

Faculté de Pharmacie

Année 2025

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement
le 27 juin 2025

Par

Augustin ABADIE

Évaluation du DOAC Stop™ pour la neutralisation des AOD dans les bilans d'hémostase au CHU de Limoges

Thèse dirigée par Dr Magali DONNARD

Examineurs :

M. Nicolas Picard, PU-PH, Laboratoire de Pharmacologie CHU de Limoges

M. Jean Feuillard, PU-PH, Laboratoire d'Hématologie biologique, CHU de Limoges

Mme. Jasmine Chauzeix, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

M. David Rizzo, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

Mme. Magali DONNARD, PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges



Faculté de Pharmacie

Année 2025

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 27 juin 2025

Par

Augustin ABADIE

Évaluation du DOAC Stop™ pour la neutralisation des AOD dans les bilans d'hémostase au CHU de Limoges

Thèse dirigée par Dr Magali DONNARD

Examineurs :

M. Nicolas Picard, PU-PH, Laboratoire de Pharmacologie CHU de Limoges

M. Jean Feuillard, PU-PH, Laboratoire d'Hématologie biologique, CHU de Limoges

Mme. Jasmine Chauzeix, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

M. David Rizzo, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

Mme. Magali DONNARD, PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Dernière liste à jour sur :

https://aurora.unilim.fr/theses/nxfile/default/04019d8f-6e94-499c-8fb5-7f1c2ac7d86b/blobholder:0/liste_enseignants_pharmacie.docx

Le 1^{er} octobre 2024

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur LÉGER David

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge, Assesseur pour la Formation Continue

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas, Assesseur pour l'Innovation Pédagogique

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. JOST Jérémy	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. PICARD Nicolas	Physiologie et pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
Mme POUGET Christelle	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques
Mme VIANA Marylène	Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

Mme. CHAUZEIX Jasmine	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme DEMIOT Claire-Élise (*)	Physiologie et pharmacologie

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

Mme AUDITEAU Émilie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
Mme BEAUBRUN-GIRY Karine	Pharmacie galénique
Mme BÉGAUD Gaëlle (*)	Chimie analytique et bromatologie
M. BILLET Fabrice	Physiologie et pharmacologie
Mme BONAUD Amélie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. CALLISTE Claude	Biophysique et mathématiques
M. CHEMIN Guillaume	Biochimie et biologie moléculaire
Mme CLÉDAT Dominique	Chimie analytique et bromatologie
M. COMBY Francis	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
Mme DAMOUR Alexia	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. FABRE Gabin	Biophysique et mathématiques
M. LABROUSSE Pascal (*)	Botanique et cryptogamie
Mme LAVERDET Betty	Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland	Physiologie et pharmacologie
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VEDRENNE Nicolas	Toxicologie
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Professeur associé en service temporaire

M. FOUGÈRE Édouard	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
---------------------------	---

Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques

Mme MARCELLAUD Élodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

Mme RAKOTOMANGA Iharilanto Patricia Andrianjafy	Chimie analytique et bromatologie
Mme SALMI Djouza	Pharmacognosie, Botanique et Mycologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Professeur émérite

M. DESMOULIÈRE Alexis	Physiologie et pharmacologie
------------------------------	------------------------------

À la mémoire de Papy et de tous ceux qui me sont chers.

Alors, les Rois, les Dieux, la Chance et la Victoire

Seront à tout jamais tes esclaves soumis

Et, ce qui vaut mieux que les Rois et la Gloire,

Tu seras un Homme, mon fils !

Rudyard Kipling

Remerciements

Aux membres de ce jury,

A M. le Professeur Nicolas PICARD, Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse, et je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance. J'espère que ce travail retiendra votre attention et suscitera votre intérêt.

A M. le Professeur Jean FEUILLARD, Merci beaucoup Jean d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je profite de cette occasion pour vous remercier de votre encadrement durant ces deux stages au laboratoire d'hématologie qui m'auront vu évoluer. Les aiguilles de l'horloge n'ont désormais plus de secret pour moi ! Un grand merci également pour tout ce que vous pouvez faire pour les internes au niveau du laboratoire d'hématologie. J'espère que ce travail, dont vous attendez avec impatience les conclusions, saura retenir votre intérêt.

A M. le Maître de conférences David RIZZO, Merci infiniment David d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. (le dernier en tant que MCU ? c'est un honneur !) Malheureusement la biologie moléculaire et la cytogénétique sont des mondes que je m'obstine à ne pas explorer (on va dire que c'est le manque de temps) et je n'ai donc pas eu l'occasion de passer beaucoup de temps à tes côtés. Je te remercie cependant pour tes cours passionnants et cet accent chantant du Gers. En espérant que ce travail, qui sort un peu de tes domaines de prédilection te plaise.

A Mme le Maître de Conférence Jasmine CHAUZEIX, Tout comme pour David, je regrette cette faible appétence pour la biologie moléculaire et la cytogénétique qui a limité nos échanges. Je tiens néanmoins à te remercier pour ta disponibilité et d'avoir accepté de siéger à mon jury de thèse. Après tout, l'hémostase ça te connaît ! Il n'y aura désormais plus personne à saluer en passant dans la grotte, et je m'en excuse..

A Mme le docteur Magali DONNARD, Un immense merci de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail de thèse combinant tout ce qui me passionne en biologie médicale et ce qui m'a amené à devenir biologiste : les médicaments, les expérimentations, et enfin les analyses biologiques. Votre sujet, même si j'ai mis du temps à m'y mettre, m'a pleinement mobilisé et j'en ai retiré de nombreuses expériences. Je vous suis profondément reconnaissant pour votre disponibilité, vos relectures attentives et vos conseils éclairés tout au long de ce parcours.

Avant de franchir le pont entre le jury et toutes les autres personnes que je souhaite remercier, j'aimerais remercier le **Dr Pauline BIROT**. Merci Pauline pour ta disponibilité sans faille, tes nombreuses explications et pour avoir répondu à mes mille et une questions. Tes conseils et tes relectures ont été d'un grand secours. Je te souhaite que du bonheur pour la suite. N'oublie pas de saluer le STAR-MAX2 et la belle et la bête de ma part !

Aux **techniciens d'hémostase**, Un grand merci à vous tous **Delphine, Andréa, Hilal** (Salut Hilal ça va ?) et enfin **Guillaume** (aka Guigui Fantaisiiiiie) de m'avoir supporté dans vos pattes tout au long de ce travail. Merci pour les premiers patients et merci de m'avoir expliqué avec patience les différents tests et protocoles qui font de l'hémostase un domaine passionnant, promis je ne retoucherai plus jamais aux STACLOT ! Et Guillaume, merci de m'avoir supporté et aidé énormément durant ces interminables dimanches de manips.

A tout le personnel du **laboratoire d'hématologie**, merci à tout le monde pour votre gentillesse et pour m'avoir supporté durant ces deux semestres. C'était toujours un plaisir de venir travailler au laboratoire et c'est en partie grâce à vous. Un grand merci **Sylvie, Clément, Marie-Candice, Virginie, Marlène, Lucile** pour m'avoir accepté et aidé pendant vos soirs d'hémostase. **Marjo'**, merci pour tout, les petites/grosses blagues et ta gentillesse, je te souhaite plein de bonheur avec les Sthemo. Merci également à ceux que j'ai moins embêté, Virginie, Alexia, Anne, Yasmina, Bastien, Stéphane, Aymane, Patricia, Christelle et tous ceux que j'ai pu oublier.

Je profite de la partie hématologie pour remercier très chaleureusement le **Dr Franck TRIMOREAU** pour m'avoir accepté pendant ces nombreuses après-midis au microscope, à parler de tout et de rien (bon un petit peu d'hématologie cellulaire quand même !) Merci de nous apprendre avec une si belle passion ce domaine de l'hématologie. On se croiera sur la route, je chercherai une voiture rouge !

Mamie-Framboise, tu as ta dédicace personnalisée. Merci pour tout, ta joie de vivre, ta gentillesse, ton bureau ou l'on peut tout dire. Je te souhaite plein de bonheur pour la suite (tu as bien de la chance) J'espère que l'on se recroisera !

A l'équipe des techniciens de nuit, **Christelle, Fabrice, Damien, William**, vous qui m'avez vu dans tous les états possibles, à toutes les heures de la nuit, merci beaucoup ! J'ai adoré faire des nuits avec vous, j'ai appris énormément de choses et je vous remercie pour cela. On passera sur tout ce qui est confidentiel, c'est le pacte de la nuit !

Au service de Biochimie, merci d'avoir accepté mon retour, j'ai hâte de passer plus de temps avec vous tous. Une fois la thèse finie je reprends les bonnes vieilles habitudes (les soirs ?..) Un grand merci **Pr Frédéric Favreau** pour votre disponibilité, votre confiance et votre

accompagnement dans tous les projets possibles. Un grand merci au **Dr Yasser BAAJ**, pour toutes les explications et discussions intéressantes passées à tes côtés. Merci également à l'ensemble des biologistes de biochimie dont les **Drs Pauline CHAZELAS, Pierre-Antoine FAYE, Thierry CHIANEA, Marie-Agnès COSTA** ainsi que le **Pr Franck STURTZ** pour votre disponibilité et vos conseils. Un grand merci également aux techniciens, c'est un plaisir de travailler à vos côtés et c'est bien pour cela que je reviens. **Loïc** merci pour ta gentillesse et nos débats sur le plateau / dans les couloirs. **Thomas, Céline, Dimitri, Marianne, Djemila, Alice, Marie Lise, Christelle, Manon**, merci pour vos nombreux conseils, votre gentillesse nos nombreuses discussions et merci de me supporter !

Au service de Bactériologie-Virologie et Hygiène, une matière que j'apprécie malgré mon côté hautain (?). J'ai pu passer un excellent semestre d'été dans ce service et j'y ai énormément appris. Merci à l'ensemble des biologistes et techniciens de ce service (merci **Samuel** et **Hervé** les boss, merci **Aurélie, Marine, Chloé**, les **Emilie's**, **Karine, Myriam, Marie**, pour votre patience et la patience dont vous avez fait preuve à mon égard)

Au service d'Immunologie, Merci beaucoup pour ce stage très intéressant. Un grand merci à l'ensemble des biologistes pour leur gentillesse et leur disponibilité (**Marie-Odile, Guillaume, Ahmed**, et le secteur HLA avec **Virginie** et **Mathieu** que j'ai malheureusement moins cotoyé). Merci également à l'ensemble des techniciens de service, pour leur partage de leur passion de l'immunologie. **François**, promis je termine la validation de méthode ! **Lakhdar** merci pour tout, tes souvenirs de voyages, les sessions golf, nos nombreuses discussions, c'était un plaisir qui continuera j'espère !

Et enfin, un grand merci à toutes les personnes du CBRS que j'ai eu la chance de croiser au cours de ces trois années limougeaude. Le CBRS est un bel endroit occupé par de belles personnes.

Une petite mention spéciale également pour **David**. Merci pour ta gentillesse, pour nos innombrables discussions, merci pour nous redonner le sourire dès que tu le peux à l'internat, je te souhaite plein de bonheur !

Je fais également un petit tour par **Guéret** pour remercier la rapidité et l'efficacité du Laboratoire et de ses biologistes concernant leur retour sur l'utilisation du charbon activé.

Maintenant, voyageons un peu et passons aux vieux amis,

Aux orléanais, merci **Hugo, Ronan, François**, d'avoir été là depuis si longtemps et pour tout ce que nous avons partagé. Vous avez une place spéciale dans mon cœur, la place des vieux amis. On se voit clairement moins souvent mais je serai toujours là pour vous et j'ai hâte d'avoir le temps d'aller tous vous voir respectivement.

Aux orléano-tourangeaux, perdus dans le bateau de la PACES c'est là que nous nous sommes rapprochés, **Paul, Cruz, Dany, Maxence** et **Carlos**, une petite pensée pour vous la Bouev' !

Aux tourangeaux, La Phamille, **Antoine, Léa**, désolé pour mes réponses aléatoires et si tardives. Je suis hyper fier de vous et de la Phamille. **Antoine** un infini merci de m'avoir choisi et supporté durant toutes ces années tourangeaude, à l'heure où j'écris ces lignes tu rentres

également dans ta dernière ligne droite alors je te souhaite plein de courage et on fêtera ça !
Léa, bienvenue dans le club, trop fier de toi et hâte de voir la suite, ton parrain indigne.

Mehdi, Antoine, Romain, Benjam', merci pour votre amitié en or ! J'ai adoré tous les moments passés ensemble et je ne peux qu'avoir hâte de ces prochains moments, aussi rares soient-ils. Sachez que je ne vous oublie pas !

Thibaut, mon très cher collègue, il est loin le temps des soirées Bret's-saucissons-LFL ! Je suis très fier de nos chemins parcourus et de la suite qui arrive. Merci de m'avoir coaché et entraîné là où j'en suis actuellement.

Julien, mon fidèle binôme de TP (on se complétait quand même grave bien c'était bô), une petite pensée pour toi.

Simon et Gallou, les frérots de la pharma, merci pour toutes ces années à la Fac' je vous souhaite de vous épanouir à fond dans vos différents choix de vie !

Coco, de Pharmalab à la communication à distance, merci pour ta patience (++) envers mes réponses tardives, continue de pétiller chaque jour qui passe !

Un immense merci également à toutes celles et ceux qui ont partagé avec moi cette aventure tourangelle. Cette période a été une étape marquante de ma vie, riche en apprentissages et en évolutions personnelles, et je vous en suis profondément reconnaissant.

Après cette balade en val de Loire, revenons au cœur de nos terres Limougeaudes,

Cette ville pas forcément choisie, mais à laquelle l'on finit forcément par s'attacher, fait désormais partie d'un petit bout de mon chemin de vie. Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes que j'ai croisées sur ce chemin, en m'excusant par avance pour celles que j'ai oublié.

Au noyau dur :

A **Sami**, du J1 de l'internat jusqu'à présent nous nous sommes côtoyés et sache que c'est un honneur pour moi. Ta joie de vivre communicative et ton relationnel hors-pair font de toi une personne incroyable. Je n'ai pas de doute que cette amitié durera alors je te dis à toute !

A **Thibaut**, On va dire que tout a commencé d'une rencontre qui précédait la rentrée dans l'internat et qui donnait de bons présages. Merci pour tous tes conseils, ton rôle de grand frère biologiste, ton invitation à la deuxième collo, et tous ces moments partagés. Malheureusement le projet Biocccitanie est quelque peu compromis mais je ne me fais pas de soucis pour ton avenir ! (et le mien ?)

A **Tom**, Sache que je suis ravi de t'accompagner dans ton dernier semestre d'internat. C'est toujours un régal de discuter de tout et de rien avec toi, te donner des conseils comme en recevoir. Je te souhaite tout le bonheur qu'il est possible d'avoir cher Pr Quocoubeh que ce soit sur le plan professionnel, « insérer futur poste » et personnel avec « insérer nom de copine ».

A **Valentin**, Val' la F., sache que c'est génial d'avoir un ami comme toi. Toujours disponible, toujours partant que ce soit pour des anecdotes à rallonges, des balades aléatoires ou des sukis impromptus, j'ai hâte de voir la suite du programme.

A **Théo**, mon petit fréro de Bordeaux. Merci pour toutes ces balles tapées ensemble, pour tous ces moments lors de ton court séjour à Limoges et pour mes séjours à Bordeaux. Même à l'autre bout de la France je te prendrai comme dentiste t'inquiètes même pas !

A la première colloc, les frérots **Doud'** et **Pierrot**, Merci pour tous ces moments partagés autour de bons petits plats et bolinettes, pour toutes ces discussions sur le pas des portes, pour les potits chats (qui n'ont pas été temiked) et pour les xari reacts. Par contre pas merci au hibou grand-duc. Je ne me fais pas de soucis pour vous/nous alors je vous dis également à toute !

A la deuxième colloc, **GG**, **Clara**, **Sacha (Thibaut)** (**Cori**) , merci pour votre sollicitude et votre patience envers le Augustin qui bosse sa thèse. Merci de m'avoir proposé pleins de trucs et d'avoir accepté mes réponses (rarement ?) négatives. Ces lignes signent la fin de cette période et mon apparition plus régulière au rez de chaussée (peut être ..) Hâte de faire la loi au Colt Express et de vous faire la leçon a Exploding Kittens. **Justin** et **Serena**, merci pour ces moments (rares à cause de moi) passés à discuter à la colloc. Ne m'en voulez pas mais je ne remercierai pas Eby tout de suite..

Et enfin à tous les autres co-internes que j'ai eu la chance de croiser et de cotoyer en stage ou ailleurs,

Aux co-internes d'hémato, **Chloé** merci pour cette bonne humeur et ces discussions portées sur les relations et tout ce qui va avec **Franck** je ne peux dire que merci pour ce premier semestre légèrement tourné vers la débauche mais que nous avons chacun su corriger, t'es un pote en or man, **Mathilde** merci d'avoir apporté de la clinique et de l'expertise à ce semestre **Ludivine** merci pour les avions (j'ai paniqué) **Blandine**, Merci pour cet accent chantant, ce mandat de VP bio admirable et cette bonne humeur constante. **Cassandra** de DJ à Chef je t'ai vu grandir et je peux que te féliciter pour ton évolution (genre je me permets de dire ça ?). Merci pour tout, les conseils, les sessions myélos, les remarques quand j'étais bancal en cyto, les bons moments passés dans le bureau à parler, merci pour ta gentillesse et ton écoute et enfin merci de m'avoir supporté 2 semestres ! **Maxime** merci pour la transmission de cette passion pour le Bionano, merci de m'avoir supporté également pendant 2 semestres !

Aux co-internes de BVH, **Antoine**, peu importe dans quelle stratosphère tu te trouves actuellement, merci. **Émilien** ce fut un plaisir d'évoluer au plus près du boss des tiques et de cerba, **Manong** ma grande sœur de Limoges merci pour toutes ces discussions aléatoires et ces bons moments et de m'avoir pris comme petit frère, **Marie-Sarah** bon courage pour tes longues années d'études à venir (pitié non) **Inès** merci de nous avoir soutenu dans notre côté hautain avec Francky, **Alix**, à jamais merci pour tes cours express sur le Palu qui ont été forts efficaces (je te dédie le 10/10) **Sarah**, la désormais expatriée, merci pour ces bons moments, du squash aux ptites visites en immuno !

Aux co-internes de bioch', **Julie** et **Dorine** vous aurez toujours une petite place dans mon cœur de Tanguy, Éric et Gus, merci pour ce semestre incroyable à vos côtés. Restez comme vous êtes wsh. **JB** merci pour avoir apporté un peu de calme à ce semestre de psychopathes.

Aux co-internes d'immuno, Thibaut je ne vais pas radoter, mais merci **mamie Lucie** pour toutes ces journées chill dans le Bdi, pour toutes ces sessions remise en question et ces conseils précieux.

Aux co-internes d'hémato-bis Merci **Nathan** et **Lucas**, pour toutes ces sessions pokémon, myélo et autres, l'histoire se continue en bioch' ! Merci **Chaïma** pour ta gentillesse et ta réception aux blagues, et pas merci pour l'aiguille coincée au myélo ! **Fifame** merci pour ces sessions myélos/discussions.

Aux co-internes de bioch-bis, flemme d'écrire parce que ce n'est pas fini ! Promis à partir de maintenant je vais squatter le BDI plus souvent et pouvoir répondre à toutes vos questions qu'elles soient sur la culture G ou sur la biologie.

Aux co-internes de Pharmaco, (Allez ça compte comme un stage le temps passé avec vous non ?) **Hamza**, **Yeleen**, merci pour ces prises de vitesses, pour les discussions philosophiquement intéressantes et les inintéressantes et merci pour cet accueil si chaleureux dans le monde sombre du deuxième étage. Petite pensée pour le SAZ également.

Et à tous les autres avec qui je n'ai pas eu la chance de faire un stage. **Nisrine**, **Charlotte**, **Roy**, **Juliette**, **Alexia**, **Mathieu**, **Séléna**, **Candice** (???) **Anissa** (tu es en train de changer de catégorie t'inquiètes !) m'en voulez pas mais je vais être chaud niveau encre là..

Spéciale dédicace et remerciements à **Tata Sarah** également. Toujours de bons conseils malgré la distance. Trop fier de tes (bons) choix et de ton parcours, on se retrouve de l'autre côté !

Merci également à tous les internes de l'internat, **Antoine**, **Axel**, **Mathieu**, **Emma**, **Baptiste**, **Alvin**, **Claire**, **Alice**, **Marie**, **Mélanie**, **Quentin**, **Dino**, **Capu** pour tous ces moments partagés durant cette première année où nous étions tous paumés à Limoges !

A mes biologistes mentors, **Gaël**, **Tanguy**, **Bastien**, merci pour toutes ces discussions sur le métier (et sur pleins d'autres choses) merci de votre confiance pour vos différents projets, c'est un honneur pour moi d'avoir de tels mentors !

Un dernier remerciement, cette fois-ci en tant que président d'association, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la vie de l'AIPHL. (sauf Thibaut pour le cadeau empoisonné)

Merci à la Médicale, **Sébastien**, **Jérôme**, **Marina**, pour ces nombreuses soirées, activités et discussions passées à vos côtés. Ce sera avec plaisir que je continuerai à garder contact avec vous.

Merci à tous les membres du bureau qui ont permis à l'association d'exister et de représenter les internes en pharmacie.

