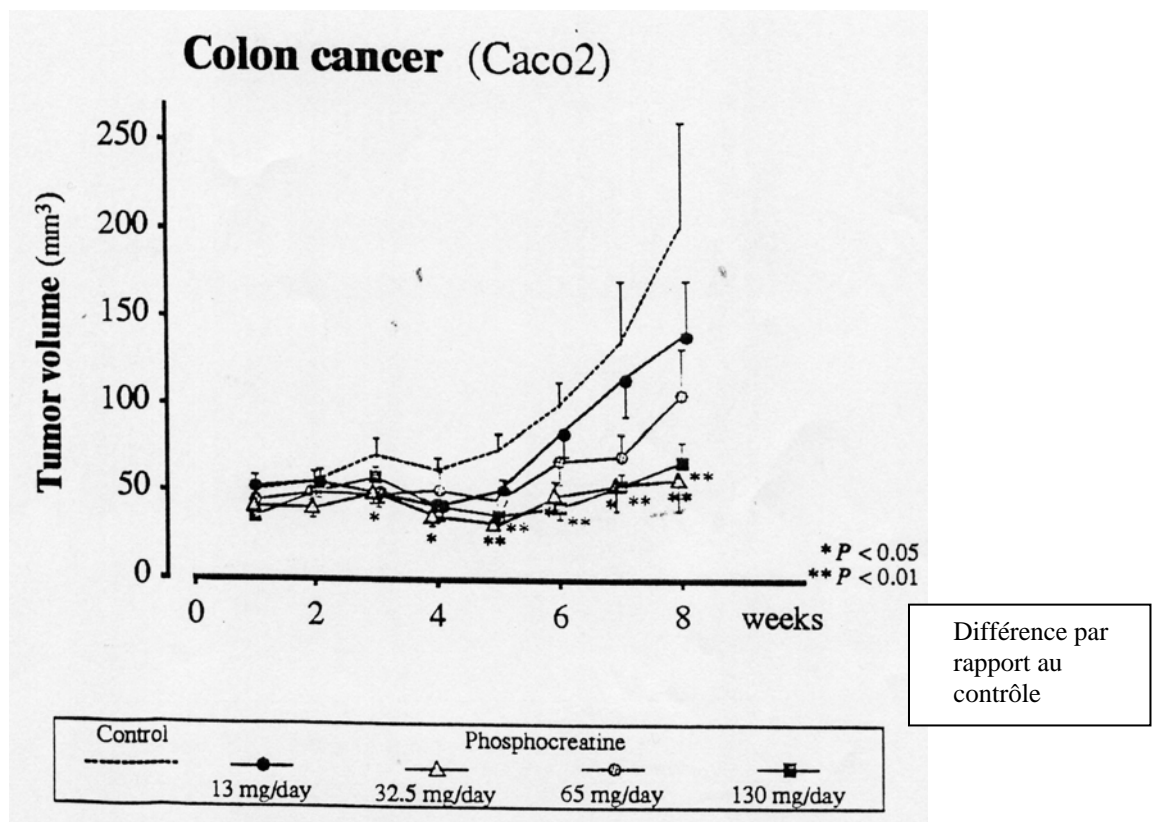


Figure 6 : Etude *in vivo* chez la souris nude de l'efficacité anti-tumorale de la CP sur une xénogreffe d'un adénocarcinome colique humain (lignée CaCo2) (d'après 20)

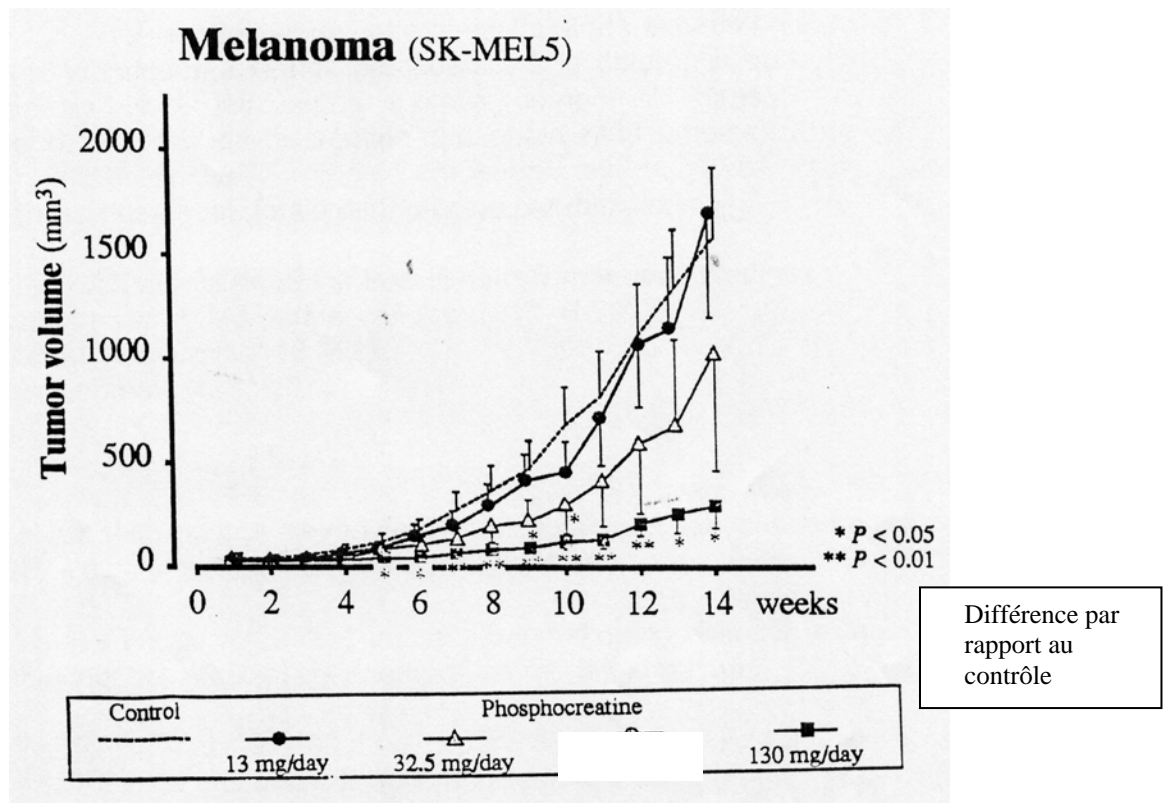


Figure 7 : Etude *in vitro* chez la souris nude de l'efficacité anti-tumorale de la CP sur une xénogreffe d'un mélanome malin humain (lignée SK-MEL5) (d'après 20)

Les caractéristiques de cette action anti-tumorale sont les suivantes :

- Le degré d'inhibition de la croissance tumorale semble dose-dépendant (fig.6 et 7) ;
- L'effet inhibiteur maximum est obtenu par une injection intra-péritonéale quotidienne de 130 mg (soit 400 μ moles) de CP dans 1 ml de sérum physiologique, le poids individuel moyen des souris étant de 22 g ;
- Huit lignées tumorales humaines ont été testées :
 - pour trois d'entre elles (carcinome bronchique à petites cellules, mélanome malin, adénocarcinome colique), le pourcentage d'inhibition tumorale a été de 55 à 80 % ;
 - pour trois autres lignées (carcinome prostatique, adénocarcinome pancréatique, adénocarcinome ovarien), le degré d'inhibition a été de 30 à 45 % ;
 - il n'a pas été mis en évidence d'effet inhibiteur significatif pour une lignée de carcinome bronchique non à petites cellules, et une lignée de carcinome colique indifférencié.
- Aucune manifestation toxique de la créatine phosphate n'a été observée. Chez les souris ayant reçu une xénogreffe de mélanome malin et traitées par la CP, il a été constaté un gain de poids significatif.

5.2.3. Pharmacocinétique de la Créatine-Phosphate après injection intra-péritonéale

Le taux plasmatique de CP atteint un pic de 10 à 11 mmol/l dans les quinze minutes suivant l'injection intra-péritonéale de 400 µmoles de CP chez la souris nude. Il est à noter que le pic de concentration de CP obtenu *in vivo* chez la souris nude correspond à celui qui induit l'inhibition complète de la croissance tumorale au cours des tests *in vitro*. Le pic de concentration est suivi d'une décroissance très rapide de la concentration plasmatique, qui au bout de trois heures ne représente plus que 12 % de celle correspondant au pic.

5.2.4. Efficacité d'une mono-thérapie par la créatine phosphate

L'efficacité anti-tumorale de la créatine phosphate seule est, à priori, paradoxale. Elle pourrait s'expliquer :

- par des taux physiologiques de CPK circulante particulièrement élevés chez la souris nude.
- Chez les animaux témoins (ne recevant en injection intra-péritonéale que du sérum physiologique), les taux plasmatiques de CPK étaient de 257±/ 84 UI par litre. Chez les animaux traités, l'activité CPK plasmatique a atteint des taux beaucoup plus élevés encore (1178 ±/ 161 UI par litre) dans les trois heures suivant l'injection intra-péritonéale de CP, sans explication apparente ;
- par les phénomènes de nécrose intra tumorale particulièrement marqués dont les xénogreffes sont le siège. Il s'agit en effet de tumeurs mal vascularisées, au sein desquelles les cellules sont anoxiques. Les cellules nécrosées libèrent dans le stroma tumoral péri cellulaire leur contenu cytoplasmique, plus ou moins riche en CPK et ATP.

Si une telle explication est confirmée, elle laisse entrevoir que ce sont les tumeurs mal vascularisées et nécrosées qui seront le plus susceptibles de répondre à l'action anti tumorale de la tri-thérapie, alors que ce sont justement celles qui sont les plus résistantes aux chimiothérapies et à la radiothérapie classiques.

5.2.5. Deux arguments supplémentaires en renfort

A l'appui de cette dernière théorie viennent deux arguments extraits d'expériences complémentaires pratiquées :

- le dosage de la CPK intra tumorale dans les xénogreffes réalisées chez la souris nude a montré que ce sont les xénogreffes tumorales dont le contenu cellulaire est le plus riche en CPK qui sont les plus sensibles à l'action anti tumorale de la CP ;
- après transfection du gène CPK à une lignée tumorale d'adénocarcinome colique à contenu cellulaire pauvre en CPK et dont la xénogreffe est peu sensible à l'effet inhibiteur sur la croissance tumorale de la créatine phosphate, la xénogreffe tumorale devient sensible à l'action de la CP.

5.2.6. Hypothèse

L'extrapolation de ces données permet d'avancer une tentative d'explication à un constat banal en cancérologie : le tissu musculaire, malgré la masse qu'il représente et son haut degré de vascularisation, n'est qu'exceptionnellement le siège de métastases cancéreuses.

L'hypothèse avancée est que la progression de ces métastases est auto-limitée par la libération massive au contact de la tumeur de CP, CPK et ATP à partir du tissu musculaire en voie d'envahissement, le tissu musculaire étant particulièrement riche en ces composants.

6. ETUDE IN VIVO, D'UNE BI-THERAPIE ASSOCIANT CREATINE PHOSPHATE ET L'ADENOSINE TRI PHOSPHATE

6.1. Modalités de l'étude

Les modalités de cette étude expérimentale chez la souris nude ont été identiques à l'étude précédente, à la différence que chaque injection intra-péritonéale chez les souris traitées comportait, dans 1 ml de sérum physiologique, à la fois de la créatine phosphate (400 μ moles) et de l'ATP. Deux posologies différentes d'ATP ont été comparées : soit une dose totale de 1 μ mole par injection, soit une dose totale de 5 μ moles par injection.

L'étude a porté sur trois lignées tumorales humaines :

- carcinome bronchique à petites cellules (NCI-H 69) ;
- glioblastome humain (U-118 MG) ;
- mélanome humain (SK-MEL-5)

6.2. Résultats

L'ATP à la posologie très élevée de 5 μ moles par injection, seule ou en association avec la CP, s'est avérée toxique (40 à 50 % de décès).

L'ATP seul, à la posologie de 1 μ mole par injection n'a pas été toxique, mais son effet inhibiteur sur la croissance tumorale a été faible ou nul.

La bi-thérapie par CP (400 μ moles par injection) et ATP (1 μ mole par injection) a eu dans tous les cas une efficacité anti tumorale supérieure à celle de la CP seule ou de l'ATP seul (tableau 1, fig.8).

	CP (400 µMOLES)	ATP (1µMOLE)	CP + ATP (400µMOLES) (1µMOLE)
CARCINOME BRONCHIQUE A PETITES CELLULES (NCI-H69)	33 %	1 %	84 %
GLIOBLASTOME HUMAIN (U 118 MG)	50%	25 %	56 %
MELANOME HUMAIN (SK-MEL-5)	- 3 %	- 19 %	39 %

Tableau 1 : Inhibition (%) de la croissance tumorale à la 5^{ème} semaine (d'après 20).

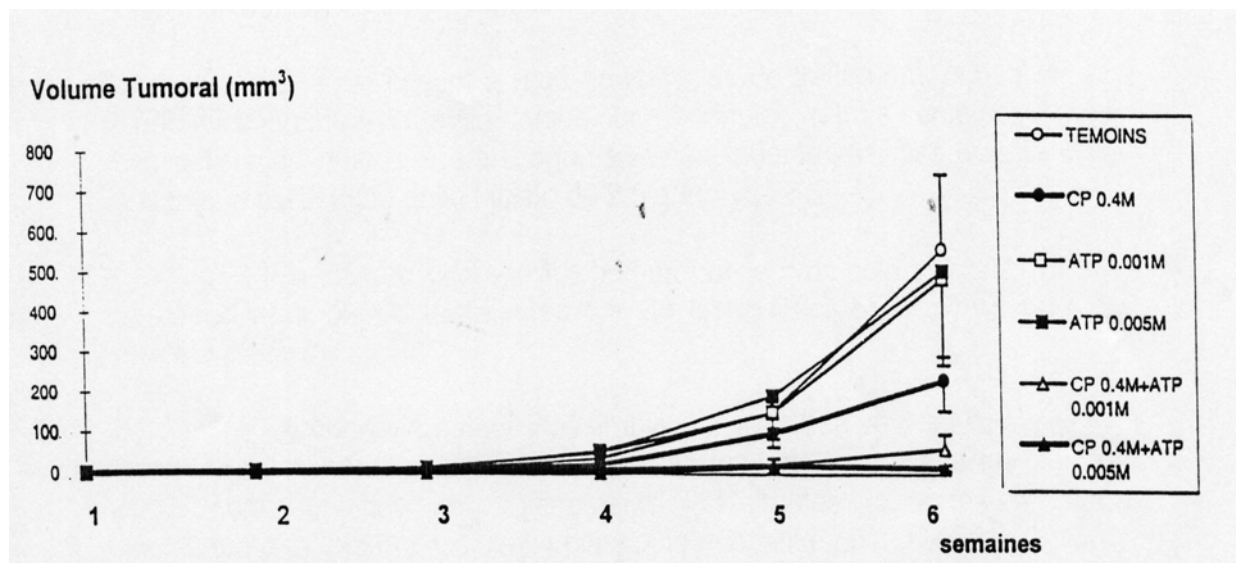


Figure 8 : efficacité de la bi-thérapie par CP et ATP. Comparaison de l'activité anti-tumorale *in vivo* chez la souris nude d'une mono-thérapie par CP, d'une mono-thérapie par ATP, et d'une bi-thérapie par CP + ATP sur des xénogreffes d'un carcinome bronchique humain à petites cellules (lignée NCI-H69) (d'après 20).

6.2.1. Essai clinique humain de phase I de la Créatine phosphate seule

Cette étude ouverte a été conduite à l'hôpital Tenon, sur 31 patients inclus, dont 29 ont été évaluables.

Chaque patient a reçu deux cycles de traitement, constitués chacun d'une injection intra veineuse unique sur 15 minutes, à trois semaines d'intervalle. Les paliers de dose ont été progressivement augmentés, par groupe de 3 à 6 patients, à partir de la dose initiale de 2,5 g/m².

La dose la plus élevée prévue par le protocole (15 g/m²) a été bien tolérée et deux doses supérieures ont été testées (20 et 25 g/m²). **La Dose Maximale Tolérée n'a pas été atteinte.**

Aucun évènement indésirable n'a été observé jusqu'au palier de 15 g/m² inclus. Au dessus, et surtout chez les trois patients inclus au palier de 25 g/m², sont survenus des

évènements indésirables rapportés à la charge osmotique et à une hypocalcémie plasmatique relative : paresthésies, bouffées de chaleur, sécheresse de la bouche, aplatissement de l'onde T et allongement de l'espace QT à l'électrocardiogramme, rapidement réversibles. Une hypokaliémie et une hypocalcémie ont été constatées chez respectivement 58 et 55 % des patients.

Sur le plan pharmacocinétique, les concentrations plasmatiques de créatine phosphate s'élèvent pour atteindre un maximum obtenu, quelque soit la dose administrée, à la fin de la perfusion (15 à 20 minutes) ; puis diminuent rapidement pour devenir indétectables deux heures après la perfusion à la plus forte dose. Les pics de concentration plasmatique de CP obtenus pour le palier de dose le plus élevé (25 g/m²) ont été de 9,25 + 1,55 mmol/l. Ces pics de concentration sont donc de la même grandeur que les concentrations efficaces *in vitro* que chez la souris nude.

L'élimination urinaire de la CP sous forme inchangée est complète en quatre heures. L'élimination urinaire des deux métabolites naturels, créatine et phosphore inorganique, se poursuit durant les 24 heures du recueil.

6.2.2. Essai clinique humain de phase I à doses répétées de la Créatine-Phosphate seule

L'autorisation d'une étude clinique humaine de phase I à doses répétées a été accordée par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) d'Aulnay sous Bois le 26 juin 1998.

L'intitulé de l'étude autorisée est : « Etude de phase I en doses répétées de la sécurité et de la pharmacocinétique de la CP administrée sous forme d'une perfusion intraveineuse en utilisant un schéma de traitement de 3 à 5 jours par semaine chez des patients présentant un cancer. »

Un essai pluricentrique a alors été initié, mais très rapidement interrompu pour des motivations inconnues d'ordre ni scientifique ni médical.

6.2.3. Etapes ultérieures.

6-A La démarche « administrativement » correcte aurait été de procéder :

- à une étude humaine de phase I à doses répétées de la CP seule ;
- à une étude pharmacologique et toxicologique animale de la CPK ;
- à des études cliniques humaines de phase I de la CPK seule, à doses uniques puis à doses répétées ;
- à des études cliniques humaines de phase I de l'ATP seul, à doses uniques puis à doses répétées ;
- puis à des essais humains de phase I des trois substances en association, à doses uniques puis à doses répétées ;
- avant de lancer des essais humains de phase II puis III de la tri-thérapie.

6-B La lourdeur de cette procédure, les délais requis et les coûts prévisionnels ont fait reculer les premiers investisseurs.

6-C Cette situation a conduit les initiateurs du projet à envisager des « stratégies de raccourci ».

- a) Une étape d'expérimentation animale, portant sur des tumeurs spontanées du gros animal, et qui consiste :
 - à établir, à partir de toutes les informations déjà recueillies et réunies, un protocole de tri-thérapie susceptible d'être administré en expérimentation animale avec un minimum de toxicité prévisible et des chances raisonnables d'efficacité anti-tumorale ;
 - à appliquer ce protocole à des chiens atteints de cancers spontanés incurables par les méthodes conventionnelles (cancers mammaires étendus, glioblastomes,...) ;
 - et à démontrer l'efficacité thérapeutique de la tri-thérapie à partir de ce modèle.

- b) Une étape humaine accélérée :
 - à partir d'une extrapolation à l'Homme du modèle thérapeutique établi chez le chien ;
 - sur la base d'essais humains de phase I-II accélérés, dont le principe sera éthiquement d'autant plus recevable que la tri-thérapie se sera révélée plus efficace et non toxique sur des tumeurs « naturelles » du gros animal ;
 - avec comme objectif une mise sur le marché après des procédures raccourcies : il y a en effet plusieurs précédents aux Etats-Unis et en Europe où un médicament a été approuvé après des études de phase II ayant montré des résultats encourageants, surtout à l'égard de maladies pour lesquelles il n'y a actuellement pas de traitements.

7. CONDUITE DE L'ESSAI DE PHASE I-II CHEZ LE CHIEN

7.1. Substances administrées

La **Créatine-Phosphate** se présente sous forme de poudre stérile en flacons de 10 g, préparés par les laboratoires UPSA. La poudre est extrêmement soluble dans l'eau et la solution injectée est préparée extemporanément par dissolution dans de l'eau distillée stérile pour préparation injectable, à raison de 20 ml de solvant pour 10 g de poudre.

Deux études pharmacologiques ont été conduites chez le chien Beagle par le département de pharmacologie générale des laboratoires UPSA. Elles ont permis de déterminer la pharmacocinétique et la toxicité aiguë de cette molécule par injection intraveineuse unique d'une part (Ref. R/PHG/789/10.96) ainsi que sa toxicité après des injections intraveineuses quotidiennes sur une période de 13 semaines (Ref. CIT Study 9643 TCC).

Après une administration unique de 328 mg/kg de CP, un pic de concentration plasmatique de CP de 2,4 à 2,6 mmol/l est atteint en cinq minutes puis décroît très rapidement pour devenir indétectable en trois heures.

L'injection de CP en 3 à 5 minutes par voie intraveineuse entraîne peu de toxicité :

- aucun effet secondaire n'est observé jusqu'à la dose de 900 mg/kg
- à 1500 mg/kg sont observés : tachycardie, allongement de l'espace QT à l'ECG, hyper sialorrhée. Ces signes cliniques ont été interprétés comme étant en relation avec l'osmolarité élevée de la préparation injectée, et non comme l'expression d'une toxicité de la molécule. A cette posologie, les signes indésirables imposent l'arrêt de l'expérimentation.

La CP a été administrée à la dose de 900 mg/kg en injection intraveineuse de 3 à 5 minutes dans la première phase de l'étude.

L'**ATP** est disponible en ampoules stériles injectables de 2 ml contenant 20 mg de principe actif, prêtes à l'emploi pour une utilisation thérapeutique humaine en réanimation cardiologique dans le traitement et le diagnostic électrocardiographique de la tachycardie ventriculaire notamment. Ces ampoules sont commercialisées sous le nom de STRIADINE® et sont disponibles à la pharmacie centrale des hôpitaux.

Aucune étude toxicologique de l'effet de l'ATP sur le chien n'avait pour le moment été réalisée, il a donc été transposé un schéma d'administration au chien par rapport aux études cliniques humaines publiées (1). Deux animaux sains ont reçu chacun deux perfusions d'ATP à une semaine d'intervalle. Chaque perfusion de 12 heures a comporté l'administration d'ATP à la dose initiale de 20 µg/kg/minute augmentée progressivement par palier de 10 µg/kg/minute toutes les 30 minutes jusqu'à l'apparition d'effets secondaires indésirables, cliniques ou électrocardiographiques, ou jusqu'au palier maximum de 75 µg/kg/minute. Lorsque des effets toxiques sont observés, la perfusion est poursuivie jusqu'à son terme à une posologie inférieure de 10 µg/kg/minute à celle du palier où sont apparus les effets toxiques.

Au terme de cette pré-expérimentation, la posologie fixée est située dans une fourchette, en dose totale, pour une perfusion de 12 heures chez un chien de 20 kg, de 288 mg d'ATP (pour une dose de 20 µg/kg/minute) à 1080 mg (pour une dose de 75 µg/kg/minute).

La **CPK** utilisée dans cette étude est une préparation purifiée à partir de muscles de lapin pour usage de laboratoire. Elle est délivrée sous forme de poudre en flacons de 1000 unités, à mettre en solution extemporanément dans 10 ml de sérum physiologique.

La CPK n'a subi aucune étude toxicologique préalablement mais il a été admis que cette molécule était probablement peu toxique car dans certaines situations pathologiques chez l'homme le taux basal circulant peut être multiplié par 10 ou 20 sans être directement responsable de manifestations indésirables. La CPK utilisée est extraite de muscles de lapin et l'on peut craindre des réactions immunitaires liées à la différence d'espèce.

Un modèle théorique d'étude pharmacocinétique, après injection intraveineuse de CPK chez le chien, montre que chez un chien de 20 kg, il faut administrer une dose de 5000 UI de CPK pour obtenir un taux plasmatique de CPK de l'ordre de 1000 UI/l (espace de diffusion extracellulaire et clairance plasmatique très faible).

La dose retenue est donc de 250 UI/kg en injection intraveineuse rapide et par l'intermédiaire d'un filtre de 0,2 micron (marque Millipore®) de manière à effectuer une filtration stérilisante, la CPK utilisée ne pouvant être stérilisée.

7.2. PRE-EXPERIMENTATION CHEZ QUATRE ANIMAUX SAINS

7.2.1. Les animaux

La pré expérimentation a pour but de réaliser, chez quatre animaux de laboratoire, un contrôle d'absence de toxicité, une prédétermination des caractéristiques pharmacocinétiques et une vérification de l'adéquation des posologies proposées pour chacune des substances utilisées, puis un contrôle d'absence de toxicité de la tri-thérapie simultanée.

Les animaux utilisés sont des chiens de race Beagle issus d'un élevage agréé, d'âge moyen de trois ans et n'ayant reçu aucun traitement lourd préalablement, susceptible de compromettre l'analyse des données obtenues. Ces chiens ne présentent aucun antécédent pathologique décrit. Ils ont subi, avant le début de l'étude, un examen clinique complet ainsi que des examens sanguins ne mettant en évidence aucun trouble pathologique aiguë ou chronique. Leur alimentation n'a subi aucun changement et les animaux n'ont subi aucun jeûne pendant toute la durée de l'expérimentation. La distribution de la nourriture s'effectue quinze minutes après le début de l'expérimentation et ce dans l'espoir de rendre ces animaux plus calmes pour la suite des manipulations.

7.2.2. Le suivi clinique

L'examen clinique de base, réalisé sur tous les chiens inclus dans le protocole, est le suivant :

- Auscultation cardiaque
- Auscultation respiratoire
- Palpation des nœuds lymphatiques rétro-mandibulaires, pré-scapulaires, inguinaux superficiels et poplités
- Palpation abdominale
- Perfusion périphérique : muqueuses, Temps de Recoloration Capillaire, chaleur des extrémités

Avant le commencement des essais, les 4 chiens ont subi un examen échocardiographique et électrocardiographique qui n'ont révélé aucune anomalie.

7.2.3. Les méthodes d'analyses

Les prélèvements sanguins se font à la veine jugulaire de l'animal. Le sang, récolté sur tubes héparinés (héparinate de lithium) de 10 ml est centrifugé à froid sur place puis le sérum est mis en micro tubes pour congélation immédiate à moins 80 degrés Celsius. Les tubes sont ensuite déposés à l'hôpital TENON par lot après transport dans de la carboglace.

