

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2016

THÈSE N°

Anticoagulants oraux

Utilisation clinique et mise en place d'une méthode de dosage des anticoagulants oraux directs par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

MÉMOIRE DE D.E.S TENANT LIEU DE THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 04 Mars 2016

Par

Antoine LANNELUC

Né le 06 décembre 1988 à Arès

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX.....Président
M. le Docteur Jean-Michel GAULIER Directeur
M. le Docteur David BALAYSSAC..... Juge
M. le Docteur Dominique PLATS..... Juge

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2016

THÈSE N°

Anticoagulants oraux

Utilisation clinique et mise en place d'une méthode de dosage des anticoagulants oraux directs par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

MÉMOIRE DE D.E.S TENANT LIEU DE THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 04 Mars 2016

Par

Antoine LANNELUC

Né le 06 décembre 1988 à Arès

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX.....Président

M. le Docteur Jean-Michel GAULIER Directeur

M. le Docteur David BALAYSSAC..... Juge

M. le Docteur Dominique PLATS..... Juge



DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR DE LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

CHEMIN Guillaume (01.09.2015 au 31.08.2016)	BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET CLINIQUE, CANCEROLOGIE
FABRE Gabin (01.10.2015 au 31.08.2016)	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques
DREYFUSS Gilles
LOUDART Nicole

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui comptent pour moi et plus particulièrement au Lieutenant-colonel Prichonnet du Service de Santé des Armées. Vétéran d'Algérie, anesthésiste, poète, mais avant tout mon grand-père, je sais que tu aurais été fier de moi.

REMERCIEMENTS

C'est en arrivant à la fin de mon cursus que je me suis rendu compte du nombre de personnes qui, chacune à leur manière, ont influencé mes études et ma personne. Qu'elles trouvent ici, même si elles ne sont pas directement citées, l'expression de ma gratitude.

Remerciements aux membres du jury :

A Monsieur le professeur des universités et praticien hospitalier Franck Saint-Marcoux :

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements. J'ai eu le privilège de travailler dans votre unité de toxicologie et vous avez largement contribué à rendre cette période très enrichissante d'un point de vue professionnel et humain. Votre soutien ainsi que votre éternelle bonne humeur tout au long de mon travail furent extrêmement précieux.

A Monsieur le docteur Jean-Michel Gaulier, praticien hospitalier et expert judiciaire :

Vous avez accepté de diriger ce travail et j'y ai été extrêmement sensible. Vous m'avez accordé votre confiance, à la fois dans la rédaction de ce travail mais aussi au cours de ces 9 mois de stage dans votre unité de toxicologie médico-légale. Vous qui fûtes mon chef, je me souviendrai longtemps de votre gentillesse, votre compétence et de votre pédagogie. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le docteur Dominique Plats, praticien hospitalier :

Vous m'avez encadré et instruit alors que je n'étais qu'un jeune interne et vous continuez à le faire maintenant que j'ai presque achevé mon cursus. Rares sont les personnes qui arrivent aussi bien que vous à marier bienveillance, humour décapant et professionnalisme. Pour vos enseignements et pour l'honneur que vous me faites d'évaluer ce travail, sachez que je vous en suis extrêmement reconnaissant.

A monsieur le Maître de Conférences Universitaires et Praticien Hospitalier David Balayssac :

Vous accepté de siéger dans mon jury de thèse et de juger ce travail, je vous en suis donc très reconnaissant.

A ma famille :

Je n'ose imaginer la personne que je serai devenue sans votre soutien indéfectible pendant toutes ces années. Cela n'a pas toujours été facile pour vous, surtout pendant les périodes de concours et de multiples examens mais vous étiez toujours là. Ce travail et ce diplôme sont en grande partie les vôtres puisque vous m'avez communiqué toute la motivation nécessaire pour avancer durant ces années. Du fond du cœur, merci, en particulier à ma chère mère qui supporte encore mon mauvais caractère avec beaucoup de patience, comme elle l'a toujours fait.

A Claire, mon amour :

Pour ta gentillesse, ton si beau sourire, ta générosité, ton humour, et tout ce qui fait que tu m'es devenue indispensable depuis cette soirée enneigée. Merci de partager ma vie et de m'avoir accepté avec mes défauts et mes projets pour l'avenir. Nous nous sommes installés au bord de l'eau il y a quelques mois, je sais que nous y serons heureux et que nous y fonderons une famille.

A mes amis :

Un très grand merci à mes amis pharma de Bordeaux, Camille, Caro, Romain, Gaëtan, Carole, Emeline, Fabio, Arnaud, Margaux. Vous comptez énormément pour moi et même si la distance nous sépare, ce sera toujours pareil entre nous. Bon, on n'aura pas vraiment fait avancer la science ni gagné des points de vie mais qu'est-ce qu'on aura ri aux soirées, aux galas, aux RPE, au RPH, aux week-end d'intégration, en cours, et pour faire plus simple, comme à chaque fois que l'on se voit. La famille.

A la constellation de la Chab' : Qui aurait cru que cette coloc serait un jour propre et parfaitement rangée ? Merci à vous tous pour ces fabuleux souvenirs que j'ai, et merci d'avance pour tous les bons moments qu'on va passer ensemble.

Merci au petit excité (« Et la, la vieille ... »), à mon Flo alias *Porcinus aquaticus* (« Pas beau ça ? »), à mon lieutenant Py (« Ho ! Le oiseau ! »), à mon Boubou (« Elle est ou la crampe ? »), à mon Barthé (« P'tite casquette, p'tit jogging »), à mon Duc (« Allons, tu es bien aigre aujourd'hui ») et bien sur notre roux, notre dadou et notre général Pakistanais.

A mes amis « d'enfance » du lycée nord Bassin : Mathieu, Manue, Elise, Irwin, Marianne, Lucie et Clément : les études, le travail et la vie nous séparent presque tout le temps mais c'est toujours un immense plaisir de vous retrouver, je sais que ce genre d'amitié perdurera, tout comme les souvenirs des moments passés ensembles. Votre plouc attitude me manque beaucoup.

Aux internes de Brive la gaillarde « Les mulets » : Je n'aurai pas pu rêver meilleure promo pour commencer l'internat, les murs portent encore les stigmates de ces moments exceptionnels que nous avons vécus. Cette période Briviste fut tout simplement incroyable. Un merci très spécial à Victor, Aymeric, Fanny, Ludi, Hélène, Anne, Flo, Alexis, Fabien, Rémi, Soso, JMP, Julie, Astug', Thomas. Il y avait beaucoup trop d'amour à Brive pendant ces deux semestres.

A mes co-internes de Limoges et particulièrement aux membres du bureau de l'amour, merci pour ces moments passés et pour ceux à venir. Bises à Gaspard « Des p'tits malins comme moi on en Verapamil », Margaux « Bonne année les corbeaux ! », Pierre alias Pharma 1 « Pieeeeeerre ! », la Pouch' « #babouin », Max « Il est parti au diable Vauvert ! », Aïssa, Baptiste, Kilian, Romain, Richard « Je viens récupérer mon vaisseau », son Altesse Charlotte XIV « Brive ? Gueret ? ok » et bien sûr, « Frantoine Moluc ».

Aux différentes équipes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler :

Merci à toute l'équipe de la PUI et de la Bulle de Brive, je n'étais qu'un « bébé interne » quand je suis arrivé la première fois et je constate que je le reste un peu même si j'ai bientôt fini mon internat. Merci à tous les techniciens, ingénieurs, secrétaires et chefs du laboratoire de pharmaco-tox de Limoges. Ces trois semestres ont été fabuleux, le laboratoire me manque. Merci également à toute l'équipe de la PUI de Limoges pour m'avoir accueilli lors de mon

arrivée en CHU. Enfin, merci à l'équipe de la Police Municipale de Lège Cap-Ferret pour ces 4 saisons passées en votre compagnie.

Merci au docteur Caroline Monchaud pour avoir relu une partie de ce travail ainsi que pour ses enseignements, ses conseils et sa patience lors des trois semestres que j'ai passé au laboratoire.

Merci au docteur Zeller, qui m'a accueilli dans son officine pendant mes différents stages (dès le collège !) et qui est le pharmacien qui m'a donné envie de me lancer dans ces études passionnantes.

Merci à Sylvain, Aïssa, Julien, Naïma, Sonia, Amélie, Lyvia et Tiphaine qui m'ont grandement aidé dans la partie pratique de ce travail.

TABLE DES MATIERES

Remerciements :	- 15
-	
Liste des abréviations :	- 13 -
Introduction :	- 14 -
A. Utilisation clinique des antivitamines K et des anticoagulants oraux directs :	- 15 -
I. Rappels de physiopathologie :	- 15 -
1. Hémostase primaire :	- 15 -
A) Présentation des différents acteurs de l'hémostase primaire :	- 16 -
(a) Le vaisseau sanguin :	- 16 -
(b) Les plaquettes :	- 17 -
(c) Le facteur de Von Willebrand :	- 18 -
(d) Le fibrinogène :	- 18 -
B) Déroulement de l'hémostase primaire :	- 18 -
(a) Adhésion des plaquettes au sous-endothélium :	- 18 -
(b) Cascade de réactions induisant l'activation des plaquettes :	- 19 -
(c) Recrutement d'autres plaquettes :	- 21 -
(d) Agrégation des plaquettes :	- 22 -
C) Conclusion de l'hémostase primaire :	- 23 -
2. Coagulation plasmatique et fibrinolyse:	- 23 -
A) Introduction :	- 23 -
B) Intervenants :	- 23 -
(a) Facteurs de coagulation :	- 24 -
(b) Inhibiteurs de la coagulation :	- 28 -
C) Déroulement de la coagulation :	- 29 -
(a) Activation :	- 29 -
(b) Propagation et amplification de la coagulation :	- 31 -
(c) Formation et stabilisation du caillot de fibrine :	- 31 -
D) Réaction de fibrinolyse :	- 32 -
(a) Acteurs de la fibrinolyse :	- 33 -
E) Exploration biologique de la coagulation et de la fibrinolyse :	- 34 -

(a)	Exploration de la coagulation :	- 34 -
(b)	Exploration de la fibrinolyse :	- 35 -
II.	Différentes catégories d'anticoagulants oraux :	- 36 -
1.	Médicaments antivitamines K :	- 36 -
A)	Présentation de la famille médicamenteuse et mécanisme d'action :	- 36 -
(a)	Historique :	- 36 -
(b)	Familles chimiques et mécanisme d'action :	- 37 -
B)	Propriétés pharmacocinétiques :	- 41 -
C)	Principaux effets indésirables et contre-indications :	- 42 -
(a)	Effets indésirables :	- 42 -
(b)	Interactions et contre-indications :	- 42 -
(c)	Variabilité inter et intra-individuelle :	- 44 -
(d)	Suivi des AVK :	- 46 -
(e)	Conduite à tenir en cas de surdosage :	- 47 -
2.	Anticoagulants oraux directs:	- 49 -
A)	Présentation de la famille médicamenteuse et mécanisme d'action :	- 49 -
(a)	Développement :	- 49 -
(b)	Mécanisme d'action :	- 50 -
(c)	Propriétés Pharmacocinétiques.....	- 51 -
(d)	Perturbation des bilans d'hémostase :	- 53 -
(e)	Absence d'antidote disponible :	- 55 -
B)	Principaux effets indésirables et contre-indications :	- 57 -
(a)	Profil du rivaroxaban :	- 57 -
(b)	Profil de l'apixaban :	- 59 -
(c)	Profil du dabigatran :	- 60 -
C)	Interactions médicamenteuses connues des AOD :	- 62 -
D)	Pharmaco épidémiologie des AOD :	- 65 -
3.	Anticoagulants oraux non utilisés chez l'homme : Les rodenticides.....	- 66 -
A)	Enjeux de la lutte contre les rongeurs :	- 66 -
(a)	Dégâts matériels occasionnés par les rongeurs :	- 66 -
(b)	Transmission de pathologies :	- 66 -
B)	Molécules utilisées comme rodenticides :	- 67 -
C)	Risques sanitaires liés à l'utilisation des rodenticides :	- 68 -

III.	Utilisation clinique des ACO :	- 70 -
1.	AVK :	- 70 -
A)	Thrombose veineuse profonde :	- 70 -
(a)	Physiopathologie :	- 70 -
(b)	Diagnostic :	- 71 -
(c)	Etiologies des thromboses veineuses profondes :	- 71 -
(d)	Traitement curatif des thromboses :	- 71 -
B)	Cardiopathies emboligènes :	- 72 -
(a)	Valvulopathies et prothèses valvulaires :	- 72 -
(b)	Fibrillation auriculaire :	- 74 -
2.	Utilisation clinique des AOD :	- 75 -
A)	Introduction :	- 75 -
B)	Indications des AOD en 2014 :	- 76 -
(a)	Pose de prothèse totale de hanche (PTH) ou de genou (PTG) :	- 78 -
(b)	Syndrome coronarien aigu ST+ :	- 78 -
B.	Mise au point d'une méthode de dosage des AOD dans le plasma par LCMSMS²	- 79 -
I.	Intérêt du dosage de la concentration des AOD :	- 79 -
1.	Corrélation concentration – effet :	- 79 -
2.	Variabilité inter individuelle :	- 81 -
3.	Situations cliniques à risque :	- 81 -
A)	Devant un saignement :	- 81 -
B)	Gestion péri-opératoire dans anticoagulants oraux directs :	- 84 -
C)	Vérification de l'observance :	- 86 -
D)	Tentative d'autolyse et toxicologie médico-légale :	- 87 -
II.	Méthode analytique :	- 88 -
1.	Rappels sur la CL-SM/SM:	- 88 -
2.	Matériels et méthodes :	- 89 -
A)	Détermination des objectifs du dosage :	- 89 -
B)	Substances pures employées :	- 90 -
C)	Préparation des solutions mères et de travail :	- 91 -
D)	Autres solutions employées :	- 91 -
E)	Méthode d'extraction employée :	- 92 -
F)	Conditions chromatographiques :	- 92 -

G) Conditions spectrométriques :	- 93 -
3. Résultats :	- 94 -
A) Temps de rétention :	- 94 -
B) Droites d'étalonnages :	- 95 -
C) Validation de la méthode :	- 99 -
(a) Répétabilité :	- 99 -
(b) Fidélité intermédiaire :	- 100 -
(c) Epreuve de dilution :	- 101 -
(d) Rendement d'extraction :	- 101 -
(e) Effet de matrice :	- 102 -
4. Discussion :	- 103 -
Conclusion :	- 103 -
Références bibliographiques :	- 106 -
Liste des figures :	- 115 -
Liste des tableaux :	- 117 -
Serment de Galien :	- 120 -

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Adénylate Cyclase

ADP : Adénosine diphosphate

ASC : Aire sous la courbe

AOD : Anticoagulants oraux directs

AUC : Area Under Curve

AVK : Antivitamines K

CCP : Concentré de Complexe Prothrombinique

CL-SM/SM : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem

FDA : Food and Drug Administration

FGAR : First Generation AVK Rodenticid

HIC : Hémorragies Intra-Crâniennes

HGI : Hémorragies Gastro-Intestinales

NACO : Nouveaux anticoagulants oraux

PDF : Produits de Dégradation de la Fibrine

RCPG : Récepteurs Couplé aux Protéines G

SGAR : Second Generation AVK Rodenticid

TCA : Temps de Céphaline avec Activateur

TQ : Temps de Quick

TXA2 : Thromboxane A2

VWF : Von Willebrand Factor

INTRODUCTION

Les anticoagulants oraux ont été développés dans la fin des années 1940 (1) et ne renfermaient alors qu'une seule famille thérapeutique, les antivitamines K (AVK). L'apparition de ces molécules a représenté une véritable avancée thérapeutique dans la prise en charge des patients à risque thrombotique élevé. Cependant, une iatrogénie médicamenteuse très élevée (17 000 hospitalisations en France par an) (2) et un suivi biologique contraignant ont incité les chercheurs à se pencher sur d'autres catégories d'anticoagulants oraux. Les Nouveaux AntiCoagulants Oraux (NACO) ou Anticoagulants Oraux Directs (AOD) ont été développés pour pallier ces défauts. Le but des laboratoires pharmaceutiques était de proposer des molécules dont l'utilisation induirait moins de iatrogénie médicamenteuse et dont le suivi biologique serait inutile. Ce dernier point était présenté comme un argument marketing par les laboratoires car il permettrait de réduire les dépenses publiques de santé tout en améliorant la sécurité et le confort des patients. Rapidement, des sociétés savantes ont modéré ces propos en estimant que dans certaines situations cliniques un dosage biologique des AOD serait indispensable à la prise en charge du patient.

Nous étudierons dans une première partie l'utilisation chez l'homme des molécules anticoagulantes par voie orale puis, dans une deuxième partie, nous présenterons la mise en place d'une méthode de dosage des anticoagulants oraux directs par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM), ainsi que ses possibilités d'utilisation telles qu'elles sont recommandées par les sociétés savantes.

A. Utilisation clinique des antivitamines K et des anticoagulants oraux directs

I. Rappels de physiopathologie

L'hémostase est un ensemble de processus physiologiques destiné à limiter les pertes sanguines lors d'une brèche vasculaire par la formation d'un thrombus. Ce thrombus hémostatique, composé d'un agrégat de plaquettes associé à de la fibrine, se forme par une succession de réactions enzymatiques faisant intervenir différents acteurs que nous détaillerons ci-dessous. Ce thrombus sera par la suite dégradé par une réaction de fibrinolyse (3).

On distingue hémostase primaire (conduisant à la formation du clou plaquettaire) (3) et coagulation plasmatique (stabilisation du clou par de la fibrine) même si ces deux phénomènes sont simultanés et interdépendants.

1. Hémostase primaire

L'hémostase primaire a donc pour but de créer un agrégat de plaquettes activées au niveau de la brèche vasculaire. Ce mécanisme fait intervenir différents acteurs tels que le vaisseau sanguin, les plaquettes, le facteur de Von Willebrand (VWF) et le fibrinogène (4).

A) Présentation des différents acteurs de l'hémostase primaire

(a) Le vaisseau sanguin

Un vaisseau sanguin est composé de trois feuillets : adventice, media et intima (5).

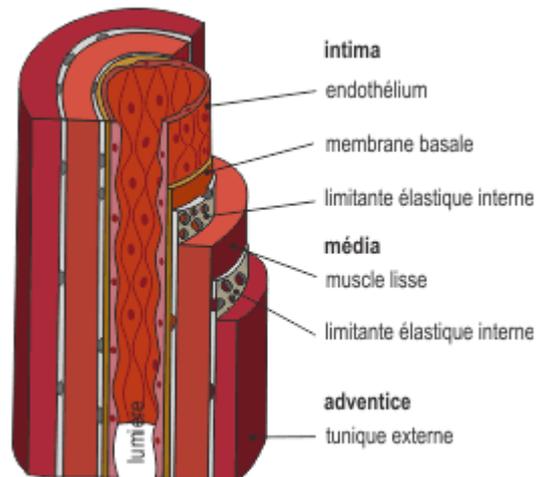


Figure n°1 : Coupe d'un vaisseau sanguin (6)

L'intima, la couche la plus interne, est composée d'un endothélium et d'un sous-endothélium. Les cellules de l'endothélium sont non-thrombogènes et ont pour fonction d'empêcher les contacts entre le sang et les cellules sous endothéliales qui à l'inverse, sont thrombogènes. De plus, les cellules endothéliales sécrètent des facteurs permettant de réguler l'activation des plaquettes (synthèse de PGI₂) et la coagulation (synthèse de protéine S).

Lors d'une blessure, il y a alors mise en contact du sang (plaquettes, facteurs de coagulation) avec les cellules sous-endothéliales. Ce contact entre les éléments du sang et les cellules va alors induire l'adhésion et l'activation des plaquettes au niveau de la brèche vasculaire.

(b) Les plaquettes

Les plaquettes sont synthétisées dans la moelle osseuse à partir des mégacaryocytes (7).

Ce sont des cellules anucléées dont la durée de vie est généralement comprise entre 8 et 10 jours. Elles sont ensuite phagocytées par les macrophages de la rate et du foie. Leur taux dans le sang varie de 150 à 450 G/L.

Les plaquettes présentent une bicouche phospholipidique dans laquelle sont insérés de nombreux récepteurs comme le récepteur à l'ADP ou le récepteur GPIIb-IIIa dont les rôles seront détaillés par la suite.

Enfin, sont présents dans le cytoplasme des plaquettes de nombreux granules (8) classés en deux catégories :

- Granules alpha : contiennent des protéines comme le facteur 4 plaquettaire, du fibrinogène, du VWF et d'autres facteurs de coagulation.
- Granules denses : contiennent de l'ADP (adénosine diphosphate), du calcium et de la 5HT (sérotonine).

Le contenu de ces granules sera déversé hors du cytoplasme lors de l'activation de la plaquette.

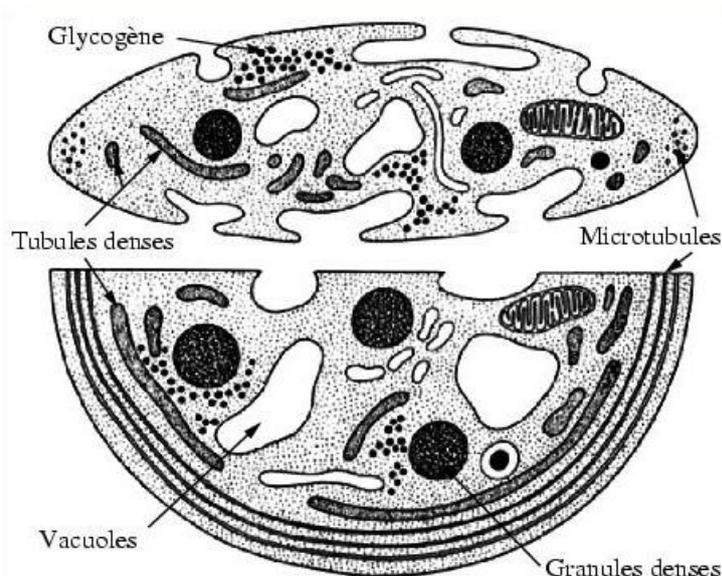


Figure n°2 : Schéma d'une plaquette avec ses récepteurs membranaires (9)

(c) Le facteur de Von Willebrand

Le VWF est produit par la cellule sous-endothéliale, une fraction est ensuite sécrétée dans le plasma tandis que l'autre reste au niveau sous-endothélial. Le VWF plasmatique présente une conformation impropre à la coagulation car il circule lié au facteur VIII (lui conférant une protection contre les réactions de lyse enzymatique) (10).

Une petite partie du VWF est retrouvée dans les granules alpha des plaquettes (11). Celui-ci ne pourra intervenir dans la coagulation que lorsque la plaquette sera activée.

(d) Le fibrinogène

Synthétisé dans le foie, le fibrinogène est un élément indispensable de l'hémostase primaire (permet l'agrégation plaquettaire) (12) mais également de la coagulation. Son rôle dans la coagulation sera détaillé en A,1,2,B,a. Le taux normal de fibrinogène se situe entre 2 et 4 g/L.

B) Déroulement de l'hémostase primaire

(a) Adhésion des plaquettes au sous-endothélium

Dès les premiers instants de la brèche vasculaire, il y a mise en contact du sous-endothélium avec le sang. Il se produit alors une activation du VWF du sous-endothélium qui va alors changer de conformation et pouvoir se fixer aux plaquettes par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire spécifique : le Gp Ib (13).

Notons également que l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium peut également se faire par l'intermédiaire du collagène, de la même façon que le VWF.

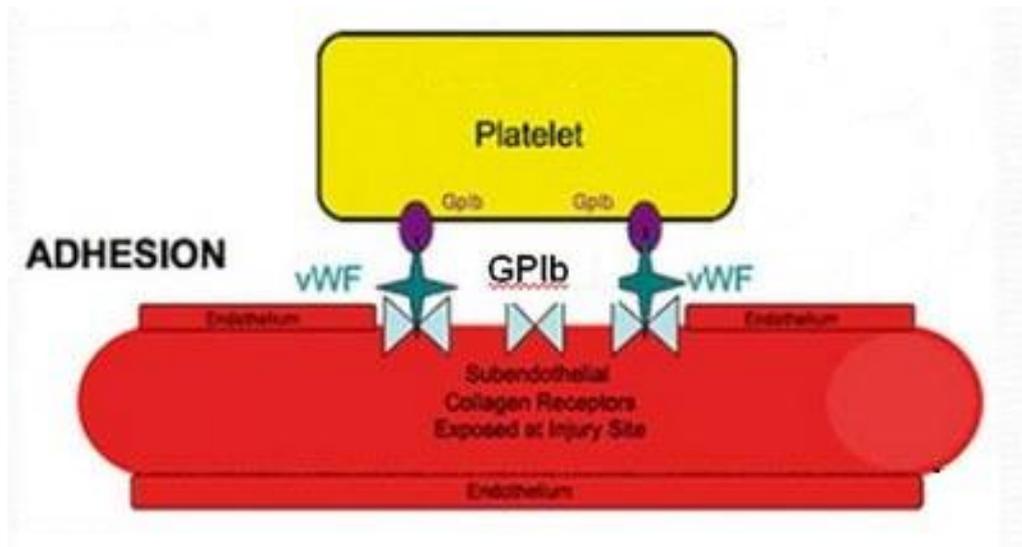


Figure n°3 : Adhésion d'une plaquette grâce au VWF (14)

(b) Cascade de réactions induisant l'activation des plaquettes

La fixation des plaquettes au sous-endothélium vasculaire va induire des cascades de réactions intracellulaires conduisant à leur activation.

- Changement de conformation

Les plaquettes vont alors évoluer et émettre des pseudopodes et induire la fusion des granules alpha et denses avec un système de sécrétion : le système canaliculaire (15).

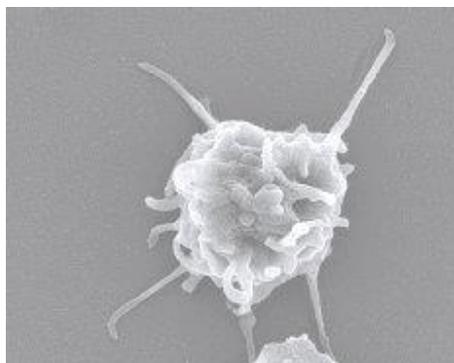


Figure n°4 : Schéma d'une plaquette activée avec présence de pseudopodes (16)

- Sécrétion du contenu des granules

Grâce à la fusion des granules alpha et granules denses, il y a sécrétion de leur contenu par l'intermédiaire du système canaliculaire : il se produit alors libération d'agents pro-agrégants tels que l'ADP, la sérotonine (induisant également une vasoconstriction, limitant les pertes sanguines), du fibrinogène ainsi que du facteur V.

- Métabolisme des phospholipides membranaires

A partir des phospholipides membranaires (PI, PC et PE), deux voies métaboliques peuvent aboutir à la production d'acide arachidonique. La première voie implique la phospholipase A2 tandis que l'autre implique la phospholipase C associée à une diglycéride lipase. L'acide arachidonique est ensuite métabolisé par une cyclooxygénase de type 1 (COX1), constitutive, en prostaglandines de type G2 et H2. Enfin, celles-ci sont métabolisées en thromboxane A2 (TXA2). Ce dernier est un agent fortement vasoconstricteur ainsi qu'un inducteur de l'activation des plaquettes par inhibition de l'adénylate cyclase (AC) membranaire.

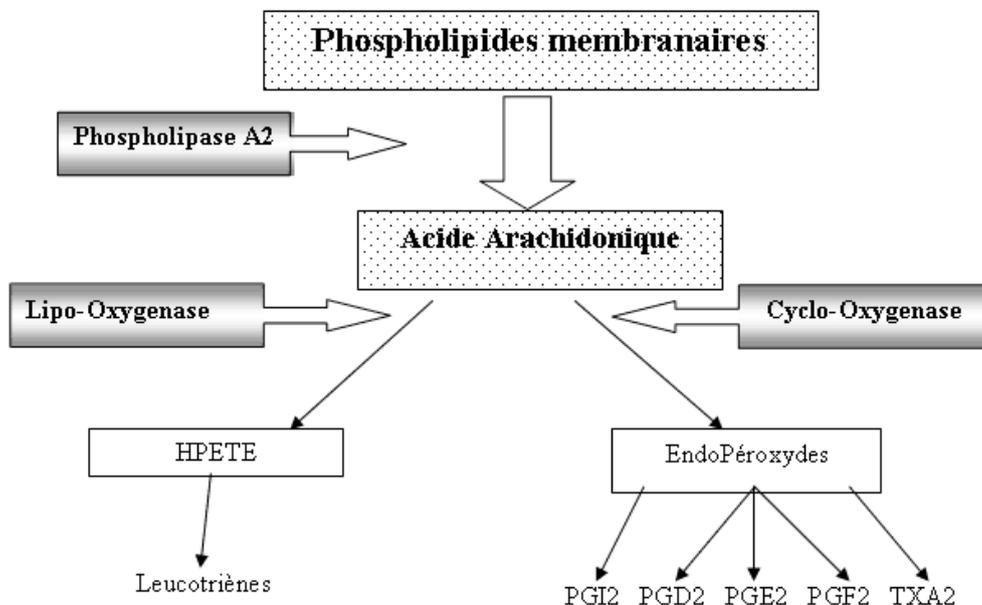


Figure n°5 : Dégradation des phospholipides membranaires (17)

Cette cascade de réactions est la cible de l'aspirine (18) : à faible dose, celle-ci va provoquer une inhibition sélective de la COX 1, empêchant ainsi la formation de TXA2, exerçant donc une activité antiagrégante plaquettaire.

A forte dose, l'aspirine va également agir au niveau d'une autre cascade de réactions. En effet, dans la cellule endothéliale, la thromboxane synthase est remplacée par une PGI2 synthase, produisant alors la formation de prostacycline qui est un agent fortement antiagrégant. L'aspirine est capable de bloquer la COX de la cellule endothéliale mais seulement à des doses élevées. L'effet antiagrégant plaquettaire de l'aspirine implique donc de l'utiliser à faibles doses.