Enfin, concluons cette balade (même si on se rapproche plus de l'autoroute) des remerciements par la famille, une entité sans laquelle je ne serai rien finalement.

Papa et Maman, quelques mots ne suffiront pas à vous remercier mais si j'en suis ici c'est en grande partie grâce à vous. Vous m'avez permis d'arriver là où j'en suis et je vous dois tout. Merci pour tous les sacrifices que vous avez réalisés pour moi (nous) tout au long de ces 25 années déjà. Merci de ne pas m'avoir mis la pression et de nous avoir laissés maîtres de nos choix. Nous avons de la chance d'avoir été éduqués de la meilleure des manières possibles et je pense que nos différentes réussites à tous les trois ne sont que le reflet de la qualité que vous avez inculquée à notre éducation. C'est plus facile à mettre à l'écrit alors encore merci pour tout, je vous aime. Je nous souhaite à tous encore de longues années à vivre ensemble, à progresser dans la vie main dans la main.

Ce travail vous est bien évidemment dédié (et encore pardon Maman pour le peu de fautes d'orthographe, et oui Papa j'ai bien corrigé la Vitamine K !)

Claire, même si je le dis que très peu je suis très fier de toi, je te souhaite de trouver la spécialité dans laquelle tu t'épanouiras le plus, c'est ça le plus important. Pour le reste de la vie, je ne me fais pas de soucis pour toi, ton caractère, ta force de conviction et tout plein d'autres choses font que tout va réussir ! Merci pour la colloc (même si c'est moi qui rangeais tout) , merci pour tous ces bons moments passés à Tours et merci de l'attention que tu portes envers moi et que je ne te renvoie pas tout le temps et je m'en excuse.

Marie, jumeaux mais nos chemins se sont séparés assez tôt. Chacun sa voie et je pense que ces voies nous ont bien trouvés. Merci d'avoir cheminé à mes côtés depuis le tout début (c'est biologiquement vrai) et merci de reconnaître que je ne t'ai pas cassé le bras (je ne l'avouerai toujours pas).

Papy et Mamie Daniel, merci pour tous ces moments passés à vos côtés. Pour toutes les choses que vous nous avez données l'occasion de faire. J'ai été et je suis le plus heureux des pouspous et tout cela c'est grâce à vous. Papy, j'espère que de là-haut tu es fier de moi, je t'expliquerai tout un de ces jours !

Papy et Mamie Wawa, merci pour tous les moments passés à vos côtés. Si j'étais le plus heureux des petits-fils c'est bien parce que j'avais quatre grands parents exceptionnels. Et je suis toujours le plus heureux des petits-fils. Merci pour tout, Papy sache que je ne t'oublierai pas. Et mamie, je sais que tu ne seras pas là le jour de la soutenance alors je m'engage à te la refaire dès que je viens à la maison !

À vous quatre, je dédie également ce travail.

Pour finir, et parce que c'est également une partie de la famille, je viens terminer (poursuivre ?) ce voyage par une étape dans l'Aisne.

À **Carole**, merci de m'avoir accepté, tout d'abord en tant que copain d'Édouard puis par la suite en tant que beau-fils. Mes montées dans l'Aisne sont toujours un plaisir et je vous remercie pour cela. Merci pour votre gentillesse, pour cet accueil à chaque fois parfait, pour tous ces petits (gros ?) plats, ces apéros et ces soirées passées à Clanlieu. En espérant que cela dure toute la vie, je me permets ainsi d'ajouter une nouvelle thèse à votre collection !

À **Mamie Janick** merci également, pour tous ces moments passés dans le Nord. Je vais conseiller les gaufres au Maroilles à toutes les personnes qui vont préparer leur thèse.

À **Charlotte**, qui de mieux pour finir ces remerciements que toi ? Les mots ne seront jamais assez longs, je les garde pour les debriefs. Merci pour ces déjà 8 mois passés à tes côtés, pour ton soutien sans faille (tu vois j'ai fini !), pour ta confiance et ton amour. Je vous souhaite plein de bonheur et qu'il dure le plus longtemps possible. Je t'aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 4.0 France** »

disponible en ligne <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>



Liste des abréviations

ADP : Adénosine diphosphate

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AOD : Anticoagulants Oraux Directs

APL : Anticorps anti-phospholipides

AVK : Antivitamines K

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

DRVVT : Temps de venin de vipère de Russell dilué

ECA : Ecarin Chromogenic Assay

FT : Facteur Tissulaire

HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire

INR : International Normalized Ratio

LA : Lupus Anticoagulant

PCR : Polymerase Chain Reaction

PTT-LA : Céphaline sensibilisée aux APL

SAPL : Syndrome des Anticorps anti-PhosphoLipides

SFTH : Société Française de Thrombose et d'Hémostase

TCA : Temps de Céphaline Activée

TP : Taux de prothrombine

TQ : Temps de Quick

TT : Temps de Thrombine

vWF : Facteur Von Willebrand

Table des matières

I. Généralités	26
I.1. Rappels sur l'hémostase	26
I.1.1. Hémostase primaire	26
I.1.1.1. Principaux acteurs	26
I.1.1.2. Mécanisme de l'hémostase primaire	28
I.1.2. Hémostase secondaire	30
I.1.2.1. Principaux acteurs	30
I.1.2.2. Mécanisme de l'hémostase secondaire	31
I.1.3. Régulation de la coagulation.....	34
I.1.4. La fibrinolyse	34
I.2. Exploration de l'hémostase.....	35
I.2.1. Conditions de prélèvement	35
I.2.2. Techniques de dosage.....	36
I.2.3. Paramètres analysés	38
I.2.3.1. Hémostase de routine	39
I.2.4. Hémostase spécialisée	43
I.2.4.1. Recherche d'anticorps anti-phospholipides.....	43
I.2.4.2. Bilan de thrombophilie	47
I.2.4.2.1. Recherche d'un déficit en Antithrombine	47
I.2.4.2.2. Recherche d'un déficit constitutionnel en protéine C.....	48
I.2.4.2.3. Recherche d'un déficit constitutionnel en protéine S	51
I.2.4.2.4. Recherche de la mutation du facteur V Leiden.....	52
I.2.4.2.5. Recherche de la mutation G20210A du facteur II.....	53
I.3. Les Anticoagulants Oraux Direct (AOD).....	55
I.3.1. Préambule.....	55
I.3.2. Indications des AOD	56
I.3.3. Anti Xa – Apixaban, Rivaroxaban et Edoxaban	56
I.3.4. Anti IIa – Dabigatran	58
I.3.5. Impact des AOD sur les tests d'hémostase	60
I.4. La solution du charbon activé	63
I.4.1. Propriétés du charbon activé et mécanismes de neutralisation.....	64
I.4.2. Différentes solutions existantes	64

I.5. Objectifs de la thèse	66
II. Matériel et Méthodes.....	67
II.1. Présentation des équipements et réactifs utilisés.....	67
II.2. Protocole expérimental	69
II.2.1. Protocole de préparation des échantillons	69
II.2.2. Recueil des résultats.....	70
II.3. Analyse statistique.....	70
III. Résultats	71
III.1. Efficacité du DOAC Stop	71
III.1.1. Hémostase de routine	71
III.1.2. Hémostase spécialisée	79
III.1.2.1. Recherche d'anticorps anti-phospholipides.....	79
III.1.2.2. Bilan de thrombophilie	82
IV. Discussion.....	84
IV.1. Choix des patients.....	84
IV.2. Analyse des résultats	84
IV.2.1. Hémostase de routine	85
IV.2.2. Hémostase spécialisée.....	86
IV.2.3. Quelques cas particuliers	88
IV.3. Aspects économiques et indications potentielles	90
IV.4. Limites du travail	91
IV.5. Perspectives.....	92
Conclusion.....	93
Références bibliographiques.....	94
Annexes	102
Serment De Galien.....	117

Table des illustrations

Figure 1: Schéma simplifié d'une plaquette avec molécules d'intérêt en hémostase	28
Figure 2: Temps vasculaire	29
Figure 3: Mécanisme de l'hémostase primaire.....	30
Figure 4: Voie extrinsèque, <i>ppl</i> : <i>phospholipides</i>	31
Figure 5: Voie intrinsèque	32
Figure 6: Modèle de la coagulation <i>in vitro</i>	32
Figure 7: Modèle de la coagulation <i>in vivo</i>	33
Figure 8: Fibrinolyse, mécanisme et régulation.....	35
Figure 9: Tube citraté, avant et après centrifugation.....	36
Figure 10: Principe de la méthode de dosage chromométrique	37
Figure 11: Principe de la méthode de dosage chromogénique.....	37
Figure 12: Principe de la méthode de dosage immunologique	38
Figure 13: Dosage de l'activité anti-Xa d'un AOD	41
Figure 14: Tests du dRVVT Screen et Confirm.....	44
Figure 15: Algorithme utilisé au CHU de Limoges pour la recherche de lupus anticoagulant (LHEM AHEMO 0048D)	46
Figure 16: Tests d'explorations globaux de la coagulation et les éléments concernés.....	46
Figure 17: Schéma du dosage de l'antithrombine	48
Figure 18: Schéma de dosage de la protéine C antigène sur automate Vidas3.....	50
Figure 19: Principe de la méthode de recherche de la mutation du facteur V Leiden	53
Figure 20: Mécanisme d'action des AOD anti-Xa sur les modèles <i>in vitro</i> (a) et <i>in vivo</i> (b) de la coagulation	56
Figure 21: Mécanisme d'action du dabigatran sur les modèles <i>in vitro</i> (a) et <i>in vivo</i> (b) de la coagulation	58
Figure 22: DOAC-Stop™	65
Figure 23: DOAC-Stop Liquid™	65
Figure 24: Illustration des STAR MAX2 et MAX1 utilisés au cours de ce travail,.....	67
Figure 25: Schéma récapitulatif du protocole de comparaison utilisé	70
Figure 26 a/b/c : Représentations graphiques de l'impact du DOAC-Stop™ sur l'activité anti Xa en fonction de l'AOD utilisé.....	71
Figure 27: Impact du DOAC-Stop™ sur le TP (a) et impact de l'apixaban sur les variations du TP (b)	72
Figure 28 : Impact du DOAC-Stop™ sur le TP (a) et impact du rivaroxaban sur les variations du TP (b)	73

Figure 29: Impact du DOAC-Stop™ sur le TP (a) et impact du dabigatran sur les variations du TP (b)	73
Figure 30: Impact du DOAC-Stop™ sur le TCA (a) et impact de l'apixaban sur les variations du TCA (b).....	74
Figure 31: Impact du DOAC-Stop™ sur le TCA (a) et impact du rivaroxaban sur les variations du TCA (b).....	75
Figure 32: Impact du DOAC-Stop™ sur le TCA (a) et impact du dabigatran sur les variations du TCA (b).....	76
Figure 33: Évolutions (a) et statistiques de tests (b) de l'impact du DOAC-Stop™ et de l'apixaban sur les activités des facteurs II, X et V	76
Figure 34: Évolutions (a) et statistiques (b) de tests de l'impact du DOAC-Stop™ et du rivaroxaban sur les activités des facteurs II, X et V.....	77
Figure 35: Évolutions (a) et statistiques (b) de tests de l'impact du DOAC-Stop™ et du dabigatran sur les activités des facteurs II, X et V	77
Figure 36: Graphique des moyennes observées du fibrinogène avant et après utilisation du DOAC-Stop™	78
Figure 37: Représentation du temps de thrombine chez patients traités par dabigatran avant et après traitement par DOAC-Stop™	78
Figure 38: Représentation graphique et statistiques de tests des comparaisons des ratios DRVVT Screen et ratios normalisés obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban	79
Figure 39: Représentation graphique et statistiques de tests des comparaisons des ratios DRVVT Screen et ratios normalisés obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par rivaroxaban	80
Figure 40: Représentation graphique et statistiques de test des comparaisons des ratios DRVVT Screen et normalisés obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par dabigatran	80
Figure 41: Représentation graphique et statistiques de test des comparaisons des PTT-LA obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran	81
Figure 42: Représentation graphique et statistiques des tests de comparaison des activités en antithrombine obtenues avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran	82
Figure 43: Représentation graphique et statistiques des tests de comparaison des activités en protéine C obtenues avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran.....	82
Figure 44: Représentation graphique et statistiques de tests de comparaison des activités en protéine S obtenues avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran.....	83

Table des tableaux

Tableau 1: Principaux récepteurs plaquettaires d'intérêt en hémostase.....	27
Tableau 2: Contenu des granules denses et alpha plaquettaires	27
Tableau 3: Méthodes de dosage et valeurs normales des tests d'hémostase de routine.....	42
Tableau 4: Tableau des différents déficits constitutionnels en protéine C et leur réponse aux tests diagnostics.....	50
Tableau 5: Tableau des différents déficits constitutionnels en protéine S et leur réponse aux tests diagnostics.....	52
Tableau 6: Récapitulatif des différents tests et valeurs normales attendues pour le bilan de thrombophilie.....	54
Tableau 7: Caractéristiques pharmacocinétiques des AOD anti-Xa	57
Tableau 8: Caractéristiques pharmacocinétiques du dabigatran (49).....	59
Tableau 9: Impact des différents AOD sur les tests d'hémostase, avec les réactifs utilisés au CHU de Limoges, d'après bibliographie et travail préliminaire (62)	61
Tableau 10: Conduite en fonction du test pour un patient sous AOD au CHU de Limoges (Qualims LHEM AHEMO 0080F)	63
Tableau 11: Automates et réactifs utilisés en fonction des tests	68
Tableau 12: Résultats biologiques d'une patiente porteuse d'anticorps anti-phospholipides, sous apixaban, avant et après utilisation du DOAC-Stop™, avec les valeurs pathologiques surlignées	89
Tableau 13: Exploration d'un patient avec bilan perturbé même après DOAC-Stop™ avec les valeurs pathologiques surlignées	90

Avant-Propos

Une heure du matin, un jeudi de juin.

A l'heure où j'écris les dernières lignes de ce manuscrit, je réalise à quel point j'ai de la chance de faire quelque chose qui me passionne.

Le but d'une vie n'est-il pas de trouver son propre chemin, en accord avec ses valeurs et ses principes ? Ce travail de thèse a eu l'avantage de me permettre de faire le point sur ce qui m'anime et me pousse à avancer, tant sur le plan scientifique que par pure curiosité.

La biologie médicale occupe une place unique à la croisée de la clinique, de la biologie, de l'informatique et de nombreux autres domaines. Le travail qui m'a été confié m'a permis de prendre conscience de l'interdépendance de ces disciplines et des différents piliers qui constituent selon moi le métier de biologiste médical.

Le premier pilier est celui du questionnement. Comme l'écrivait Mme de Staël dans un autre contexte, « *la recherche de la vérité est la plus noble des occupations, et sa publication un devoir* ». Se poser une question, formuler une hypothèse et s'engager dans sa résolution constitue la clef de toute avancée scientifique. À partir de la problématique de l'efficacité du DOAC-StopTM pour neutraliser les Anticoagulants Oraux Directs (AOD), de nombreuses autres interrogations sont apparues et ont conduit à proposer *in fine* des solutions visant à améliorer la qualité du soin dans sa globalité.

Le deuxième pilier du métier de biologiste médical est celui de l'expérimentation. Comme le souligne Alain, « *l'idée de l'expérience ne remplace nullement l'expérience* ». C'est en tentant, en échouant, puis en réussissant que l'on amène une réponse à nos interrogations. Dans le cadre de ce travail, cette démarche expérimentale apportera la réponse à la question de la neutralisation des AOD qui sera susceptible par la suite d'améliorer la prise en charge des patients, de simplifier la vie des cliniciens et des biologistes.

Le troisième pilier du métier est, selon moi, celui de la transmission et de l'éducation tant auprès des pairs qu'auprès des patients. Dans un monde où l'information circule à une vitesse folle, qu'elle soit fiable ou non, il nous incombe de partager le résultat de nos expériences et de nos connaissances et de lutter contre la désinformation. Le biologiste médical, via son rôle dans la santé publique, se place naturellement sous l'étendard de la prévention en premier lieu. Plutarque disait « *enseigner, ce n'est pas remplir un vase, c'est allumer un feu* », ainsi, chaque échange, chaque apprentissage que nous réalisons doit se faire dans le but de l'amélioration du soin.

Avant de conclure, un dernier pilier me semble essentiel : celui du relationnel. En effet, ce relationnel trouve une place dans chacun des précédents piliers. Le questionnement va naître des besoins exprimés par les cliniciens, les patients ou d'autres biologistes. L'expérimentation repose elle aussi sur la collaboration qu'il s'agisse du partage d'expertise ou de l'apprentissage des protocoles. Enfin la transmission et l'éducation ne prennent sens que lorsqu'il y a un auditoire.

C'est donc en gardant à l'esprit ces différents piliers du métier de biologiste médical que s'inscrit ce travail de thèse portant sur l'« Évaluation du DOAC-StopTM pour la neutralisation des AOD dans les bilans d'hémostase au CHU de Limoges ».

Introduction

Les anticoagulants oraux directs (AOD) représentent une évolution thérapeutique majeure dans la prévention et la prise en charge des pathologies thromboemboliques. Leurs avantages comme leur facilité d'administration ou l'absence de nécessité de suivi biologique régulier font d'eux une alternative de choix par rapport aux antivitamines K (AVK) habituellement utilisés.

Néanmoins, l'essor des AOD s'accompagne de défis et problématiques analytiques pour les laboratoires d'hémostase. Du fait de leur mécanisme d'action spécifique, à savoir une inhibition du facteur Xa (Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban) ou du facteur IIa (Dabigatran), ces molécules sont responsables de nombreuses interférences analytiques, notamment sur les tests chromométriques. Cette problématique se traduit au CHU de Limoges par plus d'une centaine de patients dont les résultats d'hémostase (dosage de facteurs de coagulation, bilan de thrombophilie, recherche d'anticorps antiphospholipides) sont rendus ininterprétables en raison de la présence d'AOD.

Actuellement, il est recommandé d'instaurer une fenêtre thérapeutique pouvant aller jusqu'à une semaine en fonction de la molécule ou de réaliser un relais par héparine de bas poids moléculaire (HBPM) avant une exploration de l'hémostase chez un patient traité par AOD aboutissant à des démarches contraignantes chez les patients et les prescripteurs. De plus, par ces contraintes, la réalité du nombre de bilans d'hémostase chez les patients sous AOD est donc probablement fortement sous-estimée.

C'est en voulant répondre à cette problématique que nous avons décidé de tester dans ce travail, la mise en place d'un traitement pré-analytique des plasmas de patients sous AOD grâce au DOAC-Stop™, une formulation à base de charbon activé capable d'adsorber les AOD dans le plasma et de les rendre inactifs et indétectables.

Cette méthode pourrait permettre de neutraliser les interférences tout en évitant l'arrêt du traitement ou le relais par HBPM.

Ce travail s'inscrit donc dans une démarche d'optimisation du rendu biologique au sein du laboratoire d'hémostase. Il débutera par un rappel de généralités sur la physiologie de l'hémostase, son exploration ainsi que sur les AOD. L'évaluation de l'efficacité du DOAC-Stop™ reposera sur une analyse comparative avant/après traitement sur des échantillons appariés de patients issus de la routine. Enfin, les résultats obtenus nous permettront d'établir, ou non, de nouvelles recommandations pratiques pour la prise en charge des plasmas de patients traités par AOD au sein du laboratoire.

I. Généralités

I.1. Rappels sur l'hémostase

Le concept de coagulation sanguine scientifiquement défini prend naissance dans les années 60 avec les premières théories sur la cascade de la coagulation. Ces travaux ont décrit un mécanisme où des proenzymes activent successivement d'autres enzymes pour aboutir *in fine* à la coagulation sanguine. (1,2).

Le terme hémostase est composé de l'assemblage de deux mots grecs: *áima* le sang et *stási* qui signifie arrêt. Il désigne l'ensemble des phénomènes physiologiques destinés à la prévention et l'arrêt des saignements

L'hémostase repose sur un équilibre dynamique entre des processus inhibiteurs et activateurs garantissant ainsi le maintien de l'intégrité vasculaire. A l'état physiologique inactifs, ce n'est qu'en présence d'un élément déclencheur comme une brèche vasculaire ou une altération des parois de l'endothélium que les mécanismes de l'hémostase vont se mettre en route. (3)

L'hémostase se déroule en trois étapes distinctes. L'hémostase primaire, qui aboutit à la formation d'un thrombus plaquettaire provisoire. L'hémostase secondaire, ou coagulation, qui va venir consolider ce thrombus par un réseau de fibrine formant un caillot stable. Et enfin, la fibrinolyse qui intervient pour dégrader progressivement le caillot, une fois la réparation tissulaire terminée.

I.1.1. Hémostase primaire

I.1.1.1. Principaux acteurs

L'hémostase primaire repose sur l'action coordonnée de plusieurs acteurs cellulaires et moléculaires aboutissant à la formation d'un thrombus plaquettaire.

- Endothélium

L'endothélium est une couche unicellulaire tapissant les vaisseaux. Il maintient la thromborésistance en sécrétant des inhibiteurs plaquettaires et des substances anticoagulantes : prostacycline, monoxyde d'azote (NO), thrombomoduline et en favorisant la fibrinolyse via l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA).