Les analyses biochimiques sont effectuées par le service de biochimie de l'hôpital TENON sous la responsabilité du Docteur Guillaume Lefèvre. Ce service a en charge les dosages de CP, CPK, phosphorémie, urémie, créatinémie, réserve alcaline (assimilée au dosage du CO₂ total) ainsi que la réalisation de ionogrammes. Concernant les dosages de la CP, ce service a du recréer un nouveau protocole de dosage car peu d'équipes avaient déjà travaillées sur cette molécule. Leur protocole expérimental se trouve en annexe.

Les Numérations Formules Sanguines ainsi que le dosage des glycémies sont réalisées au Centre de Radiothérapie Scanner de l'ENVA le jour même de l'expérimentation (appareillage : Vtest®, Glucotrend®)

Les essais de tolérance, réalisés sur les chiens sains, se déroulent en deux temps :

- une première étape est consacrée à la détection de la toxicité et l'étude pharmacocinétique de chaque molécule prise séparément
- une deuxième étape étudie la tolérance et la pharmacocinétique de la tri-thérapie.

7.2.4. Tolérance et pharmacocinétique de la Créatine-Phosphate

Les chiens 1 et 2 ont reçu à J1, J8 et J15 une injection rapide IV de CP à la dose de 900 mg/kg.

Observations cliniques :

- tachycardie après l'injection pour les deux chiens, réversible assez rapidement,
- épisode de vomissement à J1 et à J8, quelques minutes après l'injection pour le chien 2.

Prélèvements sanguins (10 ml à chaque prise) :

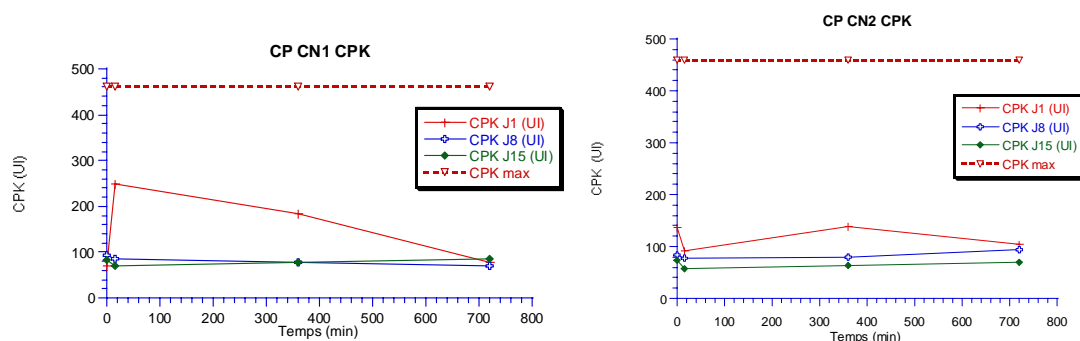
- aux temps T0, T15 min., T 6 heures, T 12 heures ;
pour dosages de : CP, CPK, calcémie, phosphorémie, kaliémie

On observe une forte augmentation de la CPK au bout de 15 à 20 minutes chez le chien 1 à J1 et J15, qu'on ne retrouve pas chez le même chien à J8 tout comme chez le chien 2 où la CPK reste globalement inchangée. Ce pic observé s'infléchit très rapidement pour revenir au niveau basal après 12 heures (fig. 9 et 10). Les valeurs usuelles de CPK sont inférieures à 460 UI/l.

L'effet de la CP sur la CPK plasmatique semble sans conséquence.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	CPK CN1 J1 (UI)	CPK CN1 J8 (UI)	CPK CN1 J15 (UI)	CPK CN2 J1 (UI)	CPK CN2 J8 (UI)	CPK CN2 J15 (UI)
0	69	93	84	136	84	74
15	250	85	69	92	77	58
360	185	79	78	139	79	64
720	720	71	86	104	94	70

Tableau 2 : Evolution de la CPK des chiens 1 et 2 sur 12 h

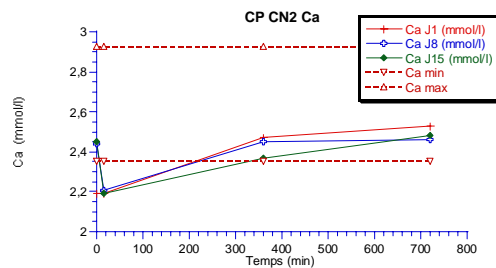
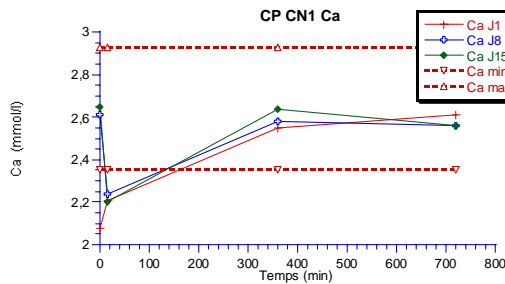


Figures 9 et 10 : Evolution de la CPK des chiens 1 et 2 sur 12 h

On observe une hypocalcémie éphémère au bout de 15 minutes et jusqu'à T3 heures (aucune valeur entre T60 et T3h pour nous renseigner plus précisément sur la cinétique), et cela est observé chez les deux chiens (2,2 mmol/l). Aucune hypocalcémie n'est observée dans la suite du traitement (fig. 11 et 12). Les valeurs usuelles de la calcémie chez le chien sont comprises entre 2,35 mmol/l et 2,93 mmol/l.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	Ca CN1 J1 (mmol/l)	Ca CN1 J8 (mmol/l)	Ca CN1 J15 (mmol/l)	Ca CN2 J1 (mmol/l)	Ca CN2 J8 (mmol/l)	Ca CN2 J15 (mmol/l)
0	2.08	2.61	2.65	2.19	2.44	2.45
15	2.21	2.24	2.20	2.19	2.21	2.19
360	2.55	2.58	2.64	2.47	2.45	2.37
720	2.61	2.56	2.56	2.53	2.46	2.48

Tableau 3 : Evolution de la calcémie des chiens 1 et 2 sur 12 h

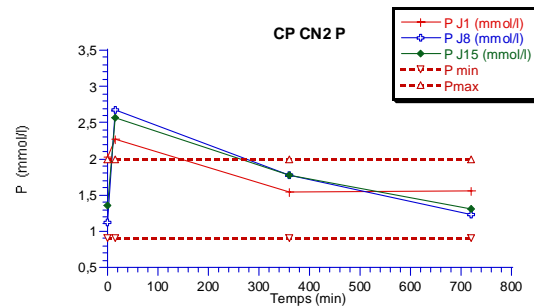
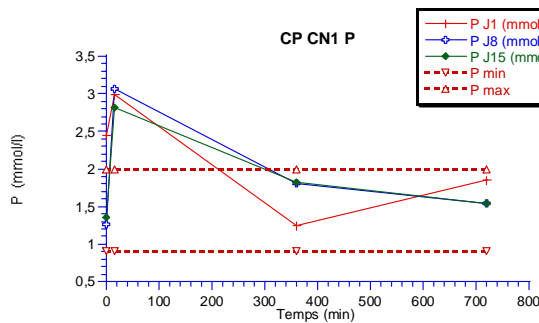


Figures 11 et 12 : Evolution de la calcémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures

La phosphorémie augmente nettement jusqu'à T15 minutes puis se normalise entre T3 heures et T6 heures (fig. 13 et 14). Les valeurs usuelles de la phosphorémie chez le chien sont comprises entre 0,9 mmol/l et 2 mmol/l.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	P CN1 J1 (mmol/l)	P CN1 J8 (mmol/l)	P CN1 J15 (mmol/l)	P CN2 J1 (mmol/l)	P CN2 J8 (mmol/l)	P CN2 J15 (mmol/l)
0	2.45	1.26	1.36	2.02	1.13	1.35
15	2.99	3.06	2.81	2.27	2.67	2.57
360	1.24	1.80	1.82	1.54	1.78	1.78
720	1.85	1.54	1.54	1.55	1.23	1.31

Tableau 4 : Evolution de la phosphorémie des chiens 1 et 2 sur 12 h

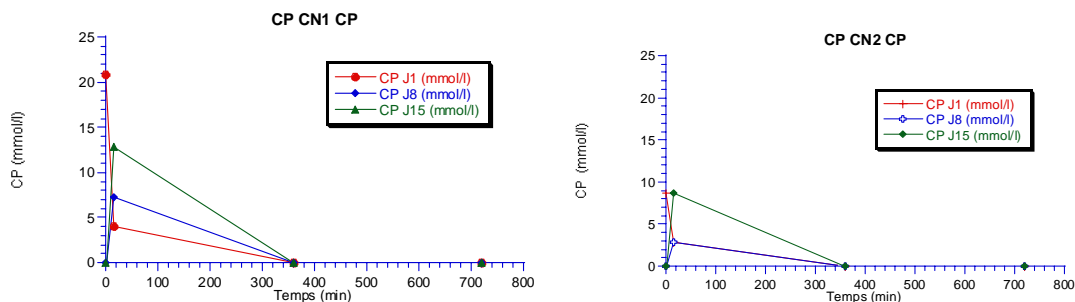


Figures 13 et 14 : Evolution de la phosphorémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures

La CP augmente brutalement à T 15 pour décroître, jusqu'à devenir indétectable à partir de T 3 heures.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	CP CN1 J1 (mmol/l)	CP CN1 J8 (mmol/l)	CP CN1 J15 (mmol/l)	CP CN2 J1 (mmol/l)	CP CN2 J8 (mmol/l)	CP CN2 J15 (mmol/l)
0	20.92	0	0	8.71	0	0
15	4.06	7.2	12.8	2.89	2.89	8.69
360	0	0	0	0	0	0
720	0	0	0	0	0	0

Tableau 5 : Evolution de la CP des chiens 1 et 2 sur 12 h

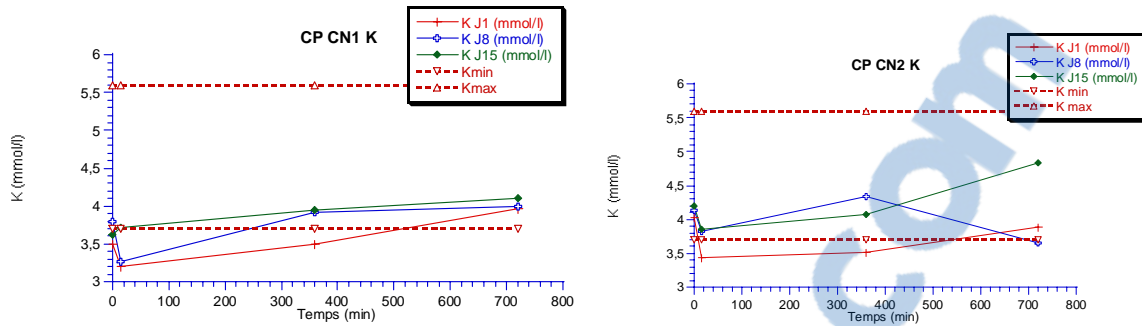


Figures 15 et 16 : Evolution de la CP des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

La kaliémie ne varie pas significativement sauf pour le chien 2 à J1 où une hypokaliémie est notée dès le début du traitement et jusqu'à T10 heures (fig. 17 et 18). Les valeurs usuelles de la kaliémie chez le chien sont comprises entre 3,7 mmol/l et 5,6 mmol/l.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	K CN1 J1 (mmol/l)	K CN1 J8 (mmol/l)	K CN1 J15 (mmol/l)	K CN2 J1 (mmol/l)	K CN2 J8 (mmol/l)	K CN2 J15 (mmol/l)
0	3.5	3.8	3.63	4.02	4.13	4.19
15	3.2	3.27	3.72	3.44	3.83	3.85
360	3.5	3.92	3.95	3.52	4.34	4.08
720	3.97	3.99	4.1	3.89	3.66	4.84

Tableau 6 : Evolution de la kaliémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures .



Figures 17 et 18 : Evolution de la kaliémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

L'injection unique de CP à la dose de 900 mg/kg ne met pas en évidence de toxicité en dehors des effets indésirables digestifs chez l'un des deux chiens. Les jours suivant l'administration ne mettent pas en évidence de troubles chez ces chiens.

L'élimination de cette molécule par l'organisme est très rapide (demi-vie de trente minutes estimée par calculs graphiques d'après les figures 65, 66, 91 et 92) et son effet très éphémère sur les paramètres biologiques (régularisation des paramètres en fin d'expérience).

7.2.5. Tolérance et pharmacocinétique de la Créatine-Phospho-Kinase

Cette étape s'effectue sur les mêmes chiens 1 et 2.

Elle se déroule à J4, J11 et J18 soit après un temps mort de 72 heures après chaque administration unique de CP.

La dose déterminée précédemment est de 250 UI/kg injectée en IV rapide de trois minutes par l'intermédiaire d'un filtre de 0,2 micron (Millipore®).

La surveillance clinique a lieu tout au long des 12 heures d'étude ainsi que dans les 72 heures qui suivent.

Observations cliniques :

- épisode de vomissements chez le chien 2 au temps T15 min. de J4 (vomités de nourriture classiques sans conséquence sur l'état général).
- épisode de diarrhée chez le même chien 2 au temps T60 min de J4.

Prélèvements sanguins (10 ml à chaque prise) :

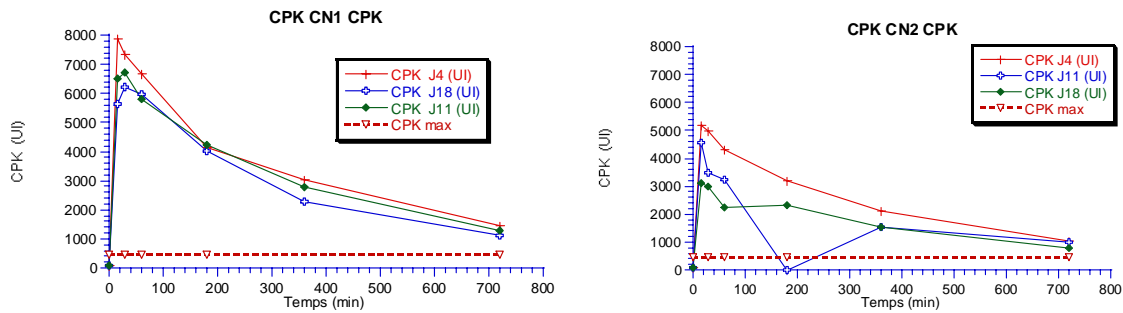
- aux temps T0, T15 min, T30 min, T60 min, T3 heures, T6 heures, T12 heures ;
- pour dosages de : CPK, urémie, créatininémie, réserve alcaline, phosphorémie, ionogramme ; NFS à T0 et T12 heures.

On observe une très forte augmentation de la CPK avec un pic plasmatique atteint au bout de 15 minutes suivi d'une phase de décroissance avec des valeurs de CPK atteignant un maximum de 7859 UI/l pour le chien 1 et à 5196 UI/l pour le chien 2 (fig. 19 et 20).

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	CPK CN1 J4 (UI)	CPK CN1 J11 (UI)	CPK CN1 J18 (UI)	CPK CN2 J4 (UI)	CPK CN2 J11 (UI)	CPK CN2 J18 (UI)
0	73	84	92	95	68	77
15	7859	6529	5642	5196	4556	3116
30	7332	6715	6225	4978	3490	3005
60	6682	5824	5957	4330	3222	2234
180	4146	4250	4004	3192	Pb techn*	2316
360	3010	2776	2292	2127	1526	1549
720	1432	1281	1136	1042	980	797

Tableau 7 : Evolution de la CPK des chiens 1 et 2 sur 12 h

* Problème technique pour le chien 2 à T3h pour toutes les valeurs biochimiques

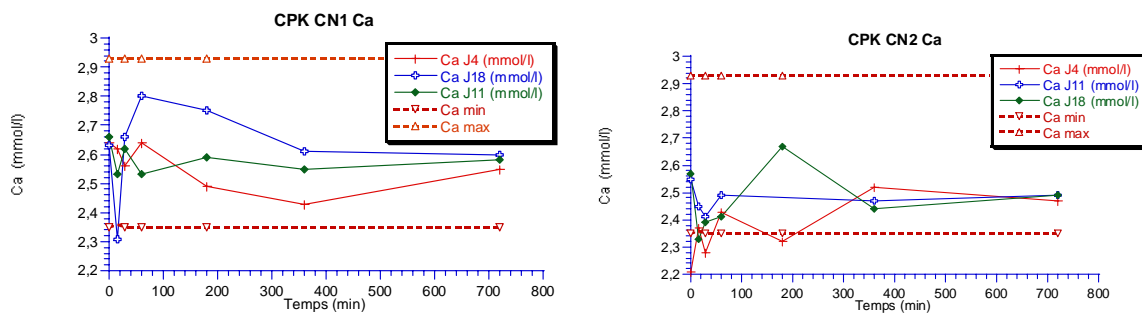


Figures 19 et 20 : Evolution de la CPK des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

La calcémie se situe dans les valeurs usuelles pendant toute cette phase d'essai (fig. 21 et 22).

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	Ca CN1 J4 (mmol/l)	Ca CN1 J11 (mmol/l)	Ca CN1 J18 (mmol/l)	Ca CN2 J4 (mmol/l)	Ca CN2 J11 (mmol/l)	Ca CN2 J18 (mmol/l)
0	2.64	2.66	2.63	2.21	2.55	2.57
15	2.62	2.53	2.31	2.37	2.45	2.33
30	2.56	2.62	2.66	2.28	2.41	2.39
60	2.64	2.53	2.80	2.43	2.49	2.41
180	2.49	2.59	2.75	2.32	* Pb	2.67
360	2.43	2.55	2.61	2.52	2.47	2.44
720	2.55	2.58	2.60	2.47	2.49	2.49

Tableau 8 : Evolution de la calcémie des chiens 1 et 2 sur 12 h

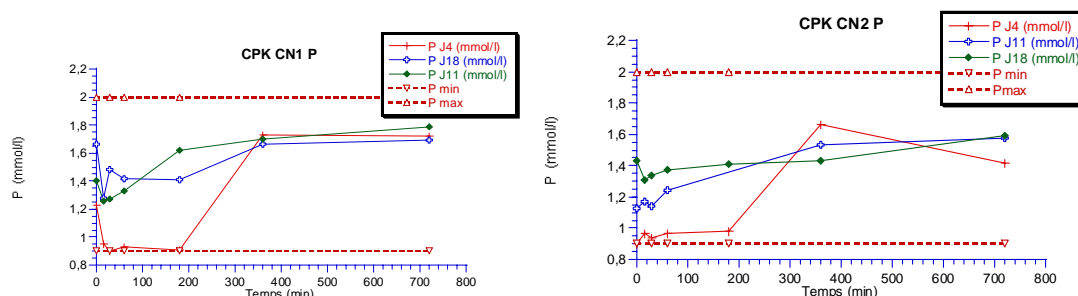


Figures 21 et 22 : Evolution de la calcémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

La phosphorémie augmente nettement tout en restant dans les normes physiologiques (fig. 23 et 24).

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	P CN1 J4 (mmol/l)	P CN1 J11 (mmol/l)	P CN1 J18 (mmol/l)	P CN2 J4 (mmol/l)	P CN2 J11 (mmol/l)	P CN2 J18 (mmol/l)
0	1.23	1.40	1.66	0.90	1.13	1.43
15	0.95	1.26	1.28	0.97	1.17	1.31
30	0.90	1.27	1.48	0.94	1.14	1.34
60	0.93	1.33	1.42	0.97	1.24	1.37
180	0.91	1.62	1.41	0.98	* Pb	1.41
360	1.73	1.70	1.66	1.66	1.53	1.43
720	1.72	1.79	1.69	1.42	1.58	1.59

Tableau 9 : Evolution de la phosphorémie des chiens 1 et 2 sur 12 h

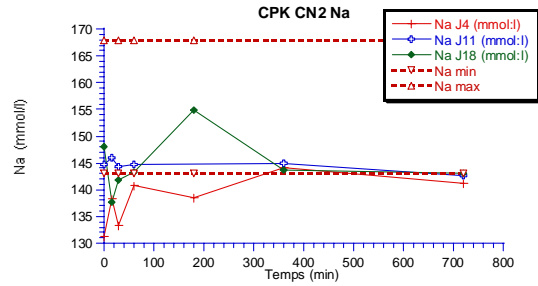
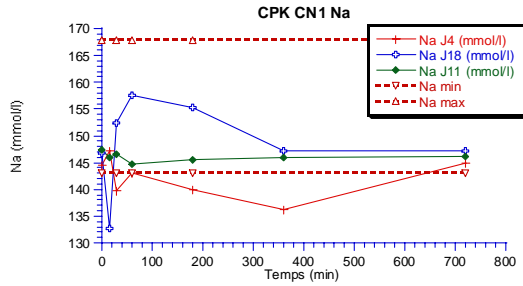


Figures 23 et 24 : Evolution de la phosphorémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

On observe chez les deux chiens une hyponatrémie transitoire à J4, qui se normalise en fin d'expérience (fig. 25 et 26). Les valeurs usuelles de la natrémie chez le chien sont comprises entre 143 et 168 mmol/l.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	Na CN1 J4 (mmol/l)	Na CN1 J11 (mmol/l)	Na CN1 J18 (mmol/l)	Na CN2 J4 (mmol/l)	Na CN2 J11 (mmol/l)	Na CN2 J18 (mmol/l)
0	144.5	147.4	146.9	131.2	144.8	148
15	147.3	146	132.7	138.2	145.9	137.7
30	139.8	146.6	152.3	133.4	144.3	141.9
60	143.1	144.7	157.5	140.8	144.7	143.3
180	140	145.6	155.2	138.5	* Pb	154.8
360	136.2	146	147.3	144.1	144.9	143.7
720	144.9	146.1	147.2	141.1	142.6	143

Tableau 10 : Evolution de la natrémie des chiens 1 et 2 sur 12 h

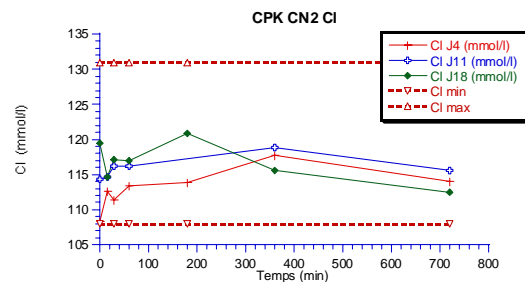
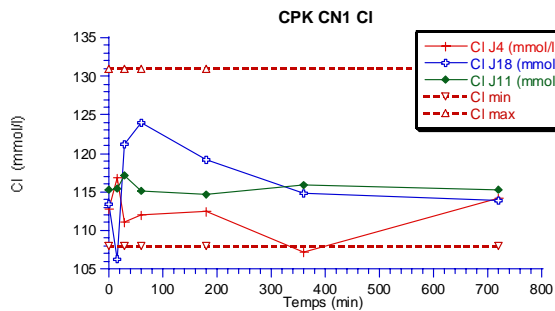


Figures 25 et 26 : Evolution de la natrémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

La chlorémie reste dans les valeurs normales comprises entre 108 et 131 mmol/l chez le chien (fig. 27 et 28).

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	Cl CN1 J4 (mmol/l)	Cl CN1 J11 (mmol/l)	Cl CN1 J18 (mmol/l)	Cl CN2 J4 (mmol/l)	Cl CN2 J11 (mmol/l)	Cl CN2 J18 (mmol/l)
0	112.8	115.2	113.4	108.3	114.4	119.5
15	116.8	115.4	106.3	112.7	114.7	114.7
30	111.1	117.1	121.2	111.4	116.2	117.1
60	112	115.1	123.9	113.4	116.2	117
180	112.5	114.6	119.2	113.8	* Pb	120.9
360	107.2	115.9	114.8	117.7	118.8	115.6
720	114.2	115.3	113.8	114	115.5	112.5

Tableau 11 : Evolution de la chlorémie des chiens 1 et 2 sur 12 h

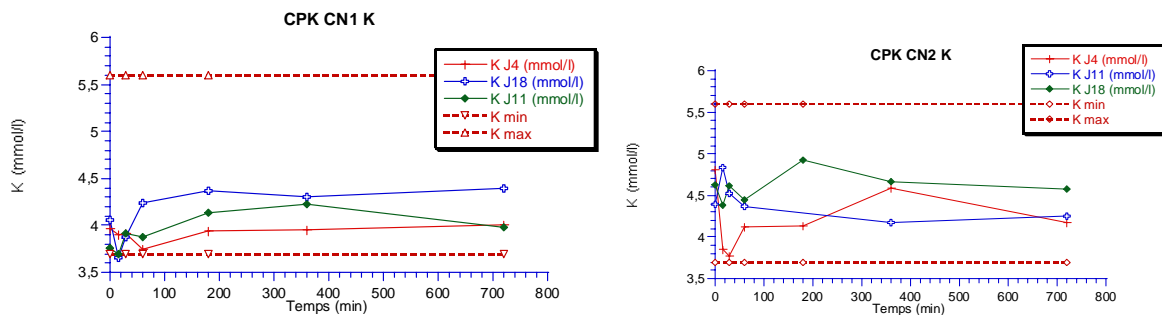


Figures 27 et 28 : Evolution de la chlorémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

La kaliémie ne présente pas d'anomalie (fig. 29 et 30).

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	K CN1 J4 (mmol/l)	K CN1 J11 (mmol/l)	K CN1 J18 (mmol/l)	K CN2 J4 (mmol/l)	K CN2 J11 (mmol/l)	K CN2 J18 (mmol/l)
0	3.97	3.76	4.06	4.81	4.39	4.63
15	3.9	3.69	3.66	3.85	4.83	4.38
30	3.91	3.91	3.87	3.77	4.53	4.61
60	3.75	3.87	4.24	4.12	4.37	4.44
180	3.94	4.14	4.37	4.14	* Pb	4.93
360	3.96	4.22	4.3	4.59	4.17	4.67
720	4.01	3.98	4.39	4.18	4.25	4.58

Tableau 12 : Evolution de la kaliémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

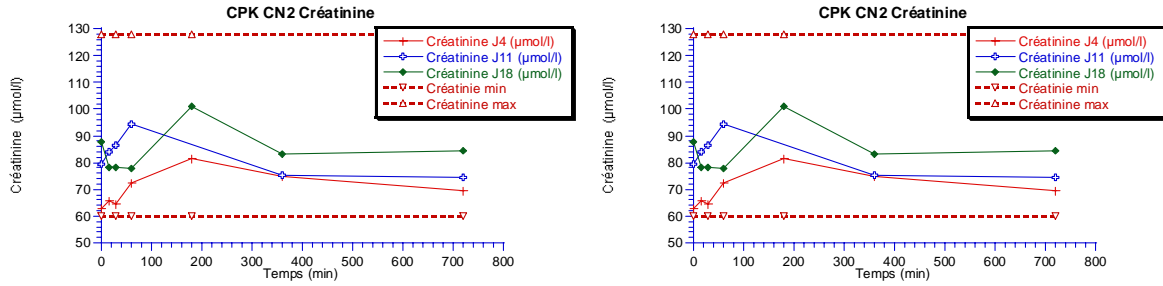


Figures 29 et 30 : Evolution de la kaliémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

Les valeurs de l'urée et de la créatinine fluctuent dans les normes usuelles. Les valeurs usuelles de la créatinine chez le chien sont comprises entre 60 et 128 $\mu\text{mol/l}$, celles de l'urée sont comprises entre 3,1 et 10,9 mmol/l. Les injections ne semblent pas présenter de répercussion sur la fonction rénale (fig. 31, 32, 33 et 34).