- Remaniement membranaire

L'activation des plaquettes va induire un remaniement des membranes permettant l'exposition d'aminophospholipides indispensables au processus de coagulation. En effet, ils servent de support aux protéines vitamines-K dépendantes pour la formation des complexes enzymatiques de la coagulation.

(c) Recrutement d'autres plaquettes

Le TXA2 et l'ADP produits lors des étapes précédentes de l'activation plaquettaire permettent le recrutement d'autres plaquettes. Grâce à la présence de récepteurs spécifiques situés sur leur membrane, l'activation d'une plaquette permet d'en recruter d'autres ce qui amplifie le phénomène hémostatique. L'ADP, par exemple, se fixe sur des récepteurs spécifiques de la famille des RCPG appelés p2y2 et P2y12.

Ce phénomène de recrutement des plaquettes est également amplifié par la présence de thrombine (produite à la fin du processus de coagulation).

Certains médicaments vont exercer leur activité antiagrégante plaquettaire au niveau de cette étape de l'hémostase primaire : Le métabolite actif du clopidogrel inhibe de façon sélective la fixation de l'adénosine diphosphate (ADP) à son récepteur plaquettaire P2Y12, et donc l'activation du complexe GPIIb/IIIa provoquée par l'ADP, de sorte que l'agrégation plaquettaire soit inhibée (19).

Suite à cette fixation irréversible, le fonctionnement des plaquettes est modifié pour le reste de leur durée de vie (environ 7 à 10 jours) et la restauration d'une fonction plaquettaire normale correspond à la période de renouvellement des plaquettes.

(d) Agrégation des plaquettes

Lors de l'activation de la plaquette, nous avons vu précédemment qu'une modification de la membrane permettait un changement de conformation des protéines membranaires. L'une d'elle, la GPIIb/IIIa, va alors acquérir la capacité de reconnaître le fibrinogène et de s'y lier (12). Lorsque le processus implique plusieurs plaquettes, il en résulte la formation d'un amas de plaquettes liées les unes aux autres par l'intermédiaire du fibrinogène, fixé sur la GPIIb/IIIa.

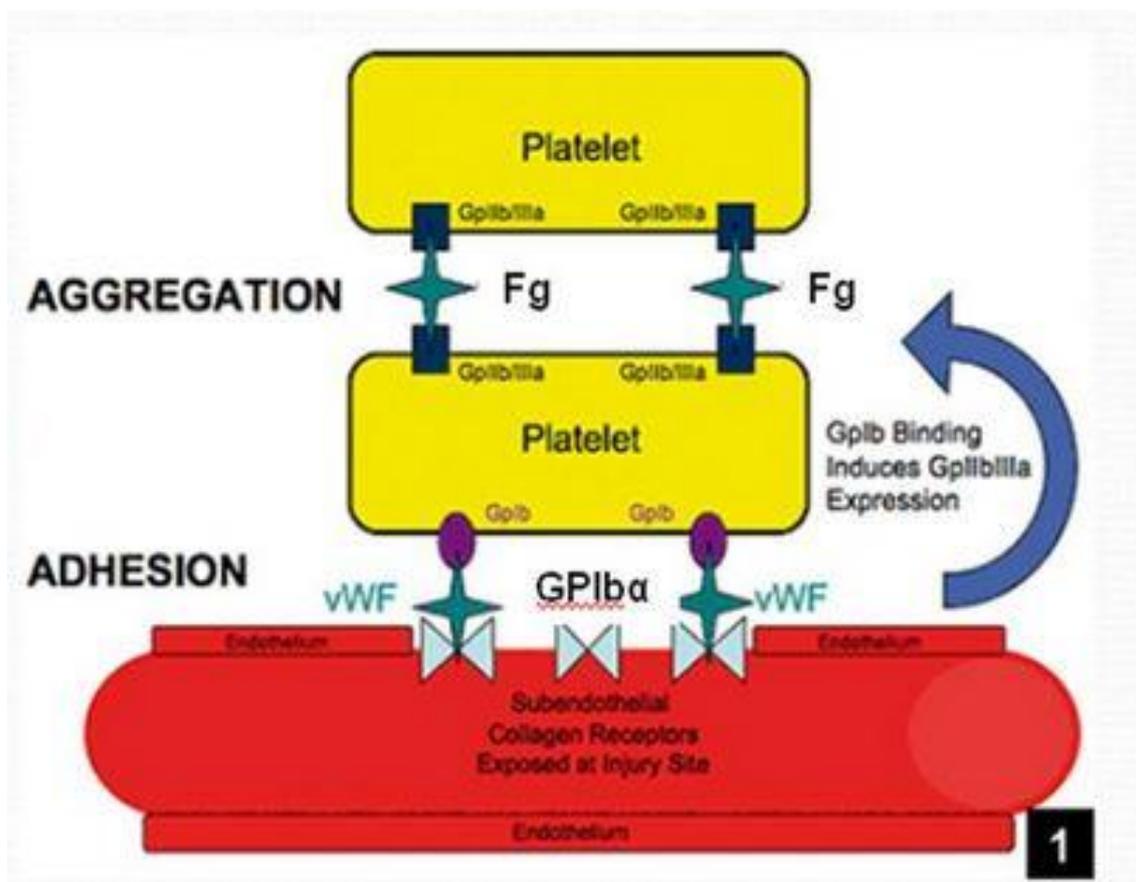


Figure n°6 : Agrégation des plaquettes entre elles (14)

Certains médicaments exercent une activité antiagrégante plaquettaire par l'intermédiaire du GPIIb/IIIa : L'abciximab est le fragment Fab de l'anticorps monoclonal chimérique 7E3. Son action est dirigée contre le récepteur de la glycoprotéine GPIIb/IIIa qui se trouve sur la surface des plaquettes humaines. L'abciximab inhibe l'agrégation plaquettaire en empêchant la liaison du fibrinogène et du facteur de Von Willebrand aux récepteurs GPIIb/IIIa des plaquettes activées (20).

C) Conclusion de l'hémostase primaire

A la fin de l'hémostase primaire, on aboutit donc à la formation d'un agrégat plaquettaire au niveau de la brèche vasculaire. L'activation des plaquettes permet d'initier la coagulation plasmatique.

2. Coagulation plasmatique et fibrinolyse

A) Introduction

La coagulation plasmatique est un phénomène enzymatique simultané à l'hémostase primaire et qui en est complémentaire. De nombreux acteurs sont communs aux deux phénomènes, comme par exemple le fibrinogène et le VWF.

Le but de la coagulation est de solidifier l'agrégat plaquettaire situé sur la brèche vasculaire, par la formation d'un caillot de fibrine. Ce caillot sera par la suite détruit lors de la réaction de fibrinolyse que nous détaillerons en A,1,2,D.

B) Intervenants

La coagulation plasmatique, tout comme l'hémostase, est un ensemble de mécanismes biochimiques complexes faisant intervenir différents acteurs que nous regrouperons en deux catégories : facteurs et inhibiteurs de la coagulation.

(a) Facteurs de coagulation

Un facteur de coagulation peut être désigné par son nom propre ou par un chiffre romain. Lorsque ce chiffre est suivi d'un « a », cela signifie que le facteur est activé et est donc capable de jouer son rôle dans la cascade de réactions de la coagulation plasmatique.

Exemple : Facteur Xa = Facteur de Stuart activé.

- Le fibrinogène

Comme nous l'avons vu en A,I,1,A,d, le fibrinogène est une protéine soluble (340 kDa), synthétisée dans le foie et présente dans le plasma et les granules alpha des plaquettes. Elle se présente sous la forme d'un dimère symétrique comprenant deux sous-unités alpha, deux sous-unités bêta et deux sous-unités gamma (12).

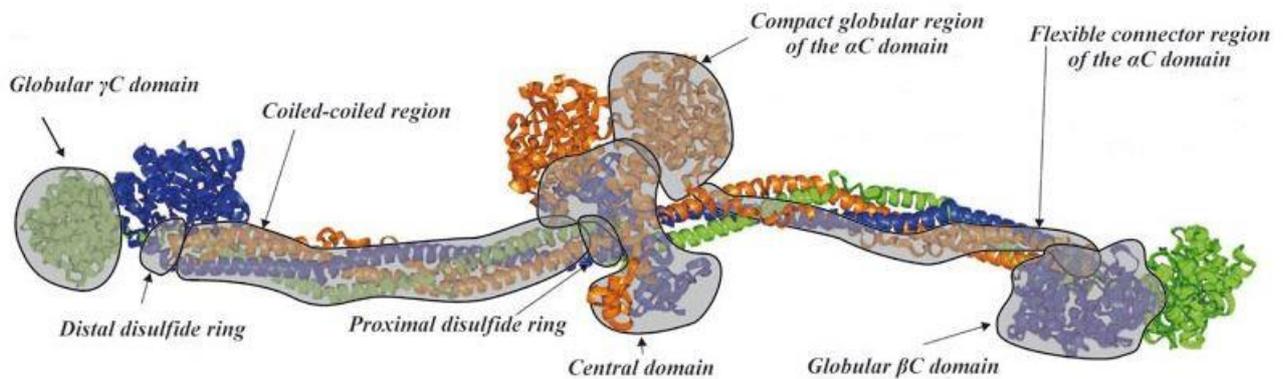


Figure n°7 : Représentation des sous-unités du Fibrinogène (21)

Son rôle principal dans l'hémostase primaire étant la formation de liaisons entre les plaquettes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

- Zymogènes de protéines sériques vitamine-K dépendantes

On appelle zymogène le précurseur inactif d'une enzyme (22). Dans le cas de la coagulation, on regroupe sous ce terme les facteurs II, VII, IX et X. Ces enzymes, synthétisées dans le foie, sont dites vitamine K dépendantes. Leur rôle est de se fixer, par l'intermédiaire de leur groupement Gla et en présence d'ion calcium, aux phospholipides membranaires présentés par les plaquettes activées (vu précédemment en A,I,1,B).

Ces résidus gamma carboxy glutamiques (Gla) situés en position N-terminale, proviennent de la carboxylation des acides glutamiques. Cette réaction à lieu dans les hépatocytes sous l'action d'une carboxylase utilisant la vitamine K réduite comme cofacteur.

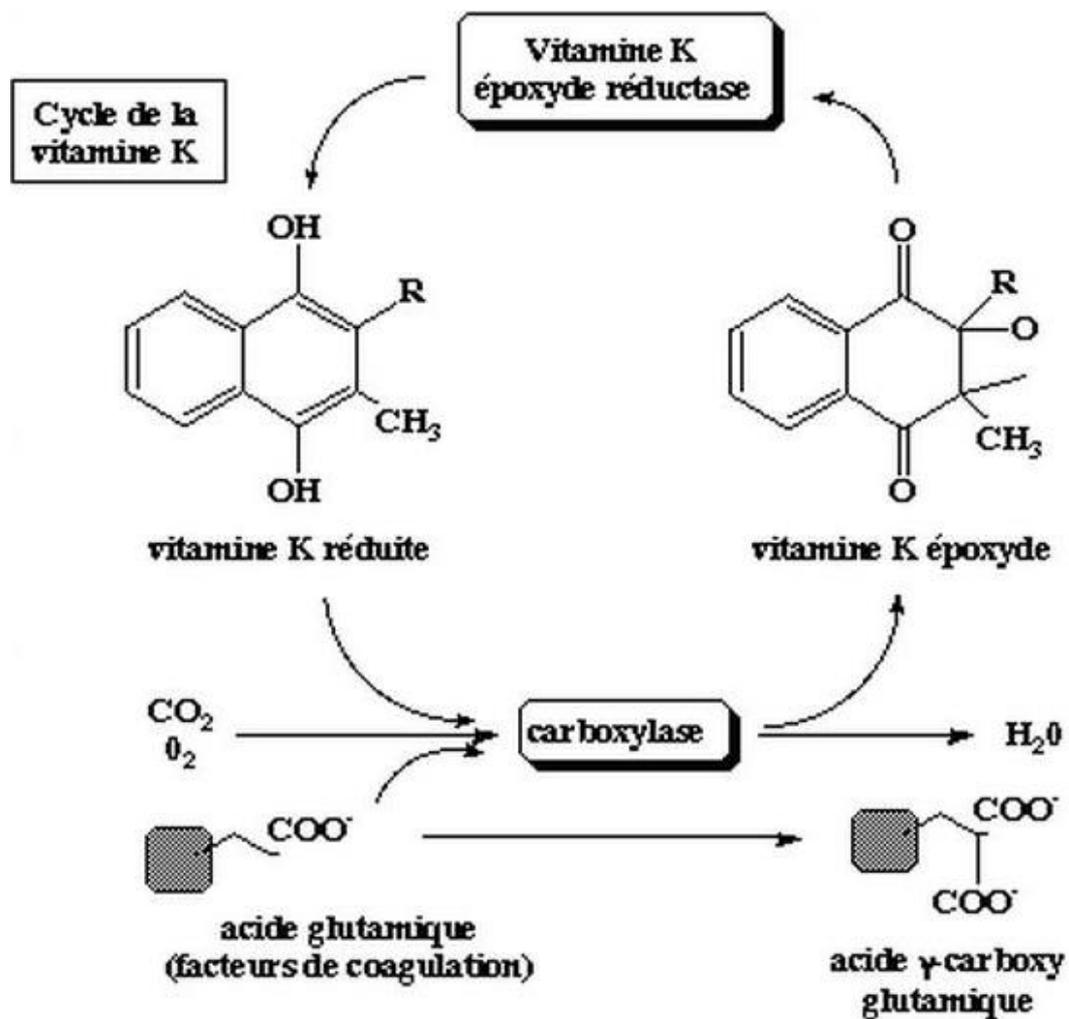


Figure n°8 : Carboxylation des résidus Glu en résidus Gla des facteurs Vit-k dépendants (23)

Comme toute réaction enzymatique, en l'absence du cofacteur Vitamine K réduite, la réaction ne pourra pas se faire : les facteurs Vit K dépendants ne pourront pas être carboxylés, et ne pourront alors pas se fixer aux phospholipides membranaires des plaquettes. On aboutit donc à un effet anticoagulant. Cet effet peut être pathologique, comme dans le cas d'un déficit en vitamine K (défaut d'apport, d'absorption,...) ou alors thérapeutique, par l'utilisation de médicaments antivitamine K.

Ces substances, que nous détaillerons en A,II,1, vont inhiber la régénération de la vitamine K réduite en bloquant le fonctionnement d'enzymes telles que l'époxyde et la quinone réductase.

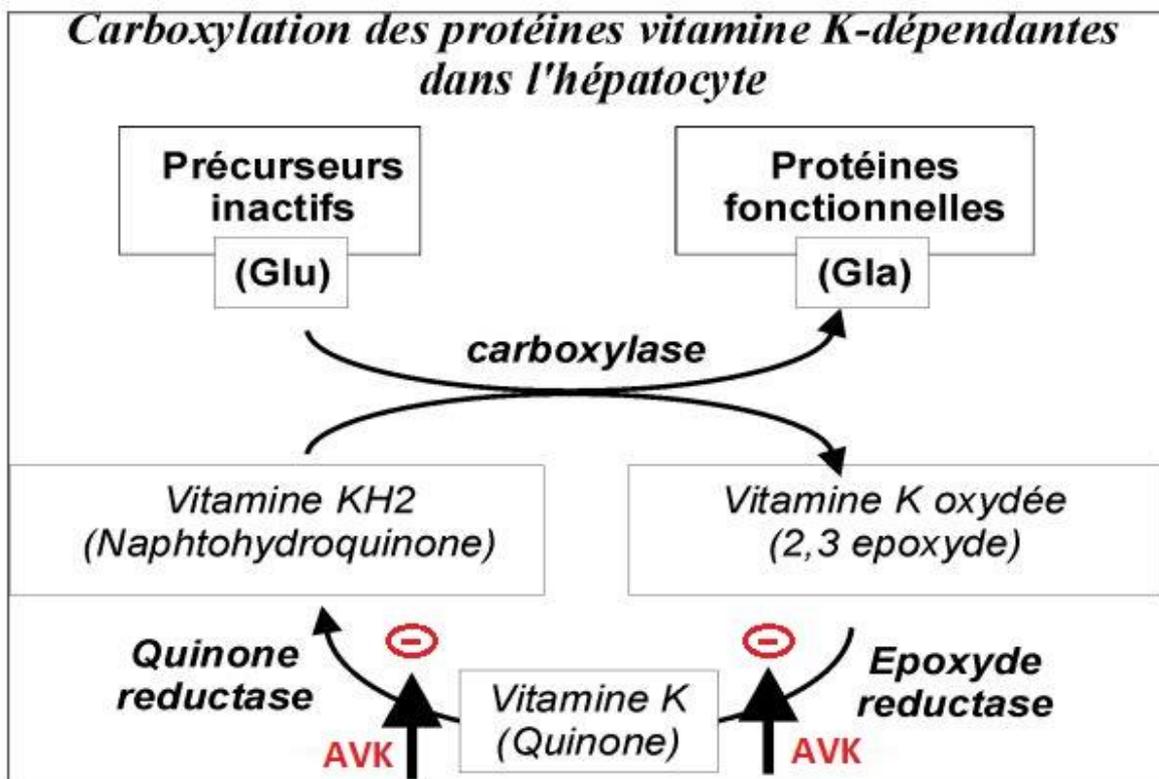


Figure n°9 : Impact de la vitamine K et des AVK sur l'activation des facteurs Vit-K dépendants

- Autres facteurs de coagulation

Les facteurs XI et XII sont synthétisés dans le foie et présents dans le plasma, ils sont capables eux aussi de se lier aux phospholipides membranaires des plaquettes activées.

Le facteur XIII se présente sous la forme d'un tétramère, composé de deux sous unités A et deux sous-unités B. Leur lieu de synthèse diffère puisque la sous-unité A est synthétisée au niveau du foie, des monocytes et des mégacaryocytes. Quant à la sous-unité B, elle est synthétisée exclusivement au niveau hépatique et assure le transport de la sous-unité A.

Le facteur XIII présente une très haute affinité pour le fibrinogène et la fibrine, nous étudierons les conséquences de cette affinité en A,I,2,C,c (25).

La synthèse du facteur V a lieu au niveau des hépatocytes et on peut le retrouver en majorité dans le plasma (80%) et à hauteur de 20% dans les granules alpha des plaquettes (voir A,I,1,A,b). Le Facteur VIII est synthétisé dans le foie, le poumon, la rate et le cerveau, il est présent dans la circulation sanguine lié au VWF. Les facteurs V et VIII sont considérés comme des cofacteurs de la coagulation.

Le facteur tissulaire est également appelé facteur III, ce facteur est un récepteur membranaire normalement absent de la circulation, présent au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire et des fibroblastes. Il sera donc exposé lors d'une brèche vasculaire et, grâce à sa haute affinité pour le facteur VII, il formera un complexe FIII – FVIIa. Ce complexe est à l'origine des cascades de réactions de la coagulation que nous détaillerons en A,I,2,C.

Tableau n°1 : Récapitulatif des facteurs de la coagulation (26)

	Dénomination	Lieu de synthèse	Demi-vie (en heures)
Facteurs			
I	Fibrinogène	Foie	100-150
II	Prothrombine	Foie + vitamine K	50-120
V	Proaccélélerine	Foie	12-36
VII	Proconvertine	Foie + vitamine K	4-6
VIII	Facteur anti-hémophilique A	Foie	10-16
IX	Facteur anti-hémophilique B	Foie + vitamine K	24
X	Facteur Stuart	Foie + vitamine K	36-48
XI	Facteur Rosenthal ou PTA	Foie	40-80
XII	Facteur Hageman	Foie	50-70
XIII	Facteur stabilisant de la fibrine	Foie	150-300

- Principe général de l'activation des zymogènes

Une fois fixés au niveau des phospholipides membranaires des plaquettes activées, un zymogène (inactif) sera la cible d'une enzyme protéolytique.

Il en résultera le clivage d'un fragment peptidique du zymogène, ce qui permet de démasquer le site catalytique du facteur de coagulation et donc, lui permet d'avoir une activité enzymatique.

Ces réactions sont très lentes en solution mais une fois fixées sur leur support spécifique (surface membranaire d'une plaquette activée) leur vitesse s'accroît de manière très importante (27).



Figure n°10 : activation de la prothrombine par le facteur Xa

(b) Inhibiteurs de la coagulation

Antithrombine III (ATIII) : Synthétisée par le foie, l'ATIII est un inhibiteur des sérines protéase. C'est le principal inhibiteur du facteur Xa, dans une réaction catalysée par l'héparine(28).

Protéine C : Glycoprotéine synthétisée dans le foie en présence de vitamine K, qui circule dans le plasma sous forme inactive. C'est un inhibiteur de la coagulation qui une fois activé va permettre de cliver les facteurs Va et VIIIa, bloquant ainsi la boucle d'amplification de génération de la thrombine (10).

Protéine S : Glycoprotéine vitamine K dépendante synthétisée dans les hépatocytes, les cellules endothéliales et les mégacaryocytes (10). Elle circule dans le plasma sous deux formes, l'une libre et active, l'autre (majoritaire) liée à une protéine de transport du complément, la C4b *Binding protein*. C'est un inhibiteur physiologique de la coagulation de par son rôle de cofacteur de la protéine C. Elle permet donc elle aussi la protéolyse des facteurs Va et VIIIa.

NB : Les protéines C et S étant vitamine K dépendantes, la présence d'AVK ou la carence en vitamine K va induire une baisse de leurs taux plasmatiques et donc une baisse de leur activité anti coagulante(29). Nous obtenons donc l'effet opposé à celui recherché lors de l'administration d'AVK mais qui est supplanté par l'inactivation des facteurs II, VII, IX et X.

C) Déroulement de la coagulation

(a) Activation

Schématiquement, le phénomène de coagulation peut s'instaurer par deux chaînes de réactions indépendantes mais aboutissant toutes les deux à la formation de thrombine. On parle de voies extrinsèque et intrinsèque de la coagulation.

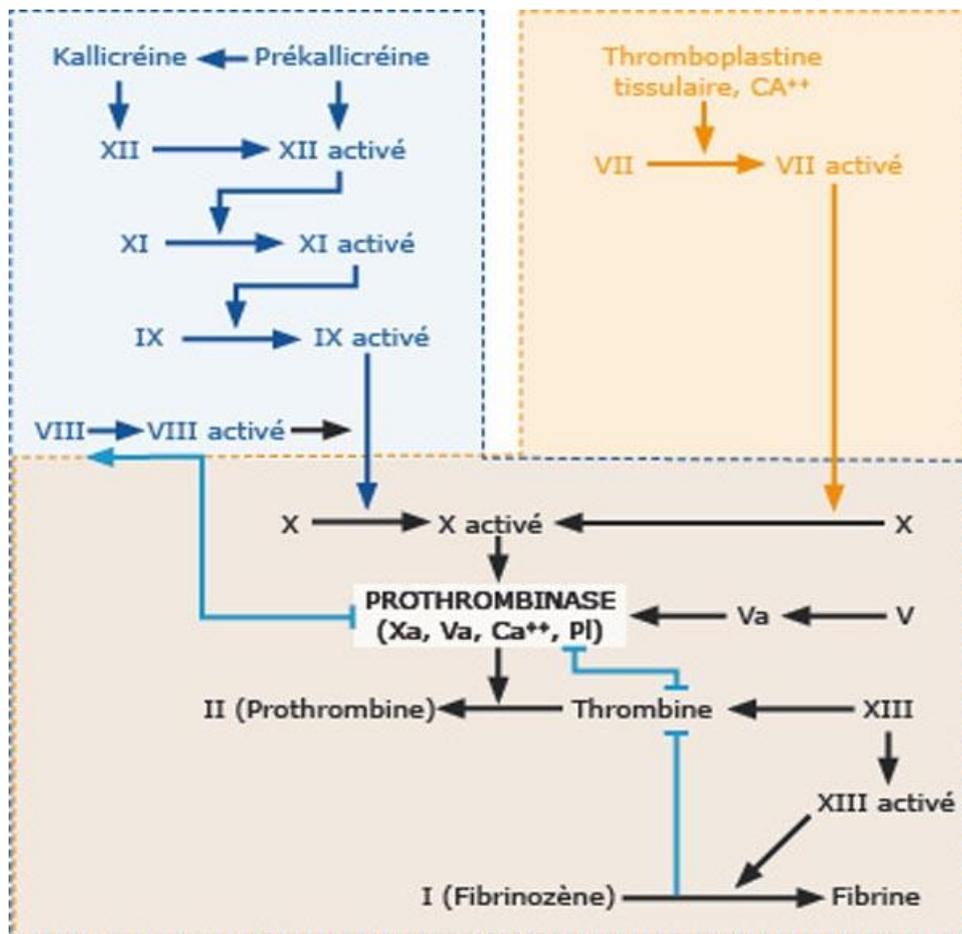


Figure n°11 : Représentation schématique de la coagulation (30)

- Voie extrinsèque

Nous avons vu précédemment que lors d'une brèche vasculaire, de nombreux éléments normalement isolés sont mis en contact avec le sang. C'est le cas du facteur tissulaire (facteur III), présent de manière constitutive sur les fibroblastes du sous endothélium. Le facteur VII circulant va alors venir se lier sur le FT, produisant un complexe F VII – FT qui, après liaison avec des ions calcium, s'activera en complexe F VIIa-FT.

Une fois ce complexe VIIa-FT formé, celui-ci va alors activer les facteurs IX et X. Les facteurs IXa et Xa pourront alors soit rester fixés au complexe et induire la production de thrombine, ou bien diffuser et recruter d'autres plaquettes activées au niveau de la brèche vasculaire.

- Voie intrinsèque ou phase « contact »

La deuxième voie est dite intrinsèque car, par opposition à la voie extrinsèque, tous les facteurs intervenants sont déjà présents dans le sang. Celle-ci s'active lors de la mise en contact du sang avec une surface chargée négativement telle que le verre, le kaolin et les cellules endothéliales.

L'ancienne conception de la coagulation impliquait une séparation stricte des deux voies tandis que de nouvelles théories donnent à la phase contact un rôle de consolidation et d'amplification de la voie extrinsèque grâce au facteur XI activé (31).

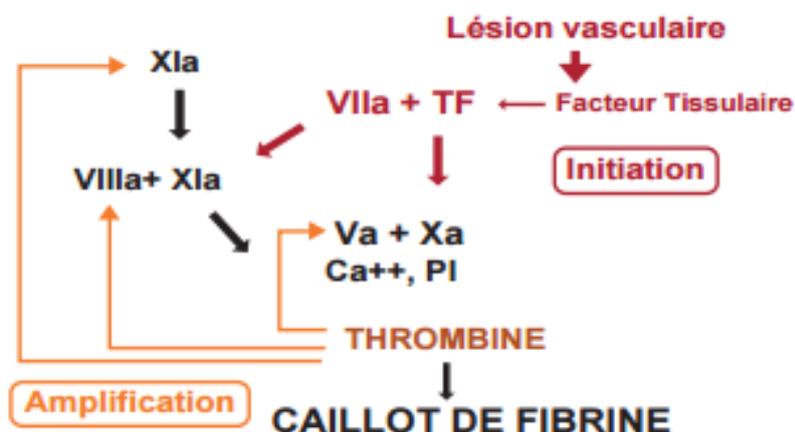


Figure n°12 : Nouvelle conception de la coagulation (32)

(b) Propagation et amplification de la coagulation

Nous avons vu en A,1,2,C,a que l'initiation de la coagulation par la voie exogène aboutissait à la formation de thrombine.

Son rôle principal est d'activer la transformation de fibrinogène en fibrine, qui va alors commencer à venir consolider le clou plaquettaire (31).

La thrombine stimule également sa propre production en activant les plaquettes situées à proximité qui exprimeront alors plus de phospholipides au niveau externe de leur membrane cytoplasmique. Elle active également les cofacteurs V et VIII, ainsi que le facteur XI, activant d'autant plus sa propre synthèse. Le facteur VIIIa est le cofacteur de l'activation du X par le IXa tandis que le facteur Va permet l'activation de la prothrombine (II) par le facteur Xa. Ces cofacteurs, en se liant à la fois à l'enzyme et au substrat, permettent d'augmenter la vitesse de réaction de clivage peptidique nécessaire à l'activation des zymogènes : Ils induisent un positionnement idéal de l'enzyme en dégageant son site actif et en le rapprochant du site de la liaison peptidique.

(c) Formation et stabilisation du caillot de fibrine

Nous avons vu précédemment que le rôle majeur de la thrombine est de permettre la synthèse de fibrine à partir de fibrinogène, la fibrine venant alors consolider le clou plaquettaire.