Lors d'une lésion, l'endothélium passe d'un état antithrombotique à un état prothrombotique. Il réduit sa production de prostacycline et de NO, augmente l'expression du facteur von Willebrand (vWF) ainsi que du facteur tissulaire (FT), et expose la phosphatidylsérine, normalement située sur le feuillet interne de la membrane plasmique, facilitant l'activation de la coagulation.

- Sous-endothélium

Le sous-endothélium possède des propriétés hautement thrombogènes. Son exposition lors d'une lésion vasculaire déclenche l'hémostase primaire. Il est composé de différents types de

collagène dont certains (collagène de type I et III) favorisent l'adhésion plaquettaire via les récepteurs GPVI et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, ainsi que du facteur von Willebrand.

D'autres protéines adhésives, comme la fibronectine, la laminine ou encore la thrombospondine renforcent cette interaction avec les plaquettes. Le sous-endothélium contient aussi des protéoglycanes stabilisant sa matrice extra-cellulaire. Enfin, il exprime le facteur tissulaire (FT), initiant la voie extrinsèque de la coagulation et assurant la transition entre hémostase primaire et hémostase secondaire.

- Plaquettes

Les plaquettes sont les plus petits constituants du sang. Ces cellules anucléées ont une durée de vie d'environ sept jours et dérivent de mégacaryocytes situés dans la moelle hématopoïétique. Leur rôle dans l'hémostase est médié par différents récepteurs exprimés sur leur membrane phospholipidique (Figure 1) (Tableau 1) :

Tableau 1: Principaux récepteurs plaquettaires d'intérêt en hémostase

GPIb-IX-V	Intégrine $\alpha 2\beta 1$ (GP Ia-IIa)	Intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (GP IIb-IIIa)	GP VI	Récepteurs de stimulus
Permet l'adhésion initiale au facteur von Willebrand exposé lors d'une lésion vasculaire	Favorise l'interaction avec le collagène du sous-endothélium	Inactif sur les plaquettes au repos, mais après activation, se lie au fibrinogène permettant l'agrégation plaquettaire	Suite à sa liaison au collagène, déclenche une cascade de signalisation permettant l'activation plaquettaire	Sensibles au thromboxane A2, à l'ADP, ils permettent la propagation de l'activation plaquettaire

Les plaquettes contiennent également deux types de granules intracytoplasmiques (Tableau 2) :

Tableau 2: Contenu des granules denses et alpha plaquettaires

Granules Denses	Granules Alpha
Agonistes plaquettaires (Adénosine Diphosphate (ADP), Adénosine triphosphate (ATP)), Calcium, molécules vasoconstrictrices (sérotonine)	Facteur 4 plaquettaire (PF4), fibrinogène, facteur Von Willebrand impliqués dans l'adhésion, l'agrégation plaquettaire ainsi que la coagulation

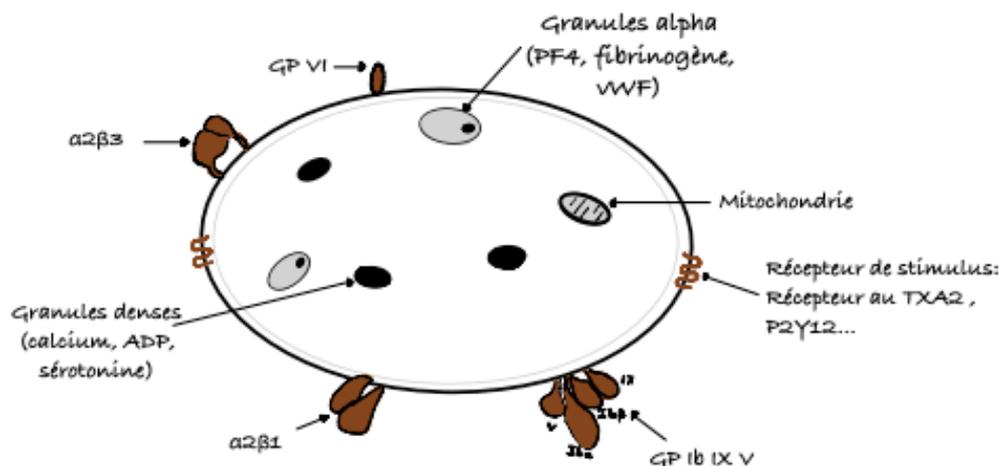


Figure 1: Schéma simplifié d'une plaquette avec molécules d'intérêt en hémostase

- Facteur von Willebrand

Le facteur von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Dans les cellules endothéliales, il est stocké dans les corps de Weibel-Palade en attendant d'être libéré en réponse à divers stimuli. Le vWF circule dans le plasma sous forme de multimères de taille variable, les formes de haut poids moléculaire étant les plus actives fonctionnellement.

Dans l'hémostase primaire, le vWF joue un rôle comme médiateur d'adhésion. Lors d'une lésion vasculaire, il se lie au collagène du sous-endothélium exposé et subit un changement conformationnel qui révèle ses sites de liaison pour le récepteur plaquettaire GPIb-IX-V. Cette interaction permet l'adhésion initiale des plaquettes à la paroi vasculaire lésée.

En plus de son rôle dans l'hémostase primaire, le vWF participe à la coagulation plasmatique en servant de protéine chaperonne pour le facteur VIII de la coagulation. Il s'associe au FVIII, afin de le protéger de la protéolyse et prolonge ainsi considérablement sa demi-vie en circulation.(4)

- Fibrinogène

Le fibrinogène (facteur I) est une glycoprotéine plasmatique soluble principalement synthétisée par le foie intervenant dans la thrombogénèse et l'athérogénèse. Dans l'hémostase primaire, il joue un rôle essentiel comme cofacteur de l'agrégation plaquettaire en se liant à l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ activée à la surface des plaquettes. Dans la coagulation, sous l'action de la thrombine, le fibrinogène sera converti en fibrine, constituant principal du caillot définitif.(5)

1.1.1.2. Mécanisme de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire débute lors de la mise en contact du sang circulant sous-endothélium à la suite d'une lésion vasculaire. Elle se déroule en deux temps ; le temps vasculaire et le temps plaquettaire.

Le temps vasculaire correspond à la vasoconstriction réflexe du vaisseau qui permet d'assurer un ralentissement du débit sanguin et de favoriser la formation du caillot de fibrine. (Figure 2)

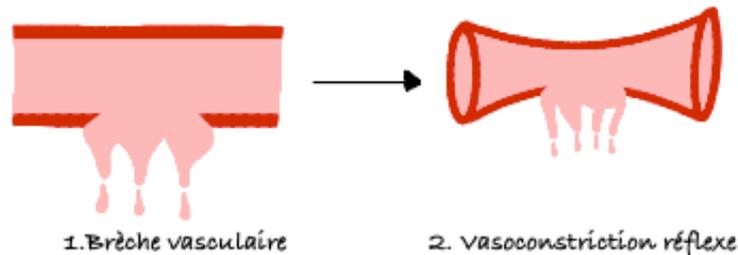


Figure 2: Temps vasculaire

Le temps plaquettaire est la deuxième étape de l'hémostase primaire. (Figure 3)

Les plaquettes vont se fixer au collagène sous-endothélial par trois mécanismes distincts. Le premier est un mécanisme indirect, prédominant dans les zones de haut flux vasculaire : la plaquette, via son récepteur GPIb-IX-V va se lier au vWF lui-même préalablement fixé au collagène sous-endothélial. Cette interaction initiale ralentit la plaquette, lui permettant ainsi d'adhérer directement au collagène par l'intermédiaire de deux récepteurs spécifiques, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et la GPVI.

L'adhésion via GPVI va déclencher une cascade de signalisation intracellulaire permettant l'activation plaquettaire caractérisée par un changement morphologique et un réarrangement intracellulaire. Cette activation permet la sécrétion du contenu des granules alpha (fibrinogène, vWF) et des granules denses (ADP, sérotonine, calcium) ainsi que l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$.

Dans un même temps, un « flip flop » lipidique se produit. La phosphatidylsérine, habituellement présente au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique de la plaquette va être transloquée à sa surface créant ainsi une surface procoagulante électro négative. Cela permettra, lors de l'hémostase secondaire, la fixation des facteurs de la coagulation vitamine-K dépendants à la surface plaquettaire activée, grâce à leurs résidus Gla qui interagissent avec les ions calcium (Ca^{2+}), formant des ponts électrostatiques avec la phosphatidylsérine.

L'activation plaquettaire va être amplifiée et maintenue par deux mécanismes principaux. D'une part, l'ADP libérée se lie aux récepteurs P2Y1 et P2Y12 sur les plaquettes voisines déclenchant la mobilisation calcique et l'inactivation de l'adénylate cyclase renforçant l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. Et d'autre part, le thromboxane A2 synthétisé par les plaquettes activées va participer à l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ et à l'activation des plaquettes voisines via sa fixation à leur récepteur du thromboxane.

Enfin, l'agrégation plaquettaire s'effectue alors grâce au fibrinogène formant des ponts entre les intégrines $\alpha 2\beta 3$ activées des plaquettes voisines, aboutissant à la formation du thrombus plaquettaire. (6)

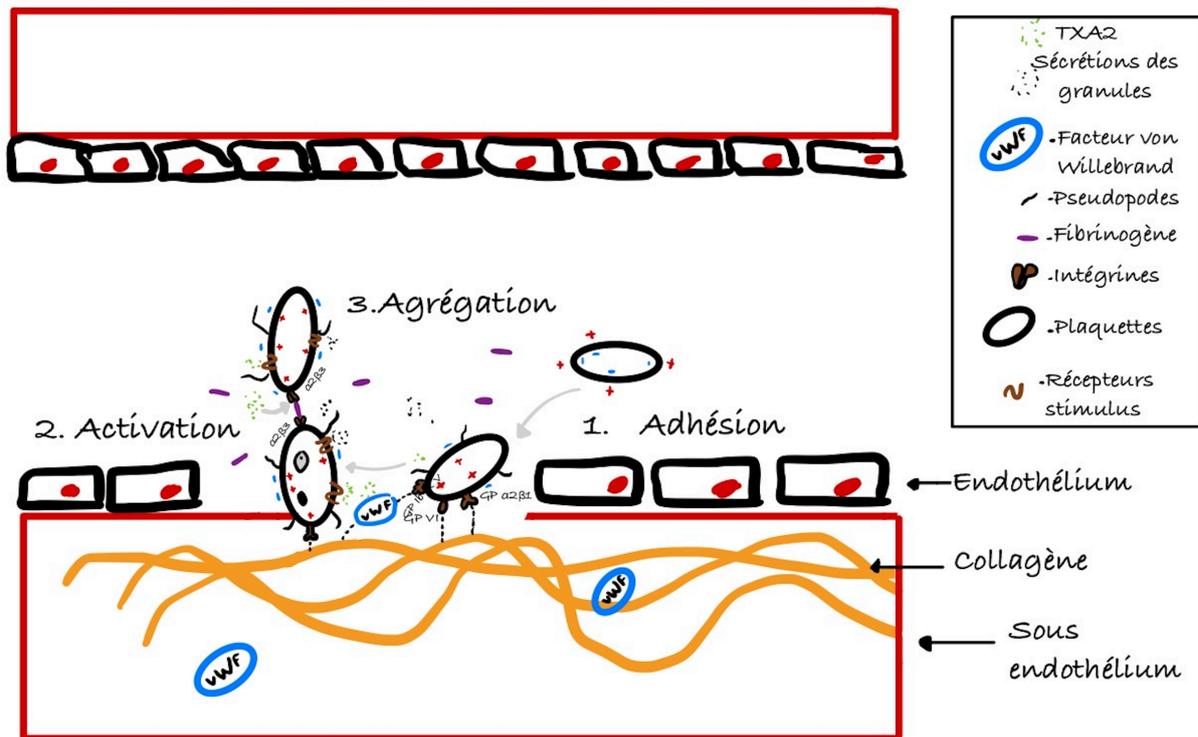


Figure 3: Mécanisme de l'hémostase primaire

I.1.2. Hémostase secondaire

I.1.2.1. Principaux acteurs

L'hémostase secondaire a pour but d'assurer la stabilisation du thrombus plaquettaire en transformant le fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble permettant ainsi l'arrêt prolongé du saignement. Ce mécanisme initié par l'exposition au facteur tissulaire (FT) est basé sur une cascade enzymatique impliquant les différents facteurs de la coagulation. Comme pour l'hémostase primaire, il est important de détailler quelque peu les différents acteurs de la coagulation.

- Facteur tissulaire

Le facteur tissulaire (FT), ou thromboplastine, ou facteur III, est le déclencheur principal de la coagulation. C'est une protéine transmembranaire composée d'un domaine extracellulaire, d'un segment transmembranaire et d'une courte portion cytoplasmique.

Il est exprimé principalement par les cellules sous endothéliales et certaines cellules hématopoïétiques. Il est physiologiquement absent de la circulation sanguine et n'est donc pas en contact direct avec les facteurs de la coagulation. Lors de son exposition dans la circulation générale, il va se lier au facteur VII, l'activer, et créer un complexe précurseur de la coagulation. (7)

- Facteurs de la coagulation

Il existe douze facteurs de la coagulation, principalement synthétisés par les hépatocytes et circulant sous forme active ou inactive. Ils sont écrits en chiffres romains et suivis de la particule « a » pour leur forme activée.

Ces facteurs se répartissent en 3 classes :

- Les zymogènes (facteurs II, VII, IX, X, XI, XII, XIII) : précurseurs inactifs de sérine protéase, (excepté le facteur XIII qui est le précurseur d'une transglutaminase). Ils circulent sous forme inactive dans le sang. Une fois activés, ils entraineront à leur tour l'activation d'autres facteurs de coagulation formant ainsi une cascade enzymatique.
- Les cofacteurs (facteurs V et VIII) : Dépourvus d'activité enzymatique propre, ils accélèrent les interactions entre les enzymes et leurs substrats protéiques. Ces cofacteurs ont besoin d'être activés par la thrombine (facteur IIa).
- Le fibrinogène : Substrat final de la coagulation, il est transformé en fibrine par la thrombine.

- Vitamine K

C'est une protéine liposoluble apportée par l'alimentation (via les légumes verts, abats) et synthétisée par les bactéries saprophytes de l'intestin. Elle possède un rôle essentiel dans la maturation fonctionnelle de quatre facteurs de la coagulation : les facteurs II, VII, IX et X.

La vitamine K, à travers son cycle d'oxydo-réduction, permet la γ -carboxylation de ces facteurs de la coagulation en venant fixer des résidus acide γ -carboxyglutamique (Gla) sur leur partie N-terminale. Ces résidus Gla, chargés électronégativement, se lient aux ions calcium chargés positivement permettant ainsi l'ancrage des facteurs de la coagulation aux surfaces phospholipidiques des plaquettes activées et donc une action locale de la coagulation.

I.1.2.2. Mécanisme de l'hémostase secondaire

Historiquement, la coagulation a été décrite selon deux voies distinctes observées en laboratoire, c'est le modèle *in vitro* (modèle comprenant l'ajout de phospholipides et de calcium) de la coagulation :

-Voie extrinsèque (ou exogène) : Après une lésion vasculaire, le contact du facteur tissulaire avec le facteur VII circulant en présence de phospholipides et de calcium va venir former le complexe FT- FVIIa qui va pouvoir activer directement le facteur X amorçant ainsi la cascade de coagulation. (Figure 4)



Figure 4: Voie extrinsèque, ppl : phospholipides

-Voie intrinsèque (ou endogène) : Déclenchée par l'activation du facteur XII au contact d'une surface chargée négativement et par la présence d'un cofacteur (Kininogène de haut poids

moléculaire (KHPM) ou prékallicréine (PK)) elle entraîne l'activation en cascade du facteur XI puis du facteur IX qui, associé à son cofacteur le facteur VIIIa forme le complexe ténase et active le facteur X. (Figure 5)

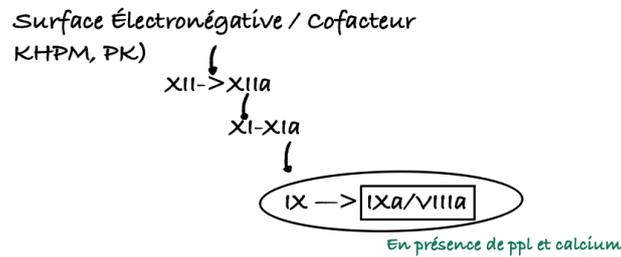


Figure 5: Voie intrinsèque

Les deux voies convergent vers la voie commune qui débute avec l'activation du facteur X. Le facteur Xa se complexe alors au facteur Va, son cofacteur et forme le complexe prothrombinase qui vient convertir la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa).

La thrombine produite va alors jouer un rôle central dans la fibrinoformation en clivant le fibrinogène pour former des monomères de fibrine. Ces monomères vont se polymériser puis s'assembler spontanément pour former un polymère de fibrine instable. Le facteur XIII, lui aussi activé par la thrombine va alors venir catalyser la formation de liaisons covalentes entre ces polymères, aboutissant à la formation du thrombus fibrino-plaquettaire stable et insoluble. (Figure 6)

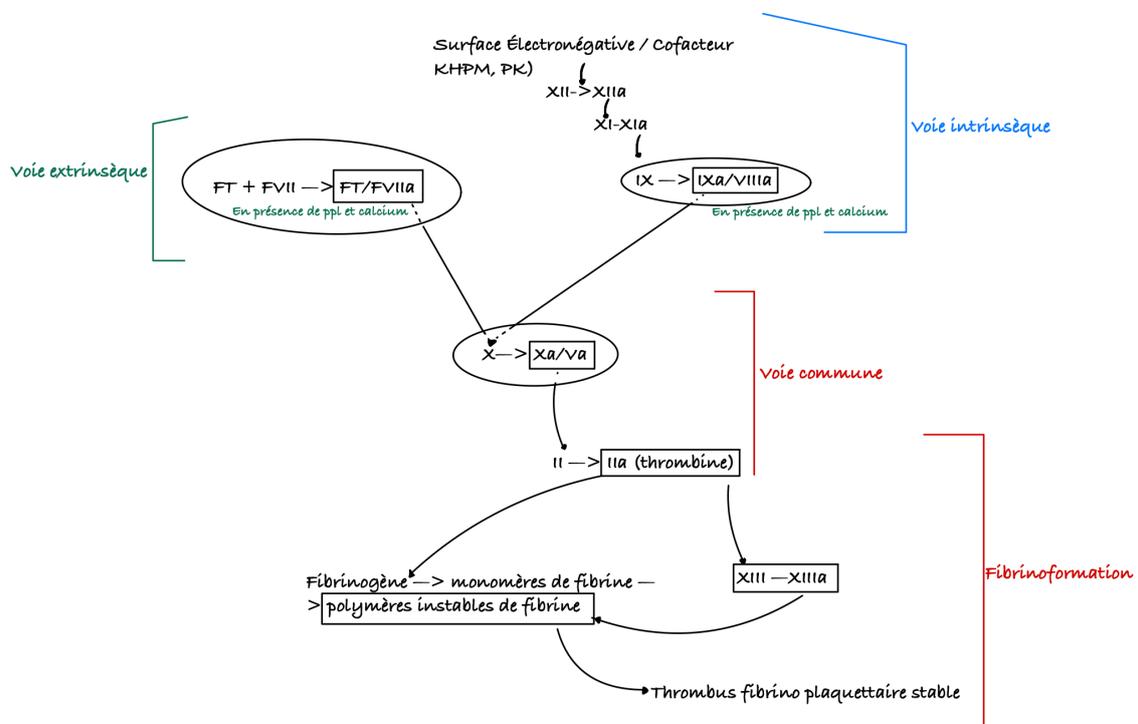


Figure 6: Modèle de la coagulation *in vitro*

Cependant, les avancées en hémostase ont montré que la coagulation physiologique différait du modèle en cascade décrit *in vitro*. Cela a amené à l'élaboration du modèle dit « cellulaire », *in vivo*, de la coagulation. Ce modèle peut être découpé en 3 phases : (8,9) (Figure 7)

La coagulation débute par la phase d'initiation. Cette phase est déclenchée par l'exposition du facteur tissulaire lors d'une lésion vasculaire qui va former un complexe avec le facteur VIIa présent à faible concentration dans le sang. Le complexe FT-FVIIa va alors activer le facteur X en Xa mais aussi le facteur IX en IXa. Cela amène à la génération des premières traces de thrombine qui seront insuffisantes pour former un caillot mais nécessaires pour déclencher la seconde phase, la phase d'amplification.

La phase d'amplification est médiée par les faibles quantités de thrombine précédemment formées. Elles vont participer à la libération du facteur VIII de son transporteur, le facteur von Willebrand, à l'activation des plaquettes et à l'activation des facteurs V et VIII qui deviennent alors des cofacteurs essentiels. La thrombine va de plus activer le facteur XI en XIa créant une voie alternative d'activation du FIX.

La troisième phase est celle de propagation. Les réactions de coagulation se concentrent à la surface des plaquettes activées riches en phosphatidylsérine permettant la fixation des facteurs vitamine-K dépendants. Le facteur IXa (activé soit par FT-FVIIa soit par XIa à la surface des plaquettes) s'associe au facteur VIIIa pour former le complexe ténase. Ce complexe ténase vient activer le facteur X plus efficacement que le complexe FT-FVIIa

Le facteur Xa s'associe alors au facteur Va pour former le complexe prothrombinase permettant une production explosive de thrombine « thrombine burst », stimulant la boucle d'amplification.