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	Créat CN1 J4 ($\mu\text{mol/l}$)	Créat CN1 J11 ($\mu\text{mol/l}$)	Créat CN1 J18 ($\mu\text{mol/l}$)	Créat CN2 J4 ($\mu\text{mol/l}$)	Créat CN2 J11 ($\mu\text{mol/l}$)	Créat CN2 J18 ($\mu\text{mol/l}$)
0	74.1	75.3	78.6	63.0	79.6	87.6
15	78.3	75.8	69.7	65.7	84.1	78.0
30	74.0	81.0	82.7	64.6	86.3	78.3
60	75.4	82.4	86.2	72.2	94.3	77.7
180	80.7	82.4	95.1	81.4	* Pb	100.8
360	72.9	82.8	84.0	74.8	75.2	83.1
720	68.2	77.0	81.8	69.5	74.6	84.6

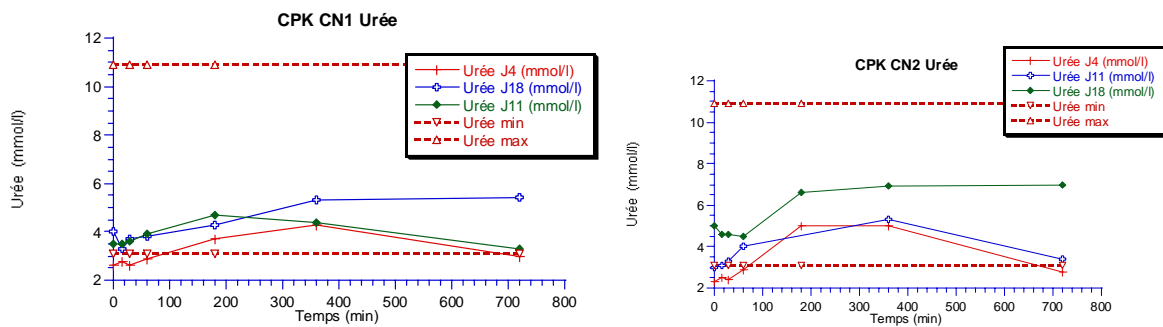
Tableau 13 : Evolution de la créatininémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.



Figures 31 et 32 : Evolution de la créatininémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	Urée CN1 J4 (mmol/l)	Urée CN1 J11 (mmol/l)	Urée CN1 J18 (mmol/l)	Urée CN2 J4 (mmol/l)	Urée CN2 J11 (mmol/l)	Urée CN2 J18 (mmol/l)
0	2.6	3.5	4.0	2.3	3.0	5.0
15	2.8	3.5	3.3	2.5	3.1	4.6
30	2.6	3.6	3.7	2.4	3.3	4.6
60	2.9	3.9	3.8	2.9	4.0	4.5
180	3.7	4.7	4.3	5.0	* Pb	6.6
360	4.3	4.4	5.3	5.0	5.3	6.9
720	3.0	3.3	5.4	2.8	3.4	7.0

Tableau 14 : Evolution de l'urémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

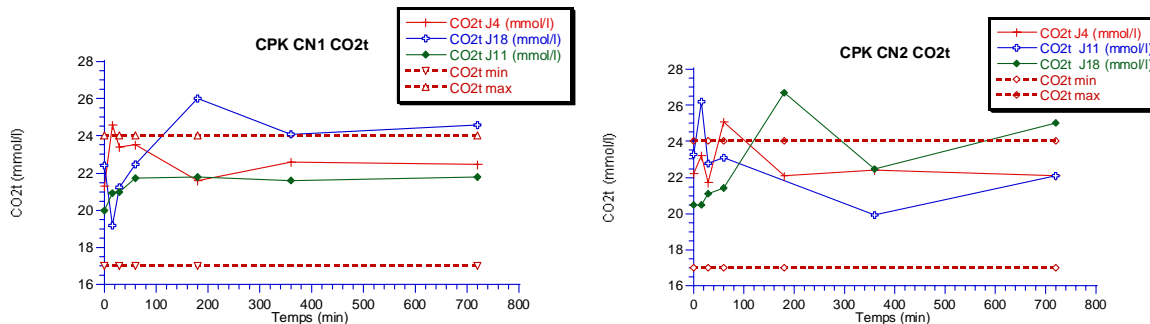


Figures 33 et 34 : Evolution de l'urémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

Concernant la réserve alcaline, on observe une alcalose transitoire entre la première et la troisième heure lors de J18, ainsi qu'un bref épisode à T15 de J11 avec le chien 2 (fig. 35 et 36). Les valeurs usuelles du CO₂ total (assimilé à la réserve alcaline dans ce cas) chez le chien sont comprises entre 17 et 24 mmol/l.

Temps (min)	Chien 1			Chien 2		
	CO2t CN1 J4 (mmol/l)	CO2t CN1 J11 (mmol/l)	CO2t CN1 J18 (mmol/l)	CO2t CN2 J4 (mmol/l)	CO2t CN2 J11 (mmol/l)	CO2t CN2 J18 (mmol/l)
0	21.3	20.0	22.4	22.2	23.3	20.5
15	24.6	20.9	19.2	23.2	26.2	20.5
30	23.4	21.0	21.2	21.7	22.8	21.1
60	23.5	21.7	22.5	25.1	23.1	21.4
180	21.6	21.8	26.0	22.1	* Pb	26.7
360	22.6	21.6	24.1	22.4	19.9	22.5
720	22.5	21.8	24.6	22.1	22.1	25.0

Tableau 15 : Evolution de la Réserve Alcaline des chiens 1 et 2 sur 12 heures .



Figures 35 et 36 : Evolution de la réserve alcaline des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

Les NFS effectuées à T0 et T12h ne présentent pas d'anomalies.

La tolérance à la CPK est bonne malgré les craintes justifiées concernant une réaction indésirable inter espèces.

La pharmacocinétique de la CPK est intéressante avec un pic atteignant de très hautes valeurs entre T15 min et T60 min suivi d'une décroissance rapide pour revenir à un taux presque basal au bout de douze heures.

7.2.6. Tolérance et pharmacocinétique de l'Adénosine-Tri-Phosphate

Cette étape s'effectue sur les chiens 3 et 4.

Elle se déroule à J1 et J8 au cours desquels les animaux reçoivent une perfusion d'ATP de 12 heures à la posologie initiale de 20 µg/kg/min. Cette posologie est augmentée d'un palier de 10 µg/kg/min toutes les 30 minutes jusqu'à l'apparition d'effets indésirables, cliniques ou électrocardiographiques, ou jusqu'au palier maximum de 75 µg/kg/min.

Observations cliniques :

- Abattement passager dans les dix minutes qui suivent le début de la perfusion et se poursuivant pendant trente minutes. Cette constatation est faite pour les deux chiens étudiés. Après cette phase d'induction du traitement, les animaux reprennent leur comportement habituel, c'est-à-dire agité jusqu'à la fin de l'expérience.

- Bradycardie et arythmie légères concomitantes à la période d'abattement. Cette fois encore, ces signes cliniques sont observés sur les deux chiens.
- Examen clinique de base normal par ailleurs pour la suite du traitement et pendant les 24 heures qui suivent.

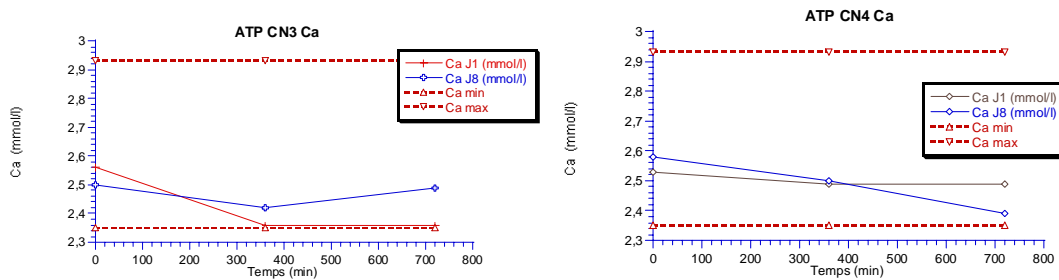
Prélèvements sanguins (10 ml à chaque prise) :

- aux temps T0, T6 heures et T12 heures
- pour dosages de CPK et calcémie.

Les valeurs de la calcémie restent dans les normes usuelles (fig. 37 et 38).

Temps (min)	Chien 3		Chien 4	
	Ca CN3 J4 (mmol/l)	Ca CN3 J8 (mmol/l)	Ca CN4 J1 (mmol/l)	Ca CN4 J8 (mmol/l)
0	2.56	2.50	2.53	2.58
360	2.36	2.42	2.49	2.50
720	2.36	2.49	2.49	2.39

Tableau 16 : Evolution de la calcémie des chiens 3 et 4 sur 12 h.

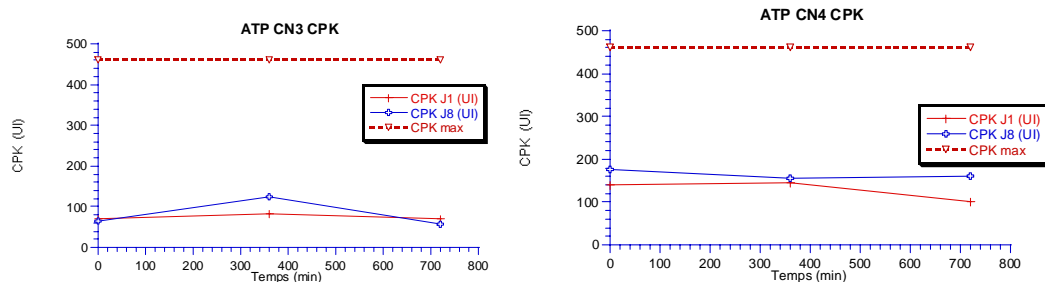


Figures 37 et 38 : Evolution de la calcémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

Les valeurs de la CPK sont comprises entre les valeurs usuelles (fig. 39 et 40).

Temps (min)	Chien 3		Chien 4	
	CPK CN3 J1 (UI)	CPK CN3 J8 (UI)	CPK CN4 J1 (UI)	CPK CN4 J8 (UI)
0	71.0	66.0	141.0	177.0
360	84.0	125.0	14.0	155.0
720	70.0	58.0	102.0	162.0

Tableau 17 : Evolution de la CPK des chiens 3 et 4 sur 12 h.



Figures 39 et 40 : Evolution de la CPK des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

La tolérance à l'ATP pour ces deux animaux est bonne, biochimiquement et cliniquement, malgré la courte période d'abattement notée à l'induction du traitement.

Surveillance électrocardiographique :

- effectuée pendant toute la perfusion, sa réalisation a été difficile étant donné l'hyperactivité de ces deux animaux. La lecture des enregistrements HOLTER, très délicate de ce fait, a été réalisée en aveugle par le cardiologue de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort. Aucune anomalie n'est visible au cours et à l'issue de la perfusion d'ATP, sur les quelques plages d'enregistrements valables.
- des ECG ont été, de ce fait, indispensables. Ils ont été analysés par le même clinicien que précédemment et dans les mêmes conditions ainsi que par un enseignant en médecine de l'ENVA. Leurs conclusions ne mentionnent aucune anomalie.

De l'étude de cet essai, la posologie désignée pour la suite du protocole est de **75 µg/kg/min d'ATP en perfusion de 12 heures.**

7.2.7. Tolérance et pharmacocinétique de la tri-thérapie Créatine-Phosphate, Créatine-Phospho-Kinase et Adénosine-Tri- Phosphate

a) Tri-thérapie 1

Cette étape concerne les chiens 3 et 4.

Elle se déroule après une période sans traitement de sept jours après l'essai préalable de tolérance de l'ATP et seulement une fois connus les résultats de l'étude préalable de tolérance de la CPK.

Les traitements sont administrés à J1, J8, J15, J22 et J29.

Chaque traitement de 12 heures comporte successivement :

- A T0, la mise en place d'une perfusion d'ATP pour 12 heures, à la posologie de 75 µg/kg/min.
- Puis, successivement, une injection IV rapide (3 minutes) de CPK, à la posologie de 250 UI par kg de poids corporel, par l'intermédiaire d'un filtre de 0,2 micron, dans la tubulure de la perfusion d'ATP.
- Puis l'injection IV rapide (3 à 5 minutes) de CP à la posologie de 900 mg/kg de poids corporel, dans la tubulure de la perfusion d'ATP .

A chaque traitement, sont réalisés :

- une surveillance clinique de 72 heures
- une surveillance électrocardiographique pendant 24 heures
- des prélèvements sanguins (10 ml par prise) :
aux temps T0, T15 min., T30 min., T1 heure, T6 heures, T12 heures ; pour les dosages de CP, CPK, phosphorémie, urémie, créatininémie, réserve alcaline, glycémie, ionogramme ; NFS à T0 et T12 heures.

La réalisation d'une perfusion de douze heures sur animal vigile s'avérant délicate, nous avons mis au point un système n'entravant pas la liberté de mouvements des chiens mais assurant la délivrance continue de produits. Nous avons donc utilisé un système de poches Ultraflow® (Fresenius®) qui permet une diffusion continue des produits à l'aide de poches calibrées installées dans un système poussoir. Ce système utilisé en thérapeutique humaine permet l'administration d'une chimiothérapie par voie intraveineuse en ambulatoire tout en conservant un maximum de confort pour le patient. Nous avons ainsi calculé nos volumes à perfuser de manière à adapter les quantités de produits en fonction du calibrage des poches et du temps de perfusion. Les poches étaient cachées dans un « sac banane » spécifique à Fresenius®, ce dernier étant fixé sur des harnais adaptés aux chiens, le tout est recouvert d'une bande Velpeau® et d'une bande adhésive (Elastoplast®) (cf photo1). La tubulure de perfusion sortait entre les épaules et descendait le long du membre antérieur jusqu'au cathéter inséré dans la veine céphalique. Cette tubulure était elle-même protégée par une bande auto-adhésive (Cohéban®).

Ce système permettait une plus grande maniabilité des animaux en nous affranchissant d'un pied de perfusion, une meilleure acceptabilité du protocole par les animaux qui

pouvaient tourner librement dans leurs cages et être sortis, et surtout une meilleure observance du traitement avec une perfusion à débit constant et l'impossibilité pour les chiens de dévorer leurs tubulures en notre absence.



Photo 1 : Les chiens 1 et 2 porteurs du système de poche Ultraflow® fixée sur des harnais.

L'observation clinique n'a révélé aucun trouble grave pendant toute la durée des essais, de J1 à J29 pour les deux chiens. On a pu cependant noter un léger abattement à l'induction du traitement, au bout de cinq à dix minutes, réversible en quelques minutes. Cette réaction a été observée lors de chaque journée de traitement par la trithérapie.

Un ECG a été réalisé avant chaque traitement. Aucune anomalie n'a été mise en évidence.

Les HOLTER, placés sur chacun des deux chiens, ont été difficilement interprétables, comme précédemment, du fait du caractère agité de ces deux beagles. Une sédation avait sommairement été envisagée afin de réaliser un suivi cardiologique pertinent mais vite abandonnée pour ne pas fausser les résultats obtenus.

L'analyse des ECG, réalisée à la fin du traitement par tri-thérapie, montre l'apparition d'un sous décalage de ST chez le chien 3 (fig. 41 et 42). Jusque là, les complexes QRST étaient normaux chez nos deux beagles.

Le cardiologue de l'ENVA nous a affirmé que chez le chien, ces phénomènes sont très fréquents et que le tracé du chien 3 restait normal. Nous restons perplexes face à la simultanéité d'apparition de l'évènement immédiatement en post tri-thérapie. La kaliémie chez ce chien varie dans une faible proportion pendant les douze heures de traitement avec une hypokaliémie (3,3 mEq/l) entre T15 minutes et T60 minutes globalement et une normalisation à T6 heures. Cette hypokaliémie ne semble pas pouvoir expliquer les troubles obtenus à l'ECG au moment où elle est effective.

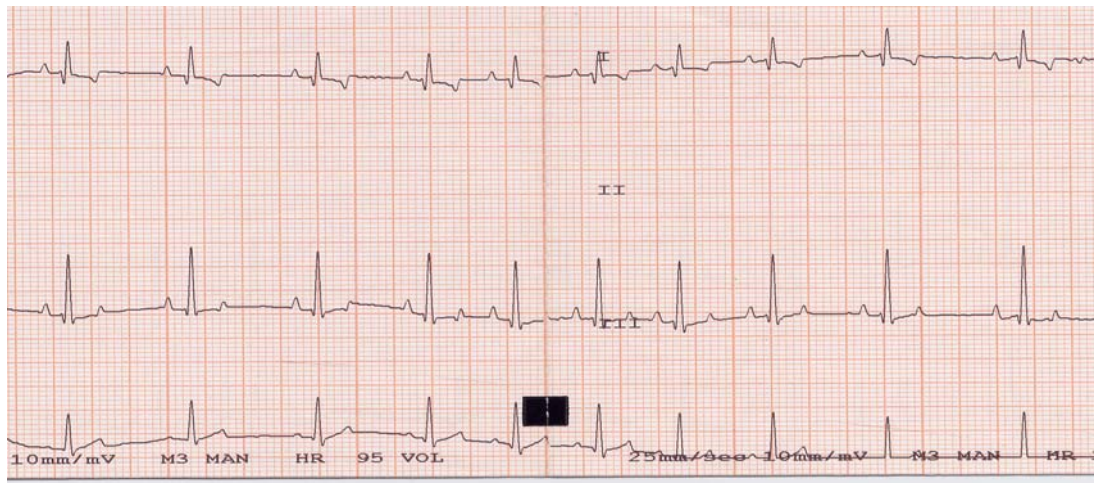


Figure 41 : ECG chien 3 à J3.

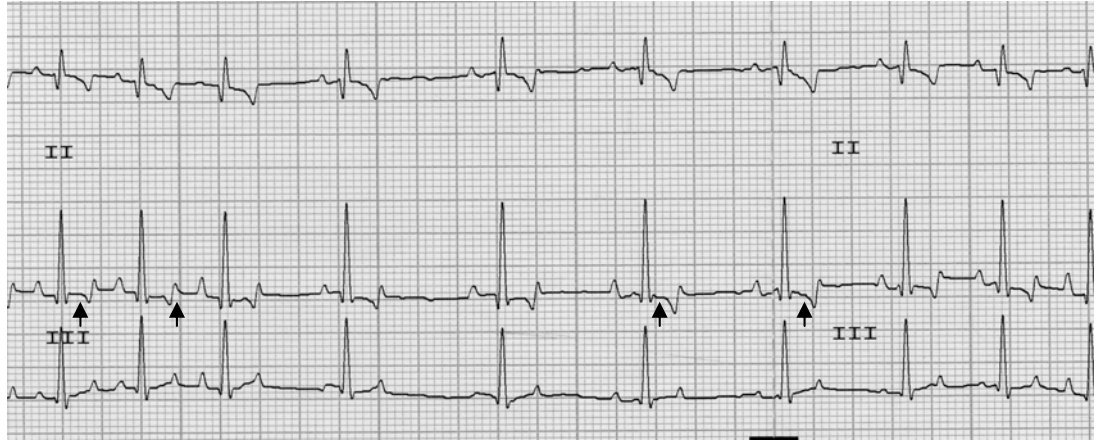
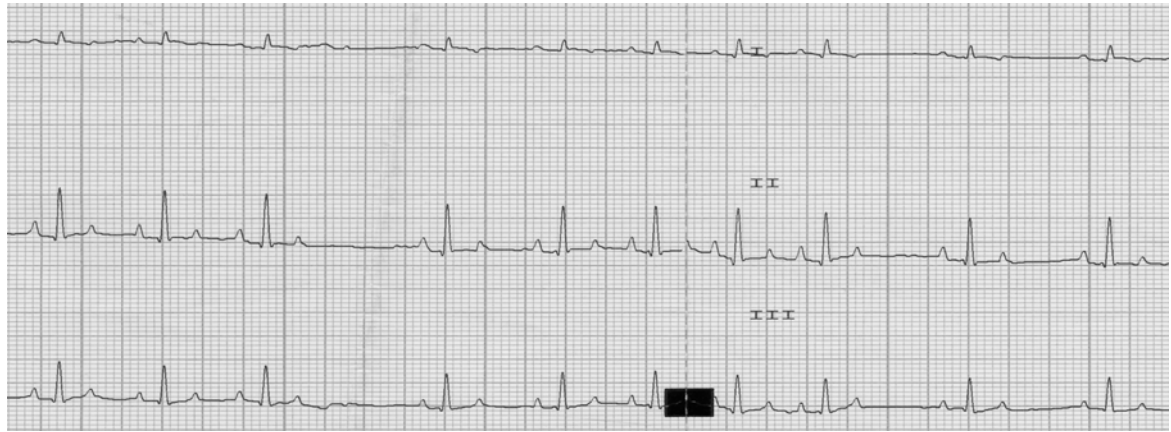


figure 42 : ECG du chien 3 à J27 montrant les sous-décalages de ST.



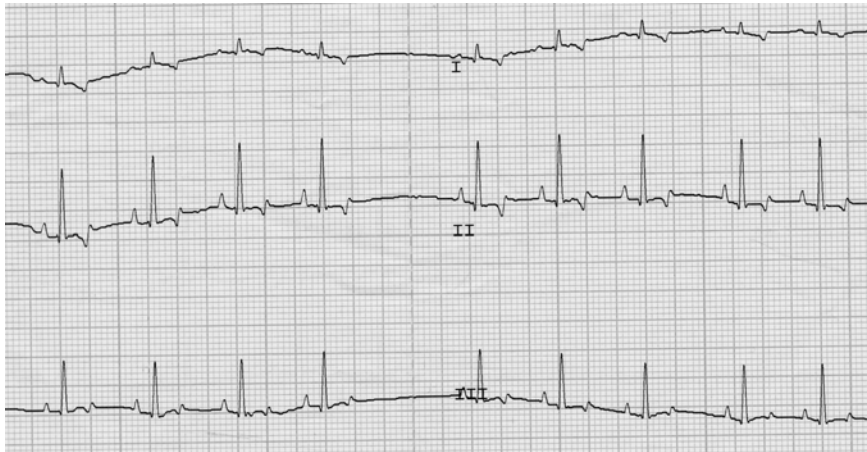


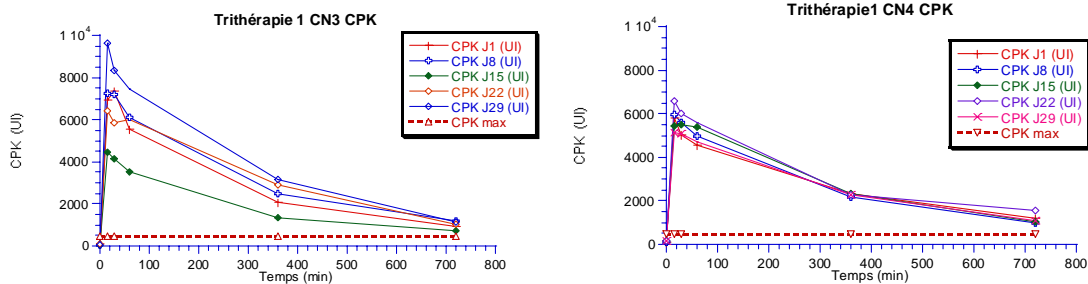
Figure 44 : ECG chien 4 à J27.

figure 43 : ECG chien4 à J3.

- La cinétique de la CPK montre un pic plasmatique atteint en 15 minutes (à 30 minutes parfois). Les valeurs à ce pic se situent entre 5800 UI/l et 9600 UI/l (fig. 45 et 46). C'est, entre J22 et J29, que les valeurs les plus fortes sont observées. L'élimination est également très rapide puisqu'au bout de 6 heures, il ne reste plus que 30 % de la valeur initiale. Il est cependant intéressant de voir qu'à l'issue des 12 heures de perfusion, la valeur de la CPK est encore de 1000 UI/l.

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	CPK CN3 J1 (UI)	CPK CN3 J8 (UI)	CPK CN3 J15 (UI)	CPK CN3 J22 (UI)	CPK CN3 J29 (UI)	CPK CN4 J1 (UI)	CPK CN4 J8 (UI)	CPK CN4 J15 (UI)	CPK CN4 J22 (UI)	CPK CN4 J29 (UI)
	0	91	73	73	115	65	107	123	139	147
15	6953	7231	4484	6429	9651	5802	5938	5466	6567	5146
30	7373	7220	4142	5882	8332	5003	5589	5520	6009	5071
60	5551	6103	3525	6020	7482	4576	4958	5388	5803	4722
360	2099	2503	1363	2882	3160	2310	2163	2348	2289	2283
720	929	1181	721	1019	1139	1178	1012	1050	1574	1101

Tableau 18 : Evolution de la CPK des chiens 3 et 4 sur 12 h .

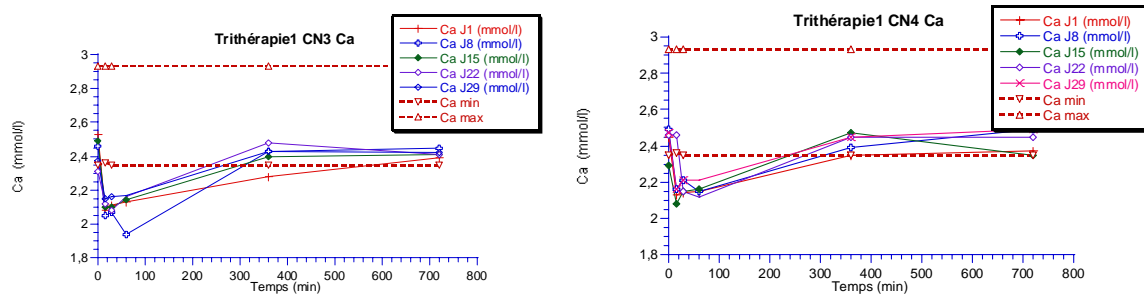


Figures 45 et 46 : Evolution de la CPK des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- La calcémie reste normale même si elle subit une légère diminution pour atteindre une valeur minimale entre T15 et T60 minutes avant de retrouver une valeur normale à T12 heures (fig. 47 et 48).