Le fibrinogène est constitué de monomères de fibrines liés à deux types de peptides, les fibrinopeptides A et B. Cet ensemble forme les trois paires de chaînes du fibrinogène : $A\alpha$, $B\beta$ et γ (33). La thrombine va alors cliver au niveau N-terminal des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ les fibrinopeptides A et B. Il y a alors libération de monomères de fibrine. Ces monomères vont pouvoir s'associer entre eux grâce à des liaisons entre les extrémités complémentaires des chaînes α , β et γ .

d'après Tollefsen, wustl, edu

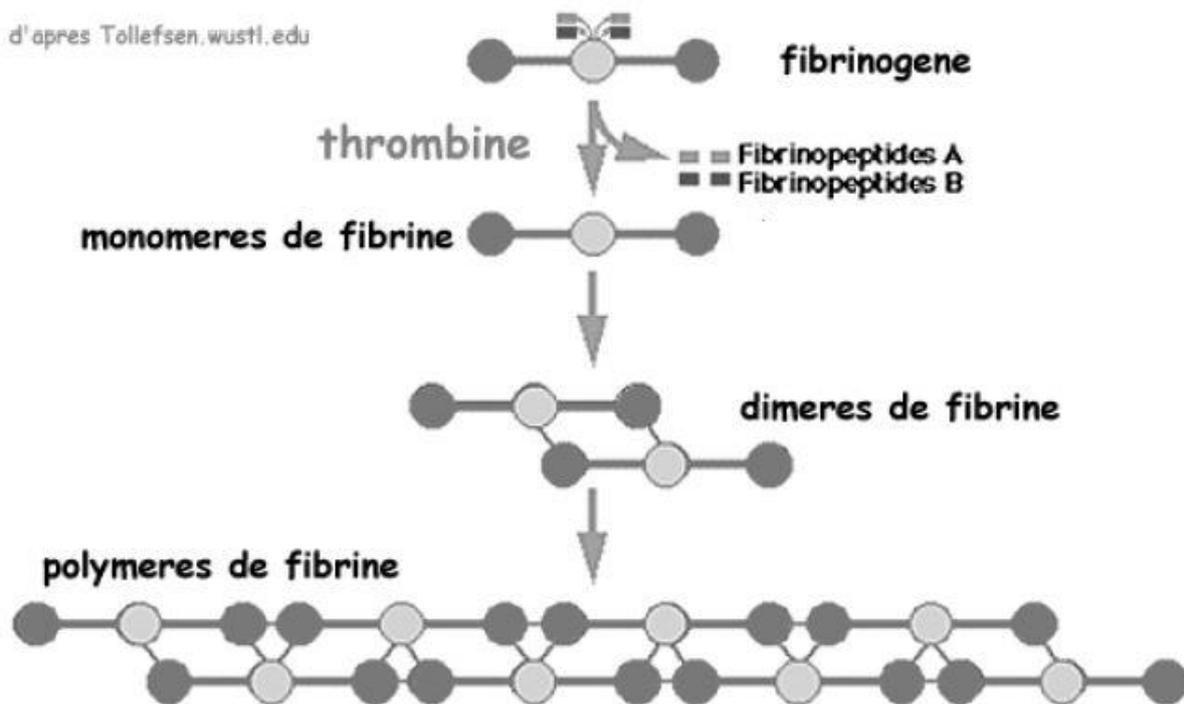


Figure n°13 : Formation des polymères de fibrine

Ce polymère de fibrine reste malgré tout instable : il doit être consolidé par le facteur XIIIa qui va établir des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine. Le facteur XIII est activé par la thrombine, selon la réaction qui nécessite la présence de fibrine et de calcium qui servent de cofacteurs. Le facteur XIIIa est une enzyme de type transglutaminase qui catalyse la formation de ponts peptidiques entre des résidus Gln et Lys. Le facteur XIIIa va donc induire des liaisons entre les monomères de fibrine, mais également avec des protéines dotées d'activité anti-fibrinolyse (11).

On obtient donc un caillot de fibrine très solide qui stabilise alors très efficacement le clou plaquettaire.

D) Réaction de fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus physiologique qui aboutit à la dégradation du caillot de fibrine formé lors de la coagulation afin de dissoudre la thrombose et éviter une coagulation excessive. Il y a alors formation de produits de dégradation de la fibrine, solubles en milieu aqueux et qui sont donc emportés par le flux sanguin.

(a) Acteurs de la fibrinolyse

La plasmine est une protéine dotée d'activité sérine protéase capable de dégrader le caillot de fibrine. Son précurseur est le plasminogène, une glycoprotéine synthétisée dans le foie qui circule librement dans le sang et présente une forte affinité pour la fibrine. La synthèse de plasmine à partir du plasminogène est régulée par différents facteurs, activateurs et inhibiteurs.

- Activateurs du plasminogène

L'activateur majeur de la synthèse des plasmine est le T-Pa (tissue plasminogen activator), synthétisé au niveau des cellules endothéliales. Son activité dans la circulation est faible car il est tout de suite la cible d'inhibiteurs qui vont l'empêcher d'activer le plasminogène (34).

Un activateur mineur du plasminogène est l'U-Pa (Urokinase). Il est synthétisé par les cellules endothéliales et les macrophages sous forme de pro-urokinase inactive (35). L'urokinase permet donc la dégradation de la fibrine présente au niveau vasculaire. Celle-ci, par l'intermédiaire de métalloprotéases, a un rôle dans le processus de dégradation de la matrice extracellulaire. La dégradation de cette fibrine par l'intermédiaire de l'U-Pa favorise donc un remodelage vasculaire.

- Inhibiteurs du plasminogène

L'inhibiteur principal de la synthèse de plasmine est le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1). Synthétisé au niveau endothélial, celui-ci a pour rôle de fixer le T-Pa libre et de l'inhiber (36). Ne pouvant agir sur le T-Pa fixé sur la fibrine, ce système de régulation permet la synthèse de plasmine uniquement en présence de fibrine et focalise donc son action là où elle est nécessaire.

Il existe deux autres inhibiteurs dont le rôle est plus secondaire : α 2-antiplasmine et TAFI (Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) (37).

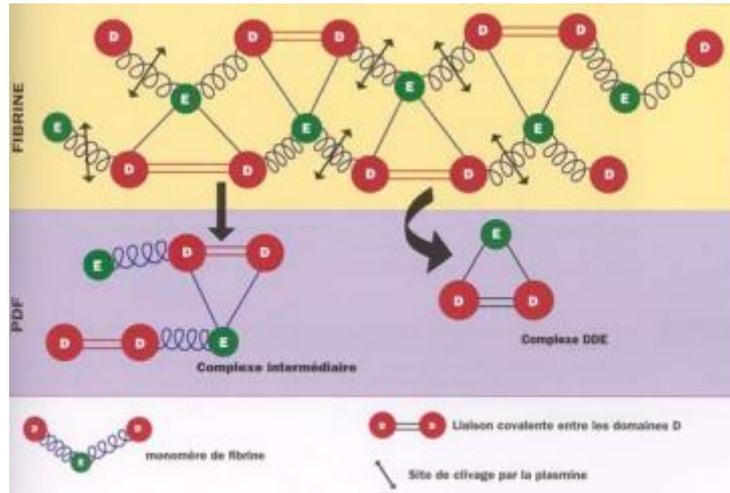


Figure n°14 : Digestion de la fibrine (3)

E) Exploration biologique de la coagulation et de la fibrinolyse

Le prélèvement sanguin doit se faire sur un tube contenant un anticoagulant chélateur du calcium, comme un tube citraté. La centrifugation permet d'obtenir un plasma dépourvu d'ions calcium, de plaquettes et donc de phospholipides. L'initiation de la coagulation nécessitera donc l'ajout d'activateurs et permettra d'explorer la voie intrinsèque ou extrinsèque en fonction de l'activateur ajouté.

(a) Exploration de la coagulation

- Temps de céphaline avec activateur (TCA)

L'ajout à un plasma citraté de céphaline (phospholipide) et d'un activateur de la voie intrinsèque type kaolin et de calcium, permet d'évaluer la voie contact de la coagulation (38). Le résultat obtenu varie donc en fonction des facteurs de la coagulation impliqués dans la voie endogène : facteurs I, II, V, VIII, IX, X et XI. Ce résultat est comparé avec celui d'un témoin et exprimé sous forme de ratio. Le TCA normal est situé aux alentours de 1.2 (10).

- Temps de Quick (TQ)

Dans ce cas, à un plasma citraté, on ajoute de la thromboplastine (phospholipide), du calcium et un activateur la voie extrinsèque : le facteur tissulaire. De la même façon que pour le TCA, le résultat varie donc en fonction des taux des facteurs impliqués : I, II, V, VII, X. Le résultat est exprimé en fonction d'un plasma témoin correspondant à 100%. La normale est > 70% (10).

(b) Exploration de la fibrinolyse

- Temps de lyse des euglobulines

Ce test consiste à analyser l'activité fibrinolytique d'un plasma dont on a supprimé les inhibiteurs de la fibrinolyse par précipitation (39). Le précipité obtenu est recalcifié, ce qui active la coagulation puis la fibrinolyse. La valeur normale doit être supérieure à 3h.

- Produits de dégradation de la fibrine

Les Produits de Dégradation de la Fibrine (PDF) dont font partie les D dimères, sont le reflet de la dégradation de la fibrine dans la circulation sanguine et donc également le reflet de sa formation. La mesure des D dimères présente une très forte valeur prédictive négative : c'est-à-dire qu'un taux bas permettra d'exclure une thrombose (40). A l'inverse, un taux élevé ne permet pas d'affirmer le diagnostic de thrombose car le taux de D dimères peut être physiologiquement modifié avec l'inflammation, l'âge ou un traumatisme.

II. Différentes catégories d'anticoagulants oraux

1. Médicaments antivitamines K

A) Présentation de la famille médicamenteuse et mécanisme d'action

(a) Historique

La découverte des toutes premières molécules présentant une activité antivitamines K commença au début des années 1920, aux Etats-unis et au Canada. Le bétail était alors décimé par une maladie inconnue provoquant des hémorragies massives spontanées, ou lors de traumatismes mineurs. Un an plus tard, Schofield détermine que l'intoxication était due à l'ingestion de foin moisi obtenu à partir de mélilot (plante herbacée du genre *Melilotus*).

En 1929, le vétérinaire américain Roderick démontre que la pathologie du bétail résultait d'une anomalie au niveau de la prothrombine, une protéine pro-coagulante. Ce n'est qu'en 1940 que Karl Paul Link isole le dicoumarol du foin moisi. Celui-ci est un métabolite des coumarines, molécules largement répandues dans les plantes herbacées.

Huit années de recherches furent nécessaires pour isoler des molécules plus puissantes et aboutir à la commercialisation de la première molécule présentant une activité antivitamines K. En 1948, la warfarine était alors utilisée pour ses propriétés anticoagulantes comme rodenticide (41). Son usage chez l'homme fut envisagé à la suite d'une intoxication massive volontaire qui fut sans conséquence chez les patients. L'usage en thérapeutique humaine commence dès 1954 et concerne entre autres patients le président Eisenhower chez qui il fut prescrit de la warfarine après un infarctus du myocarde.

Les AVK sont maintenant utilisés en France depuis plus de 60 ans et sont les anticoagulants les plus utilisés dans les cas de thromboses veineuses, valvulopathies et fibrillations auriculaires. Environ 1 % de la population française (soit environ 900 000 patients) est traité par AVK, les ventes ayant doublé entre 2000 et 2011, puis baissent en 2013 (42).

Malgré un recul suffisant, une bonne connaissance de cette catégorie médicamenteuse et un rapport bénéfice/risque favorable, les AVK restent aujourd'hui la première cause d'accident iatrogénique grave puisque l'on déplore environ 17000 (2) hospitalisations par an en France.

(b) Familles chimiques et mécanisme d'action

Actuellement, deux familles chimiques présentant une activité antivitamines K sont utilisées en thérapeutique humaine. On distingue les dérivés coumariniques (plus communément appelés coumadines) et les dérivés de l'indane-1,3-dione.

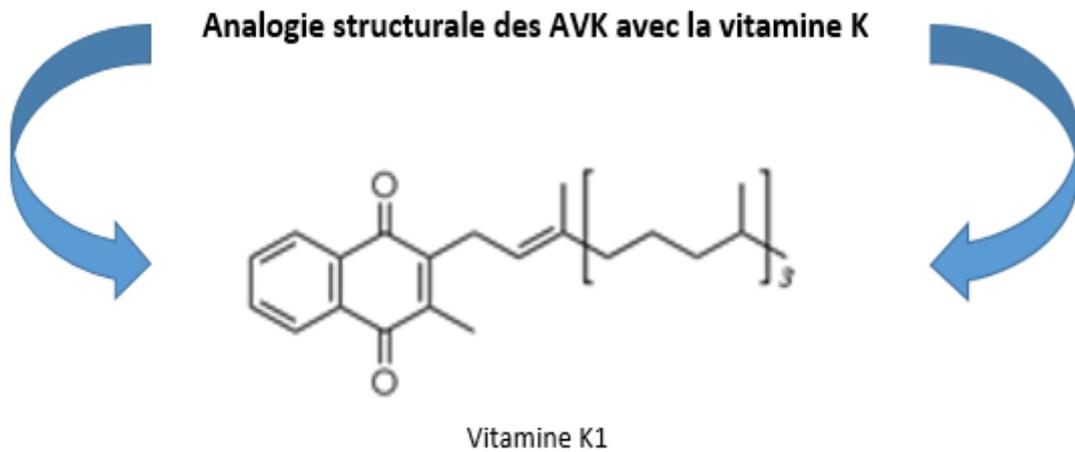
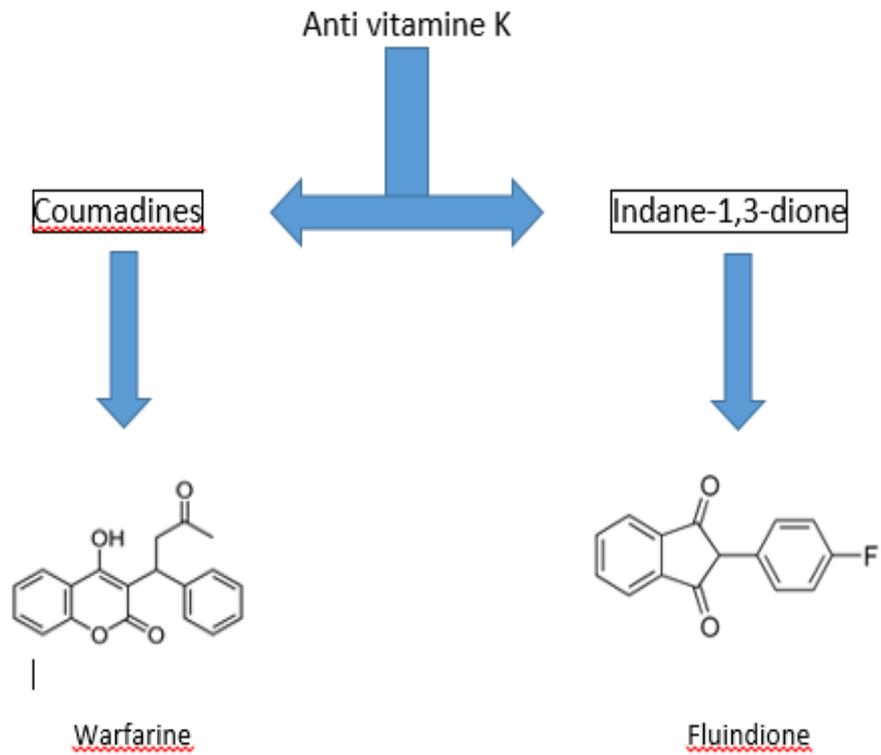


Figure n°15 : Familles chimiques et analogie structurale des antivitamines K

- Mécanisme d'action

Comme nous l'avons vu en A,1,2, la vitamine K est un élément majeur de la coagulation plasmatique. Son déficit lors de carence, ou son inactivation excessive lors d'intoxications par AVK entraînent des syndromes hémorragiques d'intensité proportionnelle au déficit d'activité.

Les antivitamines K agissent en bloquant le cycle d'oxydation-réduction de la vitamine K : Ils inhibent de manière compétitive les vitamines K réductases (Quinone et Epoxyde réductases) qui réduisent la vitamine K après son oxydation lors de la carboxylation des résidus glutamiques des précurseurs des facteurs de coagulation II, VII, IX, X, Protéine C et protéine S. Cette carboxylation étant indispensable pour transformer ces précurseurs en facteurs actifs de la coagulation, le blocage du cycle de régénération de la vitamine K réduite induit la synthèse de facteurs inactivables et donc impropres à jouer leur rôle dans la coagulation plasmatique.

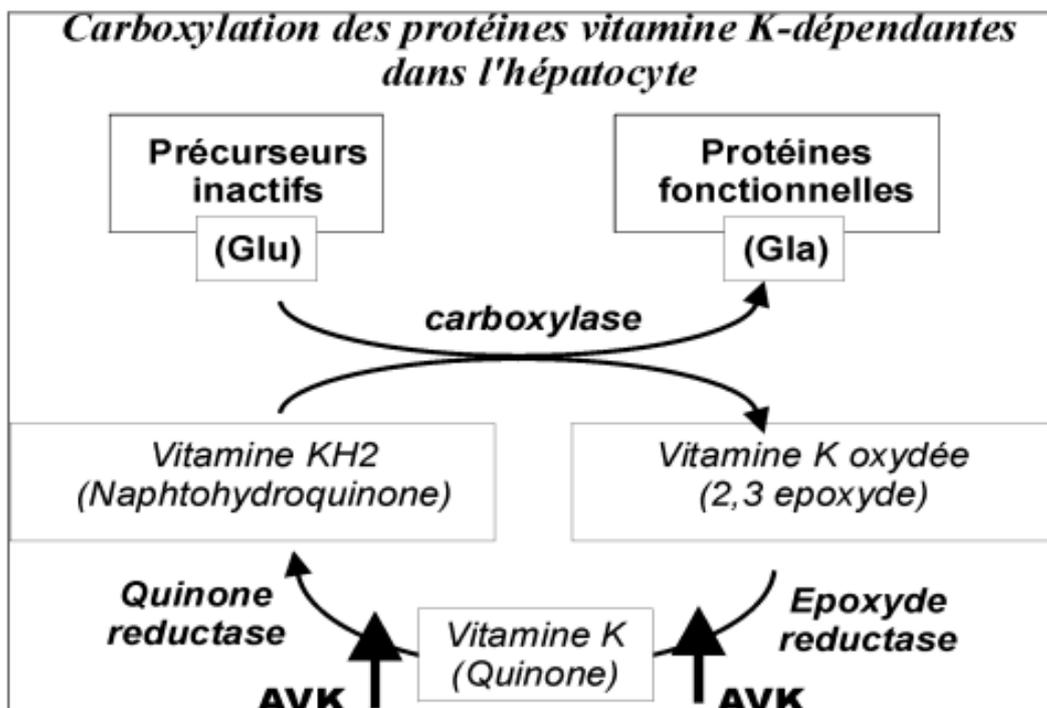


Figure n°16 : Mode d'action des AVK.(24)

Les antivitamines K vont donc empêcher la régénération des vitamines K oxydées, soit la synthèse de facteurs de coagulation activables. Cela se traduit alors par l'accumulation dans les hépatocytes des précurseurs des facteurs vitamine K dépendants appelés PIVKA. L'impact précis de cette accumulation de précurseurs n'est pas encore bien déterminé.

A l'état normal, synthèse et dégradation des facteurs vitamine-K dépendants se trouvent dans un état d'équilibre. Celui-ci est perturbé par la présence d'AVK qui réduit la synthèse de ces facteurs, entraînant un second état d'équilibre, atteint quelques jours plus tard (de l'ordre de 5 demi-vies). Les demi-vies des facteurs vitamine-K dépendants sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°2 : Demi-vies des facteurs vitamine-K dépendants (43)

Activité	Facteurs		T1/2
Procoagulante	II	Prothrombine	60h
	VII	Proconvertine	6h
	IX	Antihémophilique B	24h
	X	Stuart	50h
Anticoagulante	Protéine C		6h
	Protéine S		60h

Les AVK réduisent donc successivement les taux de proconvertine, puis de facteur antihémophilique B, puis du facteur Stuart et enfin de la prothrombine, dont l'état d'équilibre ne sera atteint qu'au bout d'une semaine environ.

Ces propriétés permettent de mieux comprendre le délai d'action des AVK et conditionnent leur utilisation en pratique : lors d'un relais héparine – AVK, il est recommandé de chevaucher les prises des deux molécules durant une période de 5 jours en moyenne (44).

B) Propriétés pharmacocinétiques

L'administration des AVK se fait exclusivement par voie orale et donne lieu à une absorption par le tractus intestinal au niveau de l'estomac et du jéjunum en 3 à 6 heures. Ces molécules se lient de façon importante à l'albumine (70 à 97%) et constitue ainsi un réservoir de molécules inactives.

Le métabolisme est essentiellement hépatique par les mono-oxydases et conjugases du réticulum endoplasmique des hépatocytes. Certains de ces métabolites ont une activité anticoagulante, responsable d'une partie des variabilités interindividuelles que l'on constate lors de l'administration d'AVK chez différents patients.

L'élimination peut se faire par la bile sous forme inactive ou au niveau glomérulaire par l'intermédiaire de l'albumine.

A l'inverse des héparines, les AVK traversent la barrière placentaire et diffusent dans le lait maternel, à l'origine de fœtopathies, contre indiquant formellement leur utilisation chez la femme enceinte ou allaitant.

C) Principaux effets indésirables et contre-indications

(a) Effets indésirables

Nous pouvons classier les effets indésirables des AVK en deux catégories : Hémorragiques et non hémorragiques.

L'intensité et la gravité des accidents hémorragiques sont directement liées au degré de non activation des facteurs vitamine-K dépendants ainsi qu'à leur localisation. Les effets indésirables comprennent des gingivorragies, épistaxis, hématuries voire de simples ecchymoses. Ces signes peuvent être des signaux d'alerte prévenant de troubles plus graves : hémarthroses localisées principalement au niveau du genou, métrorragies, hémorragies oculaires, digestives, voire intra-crâniennes.

Les accidents non hémorragiques sont quant à eux plus rares, mais il est possible de citer la nécrose cutanée ou mammaire de la femme obèse en début de traitement et l'intolérance gastrique observée avec les coumarines. Les cas de nécrose seraient dus à la chute précoce de la protéine C par rapport aux autres facteurs de la coagulation dont la demi-vie est plus longue. Il en résulte la formation de micro thromboses à l'origine d'ischémies localisées.

(b) Interactions et contre-indications

De très nombreuses substances, qu'elles soient médicamenteuses ou alimentaires, peuvent avoir un impact sur l'effet des AVK en augmentant ou diminuant leurs effets. Il est donc crucial que le clinicien connaisse précisément ces interactions et puisse apprécier au mieux le rapport bénéfice risque d'une prescription d'AVK. De plus, la mise en place d'un programme d'éducation thérapeutique du patient permet de réduire les risques de survenue d'événements iatrogéniques (45).

Tableau n°3 : Principales interactions médicamenteuses des AVK

	Augmentation de l'effet des AVK	Diminution de l'effet des AVK
Absorption digestive (1)	Ralentisseurs du transit.	Anti-acides, laxatifs, cholestyramine, charbon actif.
Liaison Albumine – AVK (2)	Abaisssement de la liaison : AINS, sulfamides, fibrates, statines,	
Catabolisme hépatique (3)	Abaissé par cimétidine, allopurinol, chloramphénicol, disulfirame.	Augmenté par les barbituriques, carbamazépine, méprobamate, phénitoïne, rifampicine, griséofulvine.
Synthèse des facteurs VK dépendants	Diminuée par amiodarone, quinidine, quinine, AINS.	Augmentée par les œstrogènes, corticoïdes.
Synthèse de VK (4)	Diminuée par les antibiotiques.	Augmentée par la prise de vitamine K peros (alimentation) ou injectable.

- 1 Absorption digestive : les coumadines, de par leur fonction phénol, sont des acides faibles. Leur absorption est donc diminuée par les substances favorisant une augmentation du pH gastrique tels que les anti-acide (inhibiteurs de la pompe à proton, antagonistes des récepteurs histaminergiques de type 2 ou topiques alcalinisants). Enfin, la cholestyramine diminue l'absorption des coumadines en interrompant le cycle entérohépatique.

- 2 Liaison à l'albumine : les AVK sont liés de manière réversible à l'albumine, à hauteur de 70 à 97 %. En cas de coadministration d'une substance également liée à l'albumine, il se produira un phénomène de compétition qui se traduira par l'augmentation de la forme libre de l'AVK et donc une augmentation de son effet.

- 3 Catabolisme hépatique : les AVK sont métabolisés au niveau du foie par des enzymes (hydroxylases principalement) de type CYP2C9. L'inhibition de ce système enzymatique provoque donc une accumulation d'AVK créant ainsi une augmentation de leur effet. A l'inverse, l'induction de ce système enzymatique induira une diminution de l'effet anticoagulant.

Il faut donc être particulièrement vigilant lors de la coadministration de substances médicamenteuses et veiller à informer le patient sur les risques encourus lors d'une automédication.

- 4 Synthèse de vitamine K : certains aliments riches en vitamine K1 tels que les choux et les haricots verts peuvent, en cas de consommation importante, déséquilibrer la balance « synthèse-dégradation » des facteurs vitamine-K dépendants. Il en résulte une diminution variable des effets anticoagulants des AVK. A l'inverse, lors de situations particulières telles qu'une alimentation parentérale exclusive, il faudra procéder à une supplémentation en vitamine K afin d'éviter une augmentation trop importante de l'effet des AVK par déficit en facteurs de coagulation VK dépendants. Enfin, comme vous l'avons vu en A,II,1,C,b la flore intestinale permet la synthèse de vitamine K. La destruction de cette flore lors d'antibiothérapies large spectre administrés par voie orale peut également potentialiser l'effet des AVK.

(c) Variabilité inter et intra-individuelle

Chez un même patient, les doses d'AVK à administrer pour obtenir un INR constant peuvent varier en fonction de situations physiopathologiques telles que l'âge, le poids et la présence de comorbidités (insuffisance hépatocellulaire et insuffisance rénale).

Entre deux patients donnés, les doses à administrer peuvent différer d'un facteur 20. Dans le cas de la warfarine, 40 % de la variabilité s'explique par un polymorphisme génétique concernant deux gènes : VKORC1 et CYP2C9.

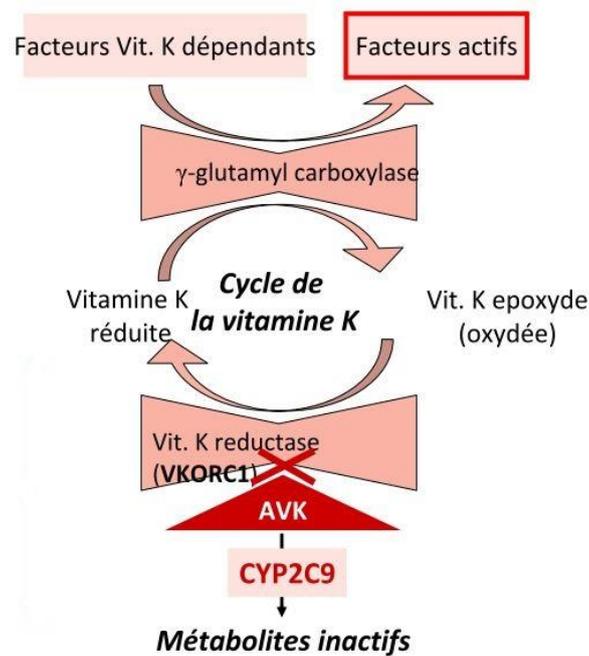


Figure n°17 : Pharmacogénétique des antivitamines K (46)

CYP2C9 : Au moins 20 allèles différents ont été identifiés concernant le gène codant pour les enzymes du CYP2C9. Parmi ces variants alléliques, certains comme le CYP2C9*2 et CYP2C9*3 entraînent des mutations faux sens entraînant la synthèse d'enzymes non fonctionnelles. Environ 40 % de la population caucasienne porte au moins un allèle non fonctionnel ce qui se traduit par une diminution de l'activité enzymatique du CYP2C9, entraînant une diminution du métabolisme des AVK et donc, l'augmentation de leur effet anticoagulant. On procède donc à un abaissement des doses proportionnel au déficit enzymatique, principalement en début de traitement.

VKORC1 : Il existe un haplotype fréquent caractérisé par une diminution de la synthèse des vitamines-K réductases, induisant une augmentation de l'effet des AVK à l'état d'équilibre.

Grâce aux études de pharmacogénétique et en tenant compte des paramètres détaillés ci-dessus, il est possible de proposer des adaptations posologiques pour chaque patient.

Tableau n°4 : Adaptations posologiques de la warfarine en fonction du profil pharmacogénétique du patient(46)

VKORC1	CYP2C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
GG	5-7 mg	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg
AG	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg
AA	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg

(d) Suivi des AVK

Comme vu en A,I,2,E, la mesure du taux de prothrombine explore la voie exogène de la coagulation à travers les facteurs II, V, VII et X. La mesure du TP seule ne permet de suivre avec précision l'effet des AVK du fait des variations des réactifs utilisés dans les différents laboratoires.

Il fut donc mis en place un calcul simple permettant de standardiser ce test :

$$\text{INR} = (\text{Temps patient} / \text{Temps témoin}) \text{ ISI}$$

INR = International normalised ratio.

ISI = Indice de sensibilité international spécifique du réactif utilisé.

Les zones thérapeutiques dans lesquelles doit se trouver l'INR varient en fonction de l'importance de l'anticoagulation souhaitée, de la pathologie, ce que nous verrons en A,III,1.

La mesure de l'INR doit commencer après la troisième prise afin de dépister une hypersensibilité chez le patient. Un INR supérieur à 2 nécessitera de diminuer les posologies. La deuxième mesure s'effectue en fonction du premier résultat et sera réalisée de 3 à 6 jours après ce premier contrôle (44).

(e) Conduite à tenir en cas de surdosage

- Surdosage asymptomatique

Dans ce cas, et si le contexte clinique le permet, on préférera une prise en charge ambulatoire. Une hospitalisation sera nécessaire en cas de facteurs de risques (âge, antécédents hémorragiques, comorbidités ...). Les recommandations sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°5 : Prise en charge des surdosages en AVK (47)

INR mesuré	Mesures correctrices recommandées en fonction de l'INR mesuré et de l'INR cible	
	INR cible 2,5 (fenêtre entre 2 et 3)	INR cible ≥ 3 (fenêtre 2,5 - 3,5 ou 3 -4,5)
INR < 4	<ul style="list-style-type: none">▶ Pas de saut de prise▶ Pas d'apport de vitamine K	
$4 \leq \text{INR} < 6$	<ul style="list-style-type: none">▶ Saut d'une prise▶ Pas d'apport de vitamine K	<ul style="list-style-type: none">▶ Pas de saut de prise▶ Pas d'apport de vitamine K
$6 \leq \text{INR} < 10$	<ul style="list-style-type: none">▶ Arrêt du traitement▶ 1 à 2 mg de vitamine K par voie orale (1/2 à 1 ampoule buvable forme pédiatrique) (grade A)	<ul style="list-style-type: none">▶ Saut d'une prise▶ Un avis spécialisé est recommandé (ex. cardiologue en cas de prothèse valvulaire mécanique) pour discuter un traitement éventuel par 1 à 2 mg de vitamine K par voie orale (1/2 à 1 ampoule buvable forme pédiatrique)
INR ≥ 10	<ul style="list-style-type: none">▶ Arrêt du traitement▶ 5 mg de vitamine K par voie orale (1/2 ampoule buvable forme adulte) (grade A)	<ul style="list-style-type: none">▶ Un avis spécialisé sans délai ou une hospitalisation est recommandé

- Hémorragies et traumatismes

Celles-ci nécessitent une hospitalisation immédiate, des critères de gravités permettent d'apprécier la sévérité des symptômes :

- abondance du saignement,
- localisation de l'hémorragie,
- contrôle de l'hémorragie impossible par des moyens usuels,
- nécessité d'une transfusion.