Cette production massive de thrombine permet également une génération rapide de fibrine ainsi qu'une activation du FXIII aboutissant, comme vu précédemment, à la formation d'un thrombus fibrino-plaquettaire stable.(10)

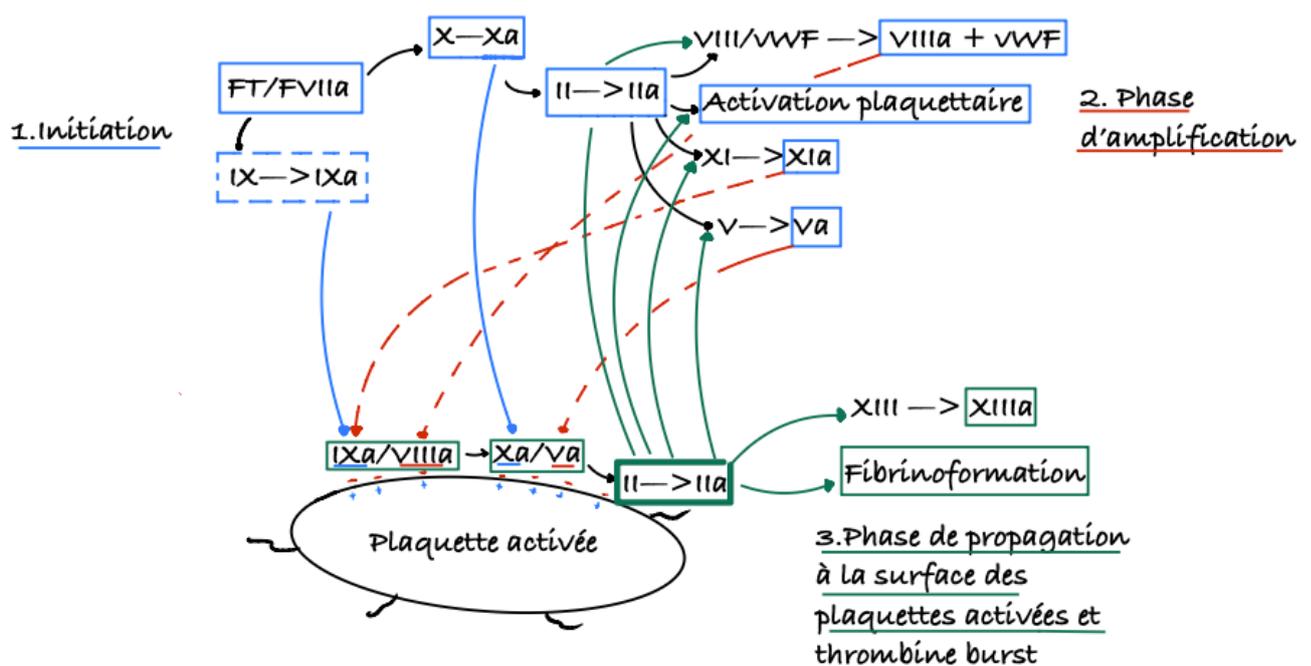


Figure 7: Modèle de la coagulation *in vivo*

I.1.3. Régulation de la coagulation

Comme tout système d'activation, la coagulation est contrebalancée par des systèmes inhibiteurs, nécessaires à l'équilibre hémostatique.

- Le système de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire est synthétisé par les cellules endothéliales. Il a pour rôle d'inhiber la phase d'initiation de la coagulation en formant un complexe avec le facteur Xa. Ce complexe ira alors se fixer sur le complexe FT-FVIIa afin de l'inhiber.

- Le système de l'antithrombine

L'antithrombine est un inhibiteur de sérine protéase synthétisé par le foie. Elle va former des complexes covalents irréversibles avec ses cibles, que sont les facteurs IIa, et Xa principalement ainsi que les facteurs VIIa, IXa, XIa et XIIa dans une moindre mesure. Son action est amplifiée par l'héparine ou les héparanes sulfates endothéliaux.

- Le système Protéine C /Protéine S

Les protéines C et S sont deux facteurs vitamino-K dépendants. La protéine S sous sa forme libre est le cofacteur de la protéine C.

La cellule endothéliale synthétise et exprime la thrombomoduline qui va se lier à la thrombine. Le complexe thrombine-thrombomoduline va entraîner l'activation de la protéine C, qui, assistée de son cofacteur la protéine S, va alors venir inactiver les facteurs Va et VIIIa freinant ainsi l'amplification de la coagulation.

- Le système inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI) / Protéine Z

La protéine Z est un facteur vitamine-K dépendant qui circule dans le plasma. Elle ne possède pas d'activité enzymatique propre mais agit comme cofacteur. Elle va former un complexe avec l'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI) qui va cibler principalement le facteur Xa lié aux phospholipides membranaires afin de l'inactiver. Le ZPI pourra également inhiber les facteurs XIa et IXa sans l'aide de la protéine Z. (11)

Ces systèmes inhibiteurs, lorsqu'ils sont en équilibre avec les mécanismes pro coagulants, assurent la limitation spatiale du thrombus au site de la lésion vasculaire ou encore la prévention d'une thrombose pathologique.

Ainsi, toute perturbation de l'équilibre hémostatique entraînera des répercussions cliniques. Une activité excessive et non régulée de la coagulation entraînera un risque thrombotique tandis qu'à l'inverse, une activation excessive des systèmes inhibiteurs, ou des déficit/ perte d'activité au niveau de l'hémostase primaire ou secondaire entraînera des risques hémorragiques.

I.1.4. La fibrinolyse

La fibrinolyse constitue l'étape finale de l'hémostase et intervient à la fin de la réparation tissulaire. Elle a pour but de dégrader le caillot de fibrine permettant ainsi la restauration de la perméabilité vasculaire.

Le plasminogène est le zymogène principal de ce système. Sa conversion en enzyme active, la plasmine, s'effectue par deux activateurs majeurs, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase (u-PA). (Figure 8)

La plasmine a pour rôle de dégrader la fibrine et va former différents produits issus de la fibrinolyse : les monomères de fibrine (FM), les produits de dégradation de la fibrine (PDF) et les D-Dimères.

Ce système de fibrinolyse sera lui aussi régulé, tout d'abord par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) qui neutralise le t-PA et l'u-PA en formant des complexes stables ou encore par l' α 2-antiplasmine qui inhibera elle la plasmine directement, limitant son action sur le thrombus. (12)

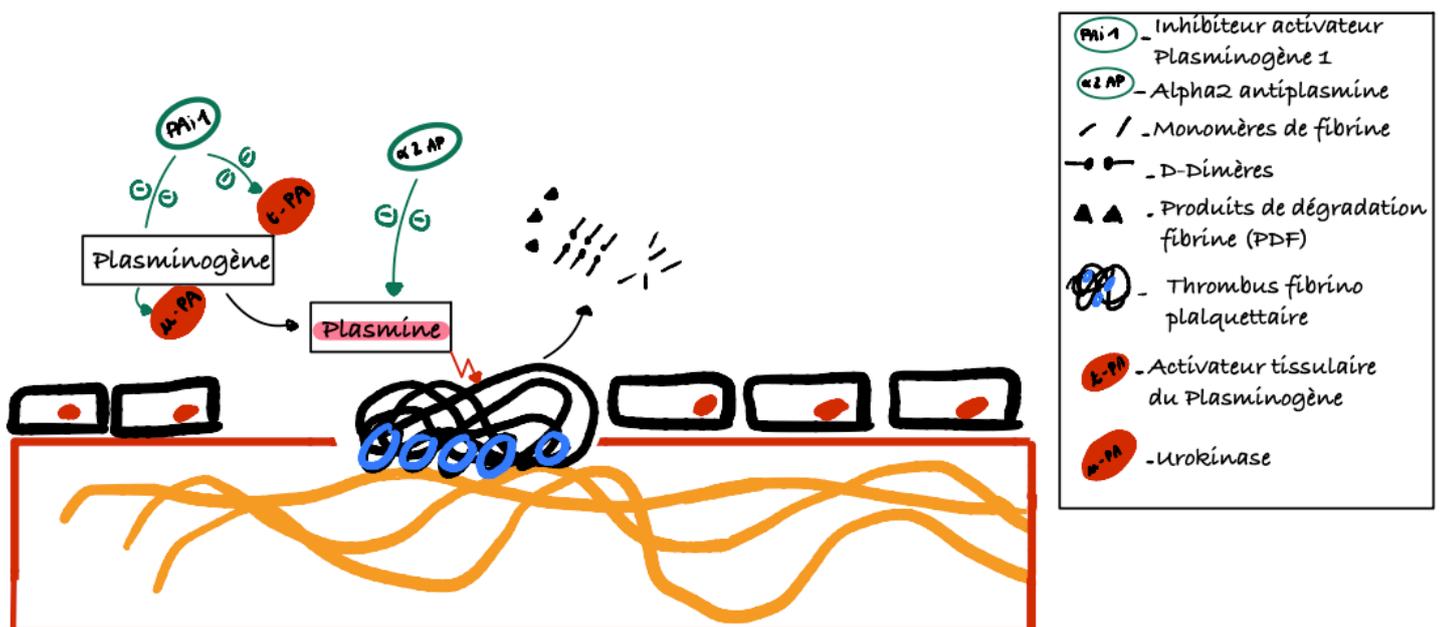


Figure 8: Fibrinolyse, mécanisme et régulation

I.2. Exploration de l'hémostase

I.2.1. Conditions de prélèvement

L'exploration de l'hémostase nécessite le respect d'un certain nombre de conditions pré-analytiques fournies par différentes sociétés savantes comme la SFTH (Société Française de Thrombose et d'Hémostase) ou l'ICSH (the International Council for Standardization of Hematology) visant à garantir la qualité des résultats. (13,14)

- Le prélèvement veineux doit être réalisé dans un tube sous « vide », stérile, citraté (citrate de sodium à 3,2 ou 3,8%) (Figure 9) ou CTAD (Citrates, Théophylline, Adénosine, Dipyridamole).
- Le tube destiné à l'hémostase doit être prélevé en premier avec l'utilisation recommandée d'un tube de purge. Cet ordre de prélèvement est recommandé afin de standardiser le vide pour assurer un remplissage optimal ainsi que d'éliminer les particules pro-coagulantes présentes au début du prélèvement suite à l'effraction cutanée.

- Le tube doit être rempli jusqu'à l'indicateur de remplissage minimum (<80% non acceptable), afin de respecter le rapport anticoagulant/sang (1/9) et d'éviter toute interférence liée à un excès d'anticoagulant qui pourrait interférer avec les résultats.
- Délai d'acheminement au laboratoire du tube le plus rapidement possible avec centrifugation à l'arrivée permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes (ppp).
- Le délai de réalisation de l'analyse dépend du paramètre étudié. Si besoin, une conservation du plasma peut être réalisée par congélation à -20°C ou -80°C.

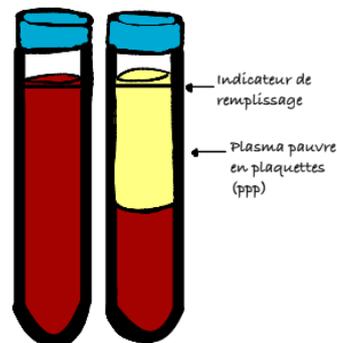


Figure 9: Tube citraté, avant et après centrifugation

I.2.2. Techniques de dosage

Afin de déterminer les différents paramètres d'intérêt en hémostase, il existe plusieurs méthodes de dosages. Les trois techniques automatisées les plus couramment utilisées sont les techniques chronométrique, chromogénique et immunologique. Il faut noter que les méthodes sont propres à chaque automate et fournisseur. Je détaillerai dans cette thèse les méthodes de dosages et les tests réalisés par les automates utilisés durant l'étude et employés au laboratoire d'hémostase du CHU de Limoges. (Tableau 3)

- Méthode Chronométrique

Cette méthode repose sur la détection du temps nécessaire à la formation in vitro d'un caillot de fibrine, après activation de la coagulation par des réactifs spécifiques du paramètre étudié.

Dans une cuvette de mesure, on va mettre une bille métallique, sensible à un champ électromagnétique. Après ajout du plasma du patient et des réactifs spécifiques du paramètre analysé la coagulation in vitro va se déclencher signant ainsi le déclenchement du temps de mesure. (Figure 10)

La bille va osciller sous l'effet d'un champ électromagnétique jusqu'à ce que la viscosité du plasma augmente en raison de la formation du caillot. Le temps mesuré en secondes peut ensuite être converti selon le paramètre étudié, en concentration (UI/mL) ou activité (en %) à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie avec des plasmas de référence. Plus le temps de formation du caillot est long, plus l'activité du paramètre étudié est faible.

La méthode chronométrique est automatisée, relativement peu coûteuse et permet une exploration fonctionnelle de la coagulation. Néanmoins, elle peut manquer de spécificité et de sensibilité, notamment pour détecter de faibles variations d'activité et est sujette à de nombreuses interférences comme la présence de traitements anticoagulants.

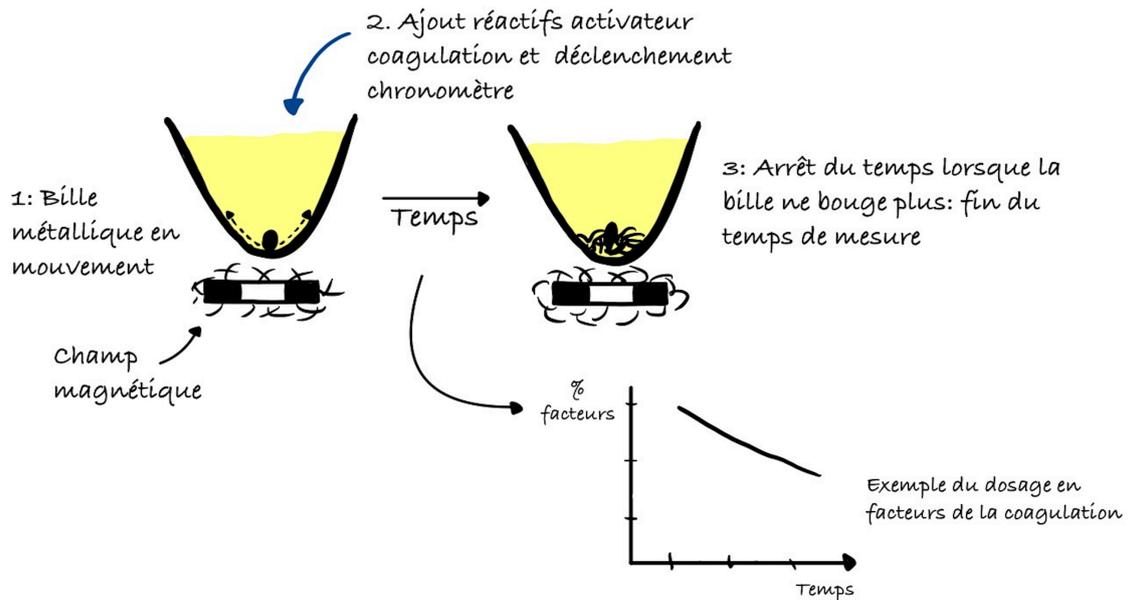


Figure 10: Principe de la méthode de dosage chronométrique

- Méthode chromogénique

Cette méthode repose sur l'utilisation d'un substrat chromogénique (substrat + chromophore) spécifique de l'enzyme ou du facteur à doser. (15)

Un substrat conjugué à un chromophore (généralement la p-nitroaniline, pNA) est ajouté au plasma du patient. Si l'enzyme ou le facteur étudié est présent dans le plasma du patient, il vient alors cliver le substrat libérant ainsi le chromophore. Cette libération entraîne un changement de coloration dans le mélange qui va être mesuré par spectrophotométrie à 405nm. La nouvelle absorbance du mélange sera alors proportionnelle à l'activité enzymatique de l'enzyme ou du facteur d'intérêt et sera convertie en activité enzymatique (%) ou concentration (UI/mL) à l'aide d'une courbe d'étalonnage. (Figure 11)

La méthode chromogénique possède une forte spécificité enzymatique et une bonne sensibilité mais reste plus coûteuse que la méthode chronométrique et est sensible aux interférences engendrées par des indices d'hémolyse, d'ictère ou de lipémie.

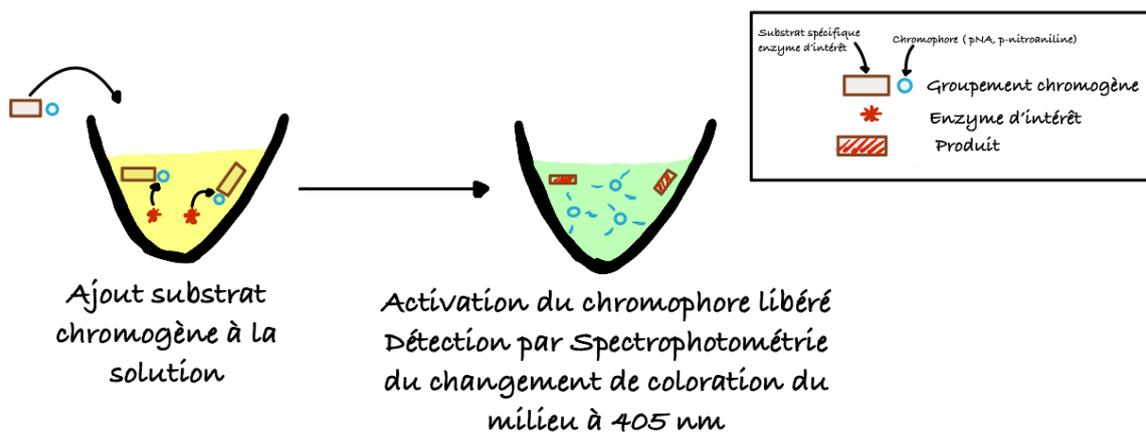


Figure 11: Principe de la méthode de dosage chromogénique

- Méthode immunologique

Cette méthode immunologique repose sur une réaction antigène-anticorps détectée par immunoturbidimétrie. Le réactif comporte des microparticules de latex recouvertes de l'anticorps spécifique de l'antigène à analyser.

La mise en contact du réactif avec le plasma du patient entraîne la formation de complexes immuns (microparticules de latex + anticorps + antigène) venant modifier les propriétés optiques de la solution. Le changement de turbidité du milieu sera alors détecté par méthode photométrique et sera proportionnel à la quantité d'antigène présente. (Figure 12)

La méthode immunologique possède une haute spécificité et sensibilité ainsi qu'une indépendance vis-à-vis de l'activité fonctionnelle. On se concentre ici sur la concentration antigénique indépendamment de l'activité fonctionnelle. Cependant, c'est une méthode coûteuse, sujette aux interférences (anticorps hétérophiles, facteur rhumatoïde, effet crochet) et qui peut être discordante avec l'activité biologique réelle de l'antigène dosé.

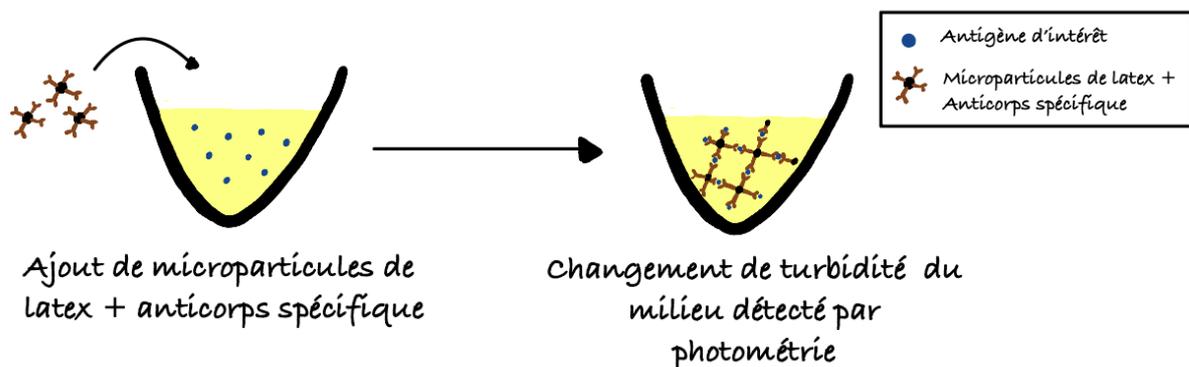


Figure 12: Principe de la méthode de dosage immunologique

Le choix de la méthode de dosage idéale en fonction du paramètre repose donc sur un ensemble de caractéristiques analytiques, pratiques et économiques. La sensibilité, la spécificité, la susceptibilité aux interférences ou encore la standardisation internationale des méthodes sont des critères que le biologiste évalue afin de choisir la méthode de dosage optimale. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients qui doivent être compris et réfléchis, comparés aux recommandations nationales et internationales afin d'obtenir le schéma idéal de diagnostic.