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	Ca CN3 J1	Ca CN3 J8	Ca CN3 J15	Ca CN3 J22	Ca CN3 J29	Ca CN4 J1	Ca CN4 J8	Ca CN4 J15	Ca CN4 J22	Ca CN4 J29
0	2.53	2.46	2.49	2.31	2.37	2.45	2.49	2.29	2.46	2.47
15	2.08	2.05	2.10	2.12	2.15	2.13	2.16	2.08	2.46	2.16
30	2.11	2.07	2.10	2.08	2.16	2.14	2.21	2.15	2.15	2.21
60	2.13	1.94	2.14	2.16	2.17	2.15	2.15	2.16	2.12	2.21
360	2.28	2.43	2.40	2.48	2.43	2.35	2.39	2.47	2.45	2.45
720	2.39	2.45	2.41	2.41	2.42	2.37	2.49	2.35	2.45	2.49

Tableau 19 : Evolution de la calcémie (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h .

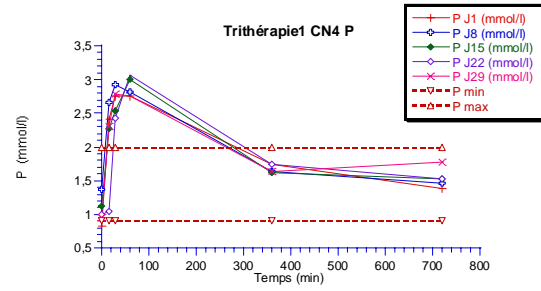
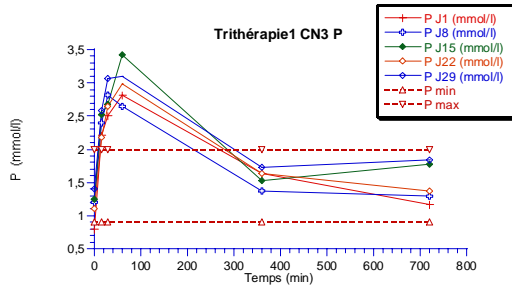


Figures 47 et 48 : Evolution de la calcémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- La phosphorémie double et même triple de valeur pendant la première heure. Sa valeur ne se normalise que six heures après le début du traitement de tri-thérapie (fig. 49 et 50).

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	P CN3 J1	P CN3 J8	P CN3 J15	P CN3 J22	P CN3 J29	P CN4 J1	P CN4 J8	P CN4 J15	P CN4 J22	P CN4 J29
0	0.8	1.2	1.24	1.1	1.41	0.83	1.37	1.12	1.0	0.95
15	2.21	2.4	2.52	2.18	2.59	2.42	2.66	2.28	1.04	2.3
30	2.51	2.81	2.68	2.64	3.06	2.75	2.93	2.54	2.43	2.78
60	2.82	2.64	3.42	2.99	3.1	2.76	2.81	3.0	3.06	2.75
360	1.63	1.37	1.52	1.63	1.73	1.74	1.63	1.62	1.75	1.64
720	1.17	1.3	1.77	1.37	1.84	1.39	1.46	1.52	1.52	1.78

Tableau 20 : Evolution de la phosphorémie (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h.

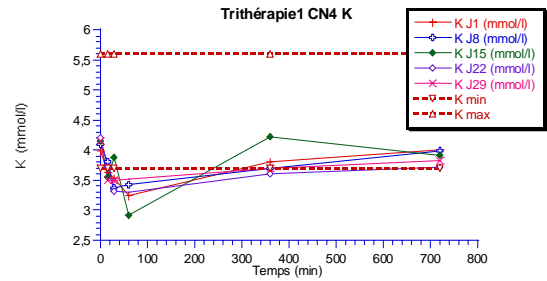
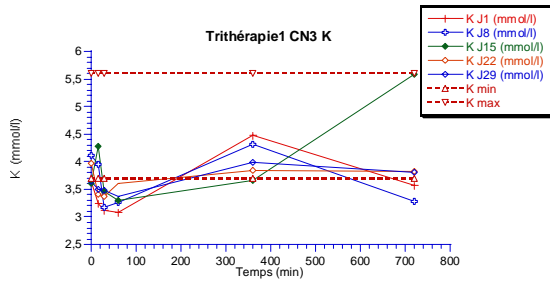


Figures 49 et 50 : Evolution de la phosphorémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- On observe une hypokaliémie transitoire en début de traitement (fig. 51 et 52).

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	K CN3 J1	K CN3 J8	K CN3 J15	K CN3 J22	K CN3 J29	K CN4 J1	K CN4 J8	K CN4 J15	K CN4 J22	K CN4 J29
0	3.64	4.11	3.6	3.97	3.65	3.98	4.09	4.15	4.21	4.16
15	3.24	3.96	4.28	3.4	3.49	3.63	3.80	3.56	3.71	3.49
30	3.12	3.17	3.47	3.37	3.48	3.53	3.38	3.87	3.32	3.5
60	3.09	3.27	3.30	3.60	3.38	3.25	3.43	2.92	3.29	3.51
360	4.47	4.32	3.67	3.84	3.99	3.80	3.70	4.23	3.61	3.69
720	3.57	3.28	5.59	3.82	3.81	4.0	3.99	3.92	3.72	3.82

Tableau 21 : Evolution de la kaliémie (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h .

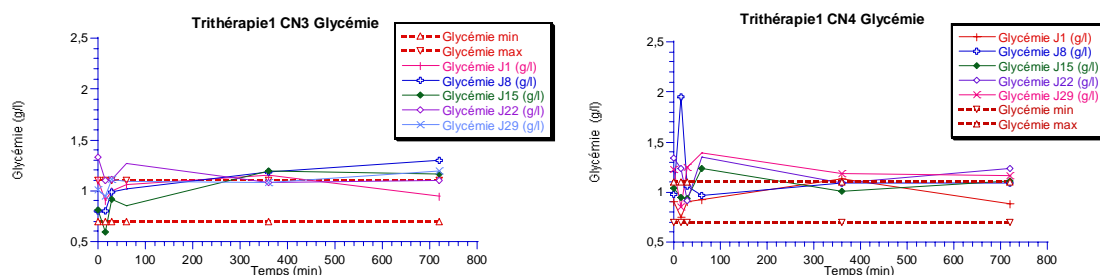


Figures 51 et 52 : Evolution de la kaliémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- La glycémie évolue selon les normes physiologiques (comprises entre 0.7 et 1.1 g/l chez des chiens) sachant que nos beagles recevaient leur repas après quinze minutes de traitement (fig. 53 et 54).

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	Gly CN3 J1	Gly CN3 J8	Gly CN3 J15	Gly CN3 J22	Gly CN3 J29	Gly CN4 J1	Gly CN4 J8	Gly CN4 J15	Gly CN4 J22	Gly CN4 J29
0	1.1	0.8	0.81	1.33	1.01	0.9	0.98	1.04	1.34	1.23
15	0.9	0.8	0.59	1.10	0.95	0.75	1.95	0.95	1.24	0.85
30	1.0	0.99	0.92	1.11	1.11	0.9	1.06	0.94	0.92	1.25
60	1.06	1.02	0.85	1.27	1.09	0.93	0.97	1.24	1.35	1.39
360	1.15	1.18	1.19	1.08	1.08	1.13	1.09	1.01	1.09	1.18
720	0.95	1.3	1.16	1.1	1.19	0.88	1.09	1.11	1.24	1.16

Tableau 22 : Evolution de la glycémie (g/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h.

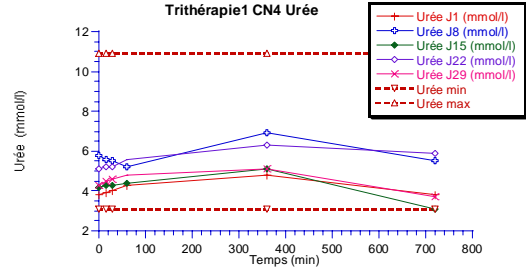
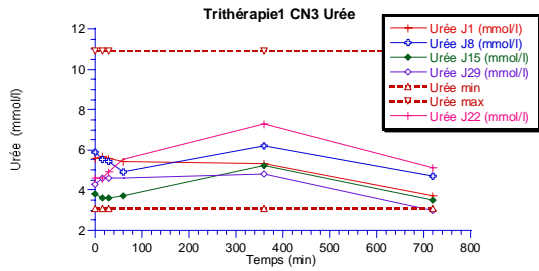


Figures 53 et 54 : Evolution de la glycémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- L'urée, même si elle augmente légèrement, reste dans les normes physiologiques (fig. 55 et 56). On observe un pic de créatinine qui se normalise après 3 heures de traitement (fig. 57 et 58). On ne met donc pas en évidence d'atteinte rénale aiguë durable secondaire à la tri-thérapie.

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	Urée CN3 J1	Urée CN3 J8	Urée CN3 J15	Urée CN3 J22	Urée CN3 J29	Urée CN4 J1	Urée CN4 J8	Urée CN4 J15	Urée CN4 J22	Urée CN4 J29
0	5.6	5.9	3.8	4.6	4.3	3.8	5.8	4.2	5.1	4.3
15	5.7	5.5	3.6	4.6	4.6	3.9	5.6	4.3	5.2	4.5
30	5.6	5.4	3.6	4.9	4.6	4.0	5.5	4.3	5.2	4.6
60	5.4	4.9	3.7	5.5	4.6	4.3	5.2	4.4	5.6	4.8
360	5.3	6.2	5.2	7.3	4.8	4.8	6.9	5.1	6.3	5.1
720	3.7	4.7	3.5	5.1	3.0	3.8	5.5	3.1	5.9	3.7

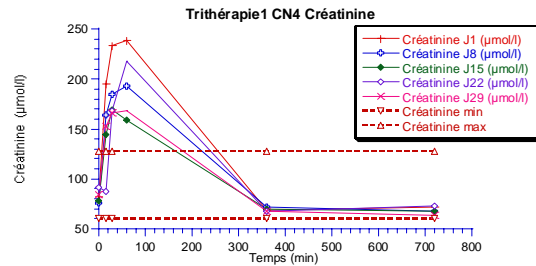
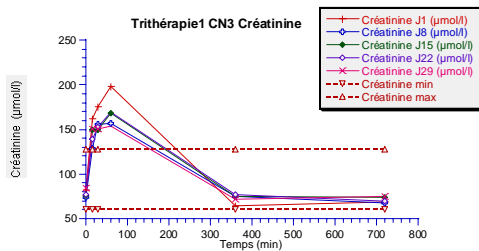
Tableau 23 : Evolution de l'urée (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h.



Figures 55 et 56 : Evolution de l'urémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	Créat CN3 J1	Créat CN3 J8	Créat CN3 J15	Créat CN3 J22	Créat CN3 J29	Créat CN4 J1	Créat CN4 J8	Créat CN4 J15	Créat CN4 J22	Créat CN4 J29
0	81.7	74.2	76.3	77	84.0	81.7	75.7	77.8	91.9	84.2
15	162.4	129	149.2	139.1	150.8	194.9	164.2	144.2	87.4	152.3
30	175.3	155.6	149.5	152.5	151	233.5	184.3	169.7	168.4	165.9
60	198.6	156.3	167.8	169.1	153.5	238.3	192.7	158.7	217.6	168
360	64.7	74.9	74.4	76.5	71.8	69.0	71.4	70.0	68.0	67.8
720	68.4	67.5	73.7	70.1	74.4	71.8	67.90	68.1	72.8	63.4

Tableau 24 : Evolution de la créatininémie ($\mu\text{mol/l}$) des chiens 3 et 4 sur 12 h.

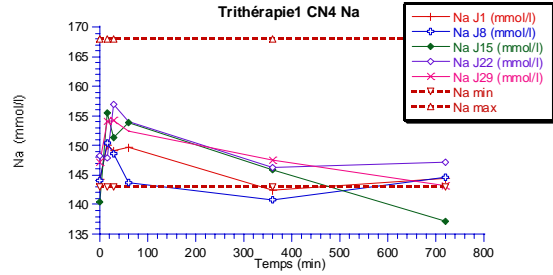
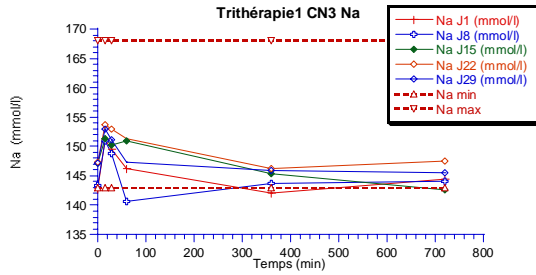


Figures 57 et 58 : Evolution de la créatininémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- La natrémie fluctue entre les valeurs normales, on observe deux hyponatrémies anecdotiques (fig. 59 et 60).

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	Na CN3 J1	Na CN3 J8	Na CN3 J15	Na CN3 J22	Na CN3 J29	Na CN4 J1	Na CN4 J8	Na CN4 J15	Na CN4 J22	Na CN4 J29
0	142.8	143.3	147.2	147.3	147.1	144.3	144.1	140.4	148.2	147.2
15	151.2	151	151.4	153.7	153	150.1	150.5	155.5	147.9	154.1
30	149.5	148.7	150.3	153	151.1	149.1	148.6	151.4	156.9	154.2
60	146.3	140.6	150.9	151.4	147.4	149.7	143.7	153.8	154	152.4
360	142.1	143.7	145.4	146.3	145.8	142.4	140.9	145.9	146.2	147.5
720	144.5	144.1	142.7	147.5	145.5	144.4	144.7	137.1	147.2	143.2

Tableau 25 : Evolution de la natrémie (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h.

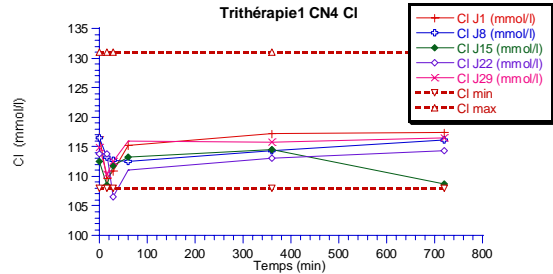
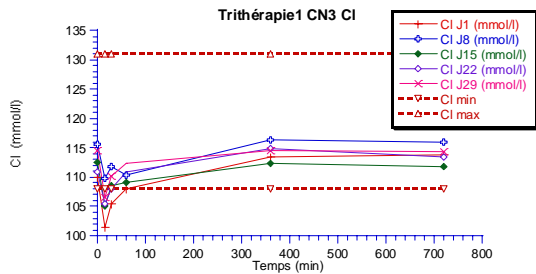


Figures 59 et 60 : Evolution de la natrémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- Sur nos deux chiens, on observe une discrète hypochlorémie à T15 (fig. 61 et 62).

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	Cl CN3	Cl CN3	Cl CN3	Cl CN3	Cl CN3	Cl CN4	Cl CN4	Cl CN4	Cl CN4	Cl CN4
	J1	J8	J15	J22	J29	J1	J8	J15	J22	J29
0	109.9	115.6	112.6	110.9	114.6	116.7	116.5	112.6	113.7	114.8
15	101.4	109.8	105	105.5	106.6	109.7	113.3	108.5	113.7	110.4
30	105.5	111.8	108.5	108	110.1	110.8	112.7	111.8	106.5	112.6
60	108	110.4	109.1	110.8	112.3	115.2	112.5	113.2	111	116
360	113.5	116.3	112.4	114.8	114.6	117.2	114.4	114.5	1113.1	115.7
720	113.8	115.9	111.8	113.5	114.3	117.5	116.1	108.8	114.3	116.5

Tableau 26 : Evolution de la chlorémie (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h .

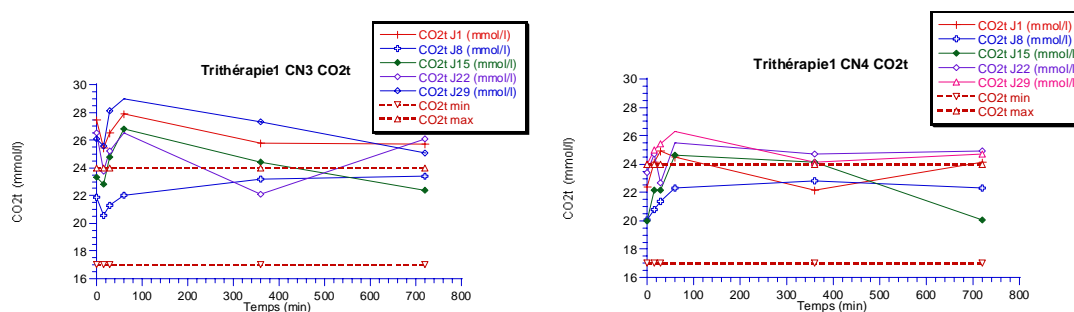


Figures 61 et 62 : Evolution de la chlorémie des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- D'après les courbes de réserve alcaline, on observe une tendance à l'alcalose chez nos deux chiens, avec une alcalose plus marquée sur le chien 3, et un retour à la normale en fin d'expérience (fig. 63 et 64). Ce phénomène pourrait expliquer l'hypochlorémie transitoire à T15 qui serait dû, alors, à cette alcalose métabolique. Une hypothèse envisageable pour l'explication de cette alcalose serait l'injection intra-veineuse d'ions phosphates. Par cette injection, on met en jeu le deuxième système tampon de l'organisme basé sur les phosphates organiques. Ce système étant l'un des principaux responsables lors d'une alcalose métabolique aiguë (25).

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	CO2t CN3 J1	CO2t CN3 J8	CO2t CN3 J15	CO2t CN3 J22	CO2t CN3 J29	CO2t CN4 J1	CO2t CN4 J8	CO2t CN4 J15	CO2t CN4 J22	CO2t CN4 J29
0	27.5	21.9	23.3	26.5	26.1	22.4	20.1	20.0	23.4	24.0
15	25.4	20.6	22.8	23.8	25.6	24.1	20.8	22.2	24.7	25.0
30	26.5	21.3	24.8	25.2	28.1	24.9	21.4	22.2	22.7	25.4
60	27.9	22.0	26.8	26.5	29.0	24.5	22.3	24.6	25.5	26.3
360	25.8	23.2	24.4	22.1	27.3	22.2	22.8	24.1	24.7	24.1
720	25.7	23.4	22.4	26.1	25.1	24.1	22.3	20.1	24.9	24.7

Tableau 27 : Evolution de la réserve alcaline (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h .

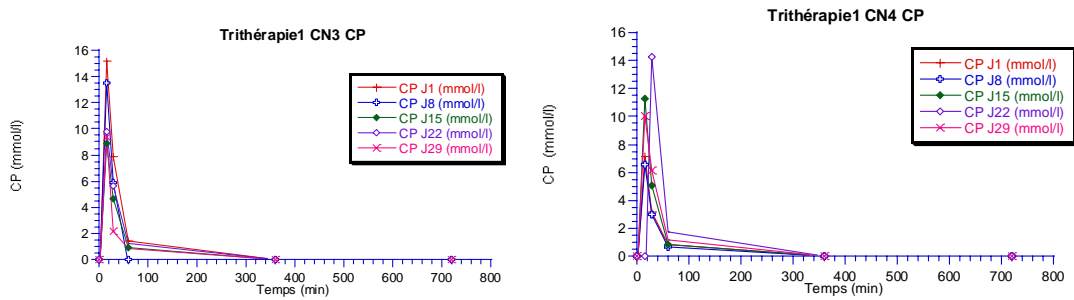


Figures 63 et 64 : Evolution de la réserve alcaline des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

- Les courbes de la CP nous montrent une cinétique confirmant un temps de demi vie très bref, d'environ 30 minutes et une disparition quasi totale de la CP au delà de 3 heures (fig. 65 et 66). Ce qui nous intéresse est la valeur maximale du pic, à savoir entre 9 et 16 mmol/l pour le chien 3, et entre 7 et 14 mmol/l pour le chien 4. D'après les expériences précédentes (cf bibliographie), on sait qu'une valeur seuil de 12 mmol/l de CP, même sur une courte durée, permet une activité anti-tumorale. On peut donc espérer une efficacité de ce protocole.

Temps (min)	Chien 3					Chien 4				
	CP CN3 J1	CP CN3 J8	CP CN3 J15	CP CN3 J22	CP CN3 J29	CP CN4 J1	CP CN4 J8	CP CN4 J15	CP CN4 J22	CP CN4 J29
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	15.14	13.52	8.86	9.8	9.41	7.1	6.52	11.26	0	10.01
30	7.89	5.88	4.63	5.67	2.2	3.17	2.99	5.05	14.3	6.15
60	1.39	0	0.94	1.26	0.84	0.87	0.68	0.80	1.78	1.14
360	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
720	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0

Tableau 28 : Evolution de la CP (mmol/l) des chiens 3 et 4 sur 12 h .



Figures 65 et 66 : Evolution de la CP des chiens 3 et 4 sur 12 heures.

La tolérance à cette tri-thérapie est bonne (cf 7.2.8. discussion), les chiens 3 et 4 ne présentant pas de troubles induits par ce protocole plus de six mois après les injections. Les résultats obtenus pour les valeurs de la CP sont encourageants pour l'utilisation thérapeutique de cette tri-thérapie.

b) Tri-thérapie 2

Cette série supplémentaire d'expérimentation, demandée en seconde intention, consiste à comparer la pharmacocinétique de la CP administrée en bolus à la dose de 1200 mg/kg au lieu de 900 mg/kg d'une part, et celle de la CP administrée en bolus de 1200 mg/kg suivi d'une perfusion de 900 mg/kg sur 12 heures. Cette étude nous permet de vérifier si on atteint la valeur seuil de 12 mmol/l pendant une courte durée permettant une inhibition sub totale à totale de la croissance tumorale ou, à défaut, si on peut maintenir un taux basal de CP de l'ordre de 4 à 5 mmol /l pendant 9 à 12 heures pour obtenir ce même effet.

Cette tri-thérapie 2 est réalisée sur les chiens 1 et 2. Ces chiens n'appartenaient pas au protocole de tri-thérapie 1.

Deux séances, effectuées à une semaine d'intervalle, sont donc consacrées à l'administration en bolus de la CP, conjointement à la CPK et à l'ATP avec les mêmes doses et mode d'administration que pour la tri-thérapie originelle.

Les deux séances suivantes, effectuées à une semaine d'intervalle, sont consacrées à l'administration en bolus de la CP ainsi que son administration en continu sur 12 heures, conjointement aux autres produits.

Pour les jours J1 et J8, chaque traitement de 12 heures comporte successivement :

- A T0, la mise d'une place d'une perfusion d'ATP pour 12 heures, à la posologie de 75 µg/kg/min, à l'aide du système de poche Ultraflow® positionnée sur le harnais,

- Puis, successivement, une injection IV rapide (3 minutes) de CPK, à la posologie de 250 UI/kg de poids corporel, par l'intermédiaire d'un filtre 0,2 micron dans la tubulure de la perfusion d'ATP,
- puis l'injection IV rapide (3 à 5 minutes) de CP à la posologie de 1200 mg/kg de poids corporel, dans la tubulure de la perfusion d'ATP.

Pour les jours J15 et J22, chaque traitement de 12 heures comporte successivement :

- à T0, la mise d'une place d'une perfusion d'ATP pour 12 heures, à la posologie de 75 µg/kg/min, à l'aide du système de poche Ultraflow® positionnée sur le harnais,
- puis, successivement, une injection IV rapide (3 minutes) de CPK, à la posologie de 250 UI/kg de poids corporel, par l'intermédiaire d'un filtre 0,2 micron dans la tubulure de la perfusion d'ATP,
- suivie d'une injection IV rapide (3 à 5 minutes) de CP à la posologie de 1200 mg/kg de poids corporel, dans la tubulure de la perfusion d'ATP,
- puis la mise en place d'une perfusion de CP pour 12 heures, à la posologie de 900 mg/kg, par la pose d'un robinet 3 voies, à l'aide du système de poche Ultraflow® positionnée, elle aussi, sur le harnais grâce à un système de porte poche Duo®.

A chaque traitement, sont réalisés :

- une surveillance clinique de 72 heures,
- une surveillance électrocardiographique pendant 24 heures,
- des prélèvements sanguins (10 ml par prise) aux temps T0, T15 min, T30 min, T60 min, T6 heures, T12 heures ; pour les dosages de CP, CPK, phosphorémie, urémie, créatininémie, réserve alcaline, glycémie, ionogramme ; NFS à T0 et T12 heures.

L'observation clinique n'a révélé aucun trouble grave pendant toute la durée des essais de J1 à J22 pour les deux chiens. De même que pour la tri-thérapie 1, on observe un léger abattement à l'induction du traitement, après cinq à dix minutes, réversible en quelques minutes, plus marqué sur le chien 1. cette réaction était constante à chaque jour de traitement.

Etant donnée la difficulté d'interprétation des holters enregistrés précédemment, seuls des ECG ont été réalisés, avant, pendant et après chaque journée de traitement. Ces ECG sont effectués par le service de Cardiologie de l'Ecole Vétérinaire et interprétés par les cardiologues de ce service. Ces derniers ne trouvent rien de pathologique, chez le chien, dans l'interprétation des différents ECG. On peut cependant s'interroger sur l'apparition d'un sous décalage de ST, absent lors du premier examen échocardiographique et lors du premier ECG en début de traitement. Cette modification d'ECG se retrouve chez le chien 1, de manière constante jusqu'à la fin du traitement (fig. 67, 68, 69 et 70). Ce sous décalage ST, visible sous plusieurs dérivations, n'est peut être pas pathologique chez le chien, mais sa présence montre cependant l'existence de modifications électriques notables (pouvant traduire une souffrance myocardique chez l'homme), imputables au traitement.