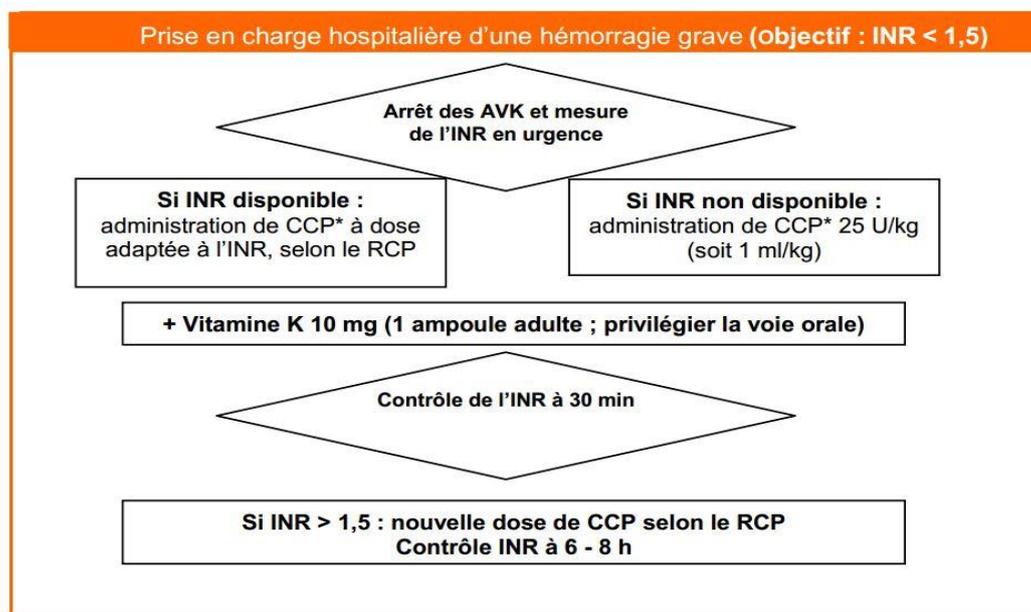


Figure n°18 : Prise en charge hospitalière d'une hémorragie grave sous AVK (47)

CCP = Concentré de Complexe Prothrombinique

2. Anticoagulants oraux directs

A) Présentation de la famille médicamenteuse et mécanisme d'action

(a) Développement

Comme nous l'avons vu ci-dessus, les AVK utilisés jusqu'à maintenant présentent un risque élevé de iatrogénie médicamenteuse, ce qui a justifié le développement et la mise au point par l'industrie pharmaceutique (Boehringer, BMS et Bayer) de nouveaux anticoagulants, utilisables en traitement au long cours ambulatoire. Ces nouvelles molécules, sensées remplacer les AVK dans certaines situations, devraient donc présenter un profil pharmacologique différent et innovant. Il faut cependant rester prudent vis-à-vis de cette nouvelle classe thérapeutique, du fait de l'absence de recul.

L'objectif était d'obtenir des molécules à demi-vie courte ou moyenne, permettant une réversibilité rapide en cas de surdosage ou d'opération chirurgicale programmée ou non (48). Celles-ci devaient également avoir un mécanisme d'action plus simple que les AVK, dont la pharmacodynamie complexe est à l'origine d'effets indésirables, ceci permettant de pouvoir prévoir leurs effets avec précision. Enfin, à la différence des AVK, l'absence de surveillance biologique permettait de simplifier la prise en charge du patient, le rendant plus compliant tout en permettant de réaliser des économies pour la collectivité.

Ces nouveaux anticoagulants par voie orale sont donc apparus en 2009, et à ce jour, seules trois molécules disposent de l'autorisation de mise sur le marché en France. Il s'agit du rivaroxaban, de l'apixaban et du dabigatran.

(b) Mécanisme d'action

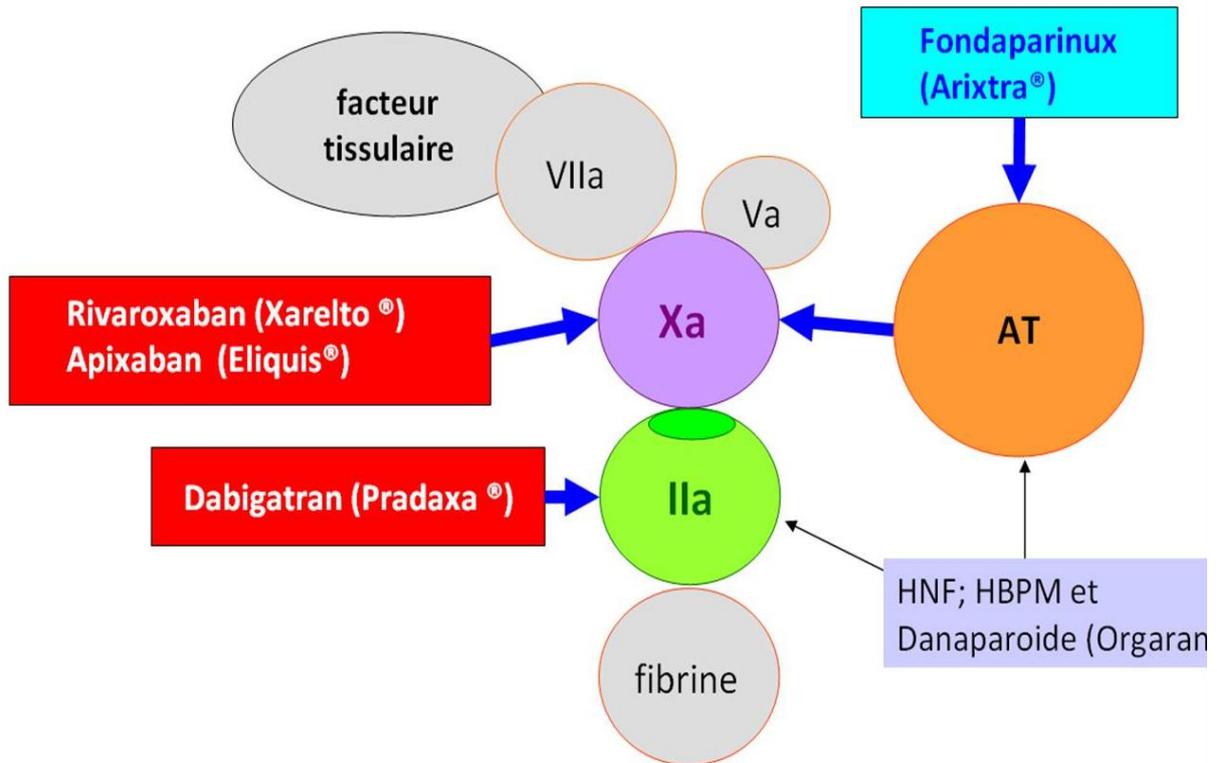


Figure n°19 : Impacts des AOD sur la coagulation plasmatique (49)

Le rivaroxaban et l'apixaban ont donc un mode d'action plus simple que les AVK, puisqu'ils inhibent directement et de manière sélective le facteur X activé. Cela provoque une inhibition des voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation, empêchant la formation de thrombine, et donc du thrombus.

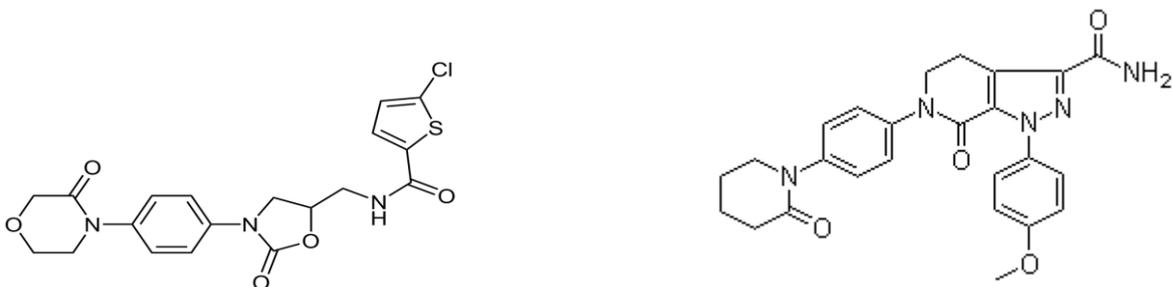


Figure n°20 : Représentations chimiques du rivaroxaban et de l'apixaban

Le dabigatran, présenté sous forme de dabigatran étexilate est une prodrogue qui après administration est métabolisée par hydrolyse catalysée par une estérase, présente au niveau plasmatique et hépatique. La forme active est un inhibiteur direct, sélectif et réversible de la thrombine libre ou liée à la fibrine.

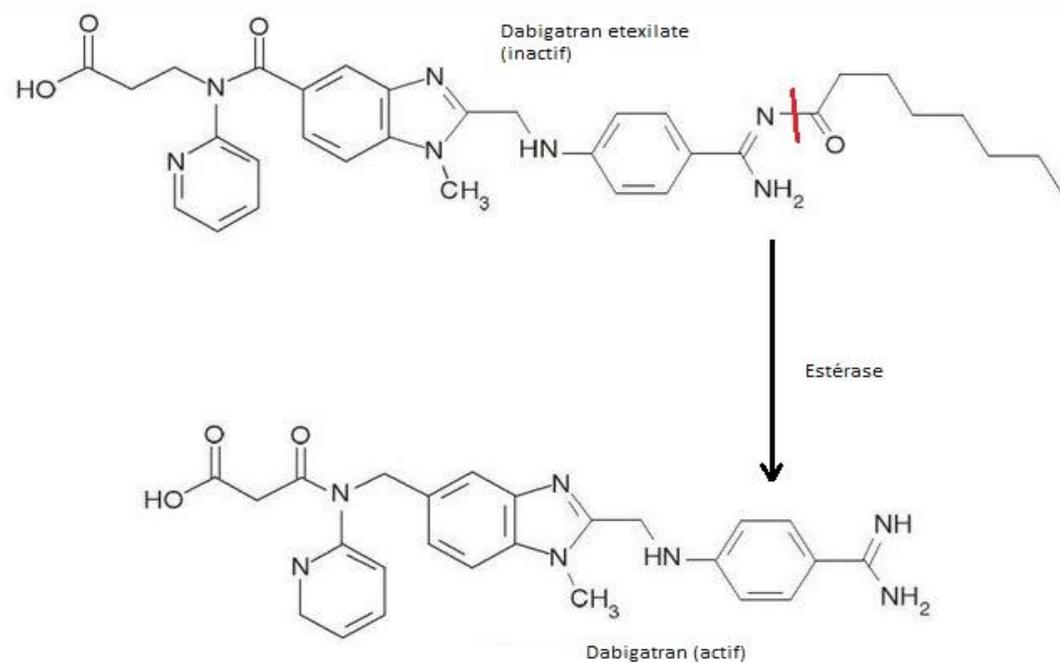


Figure n°21 : Activation du dabigatran par une Estérase

(c) Propriétés Pharmacocinétiques (50)(51)(52)

Les AOD présentent un pic sérique obtenu entre 1 et 4h après l'administration et une demi-vie comprise entre 5 et 14 heures. Leur distribution est bonne (80%) et il existe une relation linéaire et bien établie entre les concentrations plasmatiques et l'effet anticoagulant. Notons que la très forte fixation du rivaroxaban aux protéines plasmatiques empêche son élimination par dialyse.

Les différences pharmacocinétiques sont principalement situées au niveau de la phase rénale d'élimination, qui est de l'ordre de 80% pour le dabigatran, 66% pour le rivaroxaban (éliminé dans d'égales proportions en forme active et en métabolites inactifs) et 25% pour l'apixaban.

Tableau n°6 : Principales caractéristiques pharmacocinétiques des AOD (42)

	Dabigatran Anti-IIa direct	Rivaroxaban Anti-Xa direct	Apixaban Anti-Xa direct
Prodrogue	Oui Dabigatran etexilate	Non	Non
Absorption	Faible	Importante Alimentation/dose dépendante	Moderée
Biodisponibilité	6,5 %	< 15 mg : 80-100 % ≥ 15 mg : 66 % à jeun 100 % avec nourriture	50 %
Influence de la nourriture	Pas d'effet sur biodisponibilité Tmax retardé de 2 heures Prise possible au cours ou en dehors des repas	≥ 15 mg : Biodisponibilité + 39 % Prise au cours des repas uniquement < 15 mg : Prise possible au cours ou en dehors des repas	Pas d'effet sur biodisponibilité Prise possible au cours ou en dehors des repas
Influence de l'intégrité de la gélule ou du comprimé	Si ouverture de la gélule : biodisponibilité + 75 % Ne pas ouvrir/ croquer les gélules	Pas d'influence Peut être écrasé/mélangé à repas liquide (compote, eau) et administré par sonde gastrique	
Variabilité intraindividuelle			20 %
interindividuelle		30-40 % 70 % après une prise post-opératoire	30 %

Tableau n°6 : Principales caractéristiques pharmacocinétiques des AOD (suite)

Distribution Volume Distribution	60-70 litres	50 litres	21 litres
Liaison protéines plasmatiques	34-35 %	92-95 %	87 %
Métabolisme	Très faible	Important	Important Voies multiples
Métabolites	Actifs	Inactifs	Inactifs
Principales voies	Conjugaison Substrat de la P-gp	CYP3A4 Substrat de la P-gp	CYP3A4/5 Substrat de la P-gp
Principales interactions médicamenteuses d'origine métabolique	Inhibiteurs/inducteurs/substrats P-gp	Inhibiteurs/inducteurs CYP3A4 et P-gp	Inhibiteurs/inducteurs CYP3A4 et P-gp
Élimination	85 % rénale directe (sous forme inchangée)	2/3 après métabolisation 1/3 rénale directe	Surtout fécale Après métabolisation
Élimination rénale	+++ 85 % de la dose absorbée, soit 4 % de la dose administrée	++ 33 % sous forme inchangée 33 % sous forme de métabolites	+ 14 % de la dose administrée, soit 27 % de la dose absorbée
Élimination fécale	- 6 % de la dose absorbée	+ 33 % sous forme de métabolites	++ 25 % de la dose administrée sous forme de métabolites, soit 50 % de la dose absorbée

(d) Perturbation des bilans d'hémostase

En agissant sur les facteurs Xa et la thrombine, les AOD vont induire des perturbations des bilans d'hémostase (53). Nous regrouperons ces modifications dans le tableau suivant :

Tableau n°7 : Impact des AOD sur les tests de biologie médicale

Test	Apixaban	Rivaroxaban	Dabigatran
TP	Normal ou légèrement abaissé	Abaissé	Légèrement abaissé
TCA	Normal ou légèrement augmenté	Augmenté	Augmenté
TT	Normal		Augmenté
Fibrinogène			Normal ou augmenté

Ces modifications biologiques ne reflètent pas l'intensité de l'anticoagulation : il est alors impossible, par les tests d'hémostase classique d'écarter un risque d'hémorragie ou de confirmer leur efficacité. Ce point est un des principaux arguments marketings des laboratoires commercialisant les AOD, avançant que l'absence de suivi biologique serait source d'économies pour la Sécurité Sociale.

A la différence des AVK, l'absence de suivi biologique est un problème majeur en cas d'intervention chirurgicale non programmée ou devant être réalisée dans un délai trop court. Le clinicien est donc confronté à un choix important, à savoir trouver un équilibre entre l'arrêt du traitement (et donc augmentation du risque thrombotique) et l'acte chirurgical (risque hémorragique majoré initial). Cependant, certains auteurs avancent qu'en cas d'urgence, certains dosages pourraient être un reflet de l'activité anticoagulante :(54)

- Dosage de l'activité anti Xa sur plasma calibré pour le rivaroxaban et l'apixaban.
- Test Hemoclot (Temps de Thrombine standardisé) pour le dabigatran.

En pratique, la Société Française d'Anesthésie-Réanimation recommande en cas de chirurgie programmée (55):

- Peu hémorragique : Arrêt à J-2, reprise à J+2.
- A risque hémorragique : Arrêt à J-5, mise en place d'un relais par héparine de bas poids moléculaire type enoxaparine, chirurgie suivie d'une reprise de l'héparine.

En cas d'acte chirurgical urgent, il est vital de connaître la date et l'heure de la dernière prise et de retarder le plus possible la chirurgie et d'essayer d'évaluer le risque hémorragique du patient. Dans cette optique, et puisque les concentrations plasmatiques semblent être bien corrélées à l'activité anticoagulante, la mise en place d'une méthode de dosage moléculaire des AOD semble appropriée.

(e) Absence d'antidote disponible

A ce jour, il n'existe aucun antidote disposant d'autorisation de mise sur le marché ayant prouvé son efficacité lors d'hémorragies massives sous AOD. Les rares études d'administration de facteurs procoagulants non spécifiques (plasma, facteurs VK dépendants ou facteur VIIa) ont été réalisées chez l'animal ou chez le volontaire sain et n'ont pas encore montré d'efficacité clinique réelle. Cependant, certains experts recommandent l'injection de concentrés de facteurs activés type Feiba (56).

Cependant, malgré l'absence d'antidote spécifique **disponible**, le pronostic des saignements majeurs et d'opérations chirurgicales à risque est le même que pour les AVK.

- Développement d'un antidote anti-Xa

La société Portola pharmaceuticals mène actuellement des essais cliniques concernant un facteur Xa recombinant qui pourrait être utilisé comme antidote. Ce facteur, appelé andexanet alfa, est obtenu par génie génétique et est le premier de sa classe pharmacologique (54). Il présente la capacité de se lier avec une bonne sélectivité aux molécules anti-Xa présentes en solution. Ceci entraîne donc l'inactivation de la molécule AOD puisqu'elle ne peut alors plus se lier au facteur Xa endogène (57).

Deux études de phase 3 randomisées, en double aveugle versus placebo sont actuellement en cours sur des volontaires sains. Ce sont les études ANNEXA-A (Andexanet alfa a novel antidote to the anticoagulant effects of Xa inhibitors)-Apixaban et ANNEXA-R (Andexanet alfa a novel antidote to the anticoagulant effects of fXa inhibitors)-Rivaroxaban. Elles permettront de mieux évaluer la sécurité d'utilisation et l'efficacité de l'Andexanet alfa lors de l'administration aux volontaires sains de doses de charge et d'entretien d'apixaban et rivaroxaban.

Le développement de l'andexanet alfa a fait l'objet d'une procédure dite « breakthrough therapy » par la Food and Drug Administration (FDA). Cette procédure mise en place par la FDA permet d'accélérer le développement et l'autorisation de commercialisation de molécules permettant de traiter des pathologies sévères et dont la sécurité d'emploi et les bénéfices attendus sont significativement démontrés lors des premières études cliniques.

Les indications seront bien entendu le saignement majeur et la chirurgie en urgence chez le patient traité par AOD.

- Développement d'un antidote anti-IIa

La commission d'évaluation initiale du rapport bénéfice risque des produits de santé du 09/07/2015 a octroyé à La société Boehringer Ingelheim une Autorisation Temporaire d'Utilisation de cohorte concernant l'idarucizumab (58). Cette molécule est un anticorps humanisé dirigé contre le dabigatran (59). Sa fixation sur le dabigatran serait donc hautement sélective, et d'après les études menées par le laboratoire, il n'induirait pas d'effet pro-coagulant. La zone de fixation du dabigatran sur l'idarucizumab présente des similarités avec la thrombine mais, aux concentrations physiologiques, il n'a pas été relevé de fixation des substances suivantes sur l'idarucizumab : Facteurs V, VIII, XIII, fibrinogène, VWF, PAR-1 et protéine C. L'affinité mesurée de l'antidote pour le dabigatran est environ 350 fois plus importante (54) que pour la thrombine.

Une étude est actuellement en cours et inclut deux catégories de patients : la première catégorie comprend des patients présentant un saignement sous dabigatran nécessitant l'administration de l'antidote. La deuxième catégorie comprend des volontaires traités par dabigatran qui nécessitent une intervention chirurgicale urgente, qu'ils présentent ou non une hémorragie.

Cette étude, appelée RE-VERSE AD, pour (A Study of the RE-VERSal Effects of Idarucizumab on Active Dabigatran) devrait être terminée en Avril 2017 et concernera environ 250 patients d'après le laboratoire.

- Développement d'un antidote commun

Un troisième antidote est en cours d'étude, le PER977 (60). A la différence des précédentes molécules étudiées, celle-ci semble présenter une action dirigée contre plusieurs catégories d'anticoagulants, comme les héparines (fractionnées et non fractionnées), le fondaparinux et les trois AOD disponibles actuellement. Les données concernant cette molécule sont encore rares.

B) Principaux effets indésirables et contre-indications

Comme tous les anticoagulants, les AOD augmentent le risque de survenue d'évènements indésirables hémorragiques. Cependant, lors des études cliniques dont nous ne traiterons pas ici, ce risque a été mesuré comme identique ou significativement inférieur à celui des antivitamines K.

Un des principaux arguments des laboratoires commercialisant les AOD est la courte demi-vie de ces molécules. Celle-ci leur confère donc un caractère réversible ce qui est un avantage lorsque l'anticoagulation doit être interrompue. Cependant, cette caractéristique pharmacocinétique les rend particulièrement sensibles à l'oubli d'une ou plusieurs doses (61).

- (a) Profil du rivaroxaban :(51)
- Risque hémorragique

En raison du mode d'action pharmacologique du produit, l'utilisation du rivaroxaban est associée à un risque accru de saignement. Les signes, les symptômes et la sévérité dépendront de la localisation et du degré ou de l'étendue du saignement. Si le saignement est occulte, des complications peuvent se manifester sous forme de faiblesse, de pâleur, de sensations vertigineuses, de céphalées ou de gonflements inexplicables, de dyspnée et d'état de choc inexplicable. Si nécessaire, des mesures de l'hémoglobémie pourraient permettre de détecter un saignement occulte, en complément d'une surveillance clinique appropriée.

Le risque de saignement peut être augmenté chez certains groupes de patients, notamment en cas d'hypertension artérielle sévère non contrôlée et/ou de traitement concomitant modifiant l'hémostase.

Les saignements menstruels peuvent être amplifiés ou prolongés.

Dans certains cas, en conséquence de l'anémie, des symptômes d'ischémie cardiaque tels qu'une douleur thoracique ou une angine de poitrine, ont été observés. Des complications connues, secondaires à une hémorragie sévère, telles qu'un syndrome de compression des loges et une insuffisance rénale due à l'hypoperfusion, ont été signalées sous rivaroxaban. Par conséquent, l'éventualité d'une hémorragie doit être envisagée lors de l'évaluation de toute affection chez un patient sous anticoagulant.

- Risque non hémorragique

Lors des études cliniques, des effets indésirables non hémorragiques ont été relevés, les plus fréquents ($\geq 1/100$, $<1/10$) sont : Céphalées, vertiges, hypotension, prurit, fièvre, douleur des extrémités.

- Contre-indications et populations particulières

- Personnes âgées

Des concentrations plasmatiques plus élevées ont été observées chez les patients âgés avec une Aire Sous la Courbe (ASC) moyenne environ 1,5 fois supérieure, principalement en raison de la réduction de la clairance rénale. Aucun ajustement posologique n'est cependant nécessaire.

- Insuffisance hépatique

Chez les patients cirrhotiques atteints d'insuffisance hépatique légère (classe A de Child Pugh), les modifications des caractéristiques pharmacocinétiques du rivaroxaban observées étaient mineures, d'amplitude comparable à celles observées chez les sujets sains du groupe témoin.

Chez les patients cirrhotiques atteints d'insuffisance hépatique modérée (classe B de Child Pugh), l'ASC moyenne du rivaroxaban a été multipliée par 2,3 cette augmentation étant significative par rapport aux volontaires sains.

- Insuffisance rénale

Il a été observé un lien entre l'augmentation de l'exposition au rivaroxaban et la diminution de la fonction rénale évaluée par la mesure de la clairance de la créatinine (ClCr). En cas d'insuffisance rénale légère (ClCr de 50 à 80 mL/min), modérée (ClCr de 30 à 49 mL/min) ou sévère (ClCr de 15 à 29 mL/min), les concentrations plasmatiques du rivaroxaban ont été multipliées respectivement par 1,4 ; 1,5 et 1,6. Les augmentations correspondantes des effets pharmacodynamiques ont été plus marquées. En cas d'insuffisance rénale légère, modérée ou sévère, l'inhibition globale de l'activité du facteur Xa a été augmentée respectivement d'un facteur 1,5 ; 1,9 et 2,0 par rapport aux volontaires sains.

(b) Profil de l'apixaban (50)

Le profil de l'apixaban est similaire à celui du rivaroxaban du fait de leur mécanisme d'action identique. La principale différence est pharmacocinétique : L'apixaban est principalement (50%) éliminé par le foie, à la différence du rivaroxaban dont l'élimination par voie hépatique concerne 2/3 de la dose administrée.

- Contre-indications et populations particulières

- Insuffisance hépatique

Une étude figurant dans le dossier d'AMM n'a pas montré de relation entre insuffisance hépatique et augmentation de l'activité anti-Xa : Cette étude a été réalisée en incluant 8 patients atteints d'insuffisance hépatique légère, 8 insuffisants hépatiques modérés versus 16 volontaires sains. Cependant, ces conclusions ne semblent pas cohérentes si on les compare aux résultats obtenus pour le rivaroxaban : Les ASC obtenues après son administration chez des patients insuffisants hépatiques modérés sont significativement plus élevées, alors que son élimination dans les fèces ne concerne que 33% de la dose (contre 50% pour l'apixaban).

- Insuffisance rénale

Lors des études cliniques Pré AMM, il a été montré que les patients atteints d'une maladie rénale au stade terminal présentent une augmentation de l'AUC de 36% par rapport aux patients sains. L'hémodialyse ne diminue que très faiblement l'AUC puisqu'une séance débutée deux heures après ingestion d'une dose unique de 5 mg celle-ci ne diminuait que de 14%. L'hémodialyse n'est donc pas un moyen efficace pour prendre en charge une intoxication grave à l'apixaban. Cette relative inefficacité justifie d'autant plus le développement d'un antidote spécifique aux molécules anti-Xa.

Les recommandations actuelles stipulent donc que l'utilisation de l'apixaban chez les patients présentant une insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine comprise entre 15 et 29 mL/min) doit se faire avec précaution. Une surveillance clinique (à défaut de biologique) étroite sera mise en place, et une réduction de dose sera indispensable : 2.5 mg deux fois par jour, en particulier chez les patients atteints de fibrillation atriale non valvulaire. Notons également qu'aucune étude n'a été menée chez les patients atteints d'insuffisance rénale terminale chez qui l'apixaban n'est donc pas recommandé.

(c) Profil du dabigatran : (52)

- Risque hémorragique

Comme tous les autres anticoagulants, le dabigatran expose à un risque hémorragique. Ce risque a été mesuré en fonction de l'indication pour lequel les patients étaient traités. Nous présenterons dans le tableau suivant, à titre d'exemple, les saignements observés au cours de la prévention de l'AVC et l'embolie systémique chez les patients adultes présentant une fibrillation atriale non valvulaire (FANV) et traités par dabigatran versus warfarine.

Tableau n°8 : Evènements hémorragiques lors du traitement de la FANV

	Dabigatran 110mg 2/24h	Dabigatran 150mg 2/24h	Warfarine
Sujets inclus	6015	6076	6022
Hémorragies majeures	342 (2.87 %)	399 (3.32 %)	421 (3.57 %)
Hémorragies IC	27 (0.23 %)	38 (0.32 %)	90 (0.76 %)
Hémorragies GI	134 (1.14 %)	186 (1.57 %)	125 (1.07 %)
Hémorragies fatales	23 (0.19 %)	28 (0.23 %)	39 (0.33 %)
Hémorragies mineures	1566 (13.16 %)	1787 (14.85 %)	1931 (16.37 %)
Hémorragies totales	1754 (14.74 %)	1993 (16.56 %)	2166 (18.37 %)

Hémorragies IC : Hémorragies intracrâniennes

Hémorragies GI : Hémorragies Gastro intestinales

- Evènements non hémorragiques

De la même manière que pour le rivaroxaban, les évènements indésirables fréquents ci-dessous ont été recensés : anémies, douleurs abdominales, diarrhées, dyspepsie, nausées, anomalies de la fonction hépatique. Notons que des évènements type bronchospasme à l'origine de dyspnée ont été recensés mais à une fréquence qui n'a pas pu être déterminée.

- Contre-indications et populations particulières
 - Personnes âgées

Les études pharmacocinétiques de phase I spécifiques à la personne âgée ont montré une augmentation de 40 à 60 % de l'AUC et de 25% de la Cmax par rapport à une population jeune. Cette observation est à mettre en relation avec l'insuffisance rénale de la personne âgée, détaillée ci-après.

- Insuffisance hépatique

Du fait de son métabolisme très faible et de son élimination à 85% rénale, aucune modification de l'AUC n'a été mise en évidence lors de l'administration du dabigatran à 12 sujets atteints d'insuffisance hépatique modérée.

Il faut cependant garder à l'esprit que les principales études ont exclu les patients présentant un taux d'enzymes hépatiques deux fois supérieurs à la normale et donc qu'aucune proposition d'adaptation posologique n'est disponible à ce jour chez cette population.

- Insuffisance rénale

Les études de phase I du dabigatran ont mis en évidence une modification importante des demi-vies d'élimination chez les patients atteints d'insuffisance rénale modérée à sévère, comparé aux patients sains. Les principales modifications sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°9 : Demi-vies du dabigatran chez les sujets sains et ceux ayant une fonction rénale altérée

Clairance à la créatinine (ml/min)	Demi-vie moyenne (heures)
Supérieure ou égale à 80	13.4
[50 ; 80[15.3
[30 ; 50[18.4
< 30	27.2

Les concentrations de dabigatran à l'état d'équilibre sont respectivement 1.8 et 3.6 fois supérieures chez les patients présentant une insuffisance rénale légère à modérée par rapport aux patients ayant une fonction rénale normale.