1.2.3. Paramètres analysés

L'exploration de l'hémostase repose sur un ensemble de tests globaux ou ciblés permettant d'évaluer les différentes étapes de la coagulation et d'identifier d'éventuelles anomalies responsables de pathologies hémorragiques ou thromboemboliques. Au laboratoire, il y a une distinction entre les tests dits « de routine » qui peuvent être réalisés en continu, et qui permettent de définir le profil hémostatique de la plupart des patients et les tests dits « spécialisés » qui sont là pour affiner un diagnostic, explorer des pathologies, principalement

réalisés en série, mais pouvant aussi être faits en urgence. Dans cette partie nous allons détailler les différents tests utilisés durant ce travail, leurs répercussions sur le diagnostic, leur méthode de dosage et les principaux réactifs associés à ces tests. Il faut noter que tous ces tests sont réalisés *in vitro* et nécessitent une température de 37°C, mimant les conditions physiologiques. (Figure 16)

I.2.3.1. Hémostase de routine

- Taux de prothrombine (TP)

Le TP est déterminé grâce au temps de Quick (TQ). Le TQ correspond au temps de coagulation d'un plasma citraté recalcifié en présence d'un excès de facteur tissulaire et de phospholipides pro coagulants. A Limoges, le dosage du TQ se fait par méthode chronométrique sur le STAR MAX 2 et la réaction est déclenchée par l'ajout de STA-Neoptimal® qui contient du facteur tissulaire, des phospholipides et du CaCl₂.

Le TQ explore la voie extrinsèque de la coagulation, à savoir les facteurs II, V, VII, X et le fibrinogène. Il sera ensuite converti en taux de prothrombine (TP) grâce à la droite de Thivolle, permettant une expression en pourcentage de ce paramètre.

Le TQ peut aussi être exprimé par l'INR (International Normalized Ratio) qui est un mode d'expression standardisé développé spécifiquement pour harmoniser le suivi des traitements par AVK.

Un TP diminué, inférieur à 70%, (et donc TQ allongé) déclenche la réalisation de tests complémentaires comme le dosage de certains facteurs de la coagulation, l'exploration du fibrinogène, afin d'évaluer une potentielle pathologie sous-jacente. (16)

Le TP peut être diminué en cas d'insuffisance hépatique, de coagulation intravasculaire disséminée, de carence en vitamine K, de déficit en facteur du complexe prothrombinique, de prise de traitement anticoagulant interférant avec la mesure de ce paramètre (comme les AVK, les AOD...)

- Temps de Céphaline Activé (TCA)

Le temps de céphaline activé, ou TCA, est le temps de coagulation d'un plasma, recalcifié en présence de céphaline après activation de la phase contact par un activateur particulaire. Le TCA est mesuré par méthode chronométrique et c'est l'ajout de calcium qui déclenchera la réaction. Le réactif est le STA-PTT A ® qui comporte la céphaline, un activateur particulaire, et le calcium ionisé.

Le résultat de TCA est exprimé en secondes et est rendu sous la forme d'un ratio : le ratio du TCA du patient, M par rapport au TCA d'un témoin, T.

Le TCA explore la voie intrinsèque ou endogène de la coagulation. Il explore donc les facteurs II, V, VIII, IX, X, XI, XII et le fibrinogène.

Le TCA est prescrit dans 3 types de contextes cliniques à savoir la surveillance d'un traitement héparinique, un bilan pré opératoire ou alors la recherche d'un syndrome hémorragique, un bilan de thrombose, de maladies auto-immunes ou d'avortements spontanés. Le TCA est

considéré comme pathologique et nécessite une exploration en fonction du contexte lorsque le rapport TCA M/T est supérieur à 1,2.

- Facteurs de la coagulation :

Les facteurs de la coagulation sont, pour ceux étudiés dans notre thèse, le II, le X et le V, dosés par méthode chromométrique.

On utilise un plasma déficient en facteur à contrôler auquel l'on va ajouter de la thromboplastine (facteur tissulaire + phospholipides) du CaCl₂ et le plasma de notre patient. Ainsi, le plasma du patient va apporter le facteur potentiellement déficient qui devient alors le composé limitant du test. Plus le taux de ce facteur est abaissé, plus le TP sera diminué. La valeur normale de ces facteurs de la coagulation est comprise entre 70 et 120%.

Les facteurs II et VII sont des facteurs vitamine K dépendants, à la différence du facteur V. L'interprétation des facteurs se fait en regard de la valeur des autres facteurs. On pourra retrouver un déficit isolé en facteur, dû à un déficit constitutionnel ou acquis, à la présence d'inhibiteurs spécifiques, ou de certaines pathologies comme l'amylose (17). On pourra retrouver une diminution des facteurs vitamine-K dépendants dans le cas d'un traitement par AVK ou d'une carence en vitamine K. Enfin, la diminution commune de ces facteurs, peut être retrouvée en cas d'insuffisance hépatique ou de CIVD.

- Temps de Thrombine (TT)

Le temps de thrombine (TT) est un test évaluant la transformation du fibrinogène en fibrine sous l'action de la thrombine. Il repose sur la mesure du temps de coagulation d'un plasma en présence d'une solution de thrombine titrée de telle sorte que le temps de coagulation d'un plasma soit de 16 secondes. Il est mesuré par méthode chromométrique et nécessite le STA-Thrombin 10®, le réactif qui va apporter la thrombine titrée.

Un temps de thrombine anormal est supérieur à 21 secondes.

Le temps de thrombine permet, en cas d'allongement du TCA et du TQ, de vérifier l'absence d'anomalie de la fibrinoformation et de dépister la présence d'héparine ou de dabigatran dans le prélèvement. Le dabigatran et l'héparine vont agir de différentes manières. Le dabigatran va venir inhiber directement la thrombine, empêchant son action sur le fibrinogène et augmentant ainsi le temps de formation du caillot et donc le temps de thrombine. L'héparine va quant à elle inhiber indirectement la thrombine en formant une liaison avec l'antithrombine et potentialisant son action sur la thrombine. Cela aura aussi pour conséquence d'augmenter le temps de formation du caillot et donc le temps de thrombine.

- Fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine de haut poids moléculaire synthétisée par le foie et jouant un rôle dans l'hémostase primaire, l'agrégation plaquettaire ou encore l'inflammation.

Il est mesuré au laboratoire par la méthode fonctionnelle de Von Clauss qui est une variante de la mesure du temps de thrombine. Cette méthode repose sur l'ajout de thrombine calcique titrée, STA-Liquid Fib®, qui permet d'avoir un temps de coagulation qui sera fonction du taux de fibrinogène plasmatique dans le cas où le plasma du patient est dilué de façon adéquate.

L'interprétation du taux de fibrinogène se fait en fonction du contexte clinico-biologique. En effet, le taux de fibrinogène augmente en cas de syndrome inflammatoire, de diabète, d'obésité et au cours de la grossesse. Son taux va diminuer en cas d'une consommation excessive de fibrinogène, dans la fibrinolyse, la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou les traitements par L-Asparaginase. Chez un adulte normal, sans pathologies associées, le taux normal de fibrinogène est compris entre 2 et 4 g/L.

- Activité anti-Xa des AOD :

Le dosage de l'activité anti-Xa constitue la méthode de référence pour l'évaluation de l'effet des inhibiteurs directs du facteur Xa (18,19). La mesure de cette activité enzymatique repose sur la méthode chromogénique. (Figure 13)

Une quantité connue et en excès de facteur Xa exogène est ajoutée au plasma du patient. L'AOD présent dans le plasma vient inhiber une partie du facteur Xa laissant une fraction résiduelle active de facteur Xa. L'ajout d'un substrat chromogénique spécifique du facteur Xa va permettre de mesurer cette l'activité. Le facteur Xa non inhibé clive le substrat de son chromophore dont l'intensité sera mesurée par spectrophotométrie. Le signal détecté aura donc une relation inverse avec l'activité anti-Xa de l'AOD encore présent dans l'échantillon.

La quantification précise s'effectue alors par comparaison à une gamme d'étalonnage spécifique à chaque molécule, permettant de convertir l'activité mesurée en concentration plasmatique, exprimée en ng/mL pour les AOD.

Le dosage de l'activité anti-Xa permet de mesurer l'activité inhibitrice réelle de l'AOD et peut être indiquée en cas de situations hémorragiques graves, d'évaluation pré opératoire du risque hémorragique ou de suspicion de surdosage chez les patients à risque. Son interprétation nécessite de prendre en compte le délai entre la dernière prise du médicament et le prélèvement, la posologie, le rythme d'administration et l'indication thérapeutique. Cette activité anti-Xa permet aussi le suivi d'autres traitements, comme l'héparine fractionnée, les héparines de bas poids moléculaires ou encore l'organan, le résultat sera alors rendu en UI/mL. (20,21)

Il s'agit donc du test le plus sensible aux AOD anti-Xa ; il sera utilisé dans notre travail comme outil de de contrôle de l'efficacité de la neutralisation des AOD par le DOAC-Stop™.

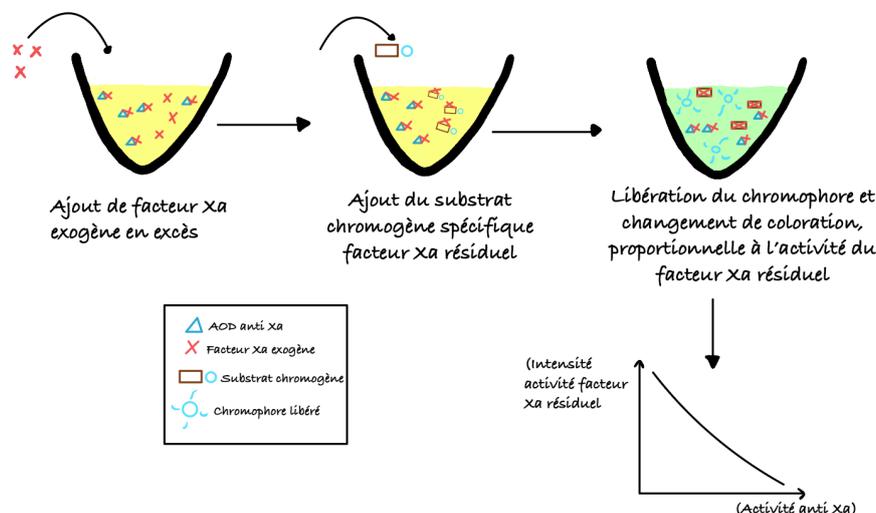


Figure 13: Dosage de l'activité anti-Xa d'un AOD

- Activité anti IIa :

Le dosage de l'activité anti-IIa repose sur la technique ECA-II (Ecarin Chromogenic Assay). L'écarine, ECA II Ecarin®, une métalloprotéase dérivée du venin de serpent *Echis carinatus*, est ajoutée au plasma du patient en même temps que de la prothrombine ECA II Prothrombin® et qu'un substrat chromogène ECA II Substrate®. L'écarine convertit la prothrombine ajoutée en méizothrombine, une forme intermédiaire active capable de libérer le chromophore de son substrat.

En présence de dabigatran l'activité de la méizothrombine est inhibée, ce qui réduit la libération du chromophore. L'intensité du signal mesuré par spectrophotométrie est donc inversement proportionnelle à la concentration de dabigatran.

Comme pour l'activité anti-Xa, l'interprétation du dosage de l'activité anti-IIa nécessite de prendre en compte le délai entre la dernière prise de médicament et le prélèvement, la posologie, le rythme d'administration et l'indication thérapeutique.

En raison de sa grande sensibilité au dabigatran, ce test sera utilisé dans notre protocole afin de confirmer l'élimination complète du médicament après traitement par DOAC-Stop™.

Tableau 3: Méthodes de dosage et valeurs normales des tests d'hémostase de routine

	Méthode de dosage Star MAX2	Valeurs normales chez l'adulte
TP	Chronométrique	<u>>70%</u>
TCA	Chronométrique	Ratio Temps malade/Temps Témoin : <u>0,8-1,2</u>
Facteurs de la coagulation	Chronométrique	<u>70-120%</u>
TT	Chronométrique	<u>< 21 secondes</u> (absence d'inhibiteurs de thrombine)
Fibrinogène	Chronométrique, Méthode de Von Clauss	<u>2-4 g/L</u>
Activité anti-Xa (Apixaban/ Rivaroxaban)	Méthode chromogénique	Fonction du traitement
Activité anti-IIa (Dabigatran)	Méthode ECA, chromogénique	Fonction du traitement

I.2.4. Hémostase spécialisée

I.2.4.1. Recherche d'anticorps anti-phospholipides

Les anticorps anti-phospholipides (aPL) représentent une famille d'autoanticorps hétérogènes dirigés directement (anti-cardiolipine (aCL)) ou indirectement (anti bêta-2-glycoprotéine I (β 2GPI)) contre les anti-phospholipides anioniques. Leur prévalence est estimée entre 1 et 5% dans la population générale et on retrouve un anticoagulant lupique chez 15 à 30% des patients atteints de lupus érythémateux systémique et des anti-cardiolipines chez 17 à 39% d'entre eux.(22)

Sur le plan physiopathologique, les aPL exercent une action prothrombotique complexe. Ils interfèrent avec les mécanismes de la coagulation en perturbant l'assemblage des complexes procoagulants sur les surfaces phospholipidiques par une action sur les protéines se liant aux phospholipides (comme la bêta-2-glycoprotéine I), en activant les cellules endothéliales, les plaquettes et les monocytes augmentant l'expression du facteur tissulaire, et en inhibant les voies anticoagulantes naturelles comme le système protéine C/protéine S. De plus, ils peuvent altérer la fibrinolyse en réduisant l'activité du t-PA. Ils perturbent également la fonction du complément, contribuant aux complications obstétricales. (23,24)

Cela crée un déséquilibre favorisant un état d'hypercoagulabilité qui se traduit par une augmentation du risque d'événements thrombotiques veineux ou artériels. Les anticorps anti-phospholipides peuvent notamment être retrouvés dans le cadre du syndrome des anticorps anti-phospholipides (SAPL), défini par l'association de manifestations thrombotiques et/ou obstétricales à la présence persistante d'anticorps anti-phospholipides hétérogènes.

Au laboratoire d'hémostase, nous allons rechercher l'effet anticoagulant in vitro signant la présence d'anticorps anti-phospholipides, exprimée par le terme de lupus anticoagulant (LA) ou anticoagulant lupique.

C'est au laboratoire d'immunologie que sera réalisée par méthode ELISA la détection des anticorps anti-phospholipides spécifiques (anticorps aCL, anticorps anti β 2GPI) ainsi que la caractérisation des isotypes d'immunoglobulines impliqués.

En hémostase, d'après les recommandations de l'ISTH (25,26), la détection de lupus anticoagulant (LA) , repose sur l'association de différents tests respectant un schéma en 3 temps : détection-mélange-confirmation.

Les tests de dépistage utilisés doivent être basés sur des principes de détections différents, le temps de venin de vipère de Russell dilué doit être le premier test considéré et doit être associé à un test de TCA sensibilisé comme avec le PTT-LA. Cette phase de dépistage permet de détecter un allongement d'un test de coagulation dépendant des phospholipides car elle se réalise en présence de réactifs appauvris en phospholipides.

Le test du mélange permet de différencier un déficit en facteur d'un inhibiteur (comme le LA) et consiste à mélanger le plasma du patient avec un plasma normal et de réaliser les précédents tests. Cela permet de différencier l'allongement du TCA causé par un déficit en facteur ou par un inhibiteur, comme le lupus anticoagulant ou un anti-facteur. Dans le cas de la présence d'un inhibiteur, le test du mélange ne sera pas corrigé par l'ajout de plasma normal.

Enfin les tests de confirmation permettent de prouver que l'inhibition est phospholipides-dépendante et consiste à refaire les tests avec cette fois-ci des réactifs enrichis en

phospholipides. L'ajout de phospholipides en excès permettra in fine de « lever » l'inhibition par les anticorps anti-phospholipides. (Figure 15)

- Test dRVVT

Le temps de venin de vipère Russell dilué est un test spécifique pour la détection de lupus anticoagulant. Le venin de vipère Russell est un activateur du facteur X qui, en présence de calcium, déclenche la coagulation à ce niveau et élimine l'impact des facteurs situés en amont.

Sur l'automate STAR MAX 2 utilisé au CHU de Limoges, le dRVVT est mesuré par méthode chronométrique et utilise deux réactifs : le STA-Staclot DRVV Screen® qui comprend du venin de Vipère Russell dilué, des phospholipides en faible concentration, du calcium et un inhibiteur d'héparine pour le test de dépistage et le Staclot DRVV Confirm® qui contient les mêmes réactifs à la différence que lui contient des phospholipides à forte concentration pour le test de confirmation.

Pour le dRVVT Screen, le résultat du test est exprimé en ratio qui correspond au temps de coagulation « screen » en seconde du plasma du patient divisé par le temps de coagulation « screen » d'un mélange de plasmas normaux.

Un ratio normal est <1,20. Il existe une zone douteuse entre 1,18 et 1,20 et le test est positif si le ratio est $\geq 1,20$.

Un test de dépistage positif ou douteux déclenche le lancement du test de confirmation. Il faut alors réaliser le test du dRVVT « confirm ». Ce test permet l'obtention d'un ratio correspondant au temps de coagulation « confirm » du patient divisé par le temps de coagulation « screen » d'un mélange de plasma normaux. In fine, cela permet l'obtention d'un ratio normalisé : ratio Screen / ratio Confirm. Lorsque ce ratio normalisé est $\geq 1,20$ cela signe la présence d'un lupus anticoagulant. (Figure 14)

Dans le cas d'un lupus anticoagulant, on s'attendra à une correction du ratio confirm, dû à la présence de phospholipides en excès. Il faudra alors confirmer le caractère persistant de ce résultat sur un prélèvement ultérieur d'a minima 12 semaines.

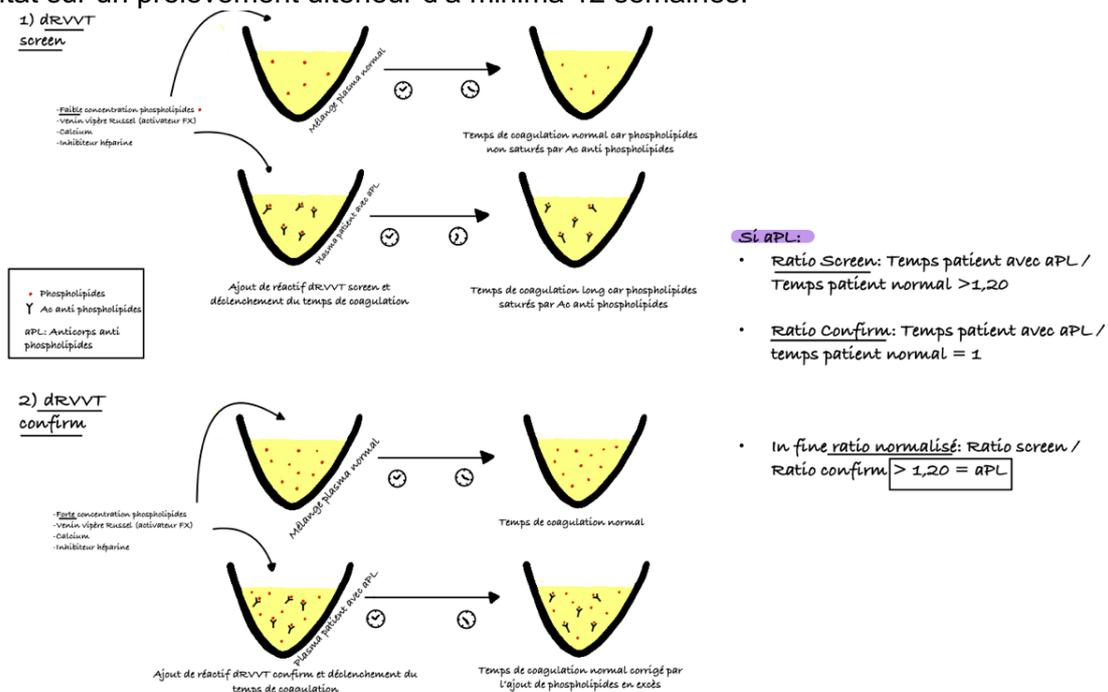


Figure 14: Tests du dRVVT Screen et Confirm

- TCA sensibilisé, réactif PTT-LA

Le temps de céphaline activateur sensibilisé pour la recherche de lupus anticoagulant (PTT-LA) repose sur le principe du temps de céphaline activée. La différence entre les deux tests repose sur le fait que pour le TCA sensibilisé, le réactif utilisé est appauvri en phospholipides, ce qui augmente la sensibilité du test envers les effets inhibiteurs des anticorps anti-phospholipides. De plus, l'utilisation d'une céphaline sensibilisée aux anticorps anti-phospholipides permet aussi d'augmenter la spécificité du test.

Les tests de dépistage et de mélange sont faits simultanément.

Le résultat du test de dépistage correspond au TCA PTT-LA divisé par le TCA PTT-LA obtenu par un mélange de plasma de patients normaux. Un résultat $\geq 1,2$ est considéré comme allongé.

Le test du mélange permet le calcul de l'indice de Rosner :

$$\frac{TCA\ PPTLA\ mélange - TCA\ PPTLA\ pool}{TCA\ PTT\ LA\ malade} \times 100.$$

Un résultat <12 est négatif, entre 12 et 15, douteux et >15 positif.

Un résultat positif signe la présence d'un inhibiteur. Il pourra alors s'agir soit d'un anticoagulant circulant de type antiphospholipides, soit d'un anti-facteur de la coagulation.

Dans le cas d'un résultat positif ou douteux, il faut alors réaliser le test de confirmation : STACLOT LA.