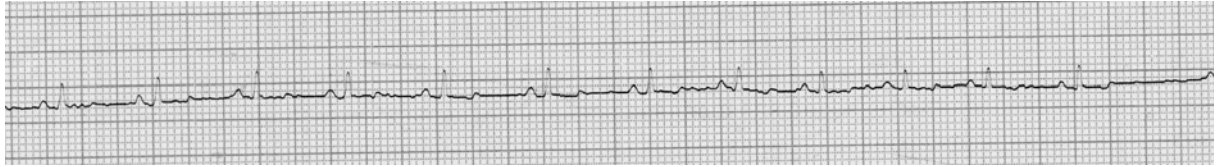


figure 67 : ECG chien 1 à J1.



figure 68 : ECG du chien 1 à J28 montrant les sous-décalages de ST.



figure 69 : ECG du chien 2 à J1.



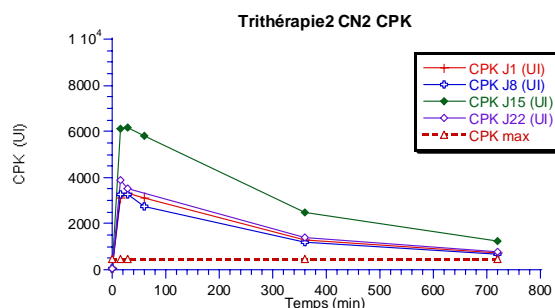
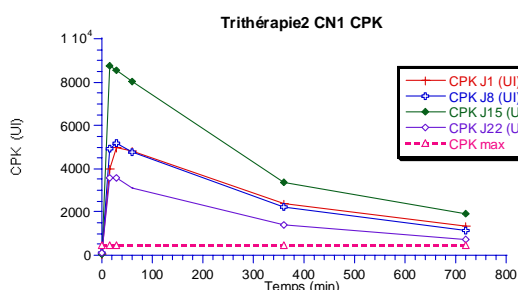
figure 70 : ECG du chien 2 à J28.

Les résultats biochimiques de la trithérapie 2 confirment ceux de la précédente trithérapie :

- La cinétique de la CPK conserve la même allure , avec un maximum à T15-T 30 minutes entre 3300 et 8000 UI/l (fig. 71 et 72). Les valeurs les plus importantes sont obtenues à J15, soit le premier jour de perfusion de CP en continue avec un bolus. L'élimination est également très rapide que la perfusion de CP soit continue ou non, pour avoisiner des valeurs normales à T12 heures.

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	CPK CN1	CPK CN1	CPK CN1	CPK CN1	CPK CN2	CPK CN2	CPK CN2	CPK CN2
	J1 (UI)	J8 (UI)	J15 (UI)	J22 (UI)	J1 (UI)	J8 (UI)	J15 (UI)	J22 (UI)
0	74	81	51	94	78	65	50	72
15	4006	4903	8768	3560	3105	3278	6115	3904
30	4996	5191	8557	3586	3302	3245	6156	3527
60	4833	4752	8049	3095	3114	2750	5822	3295
360	2364	2256	3381	1385	1298	1190	2501	1423
720	1330	1117	1920	709	722	676	1244	760

Tableau 29 : Evolution de la CPK des chiens 1 et 2 sur 12 h.

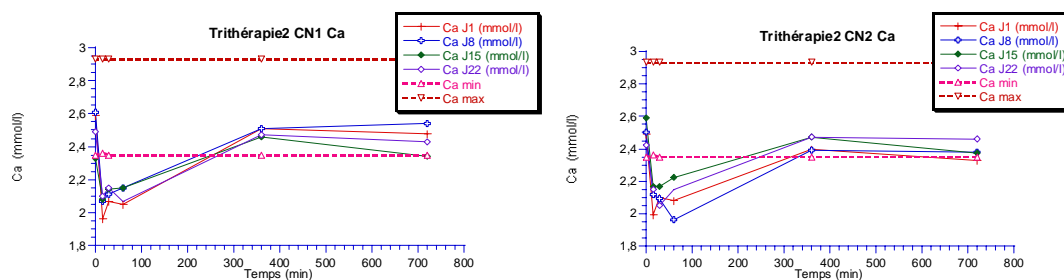


Figures 71 et 72 : Evolution de la CPK des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- La calcémie suit la cinétique observée lors de la tri-thérapie précédente avec une hypocalcémie transitoire, et un retour à la normale après T6 heures (fig. 73 et 74).

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	Ca CN1 J1	Ca CN1 J8	Ca CN1 J15	Ca CN1 J22	Ca CN2 J1	Ca CN2 J8	Ca CN2 J15	Ca CN2 J22
0	2.59	2.61	2.33	2.49	2.49	2.50	2.59	2.42
15	1.96	2.07	2.08	2.10	1.99	2.12	2.17	2.15
30	2.07	2.11	2.14	2.15	2.10	2.09	2.17	2.05
60	2.05	2.15	2.15	2.07	2.08	1.96	2.22	2.15
360	2.51	2.51	2.46	2.47	2.40	2.39	2.47	2.47
720	2.48	2.54	2.34	2.43	2.33	2.38	2.37	2.46

Tableau 30 : Evolution de la calcémie (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.

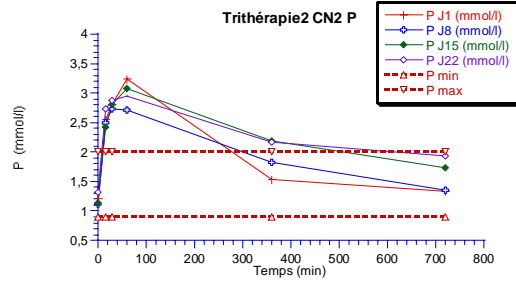
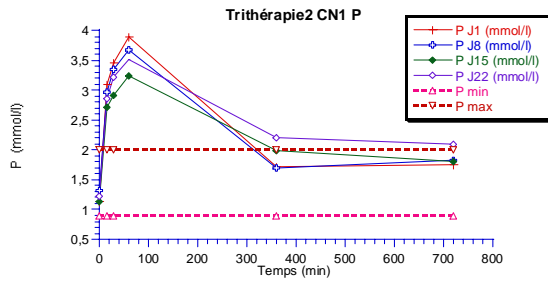


Figures 73 et 74 : Evolution de la calcémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- La phosphorémie augmente rapidement lors de la première heure et se normalise à partir de la sixième heure (la normalisation est peut être plus rapide mais nous ne disposons pas de temps intermédiaire) (fig. 75 et 76). Chez le chien 1, toutes les valeurs biochimiques sont supérieures à celles du chien 2.

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	P CN1 J1	P CN1 J8	P CN1 J15	P CN1 J22	P CN2 J1	P CN2 J8	P CN2 J15	P CN2 J22
0	1.14	1.32	1.13	1.23	1.2	1.12	1.14	1.31
15	3.09	2.96	2.71	2.86	2.55	2.49	2.42	2.74
30	3.46	3.34	2.92	3.22	2.80	2.74	2.81	2.88
60	3.90	3.68	3.24	3.51	3.24	2.71	3.08	2.94
360	1.72	1.70	1.98	2.21	1.53	1.83	2.18	2.17
720	1.76	1.83	1.80	2.09	1.33	1.35	1.74	1.93

Tableau 31 : Evolution de la phosphorémie (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.

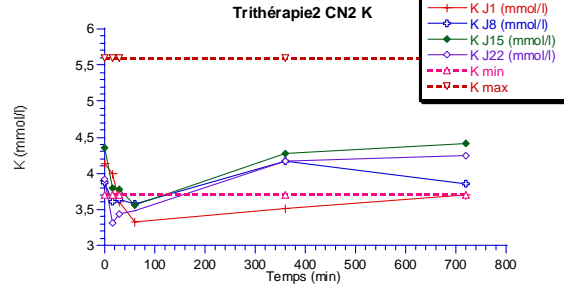
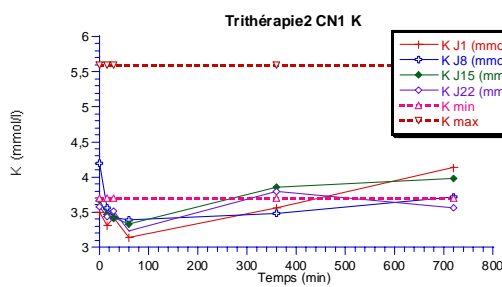


Figures 75 et 76 : Evolution de la phosphorémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- La kaliémie évolue comme précédemment avec une hypokaliémie transitoire. Cette hypokaliémie est moins marquée que chez les chiens 3 et 4 (fig. 77 et 78). Comme pour la tri-thérapie 1, on remarque que la kaliémie et la phosphorémie évoluent avec une cinétique similairement inversée, de même que la calcémie et les valeurs de la CP.

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	K CN1 J1	K CN1 J8	K CN1 J15	K CN1 J22	K CN2 J1	K CN2 J8	K CN2 J15	K CN2 J22
0	3.5	4.19	3.67	3.57	4.13	3.87	4.35	3.92
15	3.31	3.58	3.46	3.44	4.0	3.60	3.79	3.31
30	3.42	3.42	3.42	3.52	3.6	3.64	3.78	3.44
60	3.14	3.39	3.33	3.23	3.33	3.58	3.56	3.49
360	3.56	3.49	3.86	3.8	3.52	4.17	4.27	4.16
720	4.14	3.72	3.98	3.56	3.7	3.86	4.42	4.25

Tableau 32 : Evolution de la kaliémie (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.

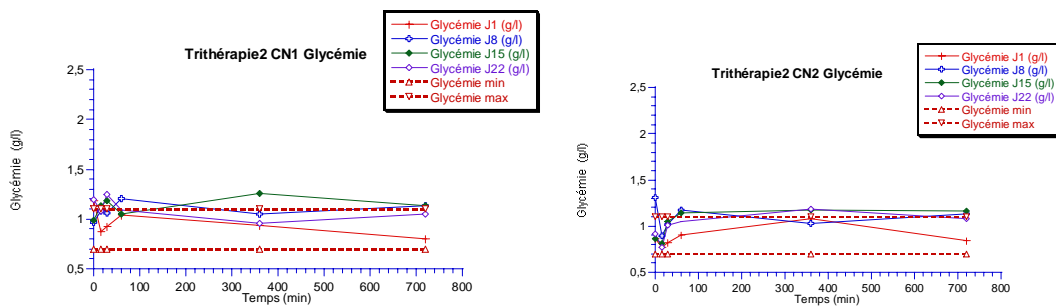


Figures 77 et 78 : Evolution de la kaliémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- La glycémie évolue selon les normes physiologiques, avec ingestion de repas 15 minutes après le début du traitement (fig. 79 et 80)

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	Gly CN1 J1	Gly CN1 J8	Gly CN1 J15	Gly CN1 J22	Gly CN2 J1	Gly CN2 J8	Gly CN2 J15	Gly CN2 J22
0	1.18	0.97	0.99	1.19	0.86	1.31	0.86	0.91
15	0.87	1.08	1.13	1.08	0.77	0.89	0.81	0.77
30	0.93	1.06	1.18	1.25	0.82	1.02	1.05	1.01
60	1.04	1.21	1.05	1.09	0.9	1.17	1.14	1.05
360	0.94	1.05	1.26	0.96	1.08	1.03	1.17	1.18
720	0.8	1.13	1.13	1.05	0.84	1.13	1.16	1.08

Tableau 33 : Evolution de la glycémie (g/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.

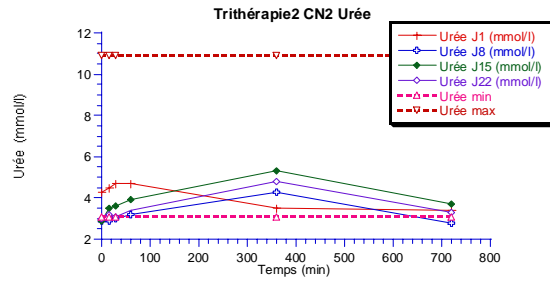
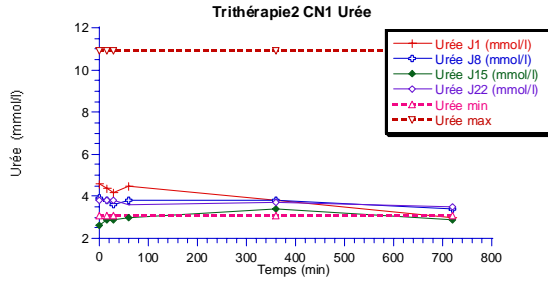


Figures 79 et 80 : Evolution de la glycémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- L'urée reste dans les normes physiologiques (fig. 81 et 82) ; la créatininémie augmente sur une même cinétique que la phosphorémie et la CP, et se normalise dès la sixième heure (fig. 83 et 84).

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	Urée CN1 J1	Urée CN1 J8	Urée CN1 J15	Urée CN1 J22	Urée CN2 J1	Urée CN2 J8	Urée CN2 J15	Urée CN2 J22
0	4.6	3.9	2.6	3.8	4.3	2.9	2.9	3.0
15	4.4	3.8	2.9	3.8	4.5	2.9	3.5	3.2
30	4.2	3.6	2.9	3.8	4.7	3.0	3.6	3.1
60	4.5	3.8	3.0	3.6	4.7	3.2	3.9	3.4
360	3.8	3.8	3.4	3.7	3.5	4.3	5.3	4.8
720	3.0	3.4	2.9	3.5	3.4	2.8	3.7	3.3

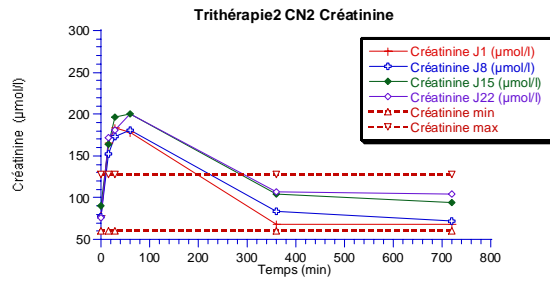
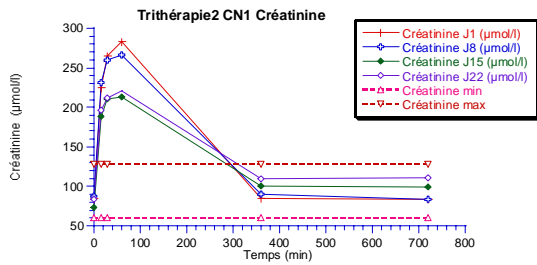
Tableau 34 : Evolution de l'urée (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.



Figures 81 et 82 : Evolution de l'urémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	Créat CN1 J1	Créat CN1 J8	Créat CN1 J15	Créat CN1 J22	Créat CN2 J1	Créat CN2 J8	Créat CN2 J15	Créat CN2 J22
0	84.5	87.8	739.	84.3	78.7	77.2	90.0	75.6
15	224.9	231.5	188.5	196.4	165.6	151.9	163.5	171.4
30	264.5	260.5	211	212.4	183.1	172.5	196.9	181.1
60	283.2	266	213.5	220.4	178.3	181.3	200	200.4
360	85.1	90.0	100.5	109.6	67.9	83.5	104.5	107
720	83.7	84.1	99.9	110.8	68.8	71.6	93.6	103.9

Tableau 35 : Evolution de la créatininémie ($\mu\text{mol/l}$) des chiens 1 et 2 sur 12 h.

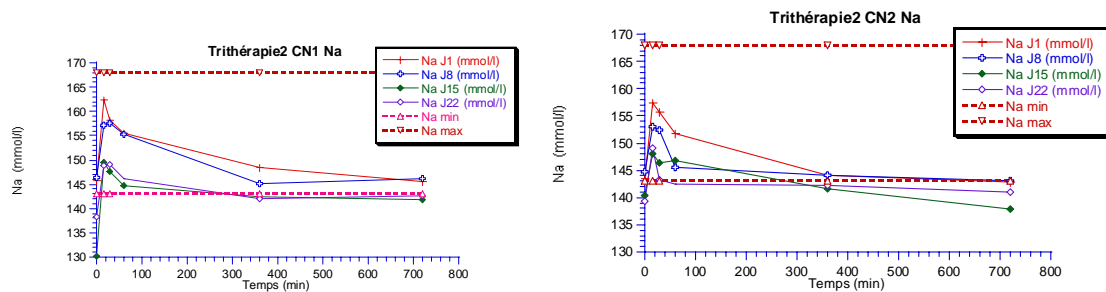


Figures 83 et 84 : Evolution de la créatininémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- La natrémie évolue dans la gamme physiologique, avec une discrète hyponatrémie en fin de traitement à J15 et J22 chez le chien 4 (fig. 85 et 86).

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	Na CN1	Na CN1	Na CN1	Na CN1	Na CN2	Na CN2	Na CN2	Na CN2
	J1	J8	J15	J22	J1	J8	J15	J22
0	145.8	146.4	130.3	138.3	143.4	144.8	140.3	139.3
15	162.3	157.2	149.5	148.9	157.4	153.1	148.1	149
30	158.2	157.6	147.6	149	155.8	152.4	146.4	143.3
60	155.5	155.3	144.8	146.1	151.7	145.5	146.7	142.4
360	148.5	145.2	142.4	142.1	144	144	141.6	142.2
720	145.5	146.2	141.8	142.7	142.8	143.1	137.8	141

Tableau 36 : Evolution de la natrémie (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.



Figures 85 et 86 : Evolution de la natrémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- De façon similaire à la tri-thérapie 1, on observe une légère hypochlorémie à T15 sur les deux chiens (fig. 87 et 88).

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	Cl CN1	Cl CN1	Cl CN1	Cl CN1	Cl CN2	Cl CN2	Cl CN2	Cl CN2
	J1	J8	J15	J22	J1	J8	J15	J22
0	112.6	113.3	101.8	106.7	110.6	111.1	108.7	104.3
15	101.5	104.1	104.0	102.4	103	106.3	104.3	101.5
30	109.5	108.1	107.7	107.8	109.2	108.9	106.6	102.2
60	114.5	113.1	110.6	109	110.8	109	108.9	106.2
360	117.5	111.5	110.8	110.3	111.8	114.2	112.2	113.9
720	115.0	114.5	113.5	111.1	111.8	115.9	112.4	111.9

Tableau 37 : Evolution de la chlorémie (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.

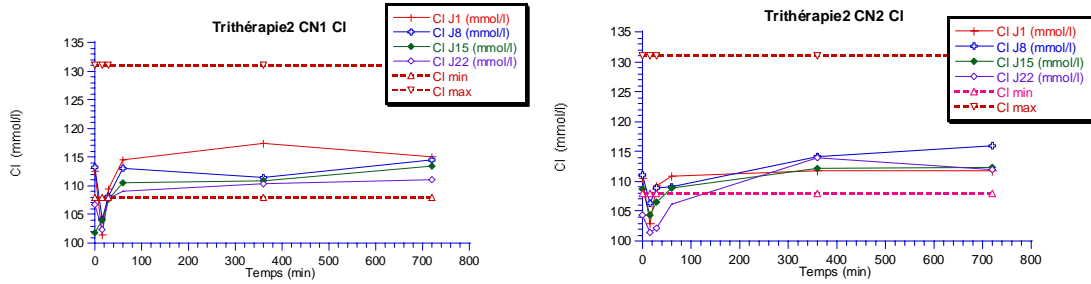
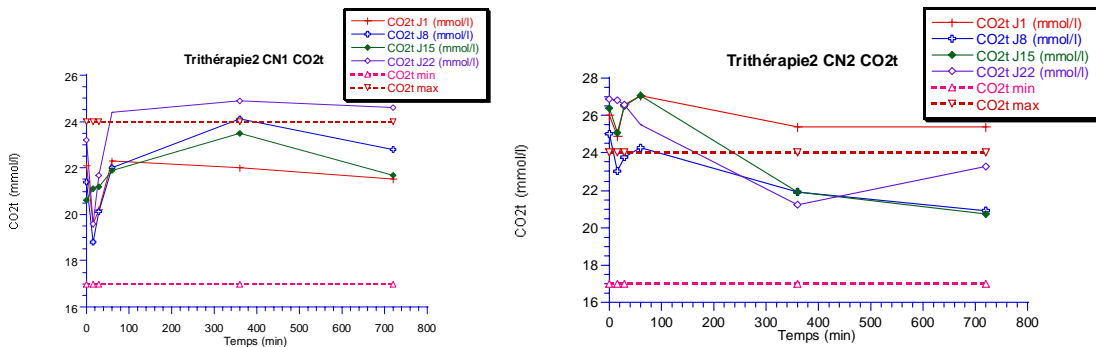


Figure 87 et 88 : Evolution de la chlorémie des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- Sur les courbes de la réserve alcaline, on observe une tendance à l'alcalose plus marquée chez le chien 2, avec toujours une normalisation en fin de traitement (fig. 89 et 90).

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	CO2t CN1 J1	CO2t CN1 J8	CO2t CN1 J15	CO2t CN1 J22	CO2t CN2 J1	CO2t CN2 J8	CO2t CN2 J15	CO2t CN2 J22
0	22.1	21.4	20.6	23.2	26.0	25.0	26.4	26.9
15	19.6	18.8	21.1	19.6	24.9	23.0	25.1	26.8
30	20.2	20.1	21.2	21.7	26.6	23.8	26.5	26.6
60	22.3	22.0	21.9	24.4	27.1	24.3	27.1	25.5
360	22.0	24.1	23.5	24.9	25.4	21.9	21.9	21.2
720	21.5	22.8	21.7	24.6	25.4	20.9	20.7	23.3

Tableau 38 : Evolution de la réserve alcaline (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.



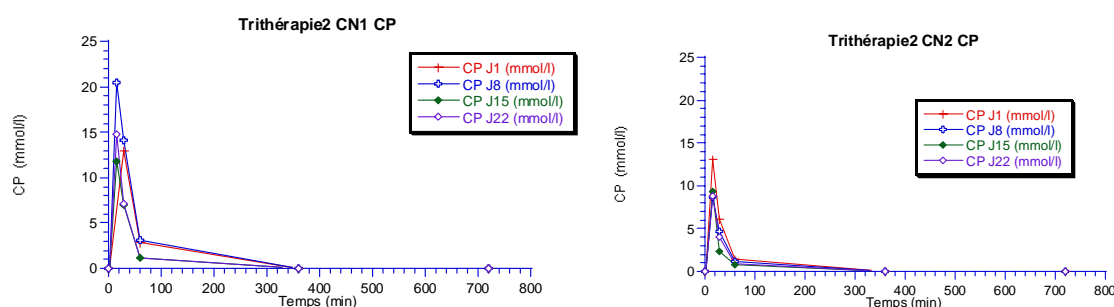
Figures 89 et 90 : Evolution de la réserve alcaline des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

- Les courbes de la CP suivent exactement la même cinétique que pour la trithérapie 1 ; un temps de demi vie de 30 minutes et une disparition au delà de la sixième heure. Que la CP soit administrée en bolus seule à 1200 mg/kg ou en bolus à 1200 mg/kg suivi d'une perfusion continue à 900 mg/kg, sa cinétique est identique et ses valeurs aussi. La valeur du pic oscille entre 11 et 21 mmol/l pour le chien 1, la valeur la plus forte étant obtenue avec le bolus seul ; et pour le chien 2, elle oscille entre 9 et 13 mmol /l, la valeur maximale étant aussi obtenue avec l'injection en bolus seule (fig. 91 et 92). On

n'observe pas de différence majeure entre l'injection en bolus à 900 mg/kg de la tri-thérapie 1, l'injection en bolus à 1200 mg/kg ou l'injection en bolus à 1200 mg/kg suivie de la perfusion continue à 900 mg/kg. En espérant toujours obtenir la concentration permettant l'inhibition de la croissance tumorale de 12 mmol/l, on pourrait se satisfaire d'une injection bolus à 900 mg/kg voire 1200 mg/kg.

Temps (min)	Chien 1				Chien 2			
	CP CN1 J1	CP CN1 J8	CP CN1 J15	CP CN1 J22	CP CN2 J1	CP CN2 J8	CP CN2 J15	CP CN2 J22
0	0	0	0	0	0	0	0	0
15		20.44	11.73	14.76	13.15	8.65	9.28	8.77
30	12.93	14.13	6.97	7.12	6.09	4.73	2.4	4.07
60	2.89	3.05	1.19	1.14	1.46	1.12	0.84	0.9
360	0	0	0.05	0.04	0	0	0	0
720	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 39 : Evolution de la CP (mmol/l) des chiens 1 et 2 sur 12 h.



Figures 91 et 92 : Evolution de la CP des chiens 1 et 2 sur 12 heures.

7.2.8. Discussion

Pour la partie concernant la tolérance de la CP, nous observons qu'elle est excellente. Concernant sa pharmacocinétique, nous avons calculé graphiquement une demi-vie d'environ trente minutes, le pic plasmatique apparaît entre quinze et vingt minutes puis la molécule est rapidement indétectable au bout de trois heures. Ces résultats (aussi peu fiables qu'ils soient sur seulement deux animaux) confirment la cinétique donnée par les études chez l'homme (essai humain clinique de phase I de la CP seule). Les courbes représentant l'évolution de la phosphorémie nous montrent un pic à environ T 15 min. Si on suppose une métabolisation de la CP en créatine et ions phosphates, nous pouvons expliquer la similitude entre les deux courbes de CP et phosphorémie. Cependant, nous n'avons aucune donnée scientifique pour justifier cette hypothèse. Il nous faudrait étudier la biodisponibilité de cette molécule avec des molécules marquées. D'après les études humaines, on observe dans plus de 50% des cas une hypokaliémie et une hypocalcémie transitoires après injection de CP(cf 6.2.1). On retrouve ces deux phénomènes sur nos courbes.

La tolérance à la CPK est excellente. Sa cinétique se présente sous forme d'un pic entre quinze et trente minutes, puis une phase de décroissance lente. L'obtention rapide de fortes de valeurs de CPK *in vivo* semble encourageante si on se base sur l'hypothèse du paragraphe 5.2.5 expliquant que les xénogreffes tumorales à contenu cellulaire riche en CPK seraient plus sensibles à l'action anti-tumorale de la CP.

La tolérance à l'ATP est excellente, cependant on observe un épisode d'abattement passager en début de traitement.

Concernant la tri-thérapie 1, l'étude de la CPK nous montre des courbes similaires à celles obtenues lors de l'injection de CPK seule. Nous retrouvons, comme dans les essais humains, une hypokaliémie et une hypocalcémie transitoires. Si on observe les courbes représentant l'évolution de la kaliémie, de la phosphorémie, de la calcémie, de la créatininémie et de la CP, on remarque que l'hypokaliémie et l'hypocalcémie se situent à peu près aux mêmes temps que les pics de CP, phosphorémie et créatininémie. Les courbes de la CP nous révèlent un pic très effilé, avec de valeurs (de 6,5 à 15 mmol/l) laissant supposer une possible efficacité anti-tumorale de cette molécule. On notera aussi l'apparition sur les tracés des ECG d'un sous-décalage ST pour le chien 3. Ce phénomène semble être sans conséquences physiologiques mais il n'apparaissait pas en début de traitement.