C) Interactions médicamenteuses connues des AOD

Grâce à leur mécanisme d'action plus simple, le risque d'interaction médicamenteuse et alimentaire des AOD est moindre que celui des AVK.

Les AOD sont affectés par les inducteurs et inhibiteurs de la glycoprotéine P : La

glycoprotéine P (P-gp) appartient à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et est un transporteur majeur impliqué dans la biodisponibilité de xénobiotiques chez l'homme. Son rôle est d'expulser les xénobiotiques hors des cellules. Elle limite donc l'absorption des médicaments à partir du tractus gastro-intestinal, en favorise l'élimination dans l'urine et la bile, mais participe aussi à un rôle de barrière protectrice pour le SNC et le fœtus. La compétition entre deux substances toutes deux prises en charge par la P-gp induira l'augmentation de leurs concentrations puisque la protéine sera saturée.

Le rivaroxaban et l'apixaban sont également affectés par les substances modifiant l'expression du cytochrome P3A4.

Les interactions médicamenteuses connues sont regroupés dans les tableaux ci-dessous (42) :

Tableau n°10 : Principales interactions médicamenteuses des AOD

	Voie	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban
Inhibiteurs de la protéase	Incidence sur P-gp et inhibition CYP3A4	Pas de donnée	ASC + 150 %	ASC + 100 %
Clarithromycine	Compétition P-gp et inhibition CYP3A4	ASC + 20 %	ASC + 50 % cliniquement non pertinent	
Erythromycine	Compétition P-gp et inhibition CYP3A4		ASC + 30 % cliniquement non pertinent	
Fluconazole	Inhibition modérée CYP3A4		ASC + 40 % cliniquement non pertinent	
Itraconazole	Compétition P-gp et BCRP et inhibition CYP3A4	ASC augmentée	ASC augmentée	ASC augmentée
Kétoconazole	Compétition P-gp et BCRP et inhibition CYP3A4	ASC + 140 à 150 %	ASC + 160 %	ASC + 100 %
Posaconazole	Compétition P-gp et BCRP et inhibition CYP3A4	ASC augmentée	ASC augmentée	ASC augmentée
Rifampicine	Inducteur P-gp, BCRP, CYP3A4 et CYP2J2	ASC - 66 %	ASC - 50 %	ASC - 54 %
Ciclosporine	Compétition P-gp	Pas de donnée		
Tacrolimus	Compétition P-gp	Pas de donnée		
Inhibiteurs pompe à protons		Pas d'effet	Pas d'effet	
Ranitidine		Pas d'effet		
Millepertuis	Inducteur P-gp, BCRP, CYP3A4 et CYP2J2	ASC diminuée	ASC diminuée	ASC diminuée
IRSN		Risque hémorragique augmenté		
ISRS		Risque hémorragique augmenté		

Tableau n°10 : Principales interactions médicamenteuses des AOD (suite)

	Voie	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban
Amiodarone	Compétition P-gp	ASC + 60 % ETEÜ : réduire posologie		Augmentation mineure ASC
Dronédarone	Compétition P-gp et inhibition CYP3A4	ASC + 70 à 140 %	Données limitées	
Digoxine	Compétition P-gp	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet
Quinidine	Compétition P-gp	ASC + 50 % ETEÜ : réduire posologie		Augmentation mineure ASC
Vérapamil	Compétition P-gp (et faible inhibition CYP3A4)	ASC + 20 à 150 % ETEÜ + FA : réduire posologie et prendre simultanément		Augmentation mineure ASC
AINS en traitement prolongé		Risque hémorragique + 50 %	Risque hémorragique augmenté	Risque hémorragique augmenté
Aspirine		Risque hémorragique + 12 à 24 %	Risque hémorragique augmenté	Risque hémorragique augmenté
Clopidogrel		ASC + 30 %	Risque hémorragique augmenté	Risque hémorragique augmenté
Prasugrel			Pas de donnée	
Ticagrelor		ASC + 46 à 56 %	Pas de donnée	
Héparines de Bas Poids Moléculaire		Risque hémorragique augmenté	Risque hémorragique augmenté	Risque hémorragique augmenté
Héparine non fractionnée		Risque hémorragique augmenté ^{II}	Risque hémorragique augmenté ^{II}	Risque hémorragique augmenté ^{II}
Diltiazem	Compétition P-gp (et faible inhibition CYP3A4)			Augmentation mineure ASC
Atorvastatine	Compétition P-gp et inhibition CYP3A4		Pas d'effet	
Carbamazépine	Inducteur P-gp, BCRP, CYP3A4 et CYP2J2	ASC diminuée	ASC diminuée	ASC diminuée
Phénytoïne	Inducteur P-gp, BCRP, CYP3A4 et CYP2J2	ASC diminuée	ASC diminuée	ASC diminuée

D) Pharmaco épidémiologie des AOD

Les AOD sont actuellement la cible d'une surveillance renforcée au niveau français et européen. Cette surveillance inclut un plan de gestion des risques et des études de pharmacovigilance. Ces études sont au nombre de deux :

Une étude de cohorte réalisée par l'ANSM (62) dont le but est d'établir le profil de risques pour les patients auparavant traités par AVK et chez qui un traitement par AOD a été instauré versus les patients toujours traités par AVK. Cette étude, menée sur 24820 patients pendant 4 mois n'a pas montré d'augmentation du risque hémorragique chez les patients traités par AOD. Il n'a pas non plus été montré d'augmentation des événements thrombo-emboliques.

Une étude de cohorte prospective menée par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés sur des patients chez qui un traitement par AVK ou AOD est instauré. Le but de cette étude est d'évaluer les risques hémorragiques et cardiovasculaires à grande échelle (63). Menée sur 71589 patients, cette étude n'a pas montré d'excès de risque hémorragique ou thrombotique chez les patients débutant un traitement par AOD.

3. Anticoagulants oraux non utilisés chez l'homme : Les rodenticides

Un rodenticide est un produit, une préparation ou une substance ayant la capacité de tuer certains rongeurs, considérés comme nuisibles par l'homme. Ils sont commercialisés sous forme de poudre, de granulés, de concentrés huileux, d'appâts prêts à l'emploi, et plus rarement en fumigations dans les galeries creusées par les rongeurs.

Il existe plusieurs catégories de rodenticides mais nous ne traiterons dans ce travail que les produits rodenticides présentant une activité anticoagulante.

A) Enjeux de la lutte contre les rongeurs

(a) Dégâts matériels occasionnés par les rongeurs

Les rongeurs sont capables de circuler dans les canalisations et les isolations des bâtiments. Ils sont responsables de dégâts occasionnés sur les marchandises stockées (64) et capables d'attaquer les gaines isolantes des câbles électriques, occasionnant ainsi des incendies. Aux états unis, le coût de ces dégradations est estimé à 8 milliards de dollars en 2008 selon la US Environmental Protection Agency. Certaines espèces fouisseuses comme le rat musqué *Ondatra zibethicus* sont également responsables d'atteintes de barrages et de digues, pouvant entraîner leur rupture.

(b) Transmission de pathologies

Les rongeurs sont responsables de la transmission d'environ 35 zoonoses (65)(66). Ces transmissions peuvent être directes par morsures ou l'environnement souillé, comme dans le cas de la leptospirose (67). La transmission peut également se faire par l'intermédiaire d'arthropodes comme dans le cas de la peste, dont le bacille *Yersinia pestis* (68) est inoculé par l'homme par la puce et qui est véhiculée par le rat noir *Ratus ratus*.

B) Molécules utilisées comme rodenticides

Les molécules rodenticides les plus utilisées appartiennent à la famille des AVK. On distingue trois familles chimiques dont deux sont communes avec les AVK destinés à l'usage humain :

- La première famille regroupe les dérivés coumariniques : Bromadiolone, Brodifacoum, coumafène, coumatétralyl et difénacoum.
- La deuxième famille est celle des dérivés thiocoumariniques avec la diféthialone.
- La dernière famille comprend un dérivé de l'indane-1,3-dione : La chlorophacinone.

Le mécanisme d'action de ces molécules rodenticides est le même que les molécules destinées à l'usage humain : elles provoquent une inhibition du recyclage de la vitamine K sous forme époxydée à sa forme réduite en bloquant une enzyme, la VKOR (Vitamine K époxyd reductase). Le résultat obtenu est le même qu'en cas d'absence de vitamine K ce qui se traduit par un blocage de l'activation des facteurs VK dépendants : II, VII, IX, X, protéine C et protéine S.

De la même façon que chez les humains, l'action des AVK n'est pas instantanée, le temps que l'organisme épuise ses stocks de vitamine K. Cet effet retardé (entre 3 et 10 jours) présente, lors de l'utilisation chez l'animal, deux avantages :

- Non association chez l'animal entre consommation de l'appât et mort (Le rongeur étant particulièrement néophobe) (69).
- Administration d'antidote chez les animaux non nuisibles qui commenceraient à présenter des symptômes d'intoxication (Chien, chat etc.).

Comme tout agent chimique utilisé pour la lutte contre les nuisibles à grande échelle, les AVK rodenticides (=AVKR) sont également inducteurs de résistance. La résistance croissante des rongeurs vis-à-vis des premières molécules a donc induit la synthèse de molécules de plus en plus toxiques.

Ainsi, on peut séparer les AVKR en deux groupes distincts :

- FGARS (First generation AVK Rodenticid) : L'animal doit consommer plusieurs fois des appâts contaminés avant d'en subir les effets. En France, 3 FGAR sont commercialisés : La coumafène, le coumatétralyl et la chlorophacinone.
- SGARS (Second generation AVK rodenticid) : La toxicité étant plus élevée, une seule dose est nécessaire pour obtenir le décès de l'animal. Ils sont qualifiés de « Single dose rodenticid » (70). 5 SGARs sont disponibles : Le brodifacoum, la bromadiolone, le difénacoum, la diféthialone et le flocoumafène.

C) Risques sanitaires liés à l'utilisation des rodenticides

L'utilisation des rodenticides expose l'homme et les animaux domestiques à un risque de contamination accidentelle. En effet, les rodenticides sont la plupart du temps utilisés sous forme de granulés ou d'un liquide avec lequel sont imprégnés des appâts. Il y a donc un risque d'ingestion par les enfants en bas âge ainsi que les animaux de compagnie ou de ferme. La prise volontaire de rodenticides n'est pas à négliger, en cas de tentative d'autolyse ou d'homicides.

Le centre antipoison de Lille a réalisé une étude (71) entre 2000 et 2008 concernant les intoxications par les rodenticides, toutes familles confondues : Sur 1750 intoxications, 1246 (71%) étaient accidentelles et 504 (29%) étaient volontaires.

Tableau n°11 : Répartition des causes d'intoxications entre 2000 et 2008 du CAP de Lille

Tentative de suicide	476
Criminelle / acte de malveillance	3
Autre intoxication volontaire	25
Exposition volontaire	504
Intoxication professionnelle	12
Pollution environnementale	5
Accident domestique	1227
Intoxication alimentaire	2
Exposition accidentelle	1246

Si l'on s'intéresse à la répartition des intoxications par tranche d'âge, on s'aperçoit que les enfants sont les principales victimes puisqu'entre 1 et 4 ans, ils représentent 53.58% soit 898 intoxications.

Tableau n°12 : Conséquences des intoxications entre 2000 et 2008 au CAP de Lille

Gravité	Nombre	Pourcentage
Sans gravité (PSS 0)	1253	78%
Faible gravité (PSS 1)	255	16%
Gravité modérée (PSS 2)	46	3%
Gravité sévère (PSS 3)	53	3%
Mortelle (PSS 4)	4	0.25%

PSS = Poison Severity Score

Le suivi médical n'a pas pu être déterminé dans 139 cas soit 8% des intoxications.

III. Utilisation clinique des ACO

1. AVK

A) Thrombose veineuse profonde

(a) Physiopathologie

Une thrombose veineuse est un caillot de fibrine dans la circulation veineuse et peut se compliquer ou non d'une embolie pulmonaire (72). Les thromboses veineuses localisées dans les membres inférieurs sont les plus fréquentes (73) même si elles peuvent survenir dans tous les territoires veineux. La formation des thromboses est préférentielle au niveau des zones de bas débit notamment dans les poches valvulaires : il y a accumulation de facteurs de coagulation activés, de plaquettes, leucocytes et globules rouges. L'occlusion de la veine par le thrombus favorise son extension rétrograde.

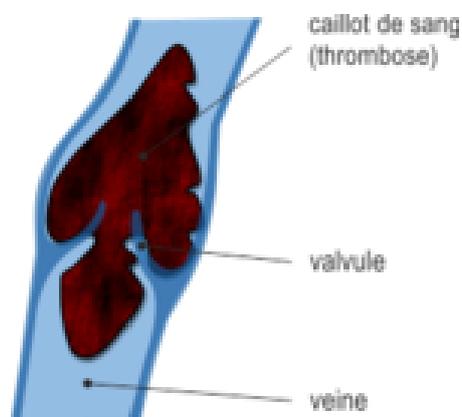


Figure n°22 : Schéma d'un thrombus veineux (6)

Les facteurs favorisant l'apparition d'une thrombose veineuse profonde sont définis par la triade de Virchow : stase sanguine, lésion de la paroi du vaisseau, altération de l'équilibre de l'hémostase.

(b) Diagnostic

Le diagnostic de thrombose veineuse est évoqué devant une douleur à la palpation du mollet, une chaleur locale et un œdème (72). Ces signes cliniques, non spécifiques, doivent être complétés par des examens complémentaires biologiques et d'imagerie médicale.

Dosage des D-dimères : Nous avons vu précédemment en A,I,2,E que le dosage des D-dimères par la technique ELISA présente une très bonne valeur prédictive négative (95%): un résultat négatif permettra d'écarter de façon quasi certaine un diagnostic de thrombose veineuse. En revanche, un dosage positif ne permet pas d'affirmer le diagnostic car le taux de D dimères peut augmenter de manière physiologique (âge, pathologies associées) (10).

Echographie Doppler : cet examen sensible, spécifique et relativement simple permet de visualiser le thrombus ainsi que ses extensions possibles.

(c) Etiologies des thromboses veineuses profondes

L'instauration d'une thrombose veineuse profonde est multifactorielle mais certaines situations cliniques sont plus à risques que d'autres (73):

- Risques acquis : âge, antécédents de thrombose, immobilisation (plâtre notamment), chirurgie orthopédique et gynécologique, grossesse, traitement par oestroprogestatifs ...
- Hémopathies malignes : Devant une thrombose idiopathique, un bilan doit être effectué.
- Facteurs de risques de thrombophilie : Déficits en inhibiteurs de la coagulation, augmentation du facteur VIII.

(d) Traitement curatif des thromboses

Le traitement curatif des thromboses fait appel aux héparines, fractionnées ou non, que nous ne détaillerons pas dans ce travail. Un relais par AVK sera instauré dès que possible, en chevauchant les prises d'héparine et AVK pendant 4 jours en moyenne (74).

Le traitement par héparine sera arrêté dès que l'INR aura atteint la zone cible, entre 2 et 3, pendant 2 jours consécutifs. Comme nous l'avons vu en A,II,1,C,c, l'effet des AVK étant très variable entre les individus, la dose doit être adaptée en fonction de l'INR.

B) Cardiopathies emboligènes

(a) Valvulopathies et prothèses valvulaires

• Physiopathologie

Les valvulopathies cardiaques sont des pathologies fréquentes dans les pays occidentaux puisque l'on estime leur prévalence à 2% de la population (75). Celle-ci croît avec l'âge puisqu'elle est comprise entre 10 et 15% chez les patients de plus de 75 ans. La cause la plus fréquente de valvulopathie est une dégénérescence liée à l'âge, notamment après 65 ans. Les deux autres causes les plus fréquentes sont l'endocardite infectieuse (1500 cas par an en France) et les valvulopathies du RAA (rhumatisme articulaire aigu) (75). Grâce à l'amélioration de la prise en charge des angines à streptocoque, responsable du RAA, celles-ci sont en baisse dans les pays développés au profit d'une augmentation des valvulopathies liées à l'âge. Le phénomène est inversé dans les pays peu développés où la prise en charge des infections à streptocoque est encore insuffisante.

Les valvulopathies sont la troisième cause d'insuffisance cardiaque et favorisent également la survenue de troubles du rythme cardiaque.

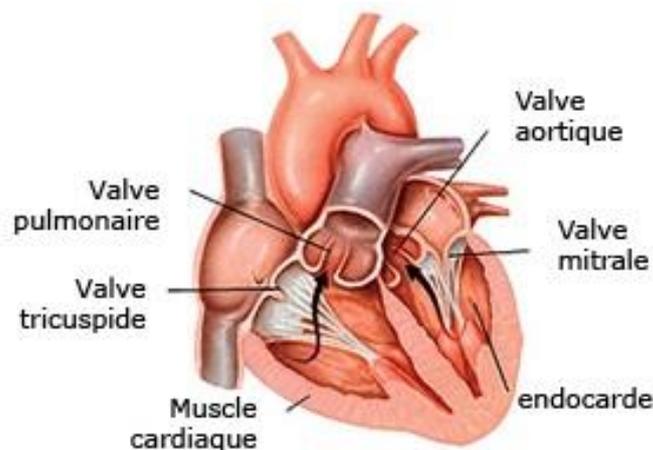


Figure n°23 : Valves cardiaques (76)

L'insuffisance valvulaire, se caractérise par une fuite de sang à travers la valve due au manque de coaptation des feuillets valvulaires. Il y a alors apparition d'un retour de sang vers la cavité située en amont. Le rétrécissement se définit par une diminution du diamètre de l'orifice, par altération de la mobilité des feuillets valvulaires.

En amont de la valve, il y a une surcharge sanguine avec augmentation du travail cardiaque (entraînant alors une hypertrophie) puis ultérieurement une dilatation des cavités d'amont par épuisement myocardique. En aval, il y a une diminution du débit sanguin. L'association d'une insuffisance et d'un rétrécissement définit une maladie valvulaire.

Le remplacement valvulaire par une prothèse procure généralement une excellente amélioration clinique. Cependant, le remplacement d'une valve native par une prothèse ne garantit pas une guérison même si elle améliore considérablement le pronostic à moyen terme. La mortalité péri opératoire n'excède plus 4 % pour un remplacement mono-valvulaire, mais la survie des opérés, qui est de 80 % à 5 ans, n'excède pas 50 à 60 % à 10 ans et 50 % environ à 15 ans (77).

Le patient est en effet exposé à de nombreuses complications de mauvais pronostic :

- Complications thromboemboliques : la plus fréquente est l'embolie artérielle périphérique, pouvant atteindre les vaisseaux cérébraux.
- Complications infectieuses : le risque d'endocardite infectieuse est particulièrement élevé et de mauvais pronostic. En cas d'endocardite post-opératoire précoce (dans les deux mois) la mortalité est supérieure à 60 % (77).

Bien que leur qualité de vie soit très améliorée après le remplacement valvulaire, ces patients sont soumis à certaines contraintes telles que l'observance d'un traitement anticoagulant qui doit être parfaitement équilibré et ceci à vie pour les porteurs de prothèses mécaniques. L'utilisation de valve biologique n'implique pas la prise d'anticoagulants oraux mais leur durée de vie plus limitée (10 ans maximum) explique qu'en l'absence de contre-indication aux AVK, on ne les implante pas chez les patients de moins de 75 ans. Les intervalles de l'INR à atteindre avec le traitement par AVK sont résumés dans la figure ci-après :

	ESC European Society of Cardiology 1995	SFC Société Française de Cardiologie 1997	ACC/AHA American College of Cardiology / American Heart Association 1998	ACCP American College of Chest Physician 2001 et 2004
Prothèses mécaniques mitrales				
– Bille ou disque	3-4,5	3-4,5	2,5-3,5	2,5-3,5
– Double ailettes	3-3,5	3-4,5	2,5-3,5	2,5-3,5
Prothèses mécaniques aortiques				
– Bille ou disque	3-4,5	3-4,5	2,5-3,5	2,5-3,5
– Fibrillation auriculaire	3-4,5	3-4,5	2,5-3,5	2,5-3,5 ou 2-3 + 80-100 mg AAS ^c
– Double ailettes	2,5-3	2-3	2-3 ^b	2-3
Prothèses biologiques				
– 3 premiers mois	2-3	2-3	2-3	2-3
Au-delà :				
– rythme sinusal	–	–	80 à 100 mg AAS ^c	80 mg AAS ^c
– fibrillation auriculaire	2-3	3-4,5	2-3,5	2-3

^a et autres facteurs de risque thrombo-embolique
^b sauf 3 premiers mois INR 2,5-3,5
^c Acide acétylsalicylique, aspirine

Figure n°24 : Zones cibles de l'INR chez le patient présentant une valve prothétique (78)

(b) Fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire (FA) est le trouble du rythme cardiaque le plus fréquent surtout chez les personnes âgées ou présentant une cardiopathie. Sa prévalence est donc variable avec l'âge, on l'estime à 0.05% chez les hommes de moins de 50 ans et 6.5% chez les plus de 80 ans (79).

La FA est caractérisée par une contraction non coordonnée des cellules myocardiques auriculaires conduisant à une altération de la fonction de contraction (80).

La FA est responsable principalement d'accidents thromboemboliques comprenant principalement des accidents vasculaires cérébraux avec une mortalité et morbidité très élevées à l'origine de nombreuses séquelles invalidantes. De plus, indépendamment des cardiopathies, une personne présentant une FA présente une mortalité presque multipliée par deux (81). Dans plus de 70% des cas, la FA est associée avec une cardiopathie sous-jacente telle qu'une hypertrophie ventriculaire gauche, une valvulopathie ou encore une cardiopathie congénitale telle qu'une communication inter-auriculaire.

La prise en charge de la FA repose sur deux modalités (82):

- Traitement de la crise : lors de la phase aigüe de l'arythmie, l'objectif est la restitution d'un rythme cardiaque normal ainsi que des constantes hémodynamiques stables.
- Traitement de fond : ce traitement a pour but la prévention des récives et des complications, notamment thrombo-emboliques.

Le traitement par AVK constitue encore la référence dans la prévention des évènements thromboemboliques chez le patient atteint de FA, l'INR cible se situe entre 2 et 3.

2. Utilisation clinique des AOD

A) Introduction

Apparus en France en 2009, les AOD sont principalement utilisés comme alternative aux AVK. Les industriels argumentent sur leur non infériorité clinique, leur utilisation plus simple et un risque hémorragique moindre du fait d'un mécanisme d'action plus simple. Même si l'absence de suivi de routine, indispensable dans le cas des AVK, peut sembler et est probablement intéressante, il ne faut cependant pas s'y limiter : en effet, l'absence d'une mesure fiable de leur activité expose au risque de surdosage, celui-ci pouvant avoir des conséquences dramatiques.

Le même problème se posera lors d'une chirurgie, qu'elle soit urgente ou non. Il n'est actuellement pas possible de s'assurer biologiquement qu'un patient est opérable dans un contexte de risque hémorragique acceptable.

De plus, comme nous l'avons vu en A,II,2,A,e il n'existe à l'heure actuelle aucun antidote spécifique et aucun consensus quant à la prise en charge d'une intoxication grave au AOD.

Les industriels avancent également un argument économique : du fait de l'absence d'un suivi régulier, le coût moyen de prise en charge serait abaissé par rapport aux AVK. Rappelons que les AVK représentent la première cause d'iatrogénie médicamenteuse et sont responsables chaque année de 17000 hospitalisations (2).

Le recul dont nous disposons n'est actuellement pas suffisant pour se prononcer sur l'impact en termes de qualité de vie du patient ou en termes économiques.

Leur usage est en forte augmentation : en 2011, on estimait à 0.1% la fraction de patients traités par AOD dans la population générale. En 2013, cette même variable était estimée à 0.6% (42).

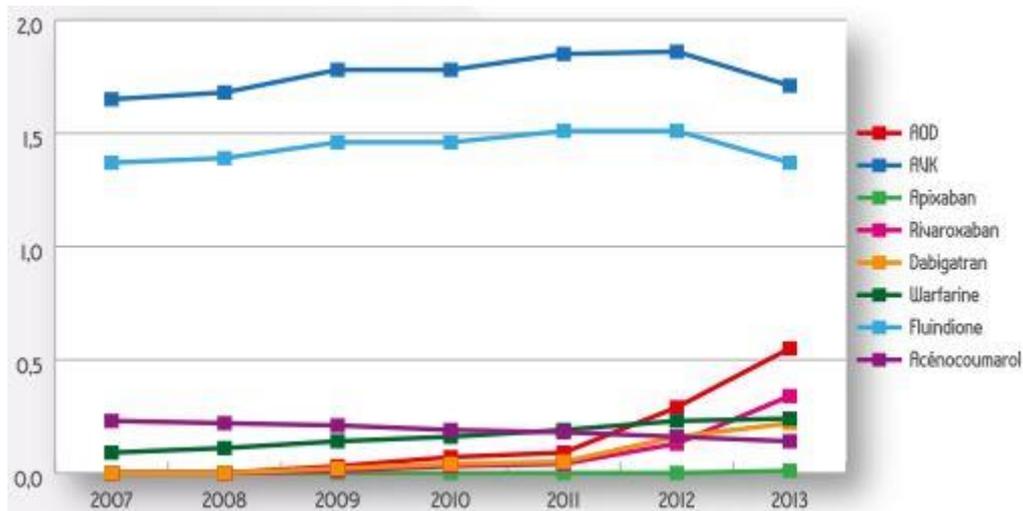


Figure n°25 : Evolution annuelle d'utilisation en % des anticoagulants oraux en France (42)

Le principe de précaution impose donc la prudence : le risque de surdosage et donc d'intoxication, volontaire ou non, est réel et doit être pris en compte lors de la prescription des AOD. Cette nouvelle classe d'anticoagulants fait donc l'objet d'une surveillance renforcée au niveau national et européen. Cette surveillance implique un plan de gestion des risques et un suivi rapproché de pharmacovigilance.

B) Indications des AOD en 2014

Les AOD n'ont pour l'instant que peu d'indications, le recul étant encore insuffisant. Les indications existantes en 2014 sont résumées dans le tableau de l'ANSM ci-dessous :

Tableau n°13 : Utilisations cliniques des AOD en 2014 (42)

DCI	Nom commercial		Indication
dabigatran	Pradaxa®	75 mg 110 mg	Prévention des événements thrombo-emboliques veineux chez des adultes bénéficiant d'une intervention chirurgicale programmée de la hanche ou du genou (prothèse totale de hanche ou de genou)
rivaroxaban	Xarelto®	10 mg	
apixaban	Eliquis®	2,5 mg	
dabigatran	Pradaxa®	110 mg 150 mg	Prévention des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des embolies systémiques chez des adultes atteints de fibrillation auriculaire (FA) non valvulaire et présentant un ou plusieurs facteur de risque
rivaroxaban	Xarelto®	15 mg 20 mg	
apixaban	Eliquis®	2,5 mg 5 mg	
rivaroxaban	Xarelto®	15 mg 20 mg	Traitement des thromboses veineuses profondes (TVP) et des embolies pulmonaires (EP) et prévention des récurrences sous forme de TVP et d'EP chez l'adulte
rivaroxaban	Xarelto®	2,5 mg	Co-administré avec de l'acide acétylsalicylique (AAS) seul ou avec de l'AAS plus du clopidogrel ou de la ticlopidine: prévention des événements athérotrombotiques chez des adultes suite à un syndrome coronarien aigu (SCA) avec élévation des biomarqueurs cardiaques
	<i>Dosage non disponible à ce jour en France</i>		

Une réévaluation des trois AOD disponibles a été effectuée par la commission de transparence de la HAS et publiée le 26 Janvier 2015. Cette réévaluation a principalement concerné l'indication de la prévention des AVC et Evènements Thrombo-Emboliques Veineux (ETEVE) chez les patients atteints de Fibrillation Atriale Non Valvulaire (FANV) : Les AOD sont maintenant placés en deuxième ligne, derrière les AVK qui à l'heure actuelle restent le traitement de référence.

Le service médical rendu reste important pour apixaban et rivaroxaban alors que celui du dabigatran a été reconsidéré comme « modéré ». Concernant l'ASMR, celui de l'apixaban devient mineur versus AVK et aucun ASMR n'est maintenant admis pour dabigatran et rivaroxaban.

L'HAS insiste maintenant sur le fait que les AOD ne sont pas à utiliser en première ligne mais à réserver aux patients chez qui l'obtention d'un INR stable n'est pas possible en dépit d'une observance correcte, et à ceux chez qui une mesure régulière n'est pas possible ou pas tolérée (61).

(a) Pose de prothèse totale de hanche (PTH) ou de genou (PTG)

Le risque thrombo-embolique après chirurgie orthopédique de la hanche ou du genou est décrit dans la littérature comme étant particulièrement élevé(83). Ce risque justifie donc la mise en place d'un traitement prophylactique. Celui sera instauré par voie orale dès le réveil du patient et poursuivra pour une durée variable en fonction de la molécule et du type d'intervention. A titre d'exemple, en cas de PTH, il est recommandé d'administrer 10 mg de Rivaroxaban pendant 5 semaines (84). En revanche, en cas de PTG le traitement se limitera à 2 semaines.

(b) Syndrome coronarien aigu ST+

Le risque thrombo-embolique est décrit comme élevé lors de la phase aiguë du syndrome coronarien ST+ et est donc généralement pris en charge par une bithérapie héparine et antiagrégant plaquettaire. Cependant, ces patients présentent également un risque élevé d'évènement thrombotique dans les mois ou les années suivant l'épisode aigu (85). La mise en route d'un traitement prophylactique des évènements thromboemboliques est donc primordiale. Les AOD dans cette indication ont montré une efficacité équivalente à celle des AVK. L'étude de cohorte réalisée par la CNAMTS n'a pas montré d'augmentation du risque hémorragique (63).

B. Mise au point d'une méthode de dosage des AOD dans le plasma par CL-SM/SM

I. Intérêt du dosage de la concentration des AOD

1. Corrélation concentration – effet

Les relations concentrations-effets sont bien connues et présentées dans les RCP des différents produits. Par exemple, le RCP de l'Apixaban stipule que l'activité anti F-Xa présente une relation étroite, linéaire et directe avec les concentrations circulantes sur de larges gammes (50).