Le STACLOT LA est un test reposant sur l'ajout de molécules de phosphatidyléthanolamine qui vont, à 37°C, présenter des structures moléculaires hexagonales de phase HII reconnues par les anticorps anti-phospholipides de type lupique ce qui permet, dans le cas d'un lupus anticoagulant, la correction de l'allongement du TCA sensibilisé. Ce test repose sur la comparaison de deux temps de coagulation réalisés en parallèle sur le plasma du patient. Le premier temps est réalisé avec un réactif pauvre en phospholipides sensibilisés (LA1) et le deuxième temps est réalisé avec un réactif enrichi en molécules de phosphatidyléthanolamine (LA2). Le résultat est exprimé par la différence entre ces deux temps (LA1-LA2). Une différence >8 secondes est considérée comme significative et témoigne de la présence d'un lupus anticoagulant.

Le STACLOT LA est une technique semi-manuelle et est donc utilisé en dernier recours. En effet, l'interprétation de la recherche de lupus anticoagulant repose sur l'analyse des deux tests réalisés conjointement à savoir le PTT-LA et le dRVVT.

Si ces 2 tests sont négatifs, alors il y a une absence d'APL. Si ces deux tests sont positifs, on réalisera une seule confirmation, la plus pratique à mettre en place, le dRVVT confirm. Si cette confirmation s'avère négative, il faudra cependant réaliser le STACLOT LA. Si l'on a la positivité d'un seul test, il faudra réaliser la confirmation du dit test.

En effet, la différence de composition des réactifs des tests permet d'expliquer les différents cas de figure. Le dRVVT est sensible à la présence d'anticorps anti-phospholipides interférant avec le complexe prothrombinase alors que le PTT-LA, qui active la coagulation par la voie intrinsèque sera sensible à d'autres complexes.

De plus, les deux tests diffèrent par leur sensibilité aux interférences. Le PTT-LA peut se retrouver allongé dans plusieurs situations : affections hépatiques, présence d'anticoagulants circulants, un traitement par AVK, héparine ou inhibiteurs de la thrombine ce qui rend son interprétation délicate. De son côté, le DRVVT est moins sensible à la présence d'héparine car il est réalisé en présence de polybrène neutralisant l'héparine jusqu'à 0,8 UI/mL. Pour un patient sous AVK le test peut être réalisé directement si l'INR est <1,5 et en mélange si l'INR est compris entre 1,5 et 3. Sous HBPM et apixaban le résultat peut être rendu s'il est négatif mais un test positif sous ces médicaments peut résulter d'une interférence.

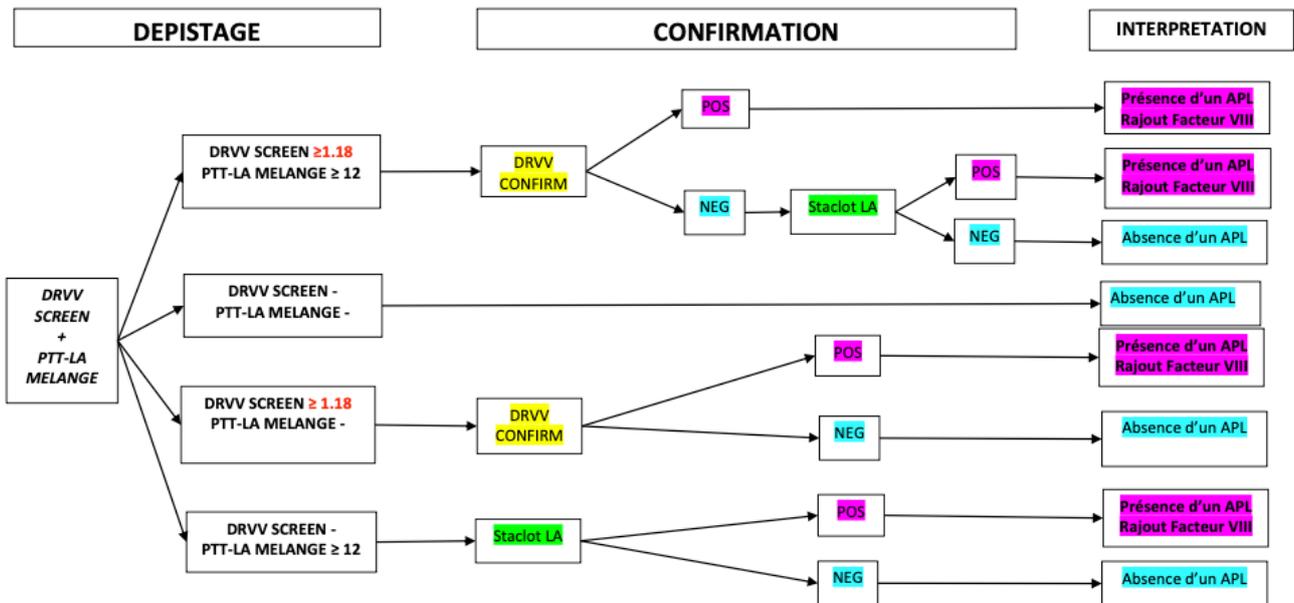


Figure 15: Algorithme utilisé au CHU de Limoges pour la recherche de lupus anticoagulant (LHEM AHEMO 0048D)

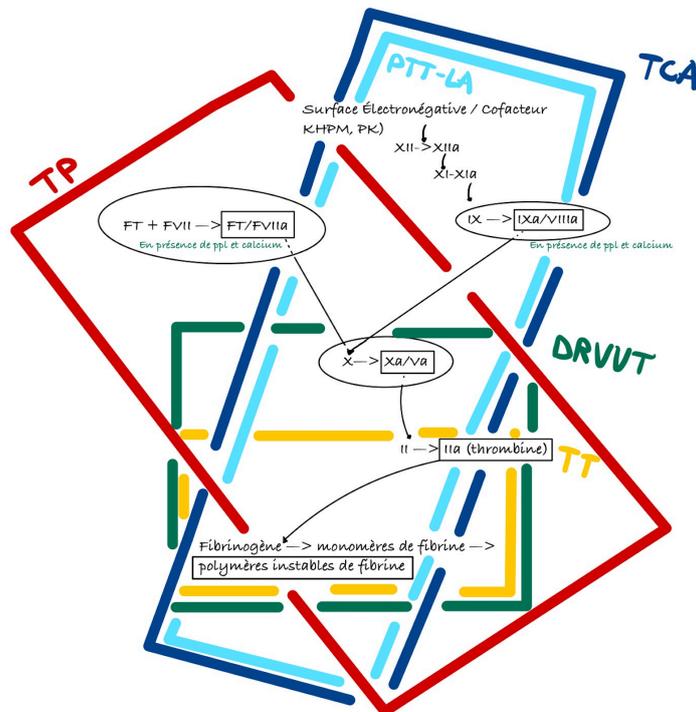


Figure 16: Tests d'explorations globaux de la coagulation et les éléments concernés

I.2.4.2. Bilan de thrombophilie

La thrombophilie désigne une ou plusieurs anomalies acquises ou héréditaires de l'hémostase qui prédisposent à une maladie thromboembolique artérielle ou veineuse.

Les thrombophilies constitutionnelles résultent soit d'un déficit en inhibiteurs de la coagulation (antithrombine, protéine C, protéine S), entraînant une régulation insuffisante de la cascade de coagulation, soit de mutations par gain de fonction comme le facteur V Leiden, résistant à l'inactivation par la protéine C activée, ou la mutation G20210A du gène de la prothrombine qui augmente sa concentration plasmatique. Ces anomalies héréditaires touchent entre 5 et 8% de la population caucasienne. (27)

Les thrombophilies acquises peuvent avoir différentes origines. Un mécanisme auto-immun comme le syndrome des anticorps anti-phospholipides, un mécanisme immunologique-allergique comme la thrombocytopenie induite par l'héparine ou un excès de facteurs de coagulation (VIII, IX ou XI (28,29)), peuvent entraîner des manifestations thrombotiques chez les patients.

Les thrombophilies se manifestent cliniquement par des thromboses veineuses superficielles ou profonde, avec ou sans embolie pulmonaire. Des cas de thromboses artérielles peuvent être retrouvés, notamment avec le déficit en protéine S ou la mutation G20210A du gène de la prothrombine.

Selon les recommandations de la Société Française de Thrombose et d'Hémostase (SFTH, anciennement GFHT) de 2020 (30), le bilan biologique d'une thrombophilie comporte la recherche des anomalies constitutionnelles (recherche d'un déficit en antithrombine, protéine C et protéine S) et des thrombophilies acquises (recherche d'anticoagulant lupique, anticorps anti bêta-2-glycoprotéine I et anti-cardiolipine) .

La recherche de thrombophilie biologique est indiquée (30–32):

- Chez les patients de moins de 50 ans ayant présenté un premier épisode de thrombose veineuse ou d'embolie pulmonaire non provoquée ou associée à un facteur de risque mineur ou chez la femme dans un contexte hormonal

- Dans les cas de récurrences non provoquées de thromboses veineuses si l'âge est inférieur à 50 ans

- Dans le cas de thromboses veineuses non provoquées dans des sites atypiques, quel que soit l'âge.

Ce bilan doit être réalisé idéalement en l'absence de traitement anticoagulant susceptible d'interférer avec les résultats. On recherchera dans le cas d'un bilan de thrombophilie, des déficits constitutionnels, il faudra donc systématiquement reconstrôler les résultats à distance pour établir le caractère persistant des différents déficits ou mutations.

I.2.4.2.1. Recherche d'un déficit en Antithrombine

Le déficit en antithrombine est un déficit de transmission autosomale dominante qui peut être de différents types : quantitatif (type I, dans 80% des cas) ou qualitatif (type II) dû à une anomalie du site de la sérine protéase, type II RS (Reactive Site), à une anomalie de la liaison à l'héparine, type II HBS (Heparin Binding Site) ou encore type II PE (Pleiotropic Effect) avec des anomalies mixtes touchants les différents domaines fonctionnels. (33)

Au laboratoire, le dépistage du déficit de l'antithrombine repose sur une méthode chromogénique qui évalue sa capacité à inhiber la thrombine en présence d'héparine.

Le plasma du patient est incubé dans un premier temps avec un réactif contenant de l'héparine et de la thrombine en excès permettant la formation d'un complexe Antithrombine du patient – Héparine – Thrombine. Dans un second temps, un réactif contenant un substrat chromogène spécifique de la thrombine va être ajouté au plasma. La thrombine résiduelle, libre, va venir cliver le substrat de son chromophore la paranitroaniline (pNA). La pNA libérée sera mesurée par spectrophotométrie à 405nm. (Figure 17)

Un déficit en antithrombine est caractérisé par une activité diminuée. Il entraîne une augmentation de la thrombine résiduelle et donc de la libération de pNA et du signal observé. Il y a donc une relation inverse entre thrombine résiduelle mesurée et activité de l'antithrombine.

Les valeurs normales de l'activité de l'antithrombine sont comprises entre 80 et 120%. Dans le cas d'un déficit, des examens complémentaires pourront être nécessaires dans le but de typer le déficit. Il faudra alors réaliser un dosage antigénique de l'antithrombine et une étude génétique de l'antithrombine.

La présence d'inhibiteurs de la thrombine comme l'argatroban ou le dabigatran dans le plasma du patient peut venir interférer avec le dosage, basé sur la thrombine, entraînant une surestimation de l'activité de l'antithrombine et donc une fausse normalisation du résultat.

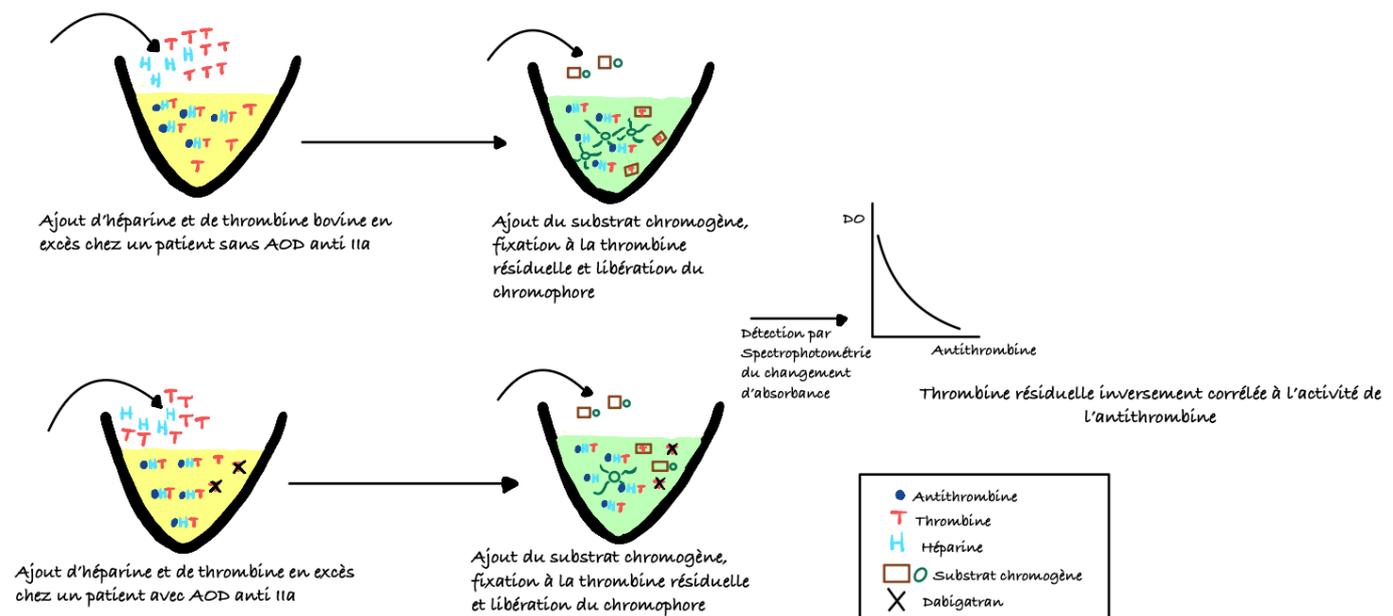


Figure 17: Schéma du dosage de l'antithrombine

I.2.4.2.2. Recherche d'un déficit constitutionnel en protéine C

La protéine C est une glycoprotéine synthétisée par le foie en présence de vitamine K. Elle possède un rôle d'inhibiteur physiologique de la coagulation. Après son activation par le complexe thrombine-thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales, la protéine C

activée inactive par protéolyse les facteurs Va et VIIIa en présence de son cofacteur, la protéine S.

Le déficit constitutionnel en protéine C peut être de deux types. Le type I est un déficit quantitatif où les taux antigéniques et fonctionnels sont diminués conjointement. Le déficit de type II est un déficit qualitatif caractérisé par un taux antigénique normal et une activité fonctionnelle diminuée. Il existe deux types de déficit de type II, le type II AC (défaut de l'activité anticoagulante de la protéine C) ou II AM (défaut de l'activité amidolytique de la protéine C).

Ces différents déficits, expliquent le fait qu'il y ait besoin de combiner plusieurs méthodes analytiques pour définir le type de déficit du patient. (Tableau 4)

Il est recommandé de doser en première intention, l'activité de la protéine C par méthode chromométrique, car elle est sensible à tous les déficits. Puis d'affiner le diagnostic en réalisant les autres dosages. De plus, une étude du gène de la protéine C (PROC), localisé sur le chromosome 2 peut être discutée avec un centre expert.

- Dosage de l'activité de la protéine C par méthode chromométrique

Il permet d'évaluer la capacité anticoagulante de la protéine C.

La protéine C présente dans le plasma du patient, va être activée par l'ajout d'un activateur spécifique, le venin d'*Agkistrodon contortix*. Une fois activée, la protéine C est mise en présence de plasma humain déficient en protéine C mais contenant tous les autres facteurs de la coagulation. L'ajout de Chlorure de Calcium (CaCl_2) permet de déclencher la réaction et la mesure du temps de coagulation. La protéine C activée va inhiber les facteurs Va/VIIIa et allonger le temps de coagulation. L'activité chromométrique de la protéine C exprimée en pourcentage sera liée au temps de coagulation.

Les valeurs normales de ce test sont comprises entre 70 et 130% chez l'adulte.

- Dosage de la protéine C antigène

Le dosage de la protéine C antigène permet de différencier le déficit de type I, où la protéine C antigène sera diminuée, des déficits de type II où seule l'activité est altérée.

Ce dosage est réalisé sur l'automate Vidas 3 développé par Biomérieux et repose sur une technique immuno-enzymatique ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

L'échantillon de plasma du patient est prélevé et transféré dans un puits. L'échantillon va être mis au contact d'un cône sensibilisé par des immunoglobulines monoclonales anti protéine C sur lesquelles la protéine C va se fixer. Un conjugué, composé d'anticorps anti-Protéine C marqué par une enzyme est ensuite ajouté et vient se fixer à l'antigène déjà capturé. Après un lavage pour éliminer les éléments non fixés, un substrat fluorescent est ajouté. Ce substrat va alors être hydrolysé par l'enzyme du conjugué pour libérer un produit fluorescent, dont l'intensité mesurée à 450 nm est proportionnelle à la quantité de protéine C présente dans l'échantillon. (Figure 18)

Les valeurs normales de protéine C antigène sont comprises entre 65 et 150%. Un taux normal ne peut pas exclure un déficit de type II et doit donc être interprété en regard des autres dosages d'exploration du déficit en protéine C.

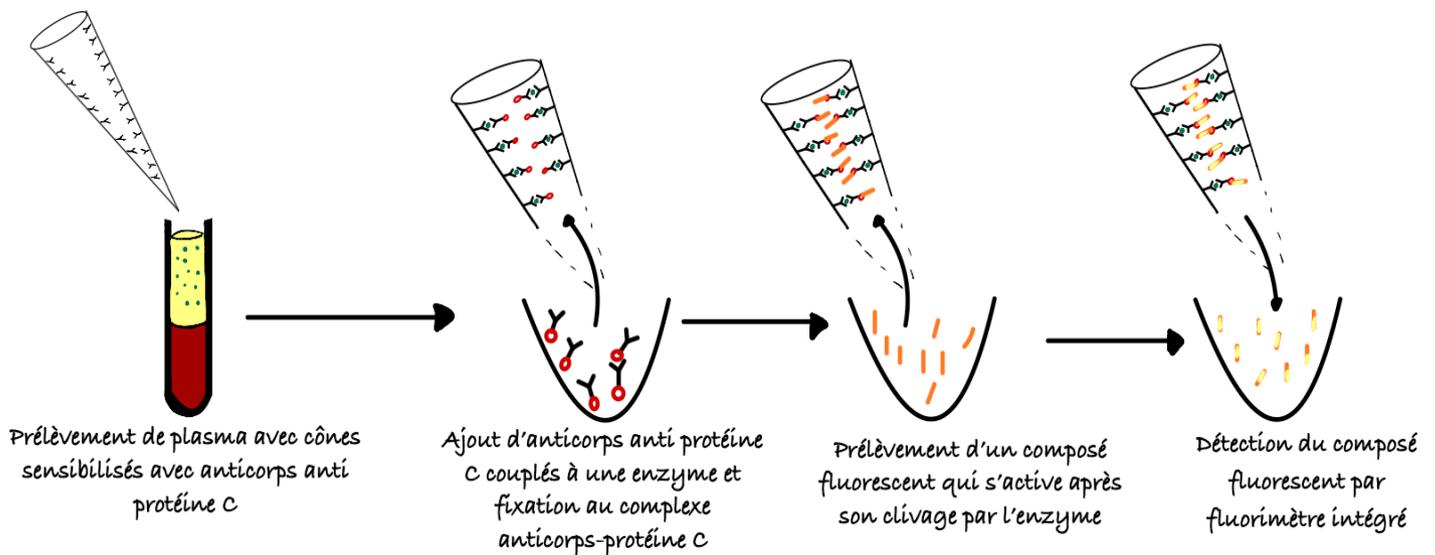


Figure 18: Schéma de dosage de la protéine C antigène sur automate Vidas3

- Dosage de l'activité de la protéine C par méthode colorimétrique amidolytique sur substrat synthétique chromogène

Le dosage par méthode colorimétrique, repose sur le principe de la méthode chromogénique et permet d'évaluer l'activité amidolytique (enzymatique intrinsèque) de la protéine C. Une activité qui sera normale uniquement dans le déficit de type II AC.

La protéine C contenue dans l'échantillon va être mise en contact avec un activateur, vu précédemment, le venin d'*Agkistrodon contortix*. La protéine C activée va alors exercer son activité enzymatique sur un groupement chromogène synthétique. Ce substrat chromogène est composé d'une séquence peptidique mimant le site naturel de clivage de la protéine C et d'un chromophore, la pNA. La libération de pNA suite au clivage du substrat produit une coloration jaune dont l'intensité, mesurée par spectrophotométrie à 405 nm sera proportionnelle à la quantité de protéine C initiale.

Les valeurs normales de l'activité amidolytique de la protéine C sont comprises entre 70 et 130%. Lors d'un déficit de type II AM, il y a une altération structurale du site catalytique de la protéine C qui entraîne une diminution de l'activité colorimétrique mesurée. Dans le cas du déficit de type II AC, il y a une anomalie d'interaction fonctionnelle avec la protéine S, le facteur Va, VIIIa ou les phospholipides, mais le site actif reste intact.

Tableau 4: Tableau des différents déficits constitutionnels en protéine C et leur réponse aux tests diagnostics

	Protéine C activité anticoagulante	Protéine C antigène	Protéine C activité amidolytique
Type I quantitatif	↓	↓	↓
Type II qualitatif AC (anticoagulant)	↓	N	N
Type II qualitatif AM (amydolitique)	↓	N	↓

I.2.4.2.3. Recherche d'un déficit constitutionnel en protéine S

La protéine S est une glycoprotéine vitamine-K dépendante codée par le gène PROS1 situé sur le chromosome 3 et synthétisée principalement par les hépatocytes. Elle circule dans le plasma sous deux formes : libre (40%) et liée à la C4bBP (60%). Seule la forme libre est active en agissant comme cofacteur de la protéine C activée. Elle permet d'augmenter la protéolyse des facteurs Va et VIIIa par la protéine C. Elle catalyse également l'activité de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI).