Concernant la tri-thérapie 2, on retrouve ce sous décalage ST pour le chien 1, qui est encore présent deux semaines après l'arrêt des injections. Les autres données sont similaires à celles obtenues lors de la tri-thérapie 1. Le but de cette seconde série d'injections était d'obtenir un pic plus élevé de CP ou à décroissance moins rapide grâce à la perfusion continue. Cependant les courbes sont très similaires. Il semblerait qu'une injection bolus plus importante permette des valeurs légèrement supérieures. Malheureusement, il apparaît nettement (chez nos deux seuls animaux) que la perfusion continue ne provoque pas un taux basal de CP, la molécule était indétectable après six heures de perfusion. Néanmoins, les valeurs de CP étant toujours supérieures à 5 mmol/l lors des différents pics, il est fortement envisageable que cette tri-thérapie ait une efficacité anti-tumorale.

7.3. EXPERIMENTATION DE PHASE II CHEZ LE CHIEN ATTEINT DE CANCER EVOLUE

7.3.1. Présentation des animaux

a) Nombre d'animaux prévus

Le nombre d'animaux prévus pour ce protocole est de cinq chiens.

b) Critères d'inclusion

Ces chiens appartiennent à des clients du Centre de Radiothérapie-Scanner de l'Ecole Vétérinaire. Ils sont atteints de pathologie tumorale à un stade avancé et incurables par les thérapeutiques classiques (radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie).

Ces pathologies doivent se prêter facilement à une évaluation clinique et/ou radiologique :

- tumeurs mammaires avec nodules de perméation localement étendus ;
- glioblastome,
- mastocytome,
- cancer prostatique.

c) Critères d'exclusion

Sont exclus du protocole, les animaux présentant une tare viscérale grave antérieurement connue ou un âge avancé (supérieur ou égal à 10 ans).

d) Présentation des animaux malades

Notre première chienne **Diane**, croisée Beagle de 9 ans, avait subi une exérèse de tumeurs mammaires, sans histologie, et présentait une carcinose cutanée qui s'étendait le long de la cicatrice de la chaîne gauche sur la moitié antérieure provoquant un œdème du membre antérieur gauche. Diane était à un stade terminal avec une altération importante de l'état général. La radiographie thoracique ne montrait pas de métastases radiologiquement visibles.

Judy, une chienne Loulou de 8 ans, présentait des tumeurs mammaires de M1 à M3 sur la chaîne mammaire droite avec une carcinose cutanée inflammatoire (cf photo 2 et 3). La radiographie thoracique révélait la présence de 3 métastases de taille inférieure à 8 mm,

Lola, croisée Labrador et Berger Allemand de 7 ans, présentait des tumeurs mammaires en M4 et M5 sur la chaîne mammaire gauche (adénocarcinome) avec une carcinose cutanée inflammatoire (cf photo 7 et 8), une plaque de 2 cm de diamètre érythémateuse et purulente au niveau de la pointe de la fesse gauche marquant une infiltration profonde de la carcinose (cf photo 9), et un discret œdème à l'extrémité de

l'antérieur gauche (cf photo 10). La radiographie thoracique ne montrait pas de métastases radiologiquement visibles.

Notre quatrième chienne, **Nolly** (photo 14), Schnauzer nain de 8 ans, avait subi une excision de tumeurs mammaires (adénocarcinome), et présentait une carcinose cutanée très infiltrante sur la chaîne mammaire gauche et purulente à l'extrémité antérieure de la cicatrice (cf photos 14 et 15). Cette carcinose était douloureuse et lui provoquait une boiterie sans appui du membre antérieur gauche. La radiographie thoracique ne montrait pas de métastases radiologiquement visibles.

La cinquième chienne, **Lutèce** (photo 18), Berger Allemand de 6 ans, souffrait d'un carcinome tubulo-papillaire et trabéculaire au niveau de l'épaule gauche, opéré un an avant et présentant une carcinose cutanée inflammatoire et purulente très infiltrante s'étendant de l'épaule gauche à la moitié du cou (cf photo 19 et 20).

7.3.2. Durée du traitement

La durée initiale de traitement prévue est de un mois et comprend cinq traitements à une semaine d'intervalle.

7.3.3. Modalités techniques de l'administration de la trithérapie et posologies

Pour le premier chien DIANE, nous avons suivi le protocole suivant :

Chaque traitement de 12 heures, répété cinq fois à une semaine d'intervalle, comporte successivement :

- A T0, la mise en place d'une perfusion d'ATP pour 12 heures, à la posologie de 75µg/kg/min, dans une poche Ultraflow®,
- Puis, successivement, une injection IV rapide (3 minutes) de CPK, à la posologie de 250 UI par kg de poids corporel, par l'intermédiaire d'un filtre 0,2 micron dans la tubulure d'ATP,
- puis l'injection IV rapide (3 à 5 minutes) de CP à la posologie de 1200 mg/kg de poids corporel, dans la tubulure de la perfusion d'ATP,

Pour les trois chiens suivants, JUDY, LOLA et NOLLY, nous avons choisi un protocole délivrant plus de CP :

Chaque traitement de 12 heures, répété cinq fois à une semaine d'intervalle, comporte successivement :

- à T0, la mise en place d'une perfusion d'ATP pour 12 heures, à la posologie de 75µg/kg/min, dans une poche Ultraflow®,
- puis, successivement, une injection IV rapide (3 minutes) de CPK, à la posologie de 250 UI par kg de poids corporel, par l'intermédiaire d'un filtre 0,2 micron dans la tubulure d'ATP,
- puis l'injection IV rapide (3 à 5 minutes) de CP à la posologie de 1200 mg/kg de poids corporel, dans la tubulure de la perfusion d'ATP,
- et ensuite la mise en place d'une perfusion de CP pour 12 heures, à la posologie de 900 mg/kg, dans la tubulure de la perfusion d'ATP, à l'aide d'une poche Ultraflow®.

Pour le dernier chien, LUTECE, nous avons réduit le protocole à l'utilisation de CPK et CP .

Chaque traitement de 12 heures, répété cinq fois à une semaine d'intervalle, comporte successivement :

- à T0, une injection IV rapide (3 minutes) de CPK, à la posologie de 250 UI par kg de poids corporel, par l'intermédiaire d'un filtre 0,2 micron,
- puis l'injection IV rapide (3 à 5 minutes) de CP à la posologie de 1200 mg/kg de poids corporel, dans la tubulure de la perfusion de la CPK.

A chaque traitement, pour tous les chiens, sont réalisés :

- une surveillance de 48 heures, (avec réalisation de clichés radiographiques si nécessaire)
- des prélèvements sanguins (10 ml par prise),
aux temps T0, T15 min, T30 min, T60 min et T12 heures,
pour les dosages de CP, CPK, phosphorémie, urémie, créatininémie, réserve alcaline, ionogramme ; une NFS est réalisée à T0 et T12 heures.

7.3.4. Dépistage des effets secondaires éventuels et évaluation de la tolérance

- Concernant Diane, lors de chaque traitement, de J1 à J29, nous n'avons pas observé d'abattement à l'induction mais des épisodes de vomissements entre vingt et trente minutes après induction à J8, J15 et J29.
Les examens cliniques réalisés avant chaque traitement ne nous ont pas révélé d'autres troubles en cours de cure.
L'œdème du membre antérieur gauche a nettement régressé entre J8 et J15 pour revenir à son stade initial à J22 et J29.
Les propriétaires nous ont signalé une amélioration de l'état général avec reprise d'appétit et de vigueur entre J15 et J22 ce qui peut nous laisser supposer une action bénéfique du traitement.
Diane est décédée une semaine après J29 chez son vétérinaire traitant qui a diagnostiqué un œdème aigu du poumon. Son espérance de vie qui était estimée entre une semaine et dix jours avant traitement a donc été prolongée de trois semaines avec une qualité de vie améliorée.
- Concernant Judy, lors de chaque traitement, nous avons retrouvé l'épisode d'abattement de cinq à dix minutes, dans le quart d'heure qui suit l'induction. Des épisodes de vomissements étaient systématiques après vingt minutes de traitement, puis dans la journée après chaque abreuvement. Cependant, le repas du matin et du soir ne provoquait pas de vomissements (entre T30 et T60, et après T12 heures).
Sur le plan clinique, nous avons observé une nette amélioration à J8 et J15 avec régression des carcinoses visibles (photos 4) et l'absence d'inflammation. Les propriétaires nous ont signalé une amélioration de l'état général entre J4 et J15. Cependant nous avons dû interrompre le traitement après J22. En effet, à J22, on

notait une reprise discrète de la carcinose cutanée (cf photo 5) et une légère dégradation de l'état général avec un début d'essoufflement et de fatigue après un effort modéré. Lors de son dernier traitement prévu à J29, les propriétaires nous ont signalé une fatigue importante avec diminution de l'appétit. La chienne était en dyspnée, nous avons donc effectué une radiographie thoracique avant traitement qui a révélé la présence de multiples métastases dans tout le champ pulmonaire. L'intensification de la carcinose cutanée est remarquable macroscopiquement de J22 (photo 5) à J29 (photo 6). De ce fait, le dernier traitement n'a pas eu lieu. Les propriétaires ont fait euthanasier Judy les jours suivants. L'espérance de vie de Judy estimée à un mois avant traitement n'a pas été améliorée mais sa qualité de vie pendant quinze jours était nettement meilleure.

- Concernant Lola, on a observé les mêmes épisodes de vomissements après vingt minutes de traitement et à chaque prise de boisson jusqu'à T 6 heures. On retrouve aussi le même abattement passager lors du début du traitement. Sur le plan clinique, il y a eu une très nette amélioration à J8 et J15 avec régression des carcinoses visibles et surtout diminution de l'inflammation associée (photo 11), diminution de la plaque sur la fesse gauche et de l'œdème du membre antérieur gauche (photos 11 et 12). Cependant, nous avons dû arrêter le traitement après J15 car Lola présentait une dégradation rapide de l'état général avec reprise de carcinose très inflammatoire, augmentation de la taille et début de nécrose (pyodermite profonde) au niveau de la plaque cutanée (photo 13), abattement, dysorexie, dyspnée. Lola est décédée deux jours plus tard chez ses propriétaires d'un œdème aigu du poumon. Son espérance de vie très limitée avant traitement (inférieure à une semaine) a été augmentée avec une nette amélioration de la qualité de vie pendant quinze jours.



Photo 2 :Judy



Photo 3 : carcinose cutanée à J0



Photo 4 : carcinose cutanée à J15

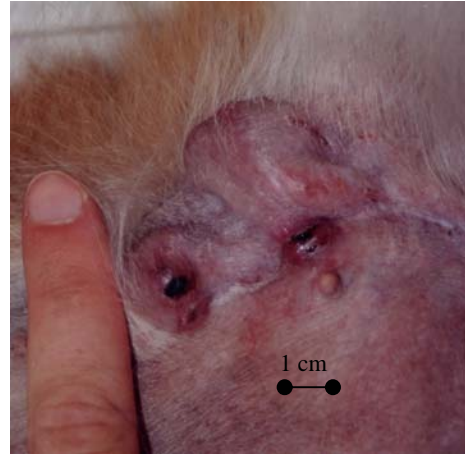


Photo 5 : carcinose cutanée à J22



Photo 6 : carcinose cutanée à J29



Photo 7 : Lola



Photo 8 : carcinose cutanée à J0



Photo 9 : Pyodermite à J0



Photo 10 : Œdème du membre antérieur gauche à J0



Photo 11 : carcinose cutanée à J15



Photo 12 : Absence d'œdème à J15



Photo 13 : Pyodermite profonde et étendue à J22

- Concernant Nolly, il n'y a pas eu d'épisodes d'abattement lors de l'induction, mais des vomissements systématiques et fréquents à partir de cinquante minutes après induction et à chaque abreuvement. Ces vomissements disparaissaient entre six et huit heures après induction. Sur le plan clinique, il n'y a eu aucune amélioration visible, ni sur la carcinose, ni sur l'état général (cf photos 16 et 17). Nolly est décédée à J22, pendant le traitement à T5 heures d'œdème aigu du poumon. Son espérance de vie estimée à quinze jours avant traitement n'a malheureusement subi aucune modification, de même que sa fin de vie qui a toujours été très algique. La chienne ne recevait aucun traitement antalgique pour ne pas interférer avec le protocole.



Photo 14 : Nolly



Photo 15 : carcinose cutanée à J0

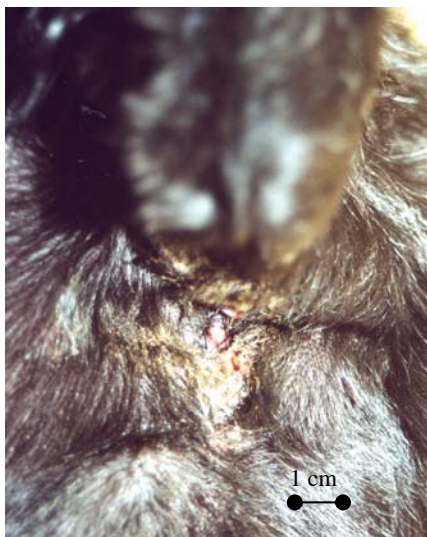


Photo 16 : carcinose cutanée à J15



Photo 17 : carcinose cutanée à J22

- Concernant Lutèce, il n'y a pas eu d'épisodes d'abattement suite à l'induction, et aucun vomissements lors des traitements. Cependant il n'y a eu aucune amélioration cliniquement décelable de J1 à J29 sur le plan de la carcinose cutanée, cette dernière s'étendant et se nécrosant au fur et à mesure (cf photos 21). Lutèce présentait un œdème du membre antérieur gauche que nous n'avons pas retrouvé dès J8, il est réapparu ponctuellement à J22. A J29, la chienne était fatigué, essoufflée, une radiographie du thorax n'a montré aucune anomalie ce jour là. Lutèce n'est pas décédée suite au traitement, les propriétaires l'ont fait euthanasier quand l'état général de la chienne le nécessitait (deux mois après la fin du traitement). Son espérance de vie estimée à un mois avant traitement a donc été multipliée par trois dans des conditions de vie tout à fait acceptable pour les propriétaires et l'animal.



Photo 18 : Lutèce



Photo 19 : Carcinose cutanée étendue à J0



Photo 20 : carcinose cutanée à J0
(vue rapprochée)



Photo 21 : carcinose cutanée à J29

7.3.5. Résultats biologiques

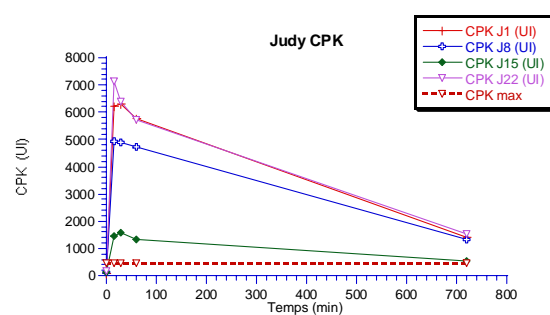
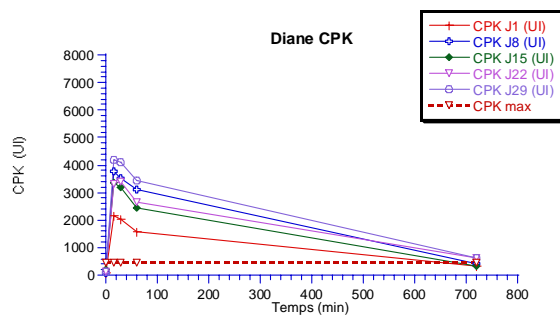
- La cinétique de la CPK est toujours la même, avec un pic situé entre 15 et 30 minutes, puis une décroissance lente jusqu'à T12 heures. On remarquera cependant, que les valeurs maximales atteintes sont nettement inférieures à celles obtenues avec les chiens sains. On observe même un pic très aplati chez Judy pour J15 avec une valeur maximale à 1581 UI/L (fig. 93 à 97). On ne peut pas dire qu'il y ait un effet d'amplification avec les traitements comme le protocole de Diane le laisserait supposer car chez Lola et Lutèce, la valeur maximale est obtenue dès J1. Pour Nolly, on observe une superposition de toutes les courbes sauf à J22 où les valeurs sont nettement inférieures.

Tps (min)	Diane					Lutèce				
	CPK J1	CPK J8	CPK J15	CPK J22	CPK J29	CPK J1	CPK J8	CPK J15	CPK J22	CPK J29
0	88	85	189	130	133	158	126	57	68	80
15	2152	3774	3345	3309	4199	4070	3442	2503	2333	2918
30	2050	3544	3181	3419	4088	4121	3212	4255	2384	2644
60	1583	3121	2435	2652	3435	3525	2834	2191	2112	2342
720	322	425	325	635	624	910	535	409	464	578

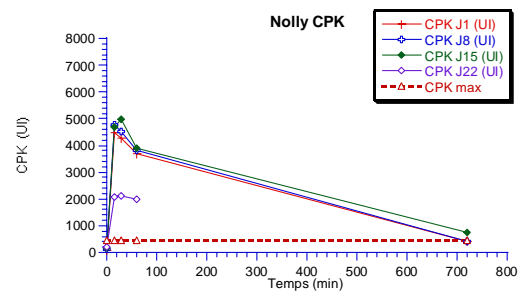
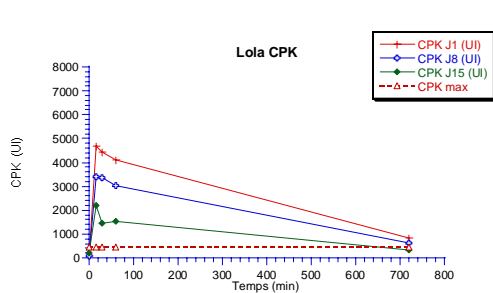
Tableau 40 : Evolution de la CPK (UI) de Diane et Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	CPK J1	CPK J8	CPK J15	CPK J22	CPK J1	CPK J8	CPK J15	CPK J1	CPK J8	CPK J15	CPK J22
0	80	145	114	155	92	78	207	85	119	183	216
15	6240	4927	1468	7143	4674	3389	2212	4469	4785	4677	2055
30	6284	4878	1581	6380	4420	3341	1464	4256	4534	4964	2124
60	5743	4733	1315	5730	4120	3022	1552	3681	3820	3885	2010
720	1405	1309	521	1546	835	636	341	422	420	767	DCD

Tableau 41: Evolution de la CPK (UI) de Judy, Lola et Nolly.



Figures 93 et 94 : Evolution de la CPK de Diane et Judy sur 12 heures.



Figures 95 et 96 : Evolution de la CPK de Lola et Nolly sur 12 heures.

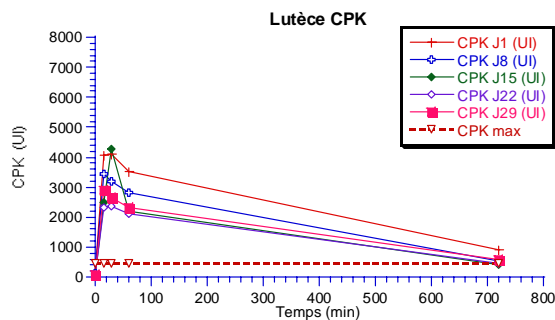


Figure 97 : Evolution de la CPK de Lutèce sur 12 heures.

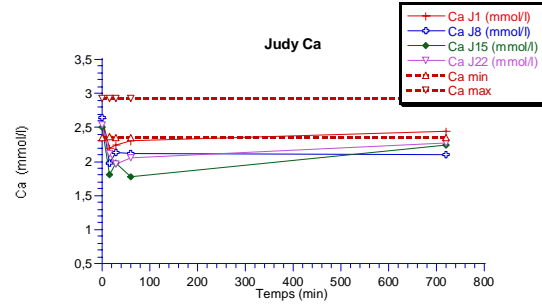
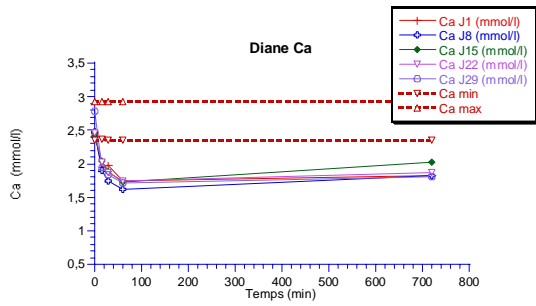
- En ce qui concerne la calcémie, on observe une nette hypocalcémie chez Diane, Lola et Nolly, plus discrète chez Judy, quasi imperceptible chez Lutèce (fig. 98 à 102). D'après la bibliographie, on connaissait la propriété hypocalcémiante de la CP, il se trouve que cette propriété est exacerbée chez les chiens cancéreux. Le retour à une calcémie normale est beaucoup plus lent que chez les chiens sains, cependant au début de chaque traitement, on retrouve une calcémie normale. Pour Nolly, à J22, on observe une hypocalcémie très importante avec une chute de 2,73 mmol/l à 0,92 mmol/l en quinze minutes le jour de son décès.

Tps (min)	Diane					Lutèce				
	Ca J1	Ca J8	Ca J15	Ca J22	Ca J29	Ca J1	Ca J8	Ca J15	Ca J22	Ca J29
0	2.45	2.47	2.42	2.46	2.78	2.71	2.75	2.73	2.85	2.84
15	1.94	1.90	2.04	2.02	1.94	2.43	2.3	2.18	2.36	2.34
30	1.97	1.74	1.89	1.87	1.84	2.42	2.37	2.3	2.37	2.3
60	1.75	1.62	1.73	1.74	1.71	2.26	2.36	2.27	2.38	2.28
720	1.82	1.82	2.02	1.87	1.81	2.65	2.72	2.71	2.64	2.71

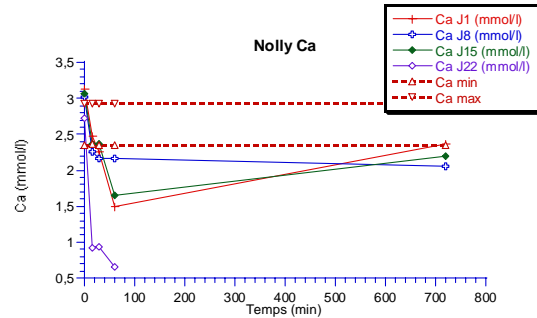
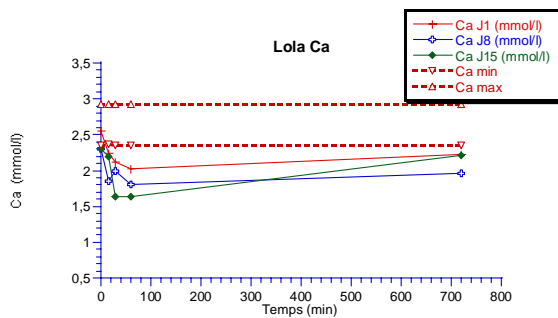
Tableau 42 : Evolution de la Calcémie (mmol/l) de Diane et Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	Ca J1	Ca J8	Ca J15	Ca J22	Ca J1	Ca J8	Ca J15	Ca J1	Ca J8	Ca J15	Ca J22
0	2.63	2.64	2.50	2.53	2.56	2.31	2.30	3.13	3.02	3.06	2.73
15	2.19	1.98	1.80	2.11	2.24	1.85	2.19	2.47	2.25	2.36	0.92
30	2.24	2.14	1.98	1.96	2.12	1.99	1.63	2.25	2.16	2.36	0.94
60	2.31	2.12	1.78	2.06	2.03	1.81	1.63	1.5	2.16	1.65	0.66
720	2.45	2.10	2.24	2.28	2.22	1.96	2.21	2.36	2.06	2.19	DCD

Tableau 43 : Evolution de la Calcémie (mmol/l) de Judy, Lola et Nolly.



Figures 98 et 99 : Evolution de la calcémie de Diane et Judy sur 12 heures.



Figures 100 et 101 : Evolution de la calcémie de Lola et Nolly sur 12 heures.

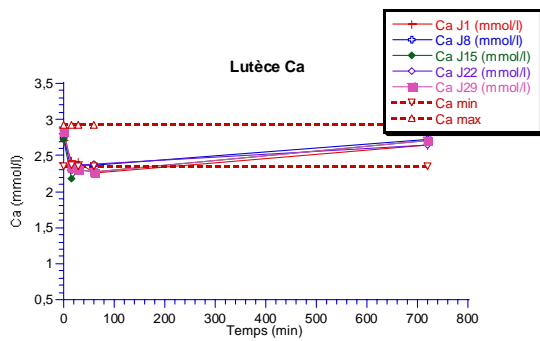


Figure 102 : Evolution de la calcémie de Lutèce sur 12 heures.

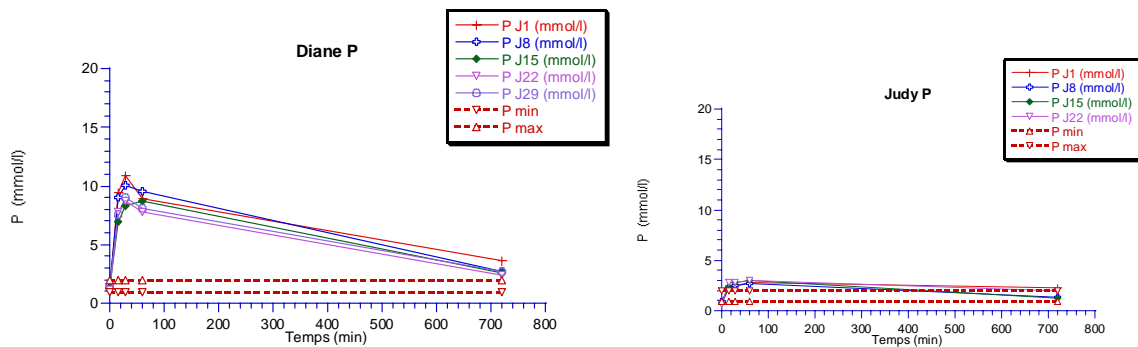
- La phosphorémie augmente de façon significative selon la même cinétique que chez les chiens sains. Cependant, on remarque qu'elle atteint des valeurs très élevées chez Diane (entre 8,3 et 11,85 mmol/l) (fig. 103 à 107), pour se régulariser en fin de traitement. Pour Nolly, on observe des valeurs très élevées qui augmentent au fur et à mesure des traitements (pic de 10,06 à 19,54 mmol/l).