Récemment, l'étude RE-LY a mis en évidence une corrélation entre les concentrations plasmatiques en Dabigatran et le risque d'accident vasculaire cérébral d'origine ischémique d'une part, et le risque de présenter une hémorragie majeure d'autre part (86). Il devient alors évident qu'un suivi thérapeutique pharmacologique, basé sur la mesure des concentrations plasmatiques permettra d'optimiser le traitement anticoagulant. Les concentrations thérapeutiques observées à l'état d'équilibre lors des études cliniques et extraites des RCP des trois molécules sont :

A l'état d'équilibre (c'est à dire après 3 jours de traitement), la moyenne géométrique de la concentration plasmatique de dabigatran au pic, lorsqu'elle est mesurée environ 2 heures après l'administration de 220 mg de dabigatran etexilate, était de 70,8 ng/mL, dans une fourchette de 35,2-162 ng/mL (25ème -75ème percentile). La moyenne géométrique de la concentration résiduelle de dabigatran, lorsqu'elle est mesurée à la fin de l'intervalle de doses (soit 24 heures après une dose de 220 mg de dabigatran) était en moyenne de 22,0 ng/mL, dans une fourchette de 13,0-35,7 ng/mL (25ème -75ème percentile).

Chez les patients ayant reçu du rivaroxaban à la dose de 2,5 mg deux fois par jour pour la prévention des événements athéro-thrombotiques suite à un SCA, la concentration moyenne géométrique (intervalle prédictif de 90 %) 2 à 4 h et environ 12 h après la dose (représentant

approximativement les concentrations maximales et minimales durant l'intervalle entre les doses) était respectivement de 47 µg/l (13 – 123) et 9,2 µg/l (4,4 – 18).

Enfin, les concentrations observées en Apixaban lors des études cliniques sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°14 : Concentrations d'Apixaban observées lors des études cliniques

	Médiane [5 ^{ème} , 95 ^{ème} Percentiles]			
<i>Prévention de l'accident vasculaire cérébral et de l'embolie systémique : FANV</i>				
2,5 mg deux fois par jour *	123 [69, 221]	79 [34, 162]	1,8 [1,0, 3,3]	1,2 [0,51, 2,4]
5 mg deux fois par jour	171 [91, 321]	103 [41, 230]	2,6 [1,4, 4,8]	1,5 [0,61, 3,4]
<i>Traitement de la TVP, traitement de l'EP et prévention des récurrences de TVP et d' O'EP (pETEV)</i>				
2,5 mg deux fois par jour	67 [30, 153]	32 [11, 90]	1,0 [0,46, 2,5]	0,49 [0,17, 1,4]
5 mg deux fois par jour	132 [59, 302]	63 [22, 177]	2,1 [0,91, 5,2]	1,0 [0,33, 2,9]
10 mg deux fois par jour	251 [111, 572]	120 [41, 335]	4,2 [1,8, 10,8]	1,9 [0,64, 5,8]

Les concentrations maximales observées lors de certaines études sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°15 : Concentrations maximales en AOD observées par différents auteurs (87)

Molécule	Posologie/24h	Cmax (µg/L)
Apixaban	20 mg	460(88)
Rivaroxaban	10 mg	141(89)
Dabigatran	150 mg	110(90)

2. Variabilité inter individuelle

Les études cliniques des anticoagulants oraux ont montré que ces substances présentent une très forte variabilité interindividuelle (91). Cette forte variabilité pourrait être expliquée par les mécanismes d'élimination des AOD que nous avons détaillé en A,II,2,A,c. En effet, l'élimination du Dabigatran est majoritairement rénale alors que celle de l'apixaban et du rivaroxaban est mixte. L'insuffisance rénale et l'insuffisance hépatique (et donc par déduction, l'âge) sont donc deux causes majeures de variabilité interindividuelle. Les personnes âgées et les insuffisants rénaux sont des populations chez qui un dosage pourrait être utilisé pour garantir une sécurité d'emploi optimale.

3. Situations cliniques à risque

A) Devant un saignement

Les anticoagulants, qu'ils soient oraux ou parentéraux, sont associés à un risque hémorragique pouvant être spontané ou provoqué(50–52). La gravité des hémorragies utilise la même classification que celle qui est utilisée pour les autres anticoagulants : On distingue, d'une part, l'hémorragie localisées dans un organe critique (Intracérébral, sous-dural ...) (92) et d'autre part, les hémorragies graves autres (47). Dans le cas d'une hémorragie chez un patient traité par Dabigatran ou rivaroxaban, et dans le cas où un dosage plasmatique est disponible, la SFAR propose l'arbre décisionnel suivant :

Hémorragie et Dabigatran (Pradaxa®) ou Rivaroxaban (Xarelto®)

Votre établissement dispose d'un dosage spécifique
de dabigatran (Pradaxa®) ou rivaroxaban (Xarelto®)

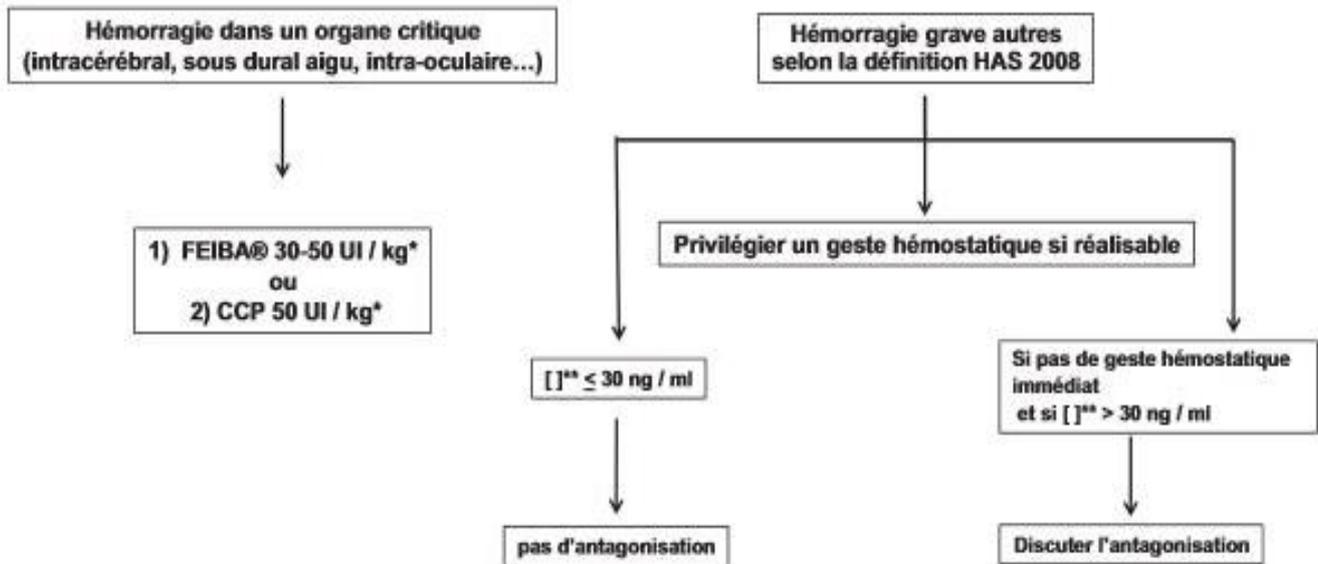


Figure n°26 : Arbre décisionnel de la prise en charge des hémorragies sous AOD quand un dosage plasmatique est disponible (93)

Dans le cas d'un saignement grave mais non critique, la concentration de 30 ng/ml a été établie comme valeur seuil pour laquelle, pour des concentrations situées en dessous, il n'y a pas lieu d'employer une antagonisation. Cette concentration a été proposée par le groupe d'intérêt en hémostase périopératoire (GIHP) en Mars 2013.

Etant donné qu'à ce jour, les méthodes de dosage des anticoagulants oraux ne sont disponibles en routine que dans très peu d'établissements hospitaliers, ce même groupe de travail a également établi un arbre décisionnel applicable en l'absence de dosage.

Hémorragie et Dabigatran (Pradaxa®) ou Rivaroxaban (Xarelto®)

Votre établissement ne dispose pas d'un dosage spécifique
de dabigatran (Pradaxa®) ou rivaroxaban (Xarelto®)

Il s'agit d'une solution dégradée en cas d'indisponibilité immédiate de dosage spécifique

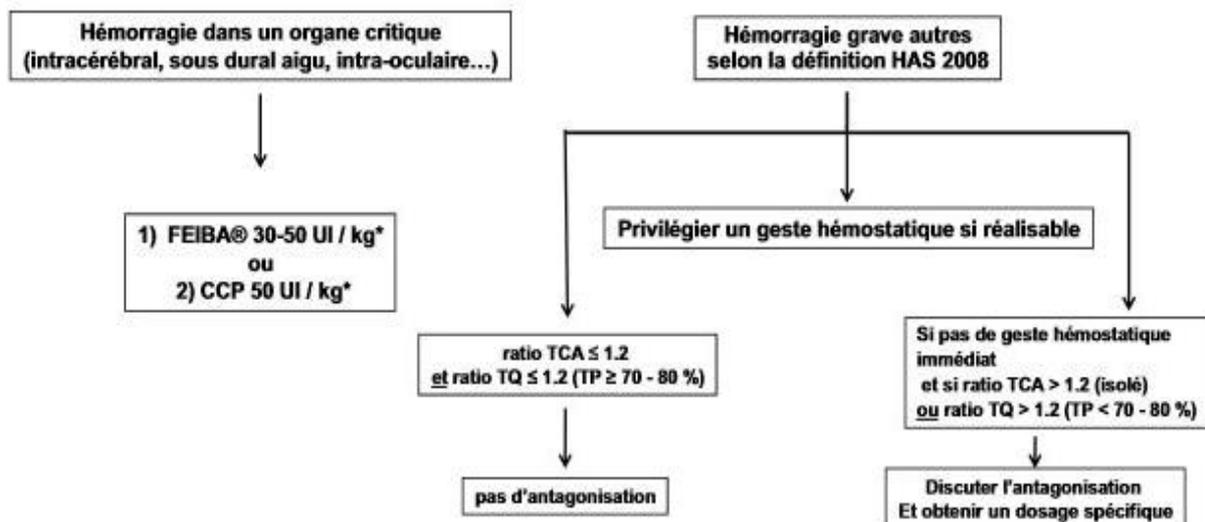


Figure n°27 : Arbre décisionnel de la prise en charge des hémorragies sous AOD en l'absence de dosage plasmatique (93)

Dans le cas où le dosage spécifique n'est pas disponible et dans le cas d'une hémorragie grave mais non critique, l'arbre décisionnel proposé ne se base que sur les tests d'hémostase classique pour décider s'il y a ou non indication à utiliser une antagonisation. Nous avons vu en A,II,2,A,d que ces tests ne devaient pas être utilisés pour mesurer précisément l'anticoagulation chez le patient traité par AOD. Dans ce cas, les mesures obtenues ne seraient qu'une indication de l'ampleur du saignement et non une appréciation précise du risque hémorragique. Il est donc primordial dans la gestion des hémorragies sous AOD de disposer d'une méthode de dosage des concentrations plasmatiques en urgence.

B) Gestion péri-opératoire dans anticoagulants oraux directs

Chaque année, environ 10% des patients traités par anticoagulants oraux au long cours nécessitent une chirurgie ou un acte (94). Pourtant, les RCP de l'apixaban, rivaroxaban et Dabigatran ne fournissent que très peu d'informations quant à la conduite à tenir en cas de chirurgie. Il y est uniquement fait mention de la nécessité de retarder au maximum les gestes invasifs urgents. Suivant la même méthodologie que la gestion des hémorragies sous AOD, le groupe d'intérêt en hémostase péri-opératoire a procédé à une revue de la littérature disponible et proposé des schémas de prise en charge des patients traités par AOD et nécessitant des gestes invasifs.

La réflexion suivra les mêmes principes qu'elle soit programmée ou urgente, à savoir, la recherche d'un équilibre entre risque thrombotique et risque hémorragique.

- Cas d'un acte invasif programmé

Dans le cas d'une opération à risque hémorragique modéré à élevé, la prise en charge dépendra de l'évaluation du risque thrombotique, directement lié à la pathologie pour laquelle il y a administration d'anticoagulant oral.

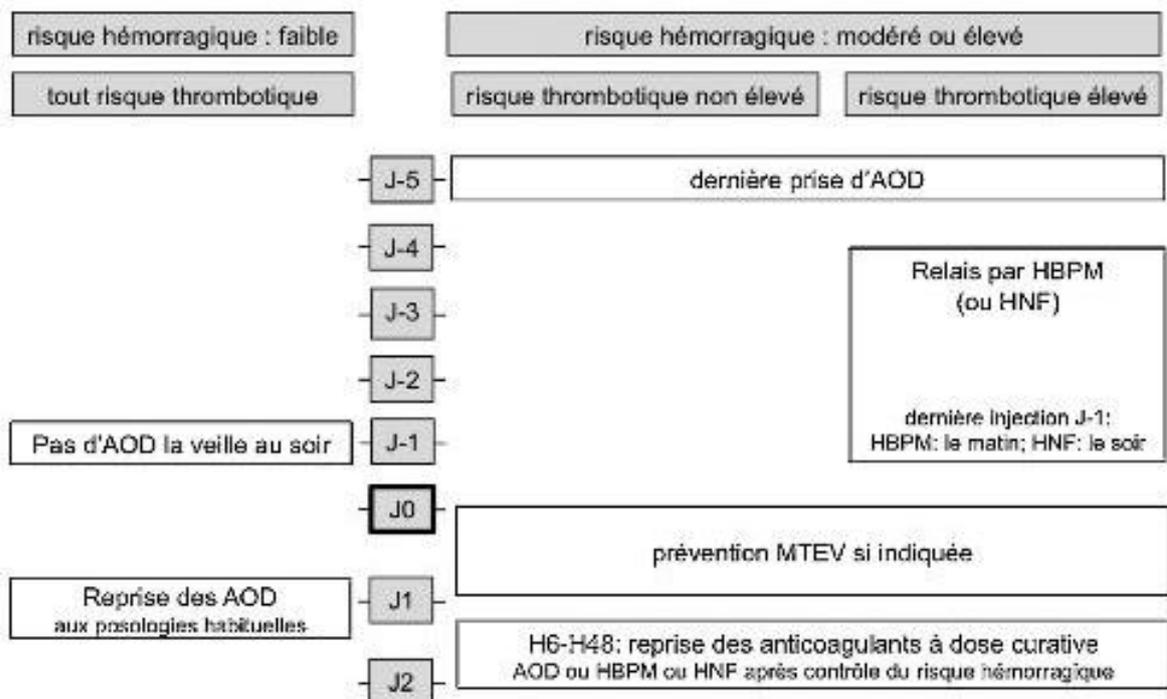


Figure n°28 : Prise en charge d'un patient traité par AOD nécessitant un acte invasif programmé (94)

Cet arbre décisionnel, basé sur la littérature existante, n'implique pas la réalisation d'un dosage des concentrations plasmatiques en AOD. Cependant, si la méthode est disponible et réalisable dans des délais acceptables, un dosage pourrait apporter une sécurité supplémentaire dans les cas où la pharmacocinétique pourrait être modifiée (insuffisant rénal, personne âgée..).

- Acte invasif réalisé en urgence

La prise en charge d'un acte invasif en urgence repose sur le dosage des concentrations plasmatiques en AOD. Cette mesure seule permettra de déterminer quand le patient sera opérable et en évaluant le risque hémorragique. Les arbres décisionnels sont sensiblement les mêmes pour les trois molécules et impliquent les mêmes bornes thérapeutiques.

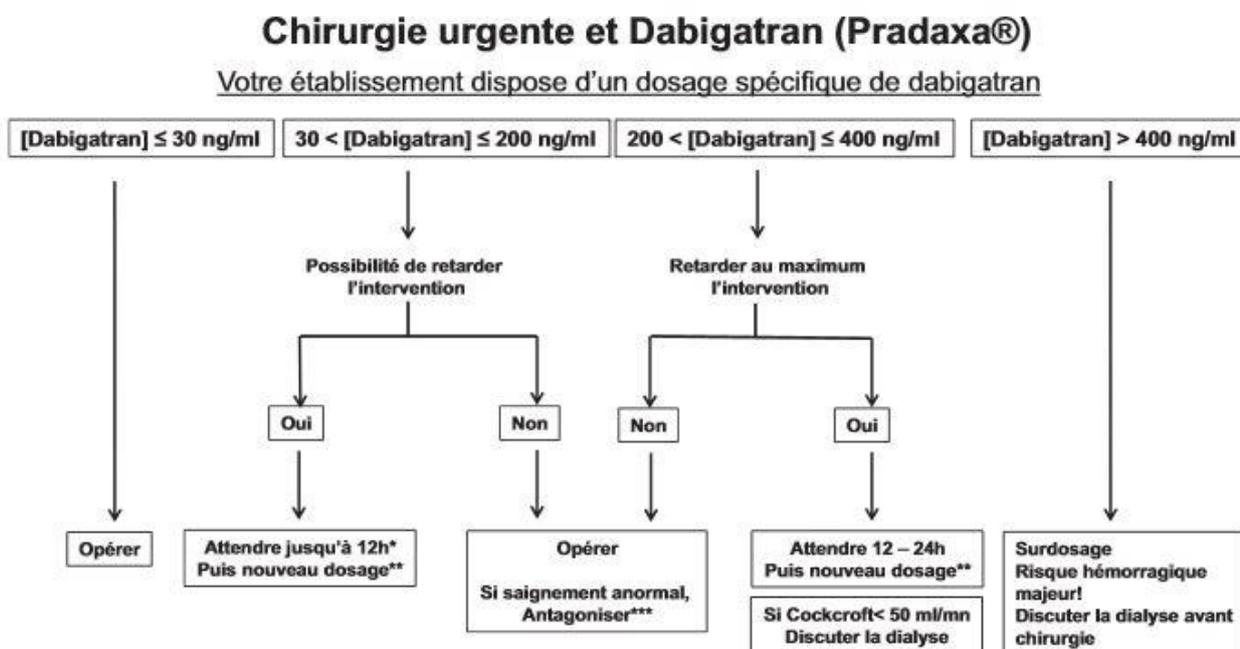


Figure n°29 : Arbre décisionnel de la prise en charge d'un acte invasif en urgence chez un patient traité par AOD quand un dosage spécifique est disponible (93)

L'arbre décisionnel du Dabigatran ne présente qu'une seule différence avec les autres molécules. Comme nous l'avons vu en I,A,II,2,A,c, cette molécule est éliminée majoritairement

par voie rénale. Dans ce cas précis, une dialyse peut être indiquée pour des concentrations supérieures à 200 ng/ml si il y a possibilité de retarder l'intervention chirurgicale. La dialyse n'est donc pas efficace pour l'apixaban et le rivaroxaban dont l'élimination est majoritairement hépatique. Récemment, le surdosage au Dabigatran chez un homme de 80 ans a été rapporté (95). Les taux élevés chez ce patient (429.31 ng/ml) ont justifié la mise en œuvre de plusieurs séances d'hémodialyse qui ont conduit à une normalisation des taux à T+72 heures.

De la même façon que pour la prise en charge des accidents hémorragiques vus en précédemment, l'absence de méthode de dosage oblige les praticiens à ne se fier qu'aux tests d'hémostases classiques, peu représentatifs de l'anticoagulation par AOD. Dans ces cas d'urgences, la disponibilité d'une méthode de dosage représente un élément fondamental de la prise en charge.

C) Vérification de l'observance

Comme pour toutes les classes thérapeutiques, les anticoagulants oraux nécessitent une éducation thérapeutique du patient afin d'obtenir une observance suffisante pour garantir une bonne évolution (ou non dégradation) de l'état clinique.

Une étude observationnelle (83) réalisée au CHU de Caen a étudié l'observance de patients traités par Dabigatran dans le traitement prophylactique des évènements thromboemboliques après arthroplastie totale de la hanche. L'étude de cohorte, menée sur 30 jours et incluant 56 patients visait à comparer l'observance au traitement oral versus un traitement injectable (ou l'observance doit être parfaite puisqu'elle est assurée par un tiers, professionnel de santé).

Les résultats de l'étude montrent une observance globale de 98.1%, avec une légère baisse dans le temps. Un patient chez qui un écart d'observance a été mis en évidence a présenté une thrombophlébite symptomatique liée à cet écart. Quatre autres patients ont présenté des thromboses veineuses distales sans impact clinique lors de la fin de l'étude.

Cette étude, souligne l'importance de l'observance du traitement anticoagulant chez les patients. Ces résultats, bien qu'excellents nécessitent de prendre un certain recul :

Cramer et Col (96) ont montré que l'observance au traitement est proche de 100% le premiers mois puis décroît à partir du second mois est n'est plus que de 68%. Les anticoagulants oraux, de par leurs indications, sont destinés à être prescrits au long cours. Les conséquences

thrombotiques d'une inobservance rendent donc l'adhésion au traitement primordial. De plus, ces médicaments sont destinés à une population plutôt âgée (83) ce qui est également dû à leurs indications. Or, cette population a tendance à commettre plus d'erreurs médicamenteuses(97) ce qui augmente le risque d'évènements indésirables. Enfin, ces traitements sont administrés à but prophylactiques. Or, il est prouvé que l'observance au traitement est moins bonne dans le cas de pathologies sans retentissement clinique immédiat comme par exemple l'hypertension artérielle (98).

Un dosage plasmatique des AOD permettrait, tout comme la mesure de l'INR, de s'assurer une sécurité d'un point de vue qualitatif (prise ou non prise) et d'un point de vue quantitatif (taux plasmatiques situés dans la zone thérapeutique).

D) Tentative d'autolyse et toxicologie médico-légale

En France, la tentative d'autolyse concernerait entre 120000 et 150000 personnes par an. Un des moyens les plus fréquemment employés est l'ingestion massive de médicaments(99) et les personnes les plus touchées sont les personnes âgées (100). Dans le cas d'une tentative d'autolyse médicamenteuse, la sévérité du cas dépendra bien évidemment des substances impliquées et donc à disposition immédiate ou rapide du patient. Dans le cas des adolescents, les substances impliquées sont le plus souvent celles qui sont disponibles dans l'armoire à pharmacie familiale (101). Dans le cas de personnes âgées, les substances sont logiquement celles qui leur sont prescrites.

Quel que soit l'origine du médicament, sa prescription implique un risque de mésusage et fatalement, de tentatives d'autolyse médicamenteuses. A notre connaissance, même s'il n'est pas encore décrit dans la littérature de cas de tentative d'autolyse médicamenteuse impliquant des AOD, ce risque n'est pas à exclure. La prise en charge hospitalière d'un patient intoxiqué s'étant intoxiqué volontairement complique la tâche des urgentistes. En effet, même si le patient est conscient, selon son état psychique et mental, celui-ci refusera peut-être d'indiquer au praticien quelle substance il a absorbé.

Les tests d'hémostase classique révéleront fatalement un désordre dans le processus physiologique de la coagulation. Nous avons cependant vu en A,II,2,A,d que ces désordres ne sont pas représentatifs de l'intensité de l'anticoagulation.

L'apport du laboratoire dans ce contexte sera alors primordial, sur un plan qualitatif et quantitatif. L'identification de la substance permettra d'orienter la prise en charge vers une symptomatique bien particulière, permettant alors de prévoir une dégradation (ou amélioration) de l'état général du patient. Sur un plan quantitatif, le dosage plasmatique doit pouvoir indiquer au clinicien si le patient se situe dans une zone toxique ou infra-toxique. Différents dosages, espacés dans le temps, permettront de dresser une ébauche de la toxicocinétique du patient. De la même façon que dans la prise en charge des hémorragies sous AOD, les taux plasmatiques doivent pouvoir indiquer au clinicien s'il y a lieu à employer l'antagonisation des AOD ou, dans le cas du Dabigatran, d'instaurer une hémodialyse.

II. Méthode analytique

1. Rappels sur la CL-SM/SM

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem est une méthode technique de séparation, d'identification et de quantification de composés chimiques présents en solution. Elle associe d'une part, la chromatographie liquide qui permet la séparation des composés et d'autre part, un spectromètre de masse qui permet l'identification et la quantification des substances présentes en solution.

En chromatographie liquide, la phase mobile liquide entraînant les molécules à séparer passe sous pression à travers une colonne contenant la phase stationnaire. Les molécules d'intérêt seront retenues proportionnellement à leur affinité pour la phase stationnaire.

Une fois séparées, les molécules en solution sont prises en charge par la source d'ionisation. En mode électrospray, celle-ci permet la formation d'ions à partir de molécules en solution tout en éliminant les molécules neutres du solvant. En mode tandem triple quadripôle, les ions sont ensuite introduits dans le premier quadripôle Q1. Celui-ci va pouvoir grâce à un champ électrique et un champ magnétique séparer les molécules en fonction de leur masse et ne retenir que l'ion d'intérêt de la molécule (ou ion pseudo-moléculaire).

Le deuxième quadripôle (cellule de collision, Q2) fragmente ensuite cet ion par collision avec un gaz neutre (ex Argon) : Plusieurs ions fils sont obtenus. La sélection et la détection de l'ion fils d'intérêt sera réalisée dans le troisième quadripôle (Q3).

2. Matériels et méthodes

A) Détermination des objectifs du dosage

Etape préliminaire au développement d'une méthode de dosage, la détermination des objectifs de dosage est indispensable. Il convient de déterminer un intervalle de concentrations dans lequel le dosage sera utilisable et utile d'un point de vue clinique. L'intervalle doit être suffisamment large pour englober l'intervalle des concentrations thérapeutiques et les concentrations considérées comme toxiques. Dans le cas de concentrations toxiques très élevées et supérieures à la limite maximum dosable, une dilution sera alors utilisée.

La CL-SM/SM étant une technique sensible, nous avons décidé de placer notre limite de quantification aussi basse qu'il était possible d'un point de vue analytique. Cette concentration minimale dosable fut établie à 2,5 µg/L pour toutes les molécules par injection directe des produits purs à des concentrations décroissantes. En effet, pour qu'une quantification soit possible il est d'usage de considérer que le signal perçu par l'analyte doit au moins être 10 fois supérieur au bruit de fond. A titre d'exemple, tout AOD confondu, la plus petite concentration observée à l'équilibre lors des essais cliniques est égale à C=4,4 µg/L d'Apixaban.

Nous avons déterminé notre limite maximale en étudiant les publications de la SFAR qui propose un arbre décisionnel que nous avons vu en page 85. La SFAR fixe à 400 µg/L d'AOD la concentration au delà de laquelle l'usage d'antidote ou de substances pro-coagulantes est recommandé(55). Une revue de la littérature a permis de déterminer quels sont les intervalles de concentrations employés par d'autres équipes de par le monde et présentés dans le tableau ci-après.

Tableau n°16 : Intervalles de concentration employés par différentes équipes

Auteurs	Molécules dosées	Intervalle employé
Korostelev et col(102)	Tous les AOD disponibles	2,5 à 500 µg/L
Delavenne et col(103)	Dabigatran	2 à 500 µg/L
Schmitz et col(104)	Tous les AOD disponibles	23 à 750 µg/L
Blaich et col(105)	Tous les AOD disponibles	1 à 500 µg/L
Nouman et col(106)	Dabigatran	1 à 600 µg/L
Antovic et col(107)	Dabigatran	1 à 586 µg/L

B) Substances pures employées

Une des premières conditions lors du développement d'une méthode de dosage est la nécessité de disposer d'échantillons de ou des substances d'intérêt. Il est primordial de se fournir auprès d'un laboratoire certifié et dont les produits sont soumis à un contrôle rigoureux afin de pouvoir garantir que les substances achetées sont pures. Nous précisons entre parenthèses les pourcentages de pureté certifiées par notre fournisseur, le laboratoire Alsachim (Illkirch, France). Le même fournisseur a également pu nous fournir les deux étalons internes utilisés dans la méthode. Les produits sont présentés dans le tableau ci-après :

Tableau n°17 : Substances pures employées

Molécule	Pureté (%)	Masse molaire (g/mol)	Rôle
Dabigatran	97	471,51	Produit d'intérêt
Rivaroxaban	>99	435,88	Produit d'intérêt
Apixaban	98	459,50	Produit d'intérêt
[13C, 2H7]-Apixaban	98.8	463,53	Etalon interne de l'apixaban et du rivaroxaban
13C6-Dabigatran	97.2	477,47	Etalon interne du Dabigatran

Les solvants utilisés – DMSO, acide chlorhydrique, acide formique, acétate d'ammonium, acétonitrile - ont été obtenus auprès de la société CARLO ERBA.

C) Préparation des solutions mères et de travail

Nous avons préparé des solutions mères pour chaque analyte et pour chaque étalon interne. Ces solutions mères sont préparées à une concentration de 1 g/L mais dans des solvants différents pour des raisons de solubilités (données fournies par le laboratoire Alsachim). Les étalons internes et le Rivaroxaban ont été solubilisés dans du DMSO, l'Apixaban dans du méthanol et enfin le Dabigatran a été solubilisé dans de l'acide chlorhydrique 0.1N.

Nous avons ensuite procédé à des dilutions successives de ces solutions mères et obtenues les solutions filles suivantes :

Tableau n°18 : Obtention des solutions filles par dilutions des solutions mères

Solution mère	Solution fille 1	Solution fille 2	Solution fille 3
Apixaban 1 g/L dans du méthanol S1	Apixaban 1 mg/L dans de l'ACN	Apixaban 0,1 mg/L dans de l'ACN	Apixaban 0,01 mg/L dans de l'ACN
Rivaroxaban 1 g/L dans du DMSO	Rivaroxaban 1 mg/L dans de l'ACN	Rivaroxaban 0,1 mg/L dans de l'ACN	Rivaroxaban 0,01 mg/L dans de l'ACN
Dabigatran 1 g/L dans de l'HCl 0,1N	Dabigatran 1 mg/L dans de l'HCl 0,1N	Dabigatran 0.1 mg/L dans de l'HCl 0,1N	Dabigatran 0,01 mg/L dans de l'HCl 0,1N
Apixaban isotopique 1g/L dans du DMSO	Apixaban isotopique 0,5 mg/L dans l'ACN	-	-
Dabigatran Isotopique 1 g/L dans du DMSO	Dabigatran isotopique 0,5 mg/L dans le HCL 0.1N	-	-

Une fois préparées, les solutions filles obtenues sont stockées à -20°C.