Les déficits constitutionnels en protéine S sont de transmission autosomale dominante à pénétrance variable et peuvent être classés en 3 types. Le type I correspond à un déficit quantitatif ou les taux de protéine S totale et libre sont diminués ainsi que l'activité de la protéine S. Le type II correspond à un déficit qualitatif caractérisé par une activité fonctionnelle réduite malgré des taux antigéniques normaux. Le type III, le plus fréquent, se caractérise par une diminution sélective de la protéine S libre. (Tableau 5)

Il est recommandé de doser en première intention l'activité anticoagulante de la protéine S car cette méthode de détection est sensible à tous les déficits, puis de compléter par le dosage de la protéine S libre antigène. Il pourra être aussi recommandé de discuter la réalisation d'une étude du gène de la protéine S (PROS1) avec un centre expert.

Les dosages doivent être pratiqués comme pour ceux de l'exploration du déficit en protéine C, à savoir à distance d'un épisode thromboembolique (>3 mois), d'une prise d'AVK (>3 semaines) et d'une insuffisance hépatique.

- Dosage de l'activité de la protéine S par méthode chronométrique

Le principe de dosage de l'activité de la protéine S par technique chronométrique repose sur l'activité cofacteur de la protéine S potentialisant l'effet de la protéine C activée. Le plasma du patient est incubé avec un plasma humain déficient en protéine S, de la protéine C activée humaine et une préparation à base de facteur Va bovin.

La protéine S présente dans l'échantillon du patient va alors potentialiser l'inactivation du facteur Va par la protéine C activée et ainsi augmenter le temps de coagulation. Plus l'activité de la protéine S est élevée, plus le temps de coagulation est long.

Les valeurs normales sont de 50 à 150% pour les femmes en âge de procréer, de 55 à 150% pour les femmes ménopausées et de 60 à 150% pour les hommes.

Cette méthode est sujette à de nombreuses interférences, l'héparine à forte concentration et les AOD peuvent entraîner une surestimation, le facteurs VIII et la présence d'anticorps anti-phospholipides une sous-estimation.

- Dosage de la protéine S libre antigène par immunoturbidimétrie

Le dosage antigénique de la protéine S libre est basé sur l'augmentation de la turbidité d'une suspension de microparticules de latex mesurée par photométrie.

Des microparticules de latex sur lesquelles sont fixés des anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine S libre sont mis en solution avec le plasma du patient. La protéine S présente dans l'échantillon se fixe alors aux anticorps entraînant une agglutination proportionnelle à sa concentration. Cette agglutination augmente la turbidité du mélange, mesurée photométriquement. Plus la turbidité est importante, plus la concentration de protéine S libre est élevée.

Les valeurs normales de la protéine S antigène par immunoturbidimétrie sont de 50 à 150% pour les femmes en page de procréer, de 55 à 150% pour les femmes ménopausées et de 60 à 150% pour les hommes.

Cette méthode basée uniquement sur la détection de la protéine S libre comporte moins d'interférences mais reste sujette aux interférences dues aux plasmas turbides, à la présence de facteur rhumatoïde ou encore une hyperfibrinogénémie.

Tableau 5: Tableau des différents déficits constitutionnels en protéine S et leur réponse aux tests diagnostics

	Protéine S libre activité	Protéine S libre antigène	Protéine S totale
Type I quantitatif	↓	↓	↓
Type II qualitatif, déficit fonctionnel	↓	N	N
Type III quantitatif de la fraction libre, défaut d'équilibre	↓	↓	N

I.2.4.2.4. Recherche de la mutation du facteur V Leiden

La mutation du facteur V Leiden est une mutation ponctuelle qui touche l'acide aminé 506 du facteur V de la coagulation. Au niveau du gène, elle entraîne une substitution du nucléotide 1691 d'une guanine (G) en une adénine (A) et au niveau protéique, elle entraîne la substitution de l'arginine par une glutamine en position 506.

Cette mutation entraîne la disparition de la cible de la protéine C activée et confère un phénotype de résistance à la protéine C activée et donc un effet pro coagulant, en retardant la dégradation du facteur Va par la protéine C activée augmentant ainsi la susceptibilité aux événements thromboemboliques. La prévalence de la mutation du facteur V Leiden est de 5 à 7% dans la population caucasienne avec une sensibilité clinique, c'est-à-dire la proportion d'individus avec la mutation ayant fait une thrombose veineuse profonde, allant de 20 à 50%. (34)

La recherche de mutation du facteur V Leiden se fait en biologie moléculaire par la technique de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). (35) (Figure 19)

Cette méthode consiste en l'amplification spécifique de la séquence cible du gène contenant la position G1691 par PCR.

L'étape suivante est une digestion enzymatique par une enzyme de restriction spécifique Hind III qui va venir couper le fragment d'ADN lorsqu'il possède la mutation.

Les fragments de restriction sont ensuite séparés par électrophorèse et permettent d'identifier le génotype : homozygote sauvage, hétérozygote muté ou homozygote muté.

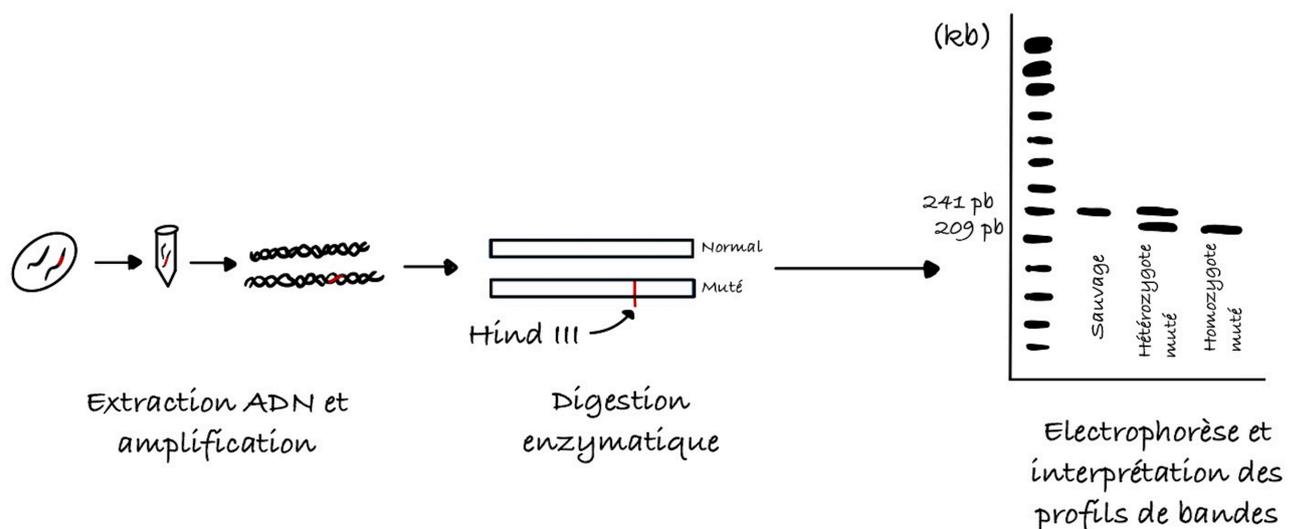


Figure 19: Principe de la méthode de recherche de la mutation du facteur V Leiden

1.2.4.2.5. Recherche de la mutation G20210A du facteur II

La mutation G202110A de la prothrombine, ou facteur II, est une mutation ponctuelle caractérisée par la substitution d'une guanine (G) par une adénine (A) en position 20210 dans la région 3' non traduite du gène et elle est localisée sur le chromosome 11. Cette région comporte un site de clivage endonucléotidique et un site de polyadénylation indispensables à la maturation des ARNm avant leur libération dans le cytoplasme. La substitution confère à cette région une activité supérieure avec une meilleure reconnaissance du site de clivage et une accumulation supérieure d'ARNm mature dans le cytoplasme aboutissant à une augmentation de la synthèse protéique du facteur II. Cette surexpression du facteur II plasmatique conduit à un excès de génération de thrombine, favorisant un état d'hypercoagulabilité. (36)

La mutation G20210A a une prévalence de 2% dans la population générale en Europe et la prévalence de cette mutation observée après un évènement thrombotique veineux est de 6 à 10% (37,38).

La détection de cette mutation repose également sur la technique de PCR-RFLP détaillée précédemment, avec pour seule différence que la partie de gène amplifiée est ici celle du gène du facteur II, encadrant le nucléotide G20210.

En conclusion, le bilan de thrombophilie classique au laboratoire à Limoges comporte (Tableau 6) :

- Recherche d'un déficit en antithrombine
- Recherche d'un déficit en protéine C
- Recherche d'un déficit en protéine S
- Recherche de la mutation du facteur V Leiden
- Recherche de la mutation G20210A de la prothrombine
- Recherche de la présence d'anticorps anti-phospholipides
- Dosage du facteur VIII

Tableau 6: Récapitulatif des différents tests et valeurs normales attendues pour le bilan de thrombophilie

	Méthode de dosage	Valeurs normales
Antithrombine	Méthode chromogénique	<u>80-120%</u>
Protéine C	Chronométrique activité anticoagulante (1 ^{ère} intention)	<u>70-130%</u> pour les méthodes chronométrique et chromogénique
	Chromogénique activité anti amidolytique	
	Immunologique- ELFA (Protéine C antigène)	<u>65-150%</u> pour la méthode immunologique
Protéine S	Chronométrique (activité protéine S)	<u>50-150%</u> (femmes en âge de procréer)
	Immunturbidimétrie (protéine S antigène)	<u>55-150%</u> (femmes ménopausées) <u>60-150%</u> (Hommes)
Mutation facteur V Leiden	PCR-RFLP	Absence de la mutation
Mutation G20210A prothrombine	PCR-RFLP	Absence de la mutation

I.3. Les Anticoagulants Oraux Direct (AOD)

I.3.1. Préambule

Pendant des décennies, les antagonistes de la vitamine K (AVK) représentaient la seule classe d'anticoagulants oraux disponibles. Bien qu'efficaces et largement utilisés, les AVK présentent de nombreux inconvénients. Ce sont des médicaments à marge thérapeutique étroite ce qui impose une surveillance biologique régulière et rigoureuse par la mesure de l'International Normalized Ratio (INR). En outre, l'adaptation posologique de ces traitements est contraignante du fait de leur longue demi-vie et ils sont sujets à de nombreuses interactions médicamenteuses et alimentaires. L'impact des AVK sur la santé publique française est également non négligeable avec 17 000 hospitalisations dues à leur surdosage selon le rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) de 2008 et près de 5000 décès par an seraient liés à des hémorragies sous AVK. (39)

Afin de répondre à ces problématiques, une nouvelle classe d'anticoagulant a été développée : les anticoagulants oraux directs (AOD). A la différence des AVK qui possèdent un mécanisme d'action indirect via le blocage de la synthèse finale des facteurs Vitamine K dépendants, II, VII IX et X, rendant leur activation impossible, les AOD possèdent un mécanisme d'action plus spécifique et direct. Le Dabigatran (Pradaxa®) va venir cibler exclusivement la thrombine (facteur IIa), tandis que le Rivaroxaban (Xarelto®), l'Apixaban (Eliquis®) et l'Édoxaban (Lixiana®) vont inhiber sélectivement le facteur Xa. Cela confère aux AOD plusieurs avantages pharmacologiques : une pharmacocinétique plus prévisible, avec néanmoins une variabilité inter-individuelle, une demi-vie plus courte, et un début d'action rapide. (40)

Les essais cliniques des différents AOD ont démontré une non-infériorité, voire une supériorité dans certaines indications (risque plus faible de provoquer une hémorragie intracrânienne (41) par rapport aux AVK en termes d'efficacité, et de profil de sécurité (42,43) et sont désormais pleinement intégrés dans les différents protocoles de prise en charge de nombreuses pathologies thromboemboliques.

Sur le plan clinique, ces propriétés vont se traduire par un nombre diminué de contraintes. La surveillance biologique systématique n'est pas nécessaire, les AOD possèdent une fenêtre thérapeutique plus large et les interactions alimentaires et médicamenteuses moins nombreuses qu'avec les AVK.

Néanmoins, malgré ces avantages, les AOD présentent certaines limites. Leur coût direct plus élevé par rapport aux AVK, leur impact sur les tests d'hémostase, la présence de plusieurs contre-indications ou précautions d'emploi spécifiques (insuffisance rénale sévère pour le dabigatran particulièrement, insuffisance hépatique modérée à sévère, grossesse) doivent être pris en compte. Certains AOD comme le rivaroxaban ou le dabigatran sont également associés à des risques accrus d'hémorragies gastro-intestinales. (41,44,45) De plus, les interactions médicamenteuses, bien que moins nombreuses qu'avec les AVK, existent notamment via le cytochrome CYP3A4 ou la glycoprotéine P. (46)

I.3.2. Indications des AOD

Les AOD possèdent une AMM pour :

- La prévention des évènements thrombo-emboliques veineux (TEV) post-chirurgies programmées pour prothèse totale de hanche ou de genou
- La prévention de l'AVC et de l'embolie systémique chez les patients adultes avec fibrillation auriculaire non valvulaire associée et présentant un ou plusieurs facteurs de risques tels que : antécédents d'AVC ou d'AIT, âge ≥ 75 ans, insuffisance cardiaque (classe NYHA (New York Heart Association) \geq II), diabète, hypertension artérielle
- Le traitement des thromboses veineuses profondes (TVP) et des embolies pulmonaires (EP) et prévention des récives de TVP et d'EP chez l'adulte
- Prévention des évènements athérothrombotiques chez des patients adultes suite à un syndrome coronarien aigu en association avec de l'acide acétyl salicylique (AAS) ou avec de l'AAS associé à du clopidogrel ou de la ticlopidine

I.3.3. Anti Xa – Apixaban, Rivaroxaban et Edoxaban

- Mécanisme d'action

Les inhibiteurs du facteur Xa agissent en inhibant de manière spécifique et réversible le facteur Xa qu'il soit intégré au complexe prothrombinase ou libre en circulation. Ils se lient directement au site actif du facteur Xa bloquant ainsi son action enzymatique. Ce blocage entraîne une réduction significative de la production de thrombine, limitant ainsi la formation de fibrine et la stabilisation du caillot sanguin. (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**)

Bien qu'ayant le même mécanisme d'action, l'apixaban et le rivaroxaban possèdent une vitesse d'inhibition du facteur Xa différente. Ceci permet d'expliquer leur impact variable sur les différents tests d'hémostase. Le rivaroxaban ayant une vitesse d'inhibition plus élevée que l'apixaban, il entraîne des modifications plus marquées des tests de coagulation in vitro. (47,48)

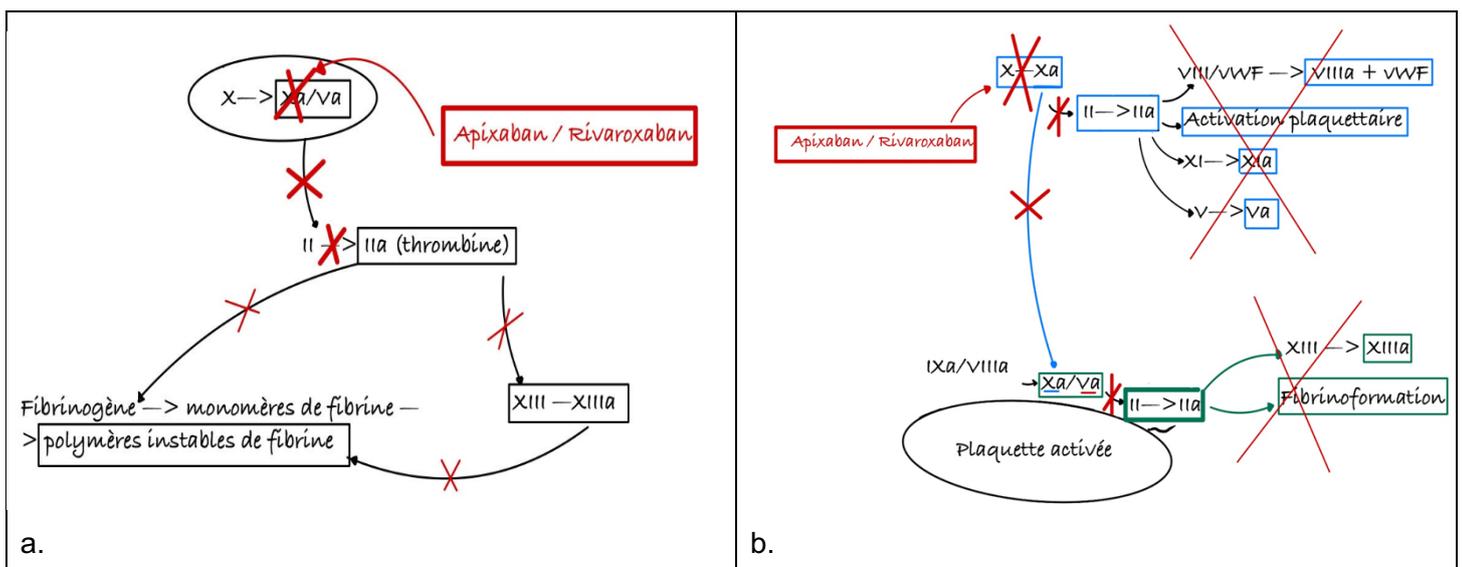


Figure 20: Mécanisme d'action des AOD anti-Xa sur les modèles in vitro (a) et in vivo (b) de la coagulation

- Pharmacocinétique (Tableau 7)

Tableau 7: Caractéristiques pharmacocinétiques des AOD anti-Xa

	Apixaban(49)	Rivaroxaban (50)	Edoxaban
Absorption	Orale	Orale	Orale
Cible	Anti-Xa direct et sélectif	Anti-Xa direct et sélectif	Anti-Xa direct et sélectif
Biodisponibilité	80%	50%	62%
Concentration maximale	0,5-4h	1-3h	1-2h
Liaison aux protéines plasmatiques	90%	85%	55%
Métabolisme	CYP3A4 et CYP2J2	CYP3A4 et CYP1A1/2	CYP3A4 et CYP1A1/2
Transport	Glycoprotéine P (P-gp)	P-gp	P-gp
Élimination	25% : Rénale 25% : Fèces	33% : Rénale inchangée 33% : Rénale métabolisée 33% : Fèces	33% : Rénale inchangée 66% : Voie biliaire
Facteurs influençant la pharmacocinétique	Fonction rénale, hépatique, médicaments inducteurs/inhibiteurs CYP3A4, P-GP	Fonction rénale, hépatique, médicaments inducteurs/inhibiteurs CYP3A4, P-GP	Fonction rénale, hépatique, médicaments inducteurs/inhibiteurs CYP3A4, P-GP

- Interactions médicamenteuses et contre-indications

Les anti-Xa sont métabolisés par les cytochromes CYP3A4, CYP2J2 et CYP1A1/2. Il va donc y avoir des interactions entre les anti-Xa et les médicaments inhibiteurs ou inducteurs de ces cytochromes. Les associations médicamenteuses les plus à risque incluent les antifongiques azolés (kétoconazole, itraconazole), les inhibiteurs de protéase du VIH, la ciclosporine, qui peuvent augmenter les concentrations plasmatiques des anti-Xa et ainsi majorer le risque hémorragique. A l'inverse, les inducteurs enzymatiques comme la rifampicine ou la carbamazépine réduisent leur concentration, diminuant ainsi leur efficacité anticoagulante.

Les contre-indications absolues aux anti Xa sont : la grossesse, l'allaitement, la fibrillation auriculaire d'origine valvulaire, une maladie hépatique avec coagulopathie et le risque de saignement cliniquement significatif. (51)

En cas particuliers, on retrouve comme contre-indications absolues l'ulcère gastro-intestinal et l'endocardite bactérienne pour le rivaroxaban. L'intolérance au lactose pour l'Apixaban et les lésion ou maladies à risque hémorragique majeure pour l'Edoxaban.

- Antidote : Andexanet Alfa

L'andexanet alfa est une protéine recombinante qui agit comme leurre moléculaire spécifique des anti-Xa. Il possède une structure analogue au facteur Xa mais est catalytiquement inactif et ne possède pas de domaine Gla ce qui empêche toute intégration au mécanisme de coagulation. Il se lie aux AOD anti-Xa avec une forte affinité, entraînant une dissociation des AOD anti-Xa du facteur Xa endogène. Sa demi-vie relativement courte (1h), impose une administration en bolus suivie d'une perfusion continue. L'un de ses principaux effets indésirables est le risque thrombotique post-administration, nécessitant une surveillance étroite des patients. (52)

Cet antidote a été approuvé aux États-Unis par la FDA en 2018 et en Europe par l'EMA en 2019. Néanmoins, il ne dispose pas de l'AMM en France. Dans le cas d'une hémorragie grave sous anti-Xa avec une concentration élevée du médicament, il est recommandé d'administrer en urgence des concentrés de complexe de prothrombine (CCP) (53) afin de restaurer les fonctions hémostatiques du patient.