Tps (min)	Diane					Lutèce				
	P J1	P J8	P J15	P J22	P J29	P J1	P J8	P J15	P J22	P J29
0	1.27	1.33	1.32	1.15	1.50	1.22	1.36	1.08	1.49	1.42
15	9.42	8.98	6.9	7.79	7.56	2.66	2.90	2.90	3.24	3.15
30	10.85	10.07	8.3	8.75	8.97	3.06	3.11	3.13	3.31	3.20
60	8.87	9.55	8.66	7.77	8.11	3.16	3.32	3.27	3.43	3.26
720	3.6	2.65	2.6	2.43	2.71	1.45	1.50	1.70	1.63	1.85

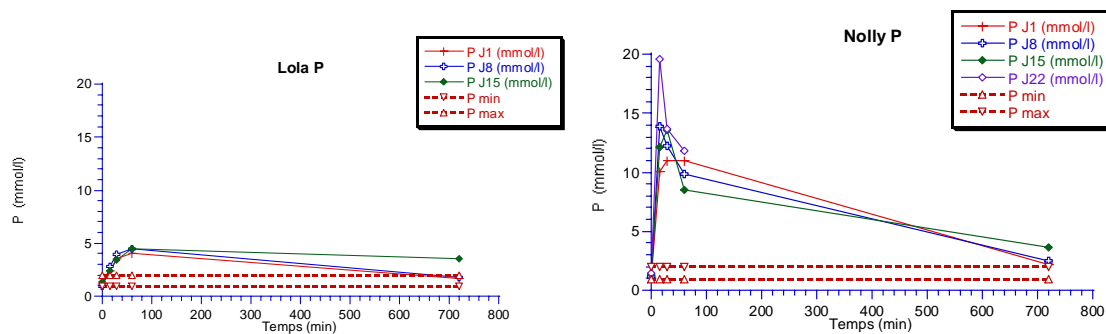
Tableau 44 : Evolution de la Phosphorémie (mmol/l) de Diane et Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	P J1	P J8	P J15	P J22	P J1	P J8	P J15	P J1	P J8	P J15	P J22
0	0.76	0.97	0.87	0.63	1.08	0.90	1.34	1.02	1.17	1.37	1.45
15	2.3	2.37	2.29	2.85	2.36	2.77	2.40	10.06	13.85	12.12	19.54
30	2.47	2.52	2.83	2.80	3.57	3.92	3.47	11.04	12.27	13.55	13.67
60	2.85	2.72	2.99	3.02	4.0	4.49	4.46	10.97	9.86	8.51	11.83
720	2.24	1.38	1.30	1.93	1.71	1.77	3.57	2.14	2.53	3.59	DCD

Tableau 45 : Evolution de la Phosphorémie (mmol/l) de Judy, Lola et Nolly.



Figures 103 et 104 : Evolution de la phosphorémie de Diane et Judy sur 12 heures.



Figures 105 et 106 : Evolution de la phosphorémie de Lola et Nolly sur 12 heures.

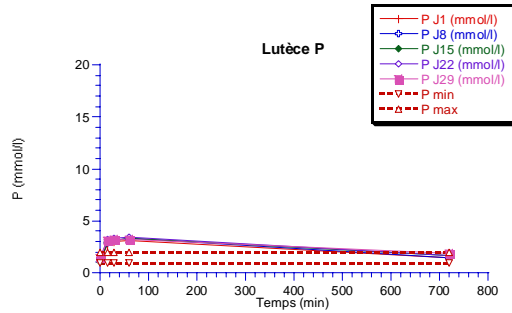


Figure 107 : Evolution de la phosphorémie de Lutèce sur 12 heures.

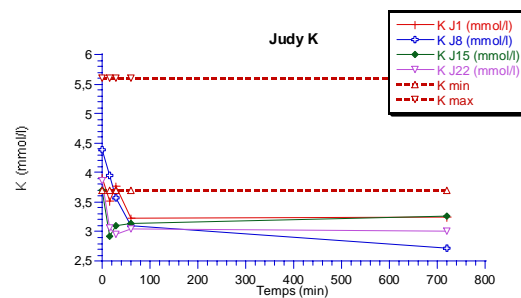
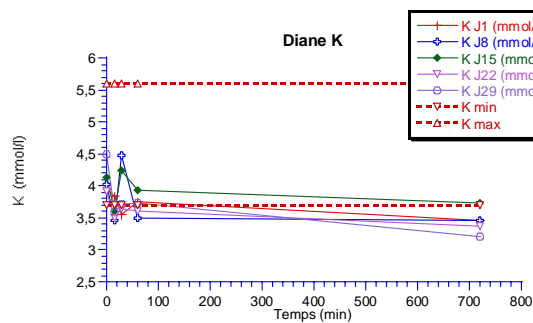
- Chez nos chiens malades, nous ne retrouvons pas tout à fait la même cinétique pour la kaliémie. En effet, l'hypokaliémie de début de traitement, suite à l'injection de CP hypokaliémante, dans les essais humains, est moins marquée, cependant elle dure plus longtemps et ne se normalise pas en fin de traitement. Cette hypokaliémie est plus marquée chez Judy, Nolly et Lola (fig. 108 à 112).

Tps (min)	Diane					Lutèce				
	K J1	K J8	K J15	K J22	K J29	K J1	K J8	K J15	K J22	K J29
0	3.96	4.02	4.14	3.91	4.5	4.14	4.14	4.28	3.96	4.63
15	3.85	3.47	3.60	3.50	3.58	4.29	3.99	3.96	3.88	3.53
30	3.55	4.48	4.24	3.65	3.72	4.16	3.98	3.99	3.63	3.63
60	3.75	3.50	3.93	3.60	3.73	3.85	3.71	3.73	3.64	3.26
720	3.47	3.46	3.73	3.38	3.20	3.86	4.49	3.96	3.99	3.76

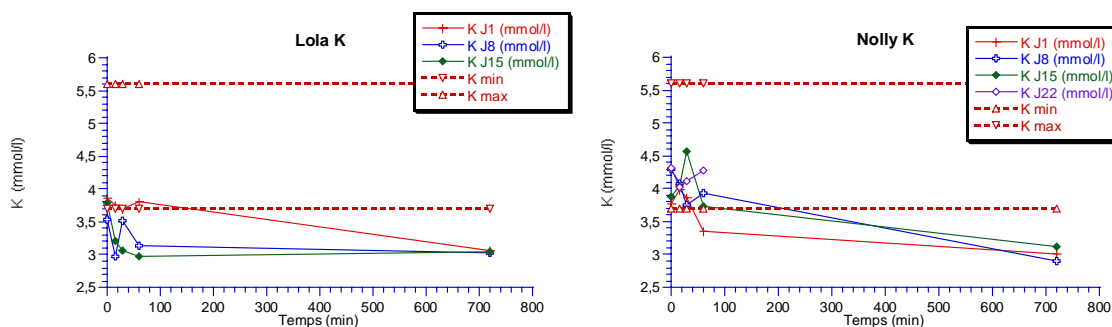
Tableau 46 : Evolution de la Kaliémie (mmol/l) de Diane et Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	K J1	K J8	K J15	K J22	K J1	K J8	K J15	K J1	K J8	K J15	K J22
0	3.91	4.36	3.69	3.86	3.86	3.554	3.79	3.77	4.29	3.88	4.32
15	3.51	4.96	2.91	3.07	3.76	2.97	3.21	3.98	4.08	4.05	4.02
30	3.77	3.57	3.1	2.95	3.70	3.52	3.07	3.86	3.76	4.56	4.11
60	3.23	3.1	3.13	3.05	3.80	3.14	2.97	3.35	3.94	3.74	4.27
720	3.24	2.72	3.27	1.93	3.05	3.03	3.04	3.01	2.90	3.11	DCD

Tableau 47 : Evolution de la Kaliémie (mmol/l) de Judy, Lola et Nolly.



Figures 108 et 109 : Evolution de la kaliémie de Diane et Judy sur 12 heures.



Figures 110 et 111 : Evolution de la kaliémie de Lola et Nolly sur 12 heures.

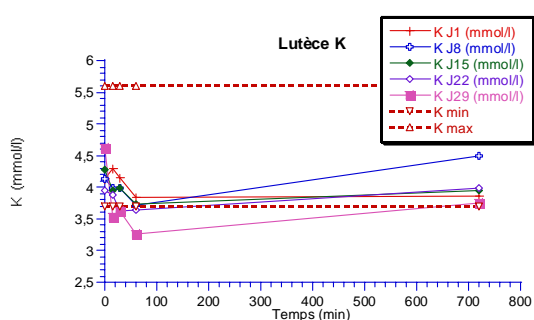


Figure 112 : Evolution de la kaliémie de Lutèce sur 12 heures.

- L'urémie évolue dans les normes physiologiques (fig. 113 à 115). La créatininémie suit la cinétique de la CP avec un pic plus élevé que chez les chiens sains, puis un retour aux normes usuelles en fin de traitement (fig. 116 à 118). Les valeurs observées de la créatinine chez Nolly sont anormalement élevées (pic de 1088 à 4598 $\mu\text{mol/l}$).

Tps (min)	Diane					Lutèce				
	Urée J1	Urée J8	Urée J15	Urée J22	Urée J29	Urée J1 L	Urée J8	Urée J15	Urée J22	Urée J29
0	4.9	5.3	5.4	5.4	7.0	3.2	5.0	2.3	2.3	2.5
15	5.1	5.1	5.3	5.2	5.8	3.1	4.9	2.2	2.3	2.6
30	4.9	5.7	5.3	5.3	5.9	3.1	4.8	2.2	2.3	2.6
60	4.9	5.4	5.5	5.3	6.1	2.9	4.6	2.2	2.2	2.5
720	6.8	7.5	5.0	5.3	6.5	4.0	2.8	2.4	3.9	2.6

Tableau 48 : Evolution de l'urémie (mmol/l) de Diane et Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	Urée J1	Urée J8	Urée J15	Urée J22	Urée J1	Urée J8	Urée J15	Urée J1	Urée J8	Urée J15	Urée J22
0	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	2.6	2.8	3.2	3.4
15	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	2.5	2.7	3.1	3.1
30	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	2.5	2.8	3.3	3.1
60	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	2.7	3.0	3.6	3.4
720	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	3.7	4.0	4.7	DCD

Tableau 49 : Evolution de l'urémie (mmol/l) de Judy , Lola et Nolly.

*Problème technique lors de la manipulation dans les laboratoires de biochimie, résultats non fournis

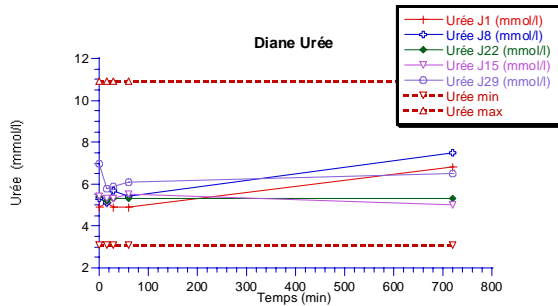


Figure 113 : Evolution de l'urémie de Diane sur 12 heures.

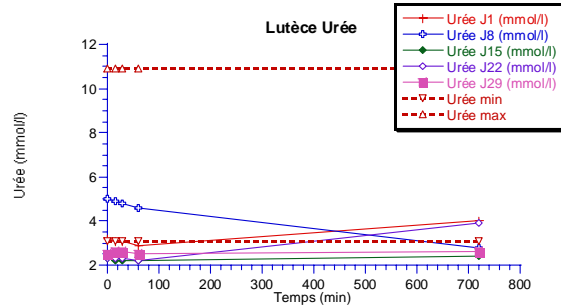
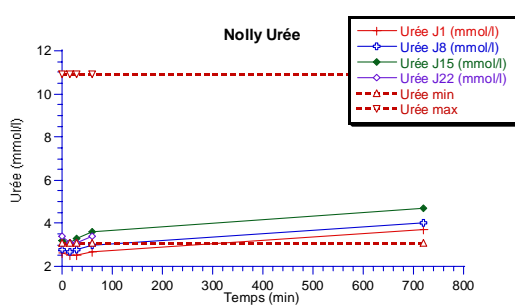


Figure 114 et 115 : Evolution de l'urémie de Lola et Lutèce sur 12 heures.

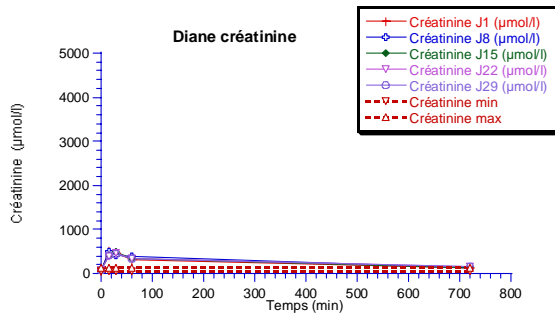
Tps (min)	Diane					Lutèce				
	Créat J1	Créat J8	Créat J15	Créat J22	Créat J29	Créat J1	Créat J8	Créat J15	Créat J22	Créat J29
0	60.4	68.8	73	66.4	84.3	93	94	86	90	81
15	515.8	481.10	422.4	397.8	405.6	203	198	206	216	196
30	458.5	409.9	493.2	460	441.9	190	198	307	206	191
60	307	385.7	346.4	342.6	348.3	200	190	211	207	178
720	118.3	129.1	124.2	147.7	159.8	95	88	92	97	91

Tableau 50 : Evolution de la créatininémie (µmol/l) de Diane et Lutèce.

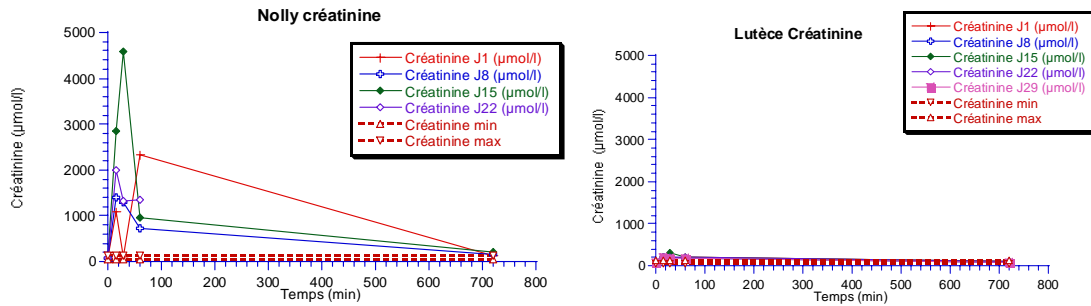
Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	Créat J1	Créat J8	Créat J15	Créat J22	Créat J1	Créat J8	Créat J15	Créat J1	Créat J8	Créat J15	Créat J22
0	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	74.3	81	82	81
15	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	1088	1401	2854	1990
30	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	103	1302	4598	1332
60	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	2332	730	950	1347
720	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	Pb T*	135	145	212	DCD

Tableau 51 : Evolution de la créatininémie ($\mu\text{mol/l}$) de Judy, Lola et Nolly.

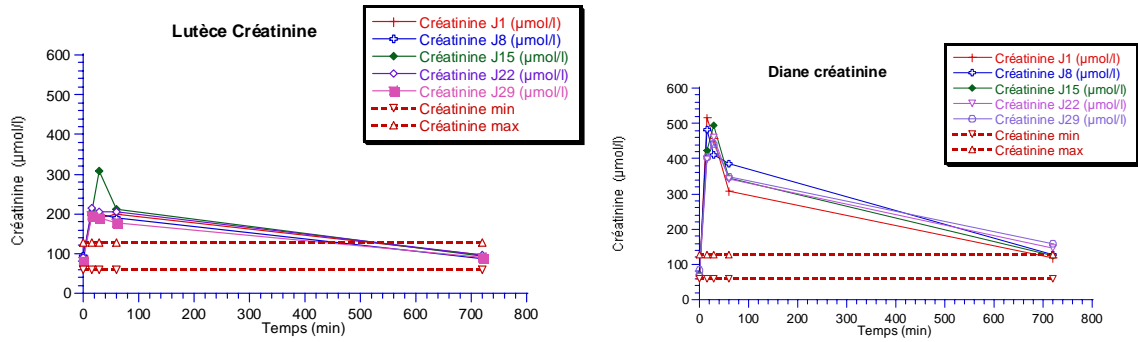
*Problème technique lors de la manipulation dans les laboratoires de biochimie, résultats non fournis



Figures 116: Evolution de la créatininémie de Diane sur 12 heures.



Figures 117 et 118 : Evolution de la créatininémie de Nolly et Lutèce sur 12 heures.



Figures 116 bis et 118 bis : Evolution de la créatininémie de Diane et Lutèce selon une échelle plus lisible

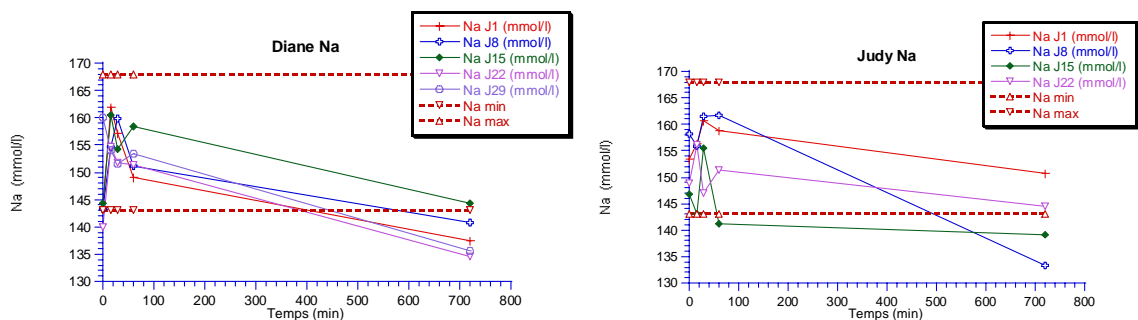
- La natrémie évolue selon les normes physiologiques, on note cependant une tendance à l’hyponatrémie en fin de traitement chez Diane, Judy et Nolly (fig. 119 à 123).

Tps (min)	Diane					Lutèce				
	Na J1	Na J8	Na J15	Na J22	Na J29	Na J1	Na J8	Na J15	Na J22	Na J29
0	143.4	143.2	144.3	140	160	145.7	145.4	145.4	147.2	145.4
15	162	154.7	160.4	154.6	154	155.2	156.8	159.2	159.2	158.1
30	157.1	159.8	154.2	151.8	151.5	153.2	155.4	155.1	157.1	154.8
60	149.1	151.1	158.3	151.3	153.5	139.8	154	150.9	156.3	153.2
720	137.5	140.7	144.3	134.6	135.6	138.4	146.5	148.8	145	147.9

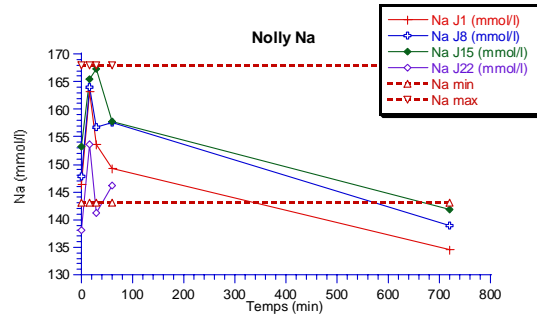
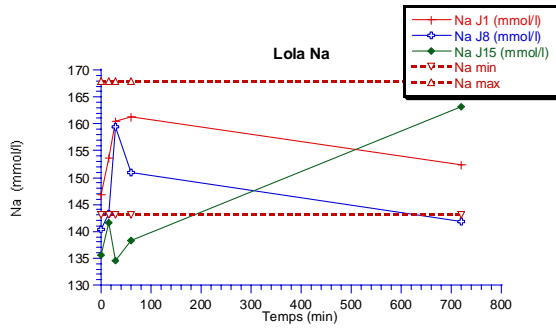
Tableau 52 : Evolution de la Natrémie (mmol/l) de Diane et Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	Na J1	Na J8	Na J15	Na J22	Na J1	Na J8	Na J15	Na J1	Na J8	Na J15	Na J22
0	153.4	158.1	146.9	148.9	146.8	140.4	135.6	146.3	147.9	153.2	138
15	156.4	155.9	143	156.1	153.6	143.2	141.6	163.1	164.1	165.5	153.7
30	160.7	161.6	155.4	147.1	160.4	159.4	134.6	153.7	156.8	167.4	141.3
60	158.8	161.7	141.2	151.4	161.4	150.9	138.2	149.3	157.5	157.8	146.1
720	150.7	133.3	139.2	144.5	152.3	141.8	163.1	134.6	139	141.9	DCD

Tableau 53 : Evolution de la Natrémie (mmol/l) de Judy, Lola et Nolly.



Figures 119 et 120 : Evolution de la natrémie de Diane et Judy sur 12 heures.



Figures 121 et 122 : Evolution de la natrémie de Lola et Nolly sur 12 heures.

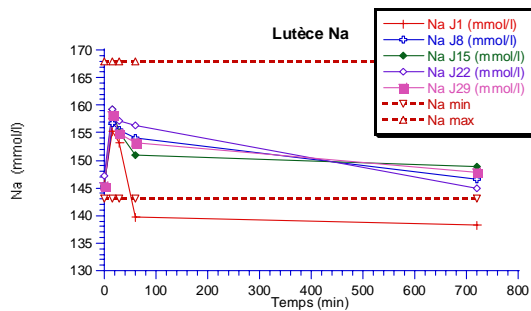


Figure 123 : Evolution de la natrémie de Lutèce sur 12 heures.

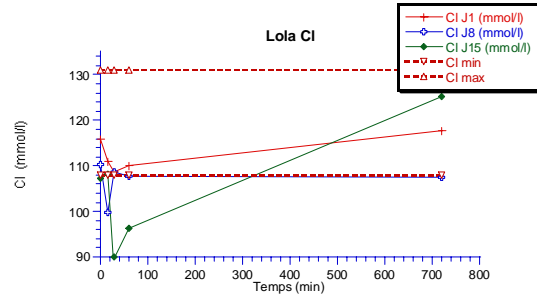
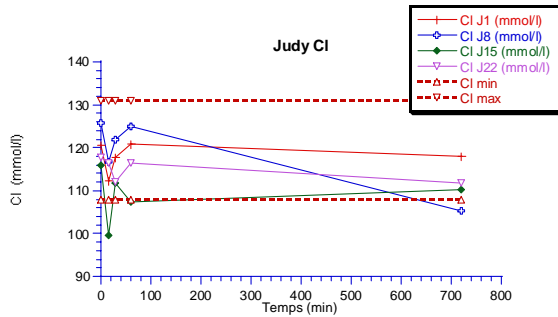
- La chlorémie fluctue entre les valeurs physiologiques, sauf à J15 où nous remarquons une hypochlorémie fugace à T15 minutes (fig. 124 à 126). Par rapport aux chiens sains, nous ne retrouvons pas de manière systématique une hypochlorémie à T15. Pour Nolly, la tendance à l'hypochlorémie est plus nette. Les valeurs de Diane ne sont pas fournies suite à un problème technique lors des analyses.

Tps (min)	Lutèce				
	Cl J1	Cl J8	Cl J15	Cl J22	Cl J29
0	117.5	114	115.5	115.4	113.2
15	112	108	108.1	109	110.4
30	113.8	110.7	112	111.6	111.4
60	108.7	114.2	111.3	115.6	114.7
720	110.2	116.8	115.6	113	111.7

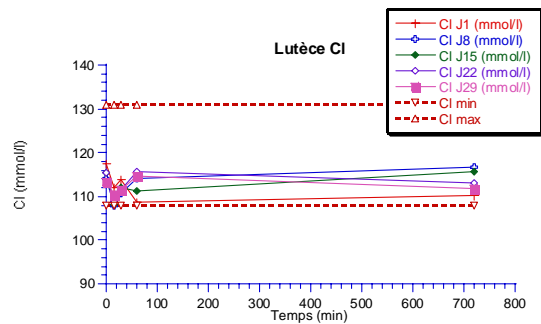
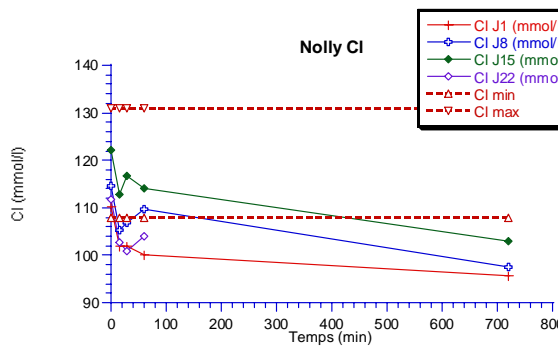
Tableau 54 : Evolution de la chlorémie (mmol/l) de Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	Cl J1	Cl J8	Cl J15	Cl J22	Cl J1	Cl J8	Cl J15	Cl J1	Cl J8	Cl J15	Cl J22
0	120.6	125.7	116	117.8	115.8	110.3	107.3	110.1	114.5	122.2	111.9
15	112.3	116.7	99.7	116.4	110.9	99.9	108.3	101.8	105.4	112.7	102.8
30	117.7	122	111.8	112	108.6	108.7	90.1	101.8	106.8	116.6	100.8
60	120.9	124.9	107.4	116.4	110	107.8	96.4	100.2	109.6	114.1	104.1
720	118.1	105.4	110.1	111.7	117.8	107.5	125.2	95.6	97.6	103	DCD

Tableau 55 : Evolution de la chlorémie (mmol/l) de Judy, Lola et Nolly.



Figures 124 et 125 : Evolution de la chlorémie de Judy et Lola sur 12 heures.



Figures 126 et 127 : Evolution de la chlorémie de Nolly et Lutèce sur 12 heures.

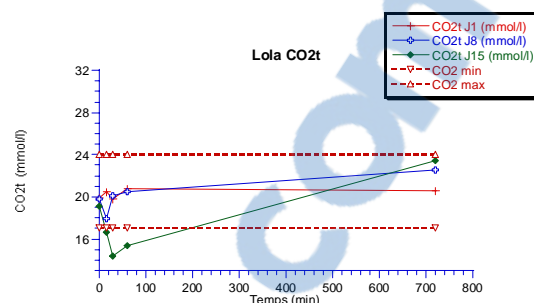
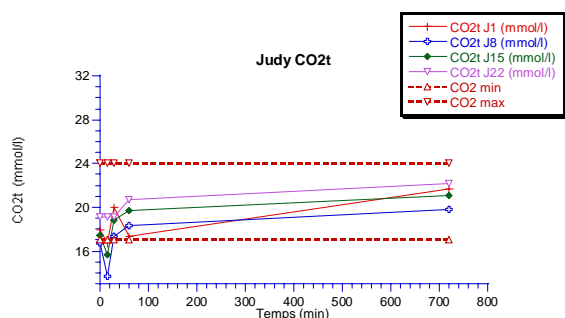
- Comparativement aux chiens sains, la tendance à l'alcalose ne se retrouve pas sur les courbes de la réserve alcaline, sauf pour Nolly (fig. 128 à 131). Les valeurs de Diane ne sont pas fournies suite à un problème technique lors des analyses.