D) Autres solutions employées

Nous avons également préparé et employé les solutions suivantes : Formiate d'ammonium 1M et acide chlorhydrique 0,1N. La phase mobile A est un mélange d'un tampon formiate 5mM avec 0,1% d'acide formique. La phase mobile B est composée d'ACN.

E) Méthode d'extraction employée

Lors de la mise au point de la méthode d'extraction nous avons décidé d'utiliser la méthode faisant appel aux sels QuEChERS. Cette méthode d'extraction a été employée pour la première fois par Anastassiades et col en 2003 qui la présentât comme une méthode rapide, facile, bon marché, robuste et fiable(108). Le terme QuEChERS est l'acronyme de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged et Safe. D'un point de vue pratique, après ajout d'acétonitrile(109) dans l'échantillon il suffit de rajouter une spatule (environ 40 mg) de sels QuEChERS. Les capacités d'adsorption des amines primaires et secondaires des sels permettent d'éliminer les différents composés organiques (glucides, lipides et pigments) contenus dans l'échantillon(110). Cette technique ne nécessite pas de compétences analytiques particulières. De plus, certains auteurs ont démontré que l'emploi d'une quantité plus faible (10 mg) ou plus importante (70 mg) de sels QuEChERS ne semble pas avoir d'impact significatif sur l'extraction (111).

F) Conditions chromatographiques

Le système chromatographique en phase liquide que nous avons employé associe deux pompes Nexera X2 LC-30AD (SHIMADZU) ainsi qu'un passeur automatique d'échantillon SIL-30AC MP Autosampler. La colonne employée pour la séparation des molécules est une colonne Halo C18 (50 x 2,1 mm) de la marque AMT-Interchim. Elle présente une porosité de 90 Angstrom et une granulométrie de 2,7 µm.

La méthode emploie une phase aqueuse (Acétate d'ammonium 5 mM / 0,1% acide formique) délivré par la pompe A et une phase organique (ACN) délivré à débit constant de 0,35 ml/min par la pompe B. Le gradient des deux phases est résumé dans le tableau ci-après :

Tableau n°19 : Gradient de phase mobile

Temps (min)	Phase A : Acétate d'ammonium 5mM / 0.1 % acide formique (%)	Phase B : Acétonitrile (%)
0,2	95	5
1,0	95	5
3,5	35	65
3,6	10	90
5,6	10	90
5,7	95	5

La représentation graphique du gradient de la phase B est tracée par le logiciel de gestion de l'appareil :



Figure n°30 : Représentation graphique du gradient de la phase B

G) Conditions spectrométriques

La source est utilisée en mode électrospray positif selon les conditions suivantes :

- Nebulizing gas flow : 3 L/min
- Heating gas flow : 10 L/min
- Interface temperature : 300 °C
- Desolvation line temperature : 250 °C
- Heat block temperature : 400 °C
- Drying gas flow : 10 L/min

Le mode de détection employé est le MRM selon les transitions suivantes :

Tableau n°20 : Transitions employés en mode MRM

Composés	m/z→m/z Transition 1*		m/z→m/z Transition 2*		m/z→m/z Transition 3*	
	Ion parent	Ion fils	Ion parent	Ion fils	Ion parent	Ion fils
apixaban	460,30	443,10	460,30	199,20		
rivaroxaban	436,10	144,95	436,10	117,05	436,10	130,05
dabigatran	472,20	289,05	472,20	172,10	472,20	324,15
apixaban isotopique	468,10	451,30	468,10	199,20		
dabigatran isotopique	478,00	295,20	478,00	172,20		

3. Résultats

A) Temps de rétention

Les temps de rétention (tR) des composés d'intérêt ainsi que leurs temps de rétention relatifs (tRR) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n°21 : Temps de rétentions des composés d'intérêt

Produit	Etalon interne	tR (min)	tRR (min)
Apixaban	Apixaban isotopique	3,171	1,000
Rivaroxaban	Apixaban isotopique	3,197	1,011
Dabigatran	Dabigatran isotopique	2,298	1,000

B) Droites d'étalonnages

Les solutions de Dabigatran d'une part et d'Apixaban/Rivaroxaban d'autre part étant séparées pour des problèmes de solubilité, il est donc nécessaire de réaliser deux gammes d'étalonnages. Ces gammes sont constituées de 9 points et s'étendent de 0 µg/L à 500 µg/L.

- Dabigatran

Préparation de la gamme d'étalonnage pour le Dabigatran : Dans des godets Eppendorf, introduire :

Tableau n°22 : Procédure d'obtention de la gamme d'étalonnage du Dabigatran

Concentration (µg/L) Réactif (µL)	Gamme d'étalonnage									Echantillon à analyser
	0	2,5	5	10	25	50	100	250	500	
Milieu biologique sans analyte	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Echantillon à analyser										100
Solution Dabigatran C=0,01 mg/L	-	25	50	-	-	-	-	-	-	-
Solution Dabigatran C=0,1 mg/L	-	-	-	10	25	50	-	-	-	-
Solution Dabigatran C=1 mg/L	-	-	-	-	-	-	10	25	50	-
HCl 0,1 N	50	25	-	40	25	-	40	25	-	50
Solution Dabigatran isotopique C= 0,5 mg/L	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Acétonitrile T°= -20 °C	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250

Une fois les godets Eppendorf complétés, les boucher et les vortexer. Un repos de 10 minutes au congélateur sera nécessaire avant l'introduction d'une spatule de sels QuEChERS dans chaque godet. Ceux-ci doivent ensuite être centrifugés 10 minutes à 13000 tours/min. Pour chaque point, prélever ensuite 66µL de la phase organique supérieure et la transférer dans un vial. Rajouter alors 134 µL de phase mobile A (tampon formiate d'ammonium 5mM / 0,1 % acide formique). Vortexer et injecter 5µL.

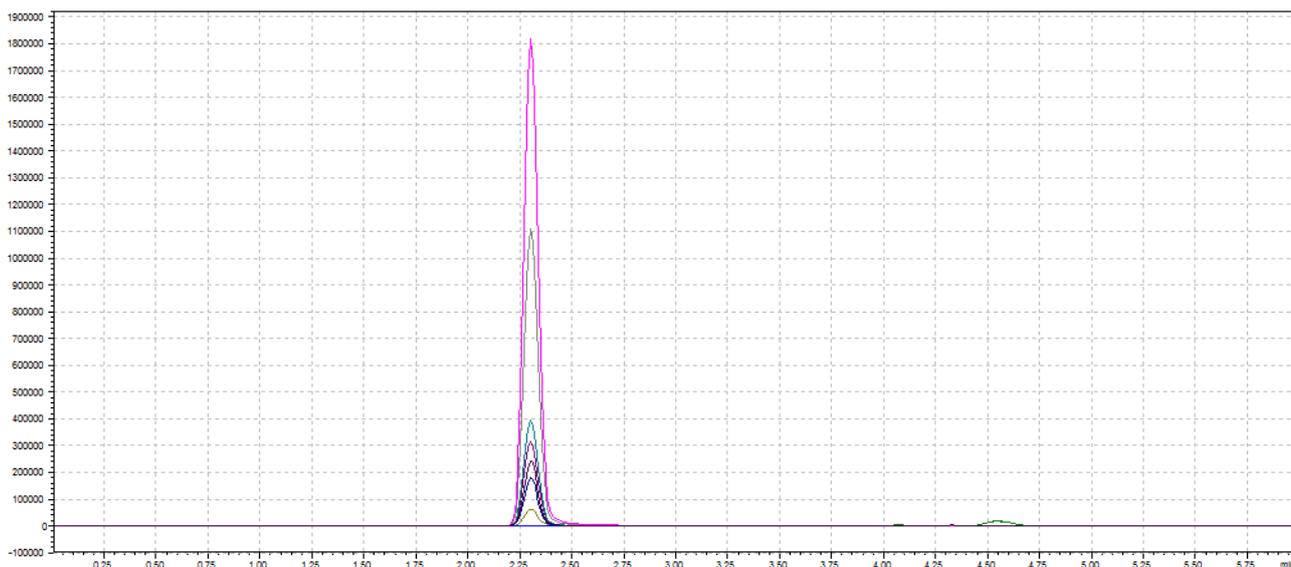


Figure n°31 : Exemple d'un chromatogramme d'un échantillon chargé à 500 µg/L de Dabigatran

Une fois les 9 points analysés, le logiciel va pouvoir déterminer la droite d'étalonnage. Celle-ci représente en ordonnée le ratio de l'aire des pics des analytes (dabigatran) par rapport à l'aire du pic de l'étalon interne (dabigatran isotopique). En abscisse la droite représente les concentrations en analyte (dabigatran).

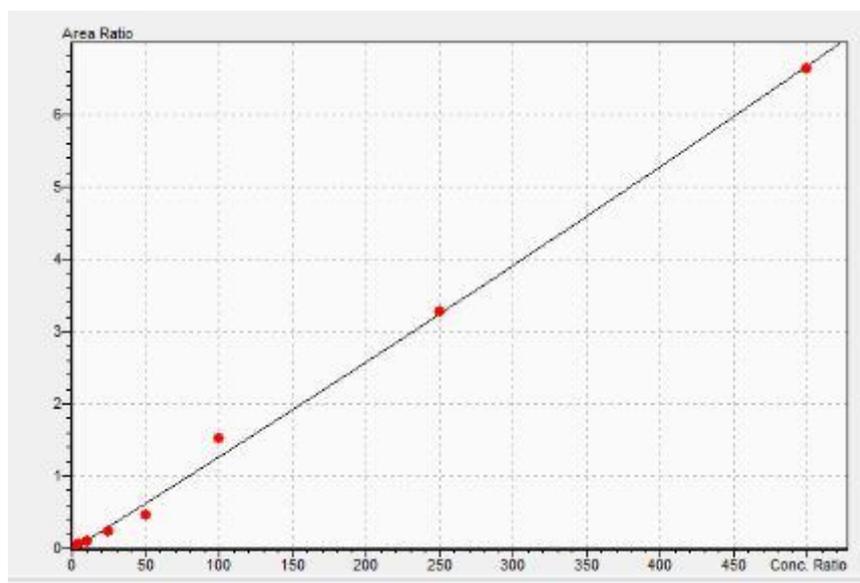


Figure n°32 : Exemple d'une droite de calibration du Dabigatran

L'équation de cette droite est de type $y = ax^2 + bx + c$.

- Apixaban et Rivaroxaban

Préparation des gammes d'étalonnage pour le rivaroxaban et l'apixaban : Dans des godets Eppendorf introduire successivement :

Tableau n°23 : Préparation de la gamme d'étalonnage du rivaroxaban et de l'apixaban

Concentration (µg/L) Réactif (µL)	Gamme d'étalonnage									Echantillon à analyser
	0	2.5	5	10	25	50	100	250	500	
Milieu biologique sans analyte	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Echantillon à analyser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Solution Apixaban et Rivaroxaban C=0.01 mg/L	-	25	50	-	-	-	-	-	-	-
Solution Apixaban et Rivaroxaban C=0.1 mg/L	-	-	-	10	25	50	-	-	-	-
Solution Apixaban et Rivaroxaban C=1 mg/L	-	-	-	-	-	-	10	25	50	-
Solution isotopique C=0.5 mg/L	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Acétonitrile T°= -20 °C	280	255	230	270	255	230	270	255	230	280

De même que pour la préparation de la droite d'étalonnage du dabigatran, une fois les godets Eppendorf complétés, les boucher et les vortexer. Un repos de 10 minutes au congélateur sera nécessaire avant l'introduction d'une spatule de sels QuEChERS dans chaque godet. Ceux-ci doivent ensuite être centrifugés 10 minutes à 13000 tours/min. Pour chaque point, prélever ensuite 66µL de la phase organique supérieure et la transférer dans un vial. Rajouter alors 134 µL de phase mobile A (tampon formiate d'ammonium 5mM / 0,1 % acide formique). Vortexer et injecter 5µL.

Exemple de chromatogramme d'un échantillon surchargé à 500 µg/L en Apixaban et Rivaroxaban :

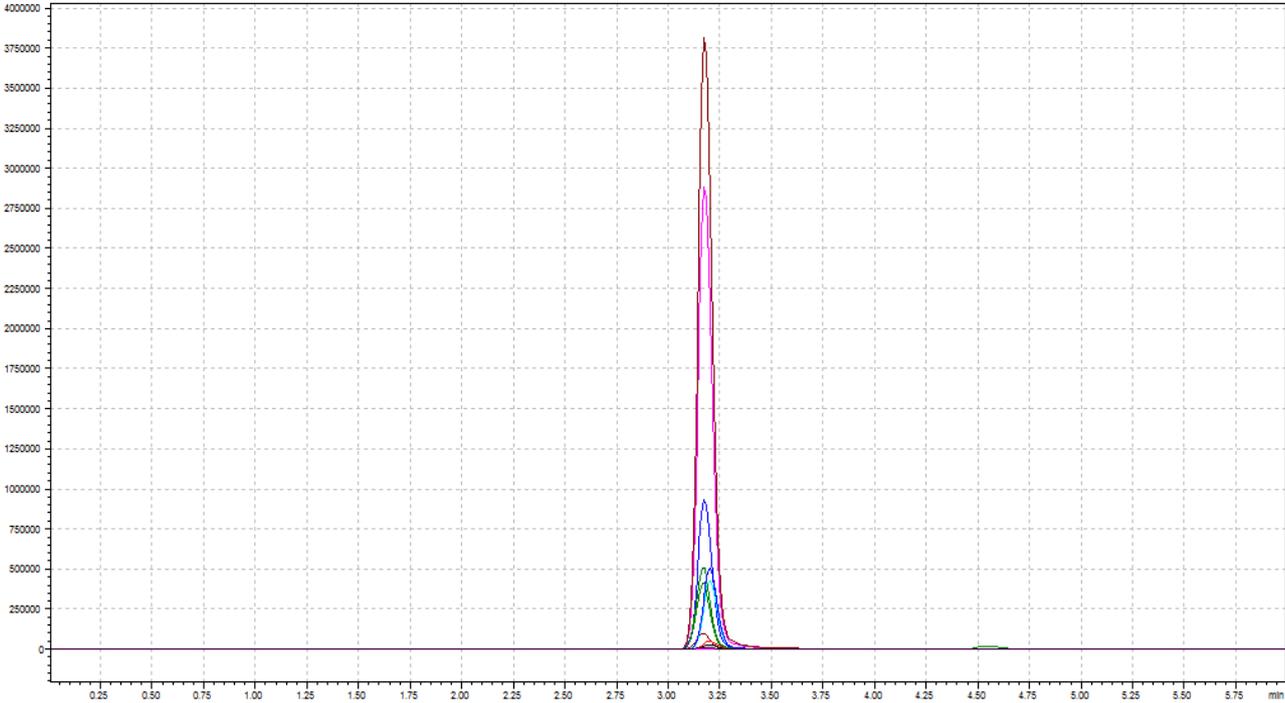


Figure n°33 : Chromatogramme d'un échantillon surchargé en Apixaban et Rivaroxaban (C=500 µg/L)

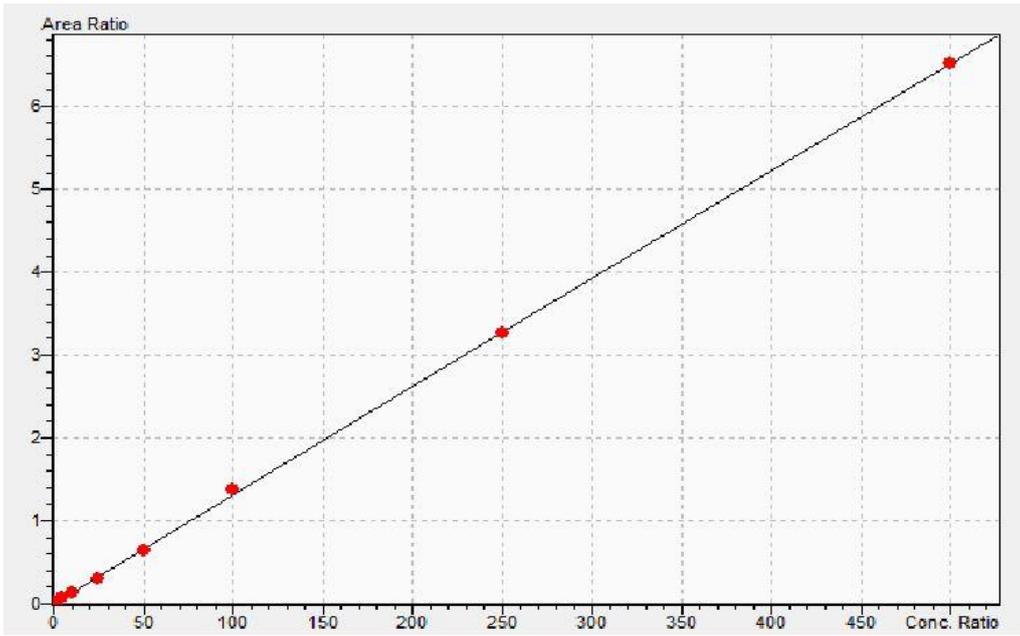


Figure n°34 : Exemple d'une droite d'étalonnage pour l'Apixaban

De la même façon que pour le dabigatran, le logiciel intègre les 9 échantillons et définit la droite d'étalonnage pour les deux molécules. De même, ces droites ont une équation de type $y = ax^2 + bx + c$. Dans l'exemple ci-dessous, concernant l'apixaban, $a = -3,1195 \cdot 10^{-7}$, $b = 0,0132$, $c = 0,0017$. Le coefficient de corrélation r^2 est égal à 0,9994.

C) Validation de la méthode

La deuxième partie du développement d'une méthode analytique repose sur la validation. Le laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Limoges travaille pour partie sous accréditation COFRAC (Comité Français d'Accréditation) (n°8-2607) en portée flexible. La nouvelle méthode analytique doit donc être validée selon la norme ISO 15189.

Nous présenterons ici quelques éléments de la procédure de validation en prenant pour exemple les calculs réalisés pour l'Apixaban, la méthode analytique ayant été validée pour les trois molécules.

(a) Répétabilité

Le COFRAC définit l'essai de répétabilité comme une procédure consistant « à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné ».

En pratique, la procédure de validation de méthode impose de réaliser 6 mesures d'un point « bas » et 6 mesures d'un point « haut ». Nous avons choisi de prendre la Limite De Quantification (LDQ=2,5 µg/L) et la valeur maximale de notre gamme, soit 500 µg/L. A partir des valeurs de concentration obtenues, on calculera le coefficient de variation et le biais. Ces deux valeurs doivent être inférieures à 20% (112).

Tableau n°24 : Valeurs obtenues lors de l'essai de répétabilité pour l'Apixaban

Date de l'essai	11/09/15	18/09/15
Concentration théorique (µg/L)	2,5	500
Nombre de mesures	6	6
Moyenne (µg/L)	2,62	464,15
Ecart type (µg/L)	0,10	10,03
Coefficient de variation (%)	3,74	2,16
Biais (%)	4,95	-7,17
Résultat	Conforme	Conforme

(b) Fidélité intermédiaire

D'après le COFRAC, « l'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages etc. ».

En pratique, nous avons choisi trois niveaux de concentration : 2,5, 100 et 500 µg/L. Nous avons analysé 6 échantillons pour chaque niveau sur une période de 6 jours. Nous avons obtenu les résultats suivants pour l'Apixaban :

Tableau n°25 : Valeurs obtenues lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour l'Apixaban

Concentration théorique (µg/L)	2,5	100	500
Nombre de mesures	6	6	6
Moyenne (µg/L)	2,60	107,25	515,10
Ecart type (µg/L)	0,19	4,58	24,17
Coefficient de variation (%)	7,47	4,27	4,69
Biais (%)	4,17	7,25	3,02
Résultat	Conforme	Conforme	Conforme

Comme pour la répétabilité, la conformité est établie si les coefficients de variation et les biais sont inférieurs à 20% (112).

(c) Epreuve de dilution

Les résultats obtenus lors de l'épreuve de dilution pour l'Apixaban sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n°26 : Valeurs obtenues lors de l'épreuve de dilution de l'Apixaban

Cmax (µg/L)	500		
Dilution	(Cmax*1,5)/2	(Cmax*1,5)/4	(Cmax*1,5)/10
Concentration théorique (µg/L)	375	187.50	75
Nombre de mesures	3	3	3
Moyenne (µg/L)	437,39	186,83	79,68
Biais relatif (%)	16,64	-0,36	6,25
Biais limite (%)	20	20	20
Résultat	Conforme	Conforme	Conforme

L'épreuve de dilution est conforme si un biais inférieur ou égal à 20% est obtenu entre la moyenne des déterminations et la valeur théorique (112).

(d) Rendement d'extraction

L'épreuve du rendement d'extraction consiste à comparer les aires des pics obtenus en analysant un échantillon surchargé puis extrait (produit extrait PE) à un autre échantillon non extrait puis surchargé (produit pur PP). Cette méthodologie permet de s'assurer que le processus d'extraction employé ne réduit pas le signal de manière significative. Nous avons choisi deux niveaux de concentration (LDQ et Cmax) et répété trois fois la mesure. Les résultats obtenus pour l'Apixaban sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n°27 : Valeurs obtenues lors de l'estimation du rendement d'extraction pour l'Apixaban

Date	11/09/15		18/09/15		
Niveaux (µg/L)	2.5		500		
PP/EI	PE/EI	0.042	0.041	6.989	6.791
		0.043	0.045	6.783	6.738
		0.042	0.043	6.572	7.042
Moyenne	0.042	0.043	6.781	7.042	
Rendement (%)	101.231		101.116		
Résultat	Conforme		Conforme		

La moyenne des rendements d'extraction aux deux niveaux doit être supérieure ou égale à 50% (112). Ces résultats démontrent que l'extraction par la méthode des sels QuEChERS est conforme aux standards requis pour la validation d'une méthode analytique. Il faut cependant prendre en compte le fait qu'un rendement d'extraction supérieur à 100 sous-entend que le processus d'extraction « ajoute » du produit d'intérêt dans l'échantillon ce qui est impossible.

(e) Effet de matrice

Les mécanismes de l'effet de matrice ne sont pas encore totalement connus à ce jour (113). Cet effet pourrait être dû à une compétition entre un analyte et une substance co-éluate non détectée présente dans la matrice. Cette réaction se déroule dans le spectromètre de masse lors de l'ionisation de la molécule d'intérêt. Elle peut se traduire par une augmentation du signal « ion enchancement » ou bien une diminution « ion suppression ».

Deux méthodes analytiques existent pour déterminer l'effet de matrice : L'infusion post-colonne et l'addition post-extraction(113). Nous avons choisi pour des raisons pratiques d'utiliser la méthode de l'addition post-extraction.

Cette technique nécessite de préparer deux catégories d'échantillons. La première catégorie est composée de phase mobile dans laquelle le produit a été additionné à une concentration connue (solution pure). La deuxième catégorie renferme des échantillons de matrice surchargés après extraction. Nous avons répété 6 fois l'expérience avec une concentration établie à C=100 µg/L. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°28 : Résultats obtenus pour la mesure de l'effet de matrice dans le dosage de l'apixaban

Réponse solution pure	Post-extraction	Ecart de signal (%)	Correction par l'étalon interne	
			Solution pure	Post-extraction
2565728	1618540	-36,92	100	100,164
	1914067	-25,40		102,343
	2175653	-15,20		107,756
	2213995	-13,71		103,089
	2454792	-4,32		104,259
	2547689	-0,70		100,618
Moyenne		-16,04		
Conclusion	Suppression ionique (SI)		SI corrigée par l'EI	

On considère qu'il y a un effet de matrice quand la variation de signal est supérieure à 15% (112). Dans notre cas, une diminution du signal implique une suppression ionique qui sera corrigée par l'étalon interne.

4. Discussion

Notre projet initial était de créer une méthode unique, simple et rapide, permettant de détecter et quantifier rapidement tous les anticoagulants oraux actuellement disponibles. Les molécules concernées étaient donc les AVK, rodenticides et AOD. Cette méthode devait permettre au laboratoire de pharmacologie toxicologie de répondre à une problématique à la fois complexe mais également très simple : « *Le patient présente ou a présenté un accident hémorragique, quelles sont les substances impliquées et dans quelle mesure le sont-elles ?* ». Plusieurs éléments devaient cependant être pris en compte : l'aspect pratique d'une part et l'aspect économique d'autre part.

D'un point de vue pratique, le développement et la mise au point d'une méthode de dosage est d'autant plus complexe qu'il y a de molécules dosées simultanément. Divers facteurs rentrent en jeu tels que la possibilité d'obtenir des temps de rétention égaux pour deux molécules, des problèmes de solubilité, des conditions d'ionisations différentes etc.

D'un point de vue économique, les coûts en réactifs sont à prendre en compte. Une méthode permettant de détecter et doser une trentaine de molécules aurait inévitablement eu un coût élevé alors qu'une seule molécule était impliquée dans l'échantillon. Le coût des étalons internes deutérés employés est très élevé et aurait représenté une dépense inutile. Par exemple, la société Alsachim pouvait nous fournir 1 mg d'Apixaban pour 420 euros hors taxe.

Les AOD étant encore d'usage minoritaire par rapport aux AVK (42) il devenait alors logique de séparer le projet en deux méthodes distinctes : Dosage des AVK et rodenticides d'une part, et dosage des AOD d'une autre part. Nous nous sommes concentrés dans ce travail sur la mise au point d'une méthode de dosage des AOD tandis qu'une deuxième équipe au sein du laboratoire se concentrait sur la méthode concernant les AVK et rodenticides. Les deux méthodes sont bien entendu complémentaires et peuvent être, dans les cas où cela s'avère nécessaire, être utilisées successivement.

Il est cependant évident que cette méthodologie ne présente pas que des avantages. Dans le cas d'une hémorragie non documentée chez un patient inconscient et dont le traitement n'est pas connu, le biologiste devra immanquablement choisir quelle méthode réaliser en priorité : S'agit d'une intoxication aux rodenticides ou bien d'un surdosage en AVK ou AOD ? Cette orientation nécessitera une coopération étroite entre clinicien et biologiste afin de pouvoir orienter ce dernier vers la méthode appropriée.

CONCLUSION

Nous avons vu à travers ce travail toute la complexité et la variété que représente la famille des anticoagulants oraux. Cette famille, dont les premiers membres ont été découverts il y a plus de 60 ans reste toutefois responsables de la majorité des accidents iatrogéniques dus aux médicaments, avec des issues parfois fatales.

Les outils biologiques existants sont d'une importance capitale dans la prise en charge du patient, que ce soit au moment de l'instauration du traitement, du suivi, ou de manière plus capitale encore, lors d'un surdosage. Le calcul et le suivi de l'INR est une démarche particulièrement bien cadrée et dont la gestion a été l'objet de nombreuses publications. Devant l'émergence d'une nouvelle sous-famille d'anticoagulants oraux, il devenait urgent de pouvoir disposer d'un outil efficace pour pouvoir évaluer leur action anticoagulante chez les patients. Notre méthode de dosage des concentrations plasmatiques d'anticoagulant oraux directs permettra de fournir au clinicien une mesure précise afin que celui-ci puisse estimer au mieux le risque hémorragique. Celle-ci pourra alors être mise en œuvre dans l'instauration et le suivi du traitement, en vérifiant que le patient se situe bien dans l'intervalle thérapeutique. Il sera alors possible d'adapter le traitement au cas par cas et de faire entrer la gestion des AOD dans une démarche de médecine personnalisée. Notre méthode, en cas d'urgence chirurgicale ou toxicologique, permettra de déterminer avec précision si le patient doit être concerné par un traitement antagoniste ou par des mesures plus simples, ne justifiant pas les effets secondaires encourus.

Bien que les AOD aient été présentés comme des médicaments ne nécessitant pas de dosage biologique, il a depuis été démontré que dans certaines indications, il devenait utile et même nécessaire d'avoir une évaluation précise de l'état d'anticoagulation du patient. Cette méthode de dosage des AOD devrait donc être un outil supplémentaire pour le clinicien sans toutefois être utilisée de manière systématique comme c'est le cas pour les antivitamines K. Utilisé dans les bonnes indications cliniques, cet outil permettra de réduire la iatrogénie médicamenteuse, et donc de réduire d'une part la mortalité des intoxications graves et d'autre part le nombre d'hospitalisations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Landry Y. Initiation à la connaissance du médicament, Enseignements de Première Année Commune aux Etudes de Santé. EdiScience; 2013.
2. Lofti B. Les anticoagulants, bénéfices cliniques et risques iatrogéniques. ANSM; 2013 Nov.
3. De Moerloose P, Boehlen F. Enseignements d'hématologie DCEM2 [En ligne]. 2005 [Consulté le 22 Janvier 2015]; Service d'angiologie et d'hémostase, Hôpitaux universitaires et faculté de médecine de Genève. Disponible sur: http://www.medecine.unige.ch/enseignement/apprentissage/module2/circ/apprentissage/intranet/pb2/hemostase_polycop.pdf
4. James C. Physiologie de l'hémostase, Diplôme d'Etudes Supérieures d'anesthésie-réanimation [En ligne]. Physiologie de l'hémostase; 2013 09 [Consulté le 22 Janvier 2015]; Hôpital Haut-Lévêque, CHU Bordeaux. Disponible sur: [http://reanesth.chu-bordeaux.fr/Formation-initiale/Dipl%C3%B4me-d-Etude-Sp%C3%A9cialis%C3%A9-en-Anesth%C3%A9sie-R%C3%A9animation-\(DESAR\)/Les-cours-DESAR/H%C3%A9mostase-Transfusion-2013/Vendredi-13-septembre-2013/Physiologie-de-l-H%C3%A9mostase-\(Dr-James\).pdf/](http://reanesth.chu-bordeaux.fr/Formation-initiale/Dipl%C3%B4me-d-Etude-Sp%C3%A9cialis%C3%A9-en-Anesth%C3%A9sie-R%C3%A9animation-(DESAR)/Les-cours-DESAR/H%C3%A9mostase-Transfusion-2013/Vendredi-13-septembre-2013/Physiologie-de-l-H%C3%A9mostase-(Dr-James).pdf/)
5. Frayon S, Cueille C, Prat R, Garel J-M. La cellule musculaire lisse vasculaire [En ligne]. Faculté de biologie, Université Pierre et Marie Curie. 2005 [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-a2.htm>
6. Fédération Française de Cardiologie. Artères et veines [En ligne]. [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.fedecardio.org/votre-coeur/anatomie/arteres-et-veines>
7. Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Physiologie de la mégacaryopoïèse [En ligne]. HématoCell. 2011 [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/plaquettes-sanguines-et-leur-pathologie/24-physiologie-de-la-megacaryopoiese>
8. Bezeaud A, Guillin M-C. Les intervenants de l'hémostase primaire [En ligne]. Exploration et Physiologie de l'Hémostase, Hôpital Bichat APHP et Université Paris 7 Denis Diderot. [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://hemostasep2.geht.org/pages/P2hemostase-page2.htm>
9. Nouette K, Richebé P, Calderon J, Mouton C, Elalamy I, Janvier G. Fonctions plaquettaires et risque hémorragique au cours de la circulation extracorporelle (CEC). *Sang Thromb Vaiss*. 2004;16(10):527–46.
10. Laboratoire biomnis. Précis de biopathologie, analyses médicales spécialisées. 2007
11. Jobin F. L'hémostase. Maloine. 1995. 496 p.

12. Marguerie G. Le fibrinogène, facteur multifonctionnel de l'hémostase. *Médecine Sci.* 1986;2:260–6.
13. Cambus J-P. Physiologie de l'hémostase [En ligne]. Faculté de médecine de Rangueil; 2002 [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: http://www.medecine.ups-tlse.fr/pcem2/cardio_vasc/telechargement/Physiologie_de_l_hemostase.pdf
14. Delavaud C, Roussel-Robert V, Stieltjes N, Allo J-C. Hémophilie - Maladie de Willebrand [En ligne]. Urgence online. 2013 [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.urgences-serveur.fr/hemophilie-maladie-de-willebrand,1637.html>
15. Kierszenbaum A. Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique. Elsevier Science Limited. Mosby; 2002.
16. Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires. Production et fonctions plaquettaires, signalisation et phosphoinositides [En ligne]. Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires. [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.i2mc.inserm.fr/equipe-11-346418.kjsp?RH=1310392587568&>
17. Université Paul Sabatier. Réaction inflammatoire: Aspects biologiques et cliniques, conduire à tenir. [En ligne]. [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item112/textel1.htm>
18. Lechat P. Enseignement de pharmacologie, niveau DCEM1 [En ligne]. Faculté de médecine, Pierre et Marie Curie. [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/POLY.Chp.9.9.html>
19. Segura VV. Indications of treatment with clopidogrel in the guidelines of the Spanish Society of Cardiology for unstable angina/non-ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55(11):1217–8.
20. Shadoff N, Valett N, Bates E. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. The EPIC Investigation. *N Engl J Med.* 1994 Jul 4;330(14):956–61.
21. Sebbag M, Moinard N, Auger I, Clavel C, Arnaud J, Nogueira L, et al. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol.* 2006;36(8):2250–63.
22. Richard B. Physiologie de la coagulation, cours de Master 2 Biologie Cellulaire Physiologie et Pathologie [En ligne]. 2013 [Consulté le 26 Janvier 2015]; UFR de médecine Paris 7 - Denis Diderot, unité INSERM U698. Disponible sur: http://b2pcr-esi.bcpp.master.univ-paris-diderot.fr/M1/UE8/cours/2012/UE8b/Richard-Courscoag_2013.pdf
23. Jaspard E. Carboxylation de la vitamine K, Université d'Angers [En ligne]. [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/2ModifPOSTtraduc/7Carboxylation/1Carboxylation.htm>

24. Bezeaud A. Physiologie de l'hémostase [En ligne]. 2011 [Consulté le 26 Janvier 2015]; UFR de médecine Paris 7 - Denis Diderot. Disponible sur: http://p2bichat2011.weebly.com/uploads/2/9/4/0/2940304/physiologie_hemostase_ab_2011.pdf
25. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res.* 1999;94(5):271–305.
26. Balédent F. Physiologie de l'hémostase [En ligne]. [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://documentation.ledamed.org/IMG/html/doc-10934.html>
27. Uprichard J, Perry D. Factor X deficiency. *Blood Rev.* 2002;(16):97–110.
28. Dictionnaire Vidal. Antithrombine III humaine [En ligne]. 2013 [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/substances/7959/antithrombine_iii_humaine/
29. Schiele F. Recommandations : bilan de thrombophilie [En ligne]. Centre Hospitalier Universitaire de Besançon. [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.besancon-cardio.org/recommandations/thrombop.htm>
30. Pavic M, Gérome P. Schéma simplifié de la coagulation [En ligne]. Université médicale Francophone. [Consulté le 26 Janvier 2015]. Disponible sur: http://campus.cerimes.fr/semiologie/enseignement/esemio5/site/html/7_3.html
31. Masrar A, Jeaidi A, Seddik R, Benkirane S. La coagulation sanguine: vers une vue nouvelle. *J Biol Médicale.* 2012 Apr;(1):53–7.
32. Hermans C, Dessomme B, Lambert C, Deneys V. Malformations veineuses et coagulopathie. *Ann Chir Plast Esthét.* 2006 Aug;51(4-5):388–93.
33. Riedel T, Suttner J, Brynda E, Houska M, Medved L, Dyr JE. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood.* 2011;117(5):1700–6.
34. Desnoyers P, Michel PL, Vahanian A, Samama M. Activateurs tissulaires du plasminogène (tPA). *Médecine Sci.* 1988;(4):222–30.
35. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Rapport public d'évaluation: Urokinase [En ligne]. 2006 Apr [Consulté le 28 Janvier 2015] p. 6. Disponible sur: http://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/472239e8580580d3eafd44dcde69d35b.pdf
36. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Sci World J.* 2014;2014:1–11.
37. Colucci M, Semeraro N. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: At the nexus of fibrinolysis and inflammation. *Thromb Res.* 2012 Mar;129(3):314–9.
38. Université médicale virtuelle Francophone. Troubles de l'hémostase et de la coagulation [En ligne]. 2010 [Consulté le 28 Janvier 2015]. Disponible sur: http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/MIB/Referentiel_national_Hemato/339.pdf

39. Cash JD, Leask E. Automatic determination of euglobulin lysis time. *J Clin Pathol*. 1965;18(6):821.
40. Lévesque H, Benhamou Y. Du bon usage des D-dimères au cours de la maladie thromboembolique veineuse. *Rev Médecine Interne*. 2015
41. Scully M. Warfarin therapy. *The Biochemist*. 2002;24:15–7.
42. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Les anticoagulants en France en 2014: état des lieux, synthèse et surveillance. [En ligne]. ANSM; 2014 [Consulté le 28 Janvier 2015]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/content/download/61981/795269/version/2/file/ANSM-rapport_NACOs-avril+2014.pdf
43. Oger E. Antithrombotiques, antivitamines K [En ligne]. 2011 [Consulté le 28 Janvier 2015]; Faculté de médecine, université de Rennes. Disponible sur: https://facmed.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20111011110938eogerAntivitamines_K_DCEM1_2011.pdf
44. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Bon usage des AVK. ANSM; 2012.
45. Léger S, Allenet B, Calop J, Bosson J. Education thérapeutique des patients sous anticoagulants oraux pour maladie thromboembolique veineuse: description du programme Educ'Avk. *J Mal Vasc*. 2004;29(3):145–51.
46. Allorge D. La pharmaco-toxicogénétique et les applications médicales actuelles. Journées Alain Feuillu - Actualités en toxicologie; 2014 May 23; Université de Rennes.
47. Haute Autorité de Santé. Surdosage en AVK, situations à risque et accidents hémorragiques, synthèse des recommandations [En ligne]. 2008 [Consulté le 28 Janvier 2015]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2008-09/surdosage_en_avk_situations_a_risque_et_accidents_hemorragiques_-_synthese_des_recommandations_v2.pdf
48. Yavordios S. Les nouveaux anticoagulants oraux directs: rôle du laboratoire d'hémostase. *Rev Francoph Lab*. 2014;2014(463):37–51.
49. Gouin I, all. Prise en charge des patients sous nouveaux anticoagulants [En ligne]. [Consulté le 28 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.urgences-serveur.fr/prise-en-charge-des-patients-sous,2002.html>
50. Bristol-Myers Squibb. Résumé des Caractéristiques du Produit: Apixaban. 2012.
51. Bayer. Résumé des Caractéristiques du Produit: Rivaroxaban. 2012.
52. Boehringer Ingelheim. Résumé des caractéristiques du Produit: Dabigatran. 2008 Mar.
53. Sié P. Bilan d'hémostase chez les patients traités par un anticoagulant oral direct (AOD). *Presse Médicale*. 2015 Jul;44(7-8):772–8.

54. Vanden Daelen S, Peetermans M, Vanassche T, Verhamme P, Vandermeulen E. Monitoring and reversal strategies for new oral anticoagulants. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2015 Jan;13(1):95–103.
55. Albaladejo P. Gestion péri-opératoire des anticoagulants : vers de nouvelles recommandations ?.pdf. *Archives of Cardiovascular diseases suppléments*; 2014.
56. Pernod G. Gestion des hémorragies lors de traitement par nouveaux anti coagulants oraux: quel challenge? *Rev Med Suisse.* 2014;10:334–6.
57. Dalal J, Bhave A, Chaudhry G, Rana P. Reversal agents for NOACs: Connecting the dots. *Indian Heart J.* 2016 Jan;
58. Boehringer Ingelheim. Résumé des Caractéristiques du Produit: Idarucizumab [En ligne]. 2015 [Consulté le 28 Janvier 2015]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/89e874fc6cfec3c9e93f33a7fe7baf6.pdf
59. Schiele F, van Ryn J, Newsome C, Sepulveda E, Park J, Nar H, et al. A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization. *Blood.* 2013;121(18):3554–62.
60. Mazur M, Sivakumar W, Taussky P, Park M. New reversal agents for oral anticoagulants on the horizon. *World Neurosurg.* 2015 Dec;84(6):1506.
61. Haute Autorité de Santé. Les « NACO », anticoagulants d'action directe, n'ont pas tous démontré la même efficacité [En ligne]. [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2008955/fr/les-naco-anticoagulants-d-action-directe-n-ont-pas-tous-demontre-la-meme-efficacite
62. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Etude des risques hémorragiques et thromboemboliques artériels liés au changement de traitement d'un médicament AVK vers un AOD chez les individus nécessitant une anticoagulation à long-terme en conditions réelles d'utilisation [En ligne]. 2014 Jun [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Presse-Communique-Points-presse/Surveillance-en-vie-reelle-des-anticoagulants-oraux-Communique>
63. Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés. Etude en "vie réelle" du bénéfice/risque à court terme des nouveaux anticoagulants oraux (dabigatran, rivaroxaban) chez les patients débutant un traitement et non précédemment traités par des AVK [En ligne]. 2014 Jun [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Presse-Communique-Points-presse/Surveillance-en-vie-reelle-des-anticoagulants-oraux-Communique>
64. Food and agriculture organization of the United Nation. Conservation des grains en régions chaudes - Lutte contre les rongeurs [En ligne]. [Consulté le 22 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.fao.org/wairdocs/x5164f/x5164f0v.htm>
65. Center for Disease Control and Prevention. Rodents [En ligne]. 2010 [Consulté le 05 Janvier 2016]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/rodents/>

66. Tadin A, Tokarz R, Markoti A, Margaleti J, Turk N, Habu J, et al. Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Feb 3;94(2):466–73.
67. Institut Pasteur. Leptospirose : Symptômes, traitement et recherche [En ligne]. 2013 [Consulté le 05 Janvier 2016]. Disponible sur: <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/leptospirose>
68. Mize EL, Britten HB. Detections of *Yersinia pestis* East of the Known Distribution of Active Plague in the United States. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2016 Jan 15;
69. Mailhe G. La lutte contre les rongeurs commensaux [En ligne]. Direction départementale des affaires sanitaires et sociales du Val D'Oise; 2009 [Consulté le 05 Janvier 2016]. Disponible sur: <http://www.val-doise.gouv.fr/content/download/2220/13908/file/La%20lutte%20contre%20les%20rongeurs%20commensaux.pdf>
70. Watt BE, Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA. Anticoagulant rodenticides. *Toxicol Rev.* 2005;24(4):259–69.
71. Centre anti-poison de Lille. Intoxications par les rodenticides [En ligne]. 2008 [Consulté le 05 Janvier 2016]]. Disponible sur: <http://cap.chru-lille.fr/~cap/GP/magazines/99183.html>
72. Meneveau N. Thrombose veineuse profonde des membres inférieurs [En ligne]. Besançon-Cardio. 2001 [Consulté le 04 Janvier 2015]. Disponible sur: <http://www.besancon-cardio.org/cours/26-thrombose.php>
73. Sève P. Thrombose veineuse et embolie pulmonaire [En ligne]. 2011 [Consulté le 05 Janvier 2016]; Faculté de médecine, Lyon. Disponible sur: http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/servlet/com.univ.collaboratif.util.LectureFichiergw?ID_FICHIER=1320397710646
74. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Prévention et traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse en médecine. 2009 Dec [Consulté le 05 Janvier 2016].p. 13.
75. Haute Autorité de Santé. Cardiopathies valvulaires et congénitales graves chez l'adulte [En ligne]. 2008 Jun [Consulté le 05 Janvier 2016]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2008-07/guide_medecin_ald_5_valvulopathies.pdf
76. Centre cardio-thoracique de Monaco. Les maladies valvulaires [En ligne]. 2012 [Consulté le 05 Janvier 2016]. Disponible sur: <http://www.ccm.mc/pdf/MaladiesValvulaires.pdf>
77. Fauvel J. Surveillance des porteurs de valves et de prothèse valvulaires [En ligne]. 2008 Feb 12;[Consulté le 05 Janvier 2016]. Université Paul Sabatier. Disponible sur: http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/MODULE7/Item105/105_poly_Surveillance_porteurvalve.pdf

78. Clouet J, Simon H, Duveau D. Le point sur les prothèses valvulaires. *Pharm Hosp.* 2006;41(165):109–23.
79. Charlemagne A, Blacher J, Cohen A, Collet J-P, Diévert F, de Groote P, et al. Epidemiology of atrial fibrillation in France: Extrapolation of international epidemiological data to France and analysis of French hospitalization data. *Arch Cardiovasc Dis.* 2011 Feb;104(2):115–24.
80. Lévy S, Guize L. Fibrillation auriculaire. 2005 Oct.[Consulté le 05 Janvier 2016]; Université de Versailles.
81. Fauvel J. Fibrillation auriculaire [En ligne]. 2009 [Consulté le 05 Janvier 2016]; Université Paul Sabatier. Disponible sur: http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module12/item_236/poly/236_Fibrillation_auriculaire.pdf
82. Haute Autorité de Santé. Guide Parcours De Soins : Fibrillation atriale [En ligne]. 2014 Feb [Consulté le 05 Janvier 2016]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-05/guide_pds_fibrillation_atriale_vf.pdf
83. Lebel B, Malherbe M, Gouzy S, Parienti J-J, Dutheil J-J, Barrellier M-T, et al. Oral thromboprophylaxis following total hip replacement: The issue of compliance. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2012 Apr;98(2):186–92.
84. Macouillard G, Freyburger G, Labrousse S, Sztark F. Dosage du Rivaroxaban et de l'Apixaban en chirurgie orthopédique et étude de leurs effets comparés sur la coagulation. *Ann Fr Anesth Réanimation.* 2013 Sep;32(1):A133.
85. Rifai R, Assayag P. Traitement médicamenteux du syndrome coronarien aigu du sujet âgé. *Arch Mal Coeur Vaiss - Prat.* 2015 Sep;2015(240):8–11.
86. Reilly PA, Lehr T, Haertter S, Connolly SJ, Yusuf S, Eikelboom JW, et al. The Effect of Dabigatran Plasma Concentrations and Patient Characteristics on the Frequency of Ischemic Stroke and Major Bleeding in Atrial Fibrillation Patients. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Feb;63(4):321–8.
87. Mueck W, Schwes S, Stampfuss. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring. *Thromb Res.* 2013 Jun 28;11(10).
88. Raghavan N, Frost CE, Yu Z, He K, Zhang H, Humphreys WG, et al. Apixaban Metabolism and Pharmacokinetics after Oral Administration to Humans. *Drug Metab Dispos.* 2009 Jan 1;37(1):74–81.
89. Kubitzka D, Becka M, Voith B, Zuehlsdorf M, Wensing G. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Oct;78(4):412–21.
90. Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(5):285–95.

91. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Les nouveaux anticoagulants oraux (dabigatran et rivaroxaban) dans la fibrillation auriculaire [En ligne]. [Consulté le 15 Décembre 2015]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Les-nouveaux-anticoagulants-oraux-dabigatran-et-rivaroxaban-dans-la-fibrillation-auriculaire-ce-qu-il-faut-savoir-Point-d-Information>
92. Weitz JI, Quinlan DJ, Eikelboom JW. Periprocedural Management and Approach to Bleeding in Patients Taking Dabigatran. *Circulation*. 2012 Nov 13;126(20):2428–32.
93. Pernod G, Albaladejo P, Sié P. Prise en charge des complications hémorragiques graves et de la chirurgie en urgence chez les patients recevant un anticoagulant oral anti-IIa ou anti-Xa direct. Propositions du Groupe d'intérêt en Hémostase Périopératoire (GIHP). *Ann Fr Anesth Réanimation*. 2013 Mar;10.
94. Godier A, Gouin-Thibault I, Rosencher N, Albaladejo P. Gestion des anticoagulants oraux directs pour un acte invasif. *J Mal Vasc*. 2015 May;40(3):173–81.
95. Bachellerie B, Ruiz S, Conil J-M, Crognier L, Seguin T, Georges B, et al. Surdosage en dabigatran chez un patient en insuffisance rénale: intérêt et limites de l'hémodialyse. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. Elsevier; 2014. p. 44–6.
96. Cramer JA, Roy A, Burrell A, Fairchild CJ, Fuldeore MJ, Ollendorf DA, et al. Medication Compliance and Persistence: Terminology and Definitions. *Value Health*. 2008 Jan;11(1):44–7.
97. Desbrus-Qochih A, Cathébras P. Obéir ou adhérer ? L'observance thérapeutique en question. *Médecine Longévité*. 2012 Dec;4(3-4):111–22.
98. Tarquinio C, Tarquinio M-P. L'observance thérapeutique: déterminants et modèles théoriques. *Prat Psychol*. 2007 Mar;13(1):1–19.
99. Metton J-P. Intoxication médicamenteuse grave en réanimation, prise en charge psychiatrique. *Réanimation*. 2006 Oct;15(5):399–404.
100. Garré J. Phénomène suicidaire et personnes âgées [En ligne]. Diplôme inter-universitaire psychopathologie de la personne âgée; Centre Hospitalier Universitaire d'Angers. Disponible sur: <http://www.med.univ-angers.fr/services/AARP>
101. Neguin C, Beuchée A, Pommereuil M, Berthier A-M, Le Gall E. Intoxication volontaire aux raticides chez une adolescente. *Arch Pédiatriques*. 1999;6:855–8.
102. Korostelev M, Bihan K, Ferreol L, Tissot N, Hulot J-S, Funck-Brentano C, et al. Simultaneous determination of rivaroxaban and dabigatran levels in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 Nov;100:230–5.
103. Delavenne X, Moracchini J, Laporte S, Mismetti P, Basset T. UPLC MS/MS assay for routine quantification of dabigatran – A direct thrombin inhibitor – In human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Jan;58:152–6.

104. Schmitz EMH, Boonen K, van den Heuvel DJA, van Dongen JLJ, Schellings MWM, Emmen JMA, et al. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2014 Oct;12(10):1636–46.
105. Blaich C, Müller C, Michels G, Wiesen MH. Multi-analyte analysis of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in human plasma using tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2014;
106. Nouman EG, Al-Ghobashy MA, Lotfy HM. Development and validation of LC–MSMS assay for the determination of the prodrug dabigatran etexilate and its active metabolites in human plasma. *J Chromatogr B.* 2015 May;989:37–45.
107. Antovic JP, Skeppholm M, Eintrei J, Boija EE, Söderblom L, Norberg E-M, et al. Evaluation of coagulation assays versus LC-MS/MS for determinations of dabigatran concentrations in plasma. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013 Nov;69(11):1875–81.
108. Anastassiades M, Lehotay S, Stajnbaher D, Schenck F. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *AOAC Int.* 2003 Mar;86(2):412–31.
109. Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaitso K, Shima N, Kamata T, et al. Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. *Forensic Sci Int.* 2013 Oct;232(1-3):40–5.
110. Anzillotti L, Odoardi S, Strano-Rossi S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC–MSMS. *Forensic Sci Int.* 2014 Oct;243:99–106.
111. Dulaurent S, El Balkhi S, Poncelet L, Gaulier J-M, Marquet P, Saint-Marcoux F. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. *Anal Bioanal Chem.* 2016 Feb;408(5):1467–74.
112. Le Grand R, Imbert L, Gaulier J-M, Tafzi N, Raffailac P. Procédure de validation des méthodes analytiques dans le service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance. CHU Limoges: Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance.; 2013 Oct p. 7.
113. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem.* 2003 Jul;75(13):3019–30.

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Coupe d'un vaisseau sanguin

Figure n°2 : Schéma d'une plaquette avec ses récepteurs membranaires

Figure n°3 : Adhésion d'une plaquette grâce au VWF

Figure n°4 : Schéma d'une plaquette activée avec présence de pseudopodes

Figure n°5 : Dégradation des phospholipides membranaires

Figure n°6 : Agrégation des plaquettes entre elles

Figure n°7 : Représentation des sous-unités du Fibrinogène

Figure n°8 : Carboxylation des résidus Glu en résidus Gla des facteurs Vit-k dépendants

Figure n°9 : Impact de la vitamine K et des AVK sur l'activation des facteurs Vit-K dépendants

Figure n°10 : activation de la prothrombine par le facteur Xa

Figure n°11 : Représentation schématique de la coagulation

Figure n°12 : Nouvelle conception de la coagulation

Figure n°13 : Formation des polymères de fibrine

Figure n°14 : Digestion de la fibrine

Figure n°15 : Familles chimiques et analogie structurale des antivitamines K

Figure n°16 : Mode d'action des AVK

Figure n°17 : Pharmaco-génétique des antivitamines K

Figure n°18 : Prise en charge hospitalière d'une hémorragie grave sous AVK

Figure n°19 : Impacts des AOD sur la coagulation plasmatique

Figure n°20 : Représentations chimiques du rivaroxaban et de l'apixaban

Figure n°21 : Activation du dabigatran par une Estérase

Figure n°22 : Schéma d'un thrombus veineux

Figure n°23 : Valves cardiaques

Figure n°24 : Zones cibles de l'INR chez le patient présentant une valve prothétique

Figure n°25 : Evolution annuelle d'utilisation en % des anticoagulants oraux en France

Figure n°26 : Arbre décisionnel de la prise en charge des hémorragies sous AOD quand un dosage plasmatique est disponible

Figure n°27 : Arbre décisionnel de la prise en charge des hémorragies sous AOD en l'absence de dosage plasmatique

Figure n°28 : Prise en charge d'un patient traité par AOD nécessitant un acte invasif programmé

Figure n°29 : Arbre décisionnel de la prise en charge d'un acte invasif en urgence chez un patient traité par AOD quand un dosage spécifique est disponible

Figure n°30 : Représentation graphique du gradient de la phase B

Figure n°31 : Exemple d'un chromatogramme d'un échantillon chargé à 500 µg/L de Dabigatran

Figure n°32 : Exemple d'une droite de calibration du Dabigatran

Figure n°33 : Chromatogramme d'un échantillon surchargé en Apixaban et Rivaroxaban (C=500 µg/L)

Figure n°34 : Exemple d'une droite d'étalonnage pour l'Apixaban

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Récapitulatif des facteurs de la coagulation

Tableau n°2 : Demi-vies des facteurs vitamine-K dépendants

Tableau n°3 : Principales interactions médicamenteuses des AVK

Tableau n°4 : Adaptations posologiques de la warfarine en fonction du profil pharmacogénétique du patient

Tableau n°5 : Prise en charge des surdosages en AVK

Tableau n°6 : Principales caractéristiques pharmacocinétiques des AOD

Tableau n°7 : Impact des AOD sur les tests de biologie médicale

Tableau n°8 : Evènements hémorragiques lors du traitement de la FANV

Tableau n°9 : Demi-vies du dabigatran chez les sujets sains et ceux ayant une fonction rénale altérée

Tableau n°10 : Principales interactions médicamenteuses des AOD

Tableau n°11 : Répartition des causes d'intoxications entre 2000 et 2008 du CAP de Lille

Tableau n°12 : Conséquences des intoxications entre 2000 et 2008 au CAP de Lille

Tableau n°13 : Utilisations cliniques des AOD en 2014

Tableau n°14 : Concentrations d'Apixaban observées lors des études cliniques

Tableau n°15 : Concentrations maximales en AOD observées par différents auteurs

Tableau n°16 : Intervalles de concentration employés par différentes équipes

Tableau n°17 : Substances pures employées

Tableau n°18 : Obtention des solutions filles par dilutions des solutions mères

Tableau n°19 : Gradient de phase mobile

Tableau n°20 : Transitions employés en mode MRM

Tableau n°21 : Temps de rétentions des composés d'intérêt

Tableau n°22 : Procédure d'obtention de la gamme d'étalonnage du Dabigatran

Tableau n°23 : Préparation de la gamme d'étalonnage du rivaroxaban et de l'apixaban

Tableau n°24 : Valeurs obtenues lors de l'essai de répétabilité pour l'Apixaban

Tableau n°25 : Valeurs obtenues lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour l'Apixaban

Tableau n°26 : Valeurs obtenues lors de l'épreuve de dilution de l'Apixaban

Tableau n°27 : Valeurs obtenues lors de l'estimation du rendement d'extraction pour l'Apixaban

Tableau n°28 : Résultats obtenus pour la mesure de l'effet de matrice dans le dosage de l'apixaban

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Anticoagulants oraux : utilisation clinique et mise en place d'une méthode de dosage des anticoagulants oraux directs par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Résumé :

Les anticoagulants oraux sont indiqués dans la prévention des évènements thromboemboliques survenant au décours de pathologies telles que la fibrillation atriale, le syndrome coronarien aigu avec sus-décalage ST ou encore la pose de prothèses de hanche ou de genou. Jusqu'en 2009 les antivitamines K étaient les seuls représentants de cette famille médicamenteuse jusqu'à ce que les anticoagulants oraux directs (AOD) soient introduits. Ceux-ci ont été présentés par les laboratoires comme des molécules au maniement plus simple, à la fois pour le patient et pour le prescripteur. L'absence de contrôle biologique régulier était un des principaux arguments mis en avant lors de la promotion de ces molécules. Cependant, des études montrent que dans certaines situations cliniques telles que l'âge avancé, l'insuffisance rénale, les intoxications ou encore le suivi thérapeutique pharmacologique, il était indispensable de disposer d'un outil précis permettant de déterminer le statut d'anticoagulation du patient. La méthode analytique développée dans le laboratoire de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance du CHU de Limoges est une technique permettant de mesurer les concentrations plasmatiques d'AOD dans une large gamme [2,5 - 500 µg/L]. Les différentes sociétés savantes ont établi des recommandations de prise en charge dans laquelle le seuil d'anticoagulation a été établi à 30 µg/L. En parallèle, un seuil de toxicité nécessitant une antagonisation a été déterminé à 400 µg/L. Cette méthode sera donc applicable dans le suivi thérapeutique du patient (concentrations plasmatiques situées dans la zone thérapeutique), dans la prise en charge chirurgicale en urgence (concentrations plasmatiques inférieures à 30 µg/L) ou encore dans les intoxications massives (concentrations plasmatiques supérieures à 400 µg/L) nécessitant l'administration d'une antagonisation. Cette méthode devrait donc améliorer la qualité de la prise en charge du patient traité par AOD.

Discipline : Pharmacie

Mots-clés : Anti-vitamines K, anticoagulants oraux directs, dosage plasmatique, suivi thérapeutique pharmacologique, urgence chirurgicale, toxicologie

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, Bâtiment CBRS, Hôpital Dupuytren, 2 avenue Martin Luther King, 87042 LIMOGES cedex

Oral anticoagulants: clinical use and development of a method for determining direct oral anticoagulants by liquid chromatography coupled with mass spectrometry in tandem

Abstract:

Oral anticoagulants are currently used in prevention of thromboembolic events occurring during pathologies such as atrial fibrillation, acute coronary syndrome with ST segment elevation or the laying of artificial hips or knee. Until 2009 the vitamin K antagonists were the only members of this drug family until direct oral anticoagulants (DOA) were introduced. These were described by pharmaceuticals laboratories as molecules to simpler handling, both for the patient and the prescriber. The absence of regular biological monitoring was one of the main arguments used during the promotion of these molecules. However, studies show that in several clinical situations such as advanced age, renal failure or acute intoxication, it was essential to have an accurate tool in order to determinate the anticoagulation patient's status. The analytical method developed in the laboratory of pharmacology, toxicology and pharmacovigilance of Limoges University Hospital is a technique for measuring plasma levels of DOA in a wide range [2.5 to 500 µg/L]. Various scientific societies have established support recommendations in which the level of anticoagulation has been established at 30 µg/L. In parallel, a toxicity threshold requiring antagonism was determined at 400 µg/L. This method will be applied in the patient's therapeutic monitoring (plasma concentrations within the therapeutic range) in the surgical treatment in emergency (plasma levels below 30 µg/L) or in the case of intoxication (plasma concentrations above 400 µg/L) requiring administration of an antagonist. This method should therefore improve the quality of patient care treated with DOA.

Discipline: Pharmacy

Keywords: Anti-vitamin K, direct oral anticoagulants, plasma dosage, therapeutic drug monitoring, surgical emergency, toxicology