Tps (min)	Lutèce				
	CO2t J1	CO2t J8	CO2t J15	CO2t J22	CO2t J29
0	17.8	22.3	23.2	20.9	21.3
15	20.3	21.5	22.3	21.7	22.3
30	20.6	22.7	21.1	21.3	22.0
60	20.7	22.5	22.4	22.5	23.6
720	19.7	23.6	25.3	25.5	27.2

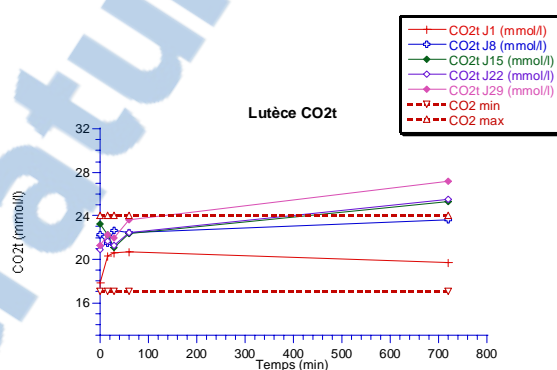
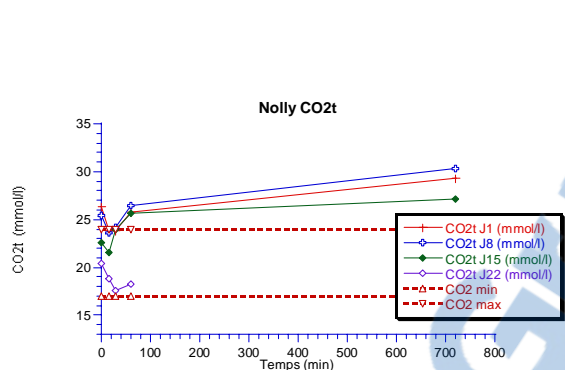
Tableau 56 : Evolution de la réserve alcaline (mmol/l) de Lutèce.

Tps (min)	Judy				Lola			Nolly			
	CO2t J1	CO2t J8	CO2t J15	CO2t J22	CO2t J1	CO2t J8	CO2t J15	CO2t J1	CO2t J8	CO2t J15	CO2t J22
0	17.9	16.7	17.4	19.1	19.9	19.8	19.1	26.3	25.4	22.6	20.4
15	16.7	13.7	15.7	19.1	20.5	17.9	16.1	23.8	23.6	21.5	18.8
30	20	17.3	18.8	19.1	19.8	20.1	14.4	23.8	24.2	24	17.6
60	17.3	18.3	19.7	20.7	20.8	20.5	15.4	25.8	26.4	25.7	18.2
720	21.7	19.8	21.1	22.2	20.6	22.6	23.4	29.3	30.3	27.1	DCD

Tableau 57 : Evolution de la réserve alcaline (mmol/l) de Judy, Lola et Nolly.



Figures 128 et 129 : Evolution de la réserve alcaline de Judy et Lola sur 12 heures.



Figures 130 et 131 : Evolution de la réserve alcaline de Nolly et Lutèce sur 12 heures.

- Nous ne disposons, à l'heure actuelle, que des résultats de Diane pour l'étude de la CP. Les prélèvements des autres chiennes n'ont pu être réalisés suite à des incidents de robots et des difficultés d'approvisionnement en réactifs nécessaires pour ce dosage particulier. Le temps de demi-vie de la CP reste identique, avec une quasi disparition à T60. Malheureusement, les valeurs maximales atteintes se trouvent nettement en dessous de nos espérances, entre 1,17 et 3,84 mmol/l. La valeur maximale étant atteinte à J29 (fig. 136 à 140).

Tps (min)	Diane				
	CP J1	CP J8	CP J15	CP J22	CP J29
0	0	0	0	0	0
15	1.68	1.46	1.96	1.17	3.84
30	0.85	0.1	1.48	0.8	1.88
60	0.12	0	0.17	0.05	0.07
720	0	0	0	0	0

Tableau 58 : Evolution de la CP (mmol/l) de Diane.

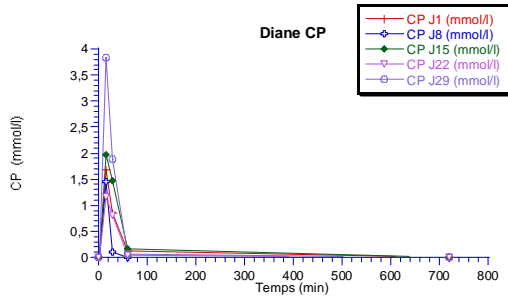


Figure 132 : Evolution de la CP de Diane sur 12 heures.

- Contrairement aux essais sur animaux sains, on observe quelques modifications sur les formules sanguines. Pour Diane, on observe une leucocytose ($21,69 \times 10^9 / l$) à J29 caractérisée par une granulocytose marquée ($17,17 \times 10^9 / l$) à T0. Ce phénomène se reproduit pour Lola à J22 avec $24,36 \times 10^9 / l$ leucocytes dont $21,61 \times 10^9 / l$ granulocytes et pour Nolly à J22 avec $25 \times 10^9 / l$ leucocytes dont $21,29 \times 10^9 / l$ granulocytes. Sur ces trois chiennes, la leucocytose apparaît le dernier jour de traitement, une semaine avant leur décès. Evidemment, ce phénomène s'accompagne de la reprise de l'inflammation au niveau de la carcinose cutanée, de son aspect purulent et infecté, et de manifestations douloureuses (lors de palpation et lors du mouvement). En revanche, Lutèce, qui présentait aussi une carcinose purulente, n'a jamais eu de granulocytose lors des traitements, et même en fin de cure, lors de la dégradation de son état général, il n'y avait aucune modification de la formule sanguine. Judy, elle, a toujours eu une formule sanguine normale.

7.3.6. Discussion

Le tableau suivant récapitule les principaux événements survenus au cours des traitements des différentes chiennes malades.

Chien	Protocole	Type de tumeurs	Effets secondaires	Efficacité anti-tumorale	Décès
Diane	1	Tumeurs mammaires avec carcinose cutanée	Vomissements à J8, J15 et J29 entre T20 et T30	Diminution de l'œdème du membre antérieur Gauche de J8 à J15 Amélioration de l'état général de J15 à J22	OAP à J29 + 1 semaine
Judy	2	Tumeurs mammaires avec carcinose cutanée et métastases pulmonaires	Abattement entre T5 et T15 Vomissements à chaque traitement entre T20 et T60 Arrêt après J22 car baisse de l'état général et reprise de l'inflammation	Diminution de l'inflammation et de la carcinose cutanée entre J8 et J15 Amélioration de l'état général de J8 à J15	Euthanasie à J29 + 1 semaine
Lola	2	Tumeurs mammaires avec carcinose cutanée	Abattement entre T5 et T15 Vomissements à chaque traitement entre T20 et T60 Arrêt après J15 car baisse de l'état général et reprise de l'inflammation, aggravation de la pyodermite	Diminution de l'inflammation et de la carcinose cutanée entre J8 et J15 Amélioration de l'état général de J8 à J15 Régression de la pyodermite de J8 à J15	OAP à J25
Nolly	2	Tumeurs mammaires avec carcinose cutanée	Vomissements à chaque traitement entre T20 et T6 h	Aucune	OAP à J22 pendant le traitement
Lutèce	3	Carcinose cutanée	Œdème du membre antérieur gauche à J22 suite à la progression de la carcinose	Prolongation de l'espérance de vie (facteur de trois)	Euthanasie à J29 + 2 mois

Tableau 59 : Récapitulatif des observations sur les chiens malades

Nous avons utilisé trois protocoles différents car, dans un premier temps, nous désirions optimiser les valeurs de CP sanguine en choisissant le protocole de Judy, Lola et Nolly, qui délivre de la CP en perfusion continue. Malheureusement, suite aux trois décès de ces chiennes, avant la fin de leur protocole, se posaient différentes questions :

- les décès pouvaient-ils être imputables à une cytotoxicité cardiaque de l'ATP ?
- pouvaient-ils être imputables à une réaction allergique induite par la CPK d'origine lapine ?



- pouvaient-ils être imputables au stade terminal du cancer chez ces chiennes ?

La première hypothèse, semblant la plus judicieuse, nous avons donc choisi un protocole sans ATP pour Lutèce. On remarque que cette dernière a survécu plus longtemps, cependant elle ne présentait qu'une carcinose cutanée et on ne peut pas conclure sur un seul cas.

D'après nos cinq chiennes (effectif trop faible pour conclure scientifiquement), on observe une certaine activité de la tri-thérapie basée sur l'amélioration transitoire de l'état général ou la régression ponctuelle de la carcinose cutanée.

D'un point de vue biochimique, la cinétique de la CPK reste identique à celles observées lors des tri-thérapies. L'hypocalcémie, qui serait induite pas la CP chez l'homme, est plus marquée chez les chiens cancéreux. L'augmentation de la phosphorémie, toujours présente, est plus importantes pour deux chiens. En ce qui concerne la kaliémie, sa cinétique est variable entre animaux, on note cependant une tendance à l'hypokaliémie. On remarque aussi une augmentation de la créatininémie, avec des valeurs aberrantes pour Nolly (problème de dosage ?). Pour cette même chienne, on observe une nette tendance à l'alcalose.

Afin de poursuivre cette ébauche d'étude et vérifier la présence ou non d'une activité anti-tumorale de l'ATP par l'intermédiaire de la CP et de la CPK, deux protocoles sont envisageables :

- un cycle de quinze jours, avec les mêmes produits, aux mêmes doses (soient deux jours de traitement à une semaine d'intervalle) répétés tous les mois pendant trois à six mois. Ce protocole pouvant accroître le risque de sensibilisation à la CPK.
- Un protocole sans ATP mais avec une large utilisation de CPK (six à sept fois la dose) afin de produire d'avantage d'ATP natif.

8. CONCLUSION

Pour conclure cette étude, nous retiendrons l'innocuité de la tri-thérapie CPK, CP et ATP sur des chiens sains, les modifications électrocardiographiques n'altérant pas l'état de santé de nos quatre Beagles. Quel que soit le protocole et les doses utilisées, ces produits sont très bien tolérés chez des animaux sains. Les valeurs biochimiques obtenues lors de ces deux protocoles laissent espérer une possible efficacité anti-tumorale de la tri-thérapie si on se réfère aux essais cliniques humains et aux essais *in vitro*.

L'expérimentation sur des animaux malades en stade terminal de maladie cancéreuse nous montre une amélioration clinique visible avant la troisième injection sur trois chiens sur cinq. Pour l'un des chiens, l'amélioration se situe sur le plan d'une faible prolongation de l'espérance de vie. Une non-efficacité chez le dernier chien ne semble pas altérer sa courte espérance de vie.

Cette étude n'est qu'une ébauche, sur peu de chiens, et constate une faible efficacité présente avant la troisième injection (quand elle existe) et une dégradation rapide de l'état général après la troisième injection. Pour approfondir cette étude, il nous faudrait un suivi cardio-respiratoire plus précis ainsi que des autopsies pour mieux comprendre les différentes causes de décès. De plus, une modification du protocole serait souhaitable afin de vérifier son efficacité anti-tumorale avant le décès des animaux.

9. BIBLIOGRAPHIE

1. AGTERESCH H.J., DAGNELIE P.C. *et al.* Randomized clinical trial of adenosine 5' triphosphate with advanced non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, **92**, 321-328.
2. APASOV S., KOSHIBA M. *et al.* Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions. *Immunol. Rev.*, 1995, **146**, 5-19.
3. BATRA S. *et* FADEEL I. Release of intra-cellular calcium and stimulation of cell growth by ATP and histamine in human ovarian cancer cells (SKOV3). *Cancer Lett.*, 1994, **77**, 57-63.
4. BRONTES S., MACINO B. *et al.* Protein tyrosine-kinases and phosphatases control apoptosis induced by extra-cellular ATP. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 1996, **218**, 344-351.
5. BURNSTOCK G. Distribution and role of purinoreceptor subtypes. *Nucleos. Nucleot.*, 1991, **10**, 910-950.
6. BURNSTOCK G. Purinergic mechanisms in biological actions of extra-cellular ATP. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1990, **603**, 1-17.
7. CHAHWALA S. *et* CANTLEY L. Extracellular ATP induces ion fluxes and inhibits growth of Freund erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 13717-13722.
8. CORREALE P., TAGLIAFERRI P. *et al.* Extracellular adenosine 5' triphosphate involvement in the death of LAK-engaged human tumor cells via PX-receptor activation. *Immunol. Lett.*, 1997, **55** (2), 69-78.
9. DI VIRGILO F. The P2Z Purinoreceptors : an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol. Today*, 1995, **16**, 524-528.
10. DI VIRGILO F., PIZZO P. *et al.* Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today*, 1990, **11**, 274-277.
11. EL-MOATASSIM C., DORNARD J. *et al.* Extracellular ATP and cell signalling. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1992, **1134**, 31-45.
12. FANG W.G., PIRNIA F. *et al.* P2-Prurinergic receptor agonists inhibit the growth of androgen-independent prostate carcinoma cells. *J. Clin. Invest.*, 1992, **89**, 191-196.

13. FILIPPINI A., TAFFS R.E., *et al.* Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes . *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 334-340.
14. FRIEDBERG I. et KUBLER D. The role of surface proteine kinase in the ATP-induced growth inhibition in transformed mouse fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1990, **603**, 513-515.
15. GORDON J.L. Extracellular ATP : effects, source and fate. *Biochem J.* ,1986, **233**, 309-319.
16. GREEN D.R. A myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science*, 1997, **92**, 1246-1247.
17. HASKELL C.M., MENDOZA E. *et al.* Phase II study of intravenous adenosine 5' triphosphate in patients with previously untreated stage IIIB and stage IV non small cell lung cancer. *Invest. New Drugs*, 1998, **16** , 81-85.
18. HASKELL C.M., WONG M. *et al.* Phase I trial of extracellular adenosine 5' triphosphate in patients with advanced cancer. *Med. Ped. Oncology*, 1996, **27**, 165-173.
19. HUANG N.N., WANG D.J. *et al.* Multiple signal transduction pathways lead to extracellular ATP-stimulated mitogenesis im mammalian cells : II. A pathway involving arachidonic acid release, prostaglandin synthesis and cyclic-AMP accumulation. *J. Cell. Physiol.*, 1991, **146**, 483-494.
20. IZRAEL V., WANG S.R. *et al.* Creatine phosphate inhibits growth of human tumors in nude mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* , 1994, **35**, A2458.
21. JAMIESON G.P., SNOOK M.B. *et al.* Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoreceptors. *J. Cell. Physiol.* 1996, **166** , 637-642.
22. JATOI A., LOPRINZI C.L. *et al.* Is ATP (Adosine 5'-Triphosphate), like STP, a performance additive for the tanks of cancer patients? *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, **92**, 290-91.
23. KIM J.S., HE L. *et al.* Mitochondrial permeability transition : a common pathway to necrosis ad apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **304** , 463-70.
24. MACIMO B., ZAMBON A. *et al.* CD45 regulates apoptosis induced by extracellular adenosine triphosphate and cytotoxic T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Research Communications*, 1996, **226** , 769-776.
25. MEYER P. *Physiologie humaine*, 2nd E. PARIS : MEYER P., 1405 p.
26. PERES A. et GIOVANNARDI S. Characteristics of the signal transduction system activated by ATP receptors in the hepatoma cell line N1S1-67. *Biochem. Biophys. Acta.* , 1995, **1265**, 33-39.

27. PIZZO P., MURGIA M. *et al.*, Role of the P2Z prurinergetic receptors in ATP mediated killing of tumor necrosis factor TNF-resistant L 929 fibroblasts. *J. Immun.*, 1992, **149**, 3372-3378.
28. SABALA P., AMLER E. *et al.* Intracellular Ca⁺⁺ signals induced by ATP and thapsigargin in glioma C6 cells. Calcium pools sensitive to inositol 1,4,5-triphosphate and thapsigargin. *Neurochem. Intern.* 1997,**31**, 55-64.
29. SPRANZI E., DJEU Y. *et al.* Lysis of human monocytic leukemia cells by extracellular adenosine triphosphate : Mechanism and characterization of the adenosine triphosphate receptor. *Blood.* 1993, **82**, 1578-1585.
30. SPUNGIN B. et FRIEDBERG I. Growth inhibition of breast cancer cells induced by exogenous ATP. *J. Cell. Physiol.*, 1993, **157**, 502-508.
31. VANDEWALLE B., HORNEZ L. *et al.* Effects of extracellular ATP on breast tumor cell growth, implication of intracellular calcium. *Cancer Lett*, 1994, **85**, 47-54.
32. VAN-LOO G., SAELENS X. *et al.* The role of mitochondrail factors in apoptosis : a Russ roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.*,2002, **9**, 1031-42.
33. WANG D.J., HUANG N.N. *et al.* Multiple signal transduction pathways lead to extracellular ATP-stimulated mitogenesis in mammalian cells : I. Involvement of protein kinase C. *J.Cell.Physiol.*, 1991,**146**, 473-482.
34. ZAMBON A., BRONTE V. *et al.* Role of extracellular ATP in cell-mediated toxicity ; a study with ATP-sensitive and ATP-resistant macrophages. *Cell Immunol.*, 1994, **156**, 458-467.
35. ZHENG L.M., ZYCHLINSKY A. *et al.* Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J. Cell. Biol.* , 1991, **112**, 279-288.

Dosage de la Créatine Phosphate
Technique manuelle
Guillaume Lefèvre
Biochimie Tenon

1) Matériel

Tubes verres usage unique 5 ml
Pool sérum # 4 ml par manipulation
Papier pH
Microcuvettes plastique usage unique
Pipettes Gilson réglables : 20µl, 100µl et 1000 µl
Embouts jetables jaunes et bleus
Balance précision « Hormonologie » et « Biologie Moléculaire »
8 Fioles 100 ml
Eau distillée en 1 litre
Agitateur
Bain Marie
Spectrophotomètre Uvikon 860
Centrifugeuse **réfrigérée** Hormonologie (Programme 1 et 2)

2) Préparation des réactifs

2-1) Réactifs de précipitation et de neutralisation

HClO₄ 6%

Soit 5,2 ml HClO₄ 70% qsp 100 ml H₂O distillée

K₂CO₃

Réaliser une solution à 69,1 g/100ml H₂O distillée

Attention chauffage nécessaire car concentration. proche de la saturation

2-2) Réactifs du dosage

Réactif R1

(mélange extemporané TEA tamponné, NADP, MgCl₂, Glucose, ADP)

Préparation des réactifs composants le R1

N.B: toutes les solutions mères sont à garder à +4°C

NaOH 1 N

Dans fiole de 100 ml, mettre 5,2 ml de Lessive de Soude d = 1,35 et compléter par H₂O distillée

TEA réaliser une solution à 195 mM
Peser 3,62 g de TEA
Disposer dans fiole jaugée de 100 ml
Ajouter 5.2ml de NaOH 1N
Compléter à 100ml avec H₂O distillée
Vérifier pH à la bandelette Ajuster éventuellement à pH 7,5-7,6

NADP Réaliser une solution à 1,242 mM
Peser 95,1 mg de **NADP**
Compléter à 100ml avec H₂O distillée

MgCl₂ Réaliser une solution à 48,86 mM
Attention très hygroscopique
Peser avec précision un poids voisin de 3 g
Compléter à 100ml avec H₂O distillée
Réaliser la dilution nécessaire pour obtenir une solution finale à 0,993 g/l

Glucose Réaliser une solution à 244,6 mM
Peser 4,40 g de Glucose
Compléter à 100ml avec H₂O distillée

ADP Réaliser une solution à 1,055 mM
Peser 45 mg de ADP
Compléter à 100ml avec H₂O distillée

Réactif R1 prêt à l'emploi

Disposer dans une fiole jaugée 50ml (soit #80 dosages)

qté pour 40 dosages

TEA	10 ml	5 ml
NADP	10 ml	5 ml
MgCl ₂	3,6 ml	1,8 ml
Glucose	10 ml	5 ml
ADP	10 ml	5 ml
H ₂ O	6,4 ml	3,2 ml

Réactif R2

Hexokinase suspension à 995 U/ml

Réaliser une solution au 1/27^{ème}

Disposer dans un tube en verre : 35µl de suspension + 965 µl H₂O (**qté pour 66 dosages**)

Garder à 4°C

Réactif R3

G6PDH suspension à 600 U/ml

Réaliser une solution au 1/16^{ème}

Disposer dans un tube en verre 60µl de suspension + 940 µl H₂O (**qté pour 66 dosages**)

Garder à 4°C

Réactif R4

Créatine kinase poudre

Réaliser une solution mère à 1250 U/ml

Peser 5 mg dans 1 ml H₂O (balance Biologie Moléculaire)

Garder à 4°C

Réaliser une solution fille prête à l'emploi

Solution fille de CK R4 (prête à l'emploi) (qté pour 66 dosages)

dans un tube à essai en verre disposer

CK solution mère 200 µl

H₂O 800 µl

Garder à 4°C

3) Gamme de calibration

Réaliser une solution fille de Créatine Phosphate soit

Solution mère de CP (111 mg/10 ml ou 34 mmol/l)

Réaliser une solution fille au 1/20^{ème} (1,7 mmol/l)

Dans un tube en verre disposer :

CP sol. Mère 100 µl

H₂O 1900 µl

Disposer dans 5 tubes :

Tubes	1	2	3	4	5
CP sol.fille (µl)	0	100	250	500	1000
Pool plasma (µl) ou H ₂ O (µl)	1000	900	750	500	0
Conc finale CP (mmol/l)	0	0,17	0,43	0,85	1,70

4) Manipulations

Allumer Uvikon 860

Attendre puis lancer le programme par F1 (#5 minutes)

Programmer le mode de lecture (voir Annexe)

Allumer centrifugeuse réfrigérée

Pièce Hormono RIA

Lancer le programme de refroidissement (**programme1**) (temps nécessaire #15 minutes)

4-1) Précipitation et neutralisation des échantillons

Décongeler les plasma
Centrifuger 10 minutes 3000 t/min
Récupérer le plasma surnageant

Dans un tube en verre, disposer :

Plasma	200 µl	
Ajouter goutte à goutte HClO ₄ 6%	400 µl	sous vortex

Centrifuger 10 minutes 3000 t/min à +4°C
Centrifugeuse réfrigérée Hormonologie **programme 2**

Récupérer **200 µl** de surnageant dans un tube verre 5ml
Neutraliser par **15 µl** de K₂CO₃
Vérifier le pH (# 7.5)

Calcul de la dilution :

Volume initial	200 µl
Volume final	610 µl

Dilution de la CP = (200 / 600) x (200 / 210) = 1 / 3,17

4-2) Protocole opératoire

Disposer dans un tube de verre :

Echantillon (surnageant, gamme ou contrôle)	100 µl
Réactif R1	600 µl
Réactif R2 (Hexokinase)	15 µl
Réactif R3 (G6PDH)	15 µl

Mélanger

Verser dans des semi micro-cuves

Les positionner dans le spectrophotomètre Uvikon 860 (au maximum 6 cuves)

Lecture contre microcuve vide en position « référence »

Attendre 8 minutes (chronomètre)

Noter l'absorbance obtenue au bout de **8 minutes** soit **Abs 1**

Ajouter dans chaque cuve

Réactif R4 Solution fille de CK	15 µl
--	--------------

Lancer le programme UVIKON « KINETIC »

(voir Annexe)

Noter l'absorbance maximale finale (**Abs2**) au bout de **15 minutes** après addition de R4

5) Calcul

Calculer pour chaque cuve : Δ Absorbance = Abs2 – Abs 1

Tracer pour la droite de calibration la relation : Absorbance = f (conc en CP en mmol/l)

En déduire la concentration en CP des échantillons

6) Caractéristiques du test :

% récupération de la CP sérique:

1^{er} essai : 87 ± 15 % (conc testées 0 à 1,7 mmol/l ; n = 5)

2^{ème} essai : 84 ± 4 % (conc testées 0,85 mmol/l ; n = 2)

% récupération moyen : 86 %

Limite de détection :

Testée en triplicate :

Conc 0 : $0,065 \pm 0,009$ Uabs (n=3)

Conc 0,85 mmol/l : $0,416 \pm 0,047$ Uabs (n = 3)

LD = ,065 + 3 x 0,009 soit **0,092 Uabs** ou **0,065 mmol/l**

Limite de linéarité de la technique : **0,065 à 0,85 mmol/l**

Si Δ Absorbance > 0,500 U abs, diluer l'échantillon neutralisé et redoser selon protocole en 4)

Précision des mesures :

Echantillon gamme aqueuse point 0,85 mmol/l.

CV : 11 à 13 %

Précision et valeur du contrôle congelé:

Echantillon surcharge sérique en CP (congelé)

CV : 16 %

Valeur cible : $1,13 \pm 0,08$ mmol/l (limites : 0,97 à 1,29 mmol/l)

Caractéristiques des signaux

Absorbance initiale contre l'air : 0.150 à 0.250 U abs

Absorbance initiale contre cuve vide 0.015 à 0.125 U abs

Première absorbance après R4 :

contre l'air = 0.200 à 0.300 Uabs

contre cuve vide = 0.090 (Pt0) à 0.250 Uabs (cal à 0.85 mmol/l)

Temps moyen d'analyse

1 manipulation (6 analyses) en # 1 heure ou 5 échantillons congelés en 2 heures

durée minimale estimée du protocole : 108 prélèvements soit 22 heures (NB : sans besoin de dilution)

7) Manipulation type

avec un même ensemble de réactif (R1 à R4)

1^{ère} manipulation

4 points de gamme aqueuse (Pt 0, 0,5 et 1,7 mmol/l)

1 contrôle (sérum #1, 1 mmol /l)

2^{ème} manipulation

1 contrôle (sérum #1, 1 mmol /l)

5 échantillons congelés

8) Annexe :

Programme UVIKON 860

KINETIC

Wavelength	340 nm
Incubation time	0 sec
Reading interval	5 sec
Integration time	60 sec
Number of reading	15
Factor	1.000
Blank	0.0000 da/min
Lower limit	off
Upper limit	off
Unit/l	off
Lamp change	340 nm
H lamp	on
D2 lamp	on
Plotter mode	off
Data to RS 232 C	off
Cells to measure	(à voir selon les expériences) 1*2*3*4*5*6 AU MAXIMUM