I.3.4. Anti IIa – Dabigatran

- Mécanisme d'action

Le dabigatran éxétilate est administré sous forme de prodrogue inactive. Il va subir une bioactivation après absorption par l'action des estérases plasmatiques et hépatiques qui vont le convertir en dabigatran, le métabolite actif. Cette activation enzymatique explique sa biodisponibilité finale faible (6,5%).

Le dabigatran va ensuite venir se lier de manière spécifique et réversible au site actif de la thrombine (facteur IIa). Le dabigatran vient ainsi inhiber la formation de fibrine, l'activation du facteur XIII, interférer avec l'activation plaquettaire et la rétroactivation des facteurs V, VIII et XI.

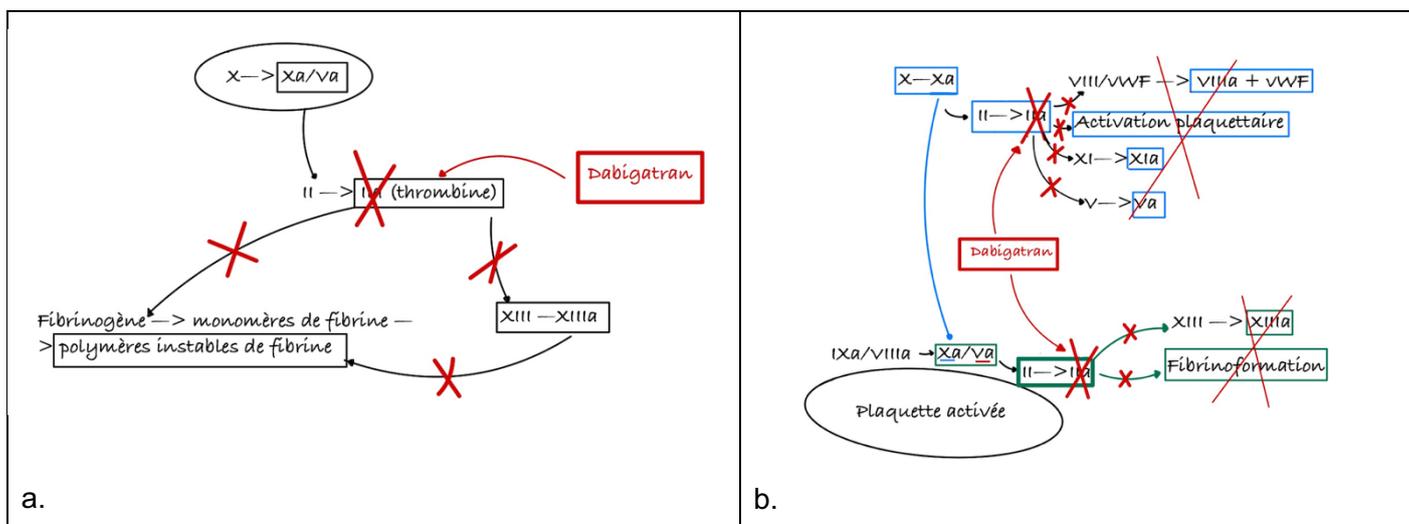


Figure 21: Mécanisme d'action du dabigatran sur les modèles in vitro (a) et in vivo (b) de la coagulation

- Pharmacocinétique (Tableau 8)

Tableau 8: Caractéristiques pharmacocinétiques du dabigatran (54)

	Dabigatran
Absorption	Voie orale sous forme de prodrogue
Cible	Anti-IIa direct et sélectif
Biodisponibilité	6,5%
Concentration maximale	1-3h
Liaison aux protéines plasmatiques	35%
Métabolisme hépatique	Non
Transport	Substrat de la glycoprotéine P (P-gp)
Élimination	80% : rénale sous forme inchangée 20% : glucoronoconjuguée dans les fèces
Facteurs influençant la pharmacocinétique	Âge avancé, fonction rénale, inducteurs/inhibiteurs de la P-gp

- Interactions médicamenteuses et contre-indications

Les principales interactions médicamenteuses du dabigatran vont être causées par son rôle de substrat de la P-gp. Ainsi il sera sensible d'une part aux inhibiteurs de la P-gp comme le kétoconazole, la ciclosporine et le vérapamil qui augmenteront sa concentration plasmatique. Et d'autre part, aux inducteurs de la P-gp comme la rifampicine ou le millepertuis qui eux diminueront son efficacité.

Le dabigatran possède les mêmes contre-indications absolues que les AOD anti Xa avec en plus une contre-indication avec toute association aux inhibiteurs de la P-gp et la présence de lésions organiques avec un risque de saignement cliniquement significatif, ou encore une contre-indication en cas d'insuffisance rénale ou hépatique sévère. (51)

- Antidote – Idarucizumab (Praxbind®)

C'est le premier antidote spécifique développé pour un anticoagulant oral direct qui a reçu son AMM en 2016 (55). Il s'agit d'un fragment d'anticorps monoclonal humanisé qui neutralise spécifiquement le dabigatran avec une affinité de liaison supérieure à 350 fois à celle du dabigatran pour la thrombine (56). Il se lie de façon puissante, rapide et irréversible au dabigatran et ses métabolites, formant des complexes inactifs qui seront éliminés par voie rénale.

Il ne possède aucune activité pro coagulante intrinsèque et n'interfère pas avec les autres médicaments anticoagulants ce qui élimine le risque de complications thrombotiques liées à son administration.

Il s'administre par voie intra veineuse sans nécessité d'ajustement posologique en fonction de l'âge, du sexe ou de la fonction rénale du patient.

I.3.5. Impact des AOD sur les tests d'hémostase

Les AOD représentent une avancée dans la prise en charge des pathologies thrombotiques en offrant une alternative aux antivitamines K et aux héparines. Néanmoins, leur prescription s'accompagne de contraintes clinico-biologiques. Ces molécules interfèrent avec les tests d'hémostase en fonction de leur mécanisme, de leur concentration plasmatique du type de test réalisé et des réactifs utilisés entraînant des résultats erronés et des interprétations cliniques incorrectes si leur présence n'est pas identifiée et considérée(57,58). Cela explique que certains dosages ne sont pas réalisés, conformément aux recommandations comme le dosage des facteurs de la coagulation, alors que d'autres sont rendus ininterprétables comme les bilans d'hémostase spécialisés, lorsque le patient est sous AOD.

Actuellement, en l'absence de stratégie de neutralisation validée comme le DOAC-Stop™, il est recommandé d'interrompre temporairement le traitement par AOD avant toute exploration de l'hémostase ou intervention à risque hémorragique en respectant une fenêtre thérapeutique de trois jours à une semaine, variable selon la molécule, la fonction rénale et le contexte clinique. Un relais par héparine de bas poids moléculaire (HBPM) peut également être envisagé chez les patients à haut risque thrombotique. Cela représente des contraintes organisationnelles importantes pour les patients et les cliniciens.

- Rivaroxaban

Le rivaroxaban inhibiteur direct et sélectif du facteur Xa influence les tests d'hémostase avec un impact variable selon le test réalisé.

Son effet caractéristique concerne le temps de Quick avec un allongement significatif et une diminution du taux de prothrombine (TP) de façon non linéaire mais corrélée à la concentration en rivaroxaban. Le TP est plus sensible que le TCA au rivaroxaban, il y aura donc un profil de variations différentielles entre TP et TCA chez un patient sous rivaroxaban.

Les dosages spécifiques des facteurs de la coagulation sont sous-estimés. En hémostase spécialisée, le rivaroxaban peut induire des faux positifs dans la recherche d'anticoagulants circulants, en particulier avec l'utilisation du dRVVT basé directement sur une activation du facteur X. Les tests chronométriques du bilan de thrombose comme l'activité de la protéine C et l'activité de la protéine S seront faussement augmentés. Cet effet est lié non pas à une hyperactivité réelle mais à un raccourcissement du temps de la coagulation causé par le rivaroxaban.

Des résultats normaux pour les tests globaux (TP et TCA) n'excluent cependant pas la présence de rivaroxaban, en raison de différences de sensibilité de ces tests et réactifs.

Le fibrinogène selon la méthode de Von Clauss, n'est pas impacté par la prise de rivaroxaban, de même que l'antithrombine dont le dosage est basé sur l'inhibition de la thrombine et non du facteur Xa au laboratoire.(59–61)

- Apixaban

L'apixaban, autre inhibiteur direct du Xa, présente des interférences similaires au rivaroxaban, mais généralement de moindre importance à concentration équivalente du fait d'une constante de vitesse d'association plus faible de l'apixaban par rapport à celle du rivaroxaban.(48) Les paramètres de l'hémostase sont ainsi peu sensibles à l'apixaban mais peuvent cependant être faussés.

Le TCA peut être allongé, le TP diminué, les facteurs de la coagulation sous-estimés, la recherche d'anticoagulant lupique peut être faussement positive, l'activité de la protéine S et l'activité de la protéine C surestimées.

L'antithrombine et le fibrinogène ne sont quant à eux, de même que le rivaroxaban, pas impactés par la présence d'apixaban. (62,63)

- Dabigatran

La dabigatran, inhibiteur direct et réversible de la thrombine, modifie les paramètres biologiques de l'hémostase avec un impact variable selon le test réalisé. Son effet le plus caractéristique concerne le temps de thrombine, avec un allongement marqué de ce temps même à des concentrations plasmatiques faibles. Ce test étant très sensible, on considère qu'un temps de thrombine négatif peut exclure présence de dabigatran dans le prélèvement.

Les tests d'exploration globaux comme le TP ou le TCA présentent une réponse dose dépendante mais non linéaire. Le TCA, plus sensible que le TP au dabigatran s'allongera pour des concentrations plus faibles que le TP créant ainsi un profil d'allongement différentiel caractéristique.

Les dosages spécifiques des facteurs de la concentration subissent une sous-estimation, plus particulièrement à forte dose. En hémostase spécialisée, le dabigatran induit une surestimation des paramètres comme l'activité de la protéine C, l'activité de la protéine S, du TCA sensibilisé et du DRVV. L'antithrombine sera surestimée sous dabigatran car la méthode de détection est basée sur un substrat anti-IIa au laboratoire et ne sera donc pas réalisée à Limoges.

Le dosage du fibrinogène, avec la méthode de Von Clauss et les réactifs de Stago, n'est pas sensible au dabigatran. (64–66)

Tableau 9: Impact des différents AOD sur les tests d'hémostase, avec les réactifs utilisés au CHU de Limoges, d'après bibliographie et travail préliminaire (67)

	Apixaban	Rivaroxaban	Dabigatran
TCA	N à ↑↑	N à ↑↑↑	↑ à ↑↑↑
TP	N à ↓↓	N à ↓↓↓	N à ↓↓↓
TT	∅	∅	↑ à ↑↑↑
Facteurs de la coagulation	N à ↓↓	N à ↓↓↓	N à ↓↓↓

Fibrinogène	∅	∅	∅
PTT-LA / DRVV	N à ↑↑	N à ↑↑↑	N à ↑↑↑
Antithrombine Basée sur anti IIa	∅	∅	N à ↑↑↑
Protéine C activité	N à ↑↑↑	N à ↑↑↑	N à ↑↑↑
Protéine C activité Chromogénique colorimétrique	∅	∅	∅
Protéine C antigène	∅	∅	∅
Protéine S activité	N à ↑↑↑	N à ↑↑↑	N à ↑↑↑
Protéine S antigène	∅	∅	∅
<p>↑ : augmentation ↓ : diminution Intensité en fonction du nombre de flèches 1 = faible / 2= modérée / 3= forte ∅ : pas de variation N: peut être normal mais n'exclue pas la présence de l'AOD</p>			

- Répercussions sur le rendu des résultats

Les résultats sont donc variables en fonction de la nature de l'AOD et difficilement interprétables en raison de la non-corrélation par rapport à la concentration en AOD. Il convient aussi de noter que pour le rivaroxaban et l'apixaban, des résultats normaux de TP et TCA n'excluent pas la présence de ces médicaments et leur potentiel impact sur des tests plus sensibles à ces molécules. S'il y a un questionnement concernant le traitement du patient, et selon le contexte, il peut par exemple être nécessaire de doser l'activité anti-Xa ou anti-IIa de ces traitements. Dans certains cas, des tests colorimétriques (protéine C) ou antigéniques (protéine C et S) sont possibles mais le diagnostic restera alors incomplet.

En pratique, il existe des règles concernant la conduite à tenir avant de réaliser des tests d'hémostase chez un patient sous AOD. (Tableau 10)

Tableau 10: Conduite en fonction du test pour un patient sous AOD au CHU de Limoges (Qualims LHEM AHEMO 0080F)

	Apixaban	Rivaroxaban	Dabigatran
TCA	À faire	À faire	À faire
TP	À faire (rendre INR ininterprétable)	À faire (rendre INR ininterprétable)	À faire (rendre INR ininterprétable)
TT	Pas nécessaire si traitement renseigné	Pas nécessaire si traitement renseigné / À faire si doute avec Dabigatran	À faire
Facteurs de la coagulation	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable
Fibrinogène	À faire	À faire	À faire
Recherche antiphospholipides PTT-LA / Staclot LA/ DRVV	Rendre si négatif	Ininterprétable	Ininterprétable
Antithrombine	À faire	À faire	Ininterprétable
Protéine C activité chronométrique	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable
Protéine C activité Chromogénique colorimétrique	À faire	À faire	À faire
Protéine C antigène	À faire	À faire	À faire
Protéine S activité chronométrique	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable
Protéine S antigène	À faire	À faire	À faire

I.4. La solution du charbon activé

Les anticoagulants oraux directs exercent donc un impact significatif, plus ou moins prédictible sur les tests de la coagulation, selon l'AOD utilisé, la méthode de dosage ou le réactif utilisé.

Au niveau de la prescription de ces traitements, le rapport d'évaluation des médicaments anticoagulants oraux de la commission de transparence a montré que la prévalence

d'utilisation des AOD a augmenté de 360% de 2012 à 2016 tandis que celle des AVK a diminué de 10% entre 2014 et 2016. (68)

C'est dans ce contexte qu'il est devenu nécessaire de s'adapter et de trouver un moyen d'agir sur les interférences analytiques des AOD en hémostase. Plusieurs équipes de recherche ont alors exploré le potentiel du charbon activé comme agent neutralisant des AOD in vitro.

Le charbon activé est une substance utilisée dans le traitement de certaines intoxications médicamenteuses. (69) Il permet l'adsorption des toxiques dans la lumière intestinale ainsi que leur dialyse intestinale entraînant une diminution de leur résorption et une accélération de leur élimination à condition d'être administré le plus tôt possible, soit maximum une heure après l'ingestion du toxique.

Les AOD étant une substance carbo-adsorbable, l'utilisation du charbon activé a été testé en conditions in vitro, afin de voir si cela pouvait permettre de palier à la problématique de l'impact des AOD sur les tests d'hémostase. (70)

I.4.1. Propriétés du charbon activé et mécanismes de neutralisation

Le charbon activé est un composé d'une structure hautement microporeuse caractérisée par une grande surface interne lui conférant une grande capacité d'adsorption. La structure poreuse du charbon activé est constituée de micropores (diamètre <2nm), de mésopores (2-50nm) et de macropores (>50nm). Ce sont les micropores qui sont responsables de la majeure partie de la surface active et donc de la capacité d'absorption des petites molécules. Il y a une adsorption en fonction de la taille de la molécule. De plus, le charbon activé, du fait de sa structure est hydrophobe.

Les AOD sont des molécules de petite taille et de faible poids moléculaire présentant une structure partiellement hydrophobe.

L'interaction entre les AOD et le charbon activé repose donc sur plusieurs mécanismes électrophysiologiques ; une affinité de taille avec la pénétration dans les micropores du charbon activé et une affinité hydrophobe favorisant l'adsorption (liaisons de van der Waals, empilement π - π (π - π)).

En revanche, les autres médicaments d'intérêt en hémostase, tels que l'héparine, les héparines de bas poids moléculaires ou encore les AVK, ne sont pas adsorbés par le DOAC-StopTM. Cette absence d'adsorption s'explique par leurs caractéristiques physico-chimiques : la taille moléculaire importante et la charge fortement négative des héparines, d'une part et la nature lipophile des AVK ainsi que leur forte liaison aux protéines plasmatiques d'autre part, ne permettent pas leur fixation au charbon activé. (70–73)

I.4.2. Différentes solutions existantes

C'est en se basant sur ces différentes propriétés qu'ont été développés différents produits à base de charbon activé dans le but de neutraliser les AOD.

- DOAC-Stop™

Le DOAC-Stop™ (Figure 22) est un produit fabriqué par Cellabs pour Haematex research une société australienne et revendue notamment par Cryopep en France. Ce sont des petits comprimés de 5 mg de charbon activé. Ils sont conditionnés pour adsorber jusqu'à 2000 ng/mL de n'importe quel AOD, pour une quantité de plasma allant de 0,5 à 1,5mL. Le protocole d'utilisation sera détaillé dans la partie II : Matériel et méthodes.

Les plus récentes études ont montré que le DOAC-Stop™ élimine efficacement tous les types d'AOD, en obtenant une concentration inférieure à 30ng/mL en substance active après traitement par DOAC- Stop™. Cela permet d'éviter les résultats faux positifs, en particulier dans les bilans de thrombophilie ou de lupus anticoagulants réalisés sous AOD. (74–76) (Annexe 4)

C'est ce produit qui a été retenu pour notre protocole expérimental, détaillé dans la seconde partie.



Figure 22: DOAC-Stop™

- DOAC-Stop Liquid™

Le DOAC-Stop Liquid™ (Figure 23) est produit par le même laboratoire que le DOAC-Stop™ et consiste en une forme liquide du précédent. C'est une suspension contenant 12,5% de charbon activé.

Elle permet de s'affranchir de l'étape de centrifugation et de diminuer la présence de microparticules résiduelles de charbon pouvant interférer au niveau analytique. L'étude publiée dans le *Journal of Clinical Medicine*, montre une efficacité au moins équivalente à celle du DOAC-Stop™ (77)



Figure 23: DOAC-Stop Liquid™

- DOAC-Remove®

Le DOAC-Remove est fabriqué par 5-Diagnostics, une société suisse, et fonctionne selon le même principe que le DOAC-Stop™. Le protocole est sensiblement le même mais ici le volume autorisé est de 1mL de plasma. L'efficacité semble être la même (78) mais une étude a montré que le DOAC-Remove® pouvait être moins efficace que le DOAC-Stop™ vis-à-vis du dabigatran (74). Néanmoins, ce n'est pas corroboré par d'autres études comparatives et nécessite donc d'autres investigations. (79)

- DOAC-Filter®

Le DOAC-Filter®, développé par Stago, repose sur une méthode de filtration. Le plasma va être introduit dans un filtre, dont la composition est confidentielle, et les AOD vont être captés et retenus par le filtre. Cela permet de s'affranchir également des étapes de centrifugation.

L'efficacité du DOAC-Filter est similaire à celle du DOAC-Stop™(80,81), il représente ainsi une bonne alternative en terme de traitement d'échantillons de patients sous AOD mais nécessite plus d'études, et notamment comparatives avec les autres méthodes de neutralisation.

Au regard des différentes caractéristiques et disponibilités des produits neutralisants, il a été choisi d'étudier le DOAC-Stop™ au laboratoire en raison de sa simplicité d'utilisation et de son efficacité démontrée dans plusieurs études préliminaires.

I.5. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'efficacité du DOAC-Stop™ en tant que traitement pré-analytique des échantillons de patients traités par AOD, dans le but de permettre l'interprétation fiable de tests d'hémostase habituellement rendus ininterprétables par la présence d'AOD.

Ce travail permettra également de comparer les résultats obtenus au CHU de Limoges aux données déjà publiées dans la littérature afin d'en apprécier la concordance et de confirmer à l'échelle locale, la pertinence de l'intégration du DOAC-Stop™ en routine.

Par ailleurs, cette étude permettra de redéfinir de nouvelles recommandations locales quant à la réalisation de bilans d'hémostase chez les patients traités par AOD. L'utilisation du DOAC-Stop™ doit-elle être systématique ou uniquement réservée à l'hémostase spécialisée ?

Enfin, ce travail s'inscrit dans une démarche de validation méthodologique avec pour finalité l'utilisation du DOAC-Stop™ au laboratoire d'hémostase.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Présentation des équipements et réactifs utilisés

- Automates

Les analyses d'hémostase ont été réalisées sur l'automate STA-R Max 2® commercialisé par la société Diagnostica Stago. Cet automate permet la réalisation des tests d'hémostase classiques ainsi que des examens spécialisés selon les principes chromométriques, colorimétriques et immunologiques.

Il est à noter que cet automate est depuis peu remplacé au laboratoire par le sthemO 301 également développé par Stago, et qui est désormais utilisé pour la majorité des tests d'hémostase au laboratoire (hormis, l'activité anti Xa /anti IIa sous AOD, les bilans de thrombophilie, la recherche d'anticorps anti-phospholipides, le facteur VII ou encore le facteur XI).

Les deux automates reposent sur les mêmes principes analytiques. Le DOAC Stop™ étant un traitement pré-analytique des échantillons, son efficacité n'est pas affectée par ce changement d'équipement. Ce postulat sera néanmoins à vérifier car les réactifs utilisés seront différents entre les deux automates même si selon le fabricant, il n'y a pas de changement.

Le laboratoire d'hémostase est équipé de trois automates STA-R Max 2® (MAX1, MAX2 et MAX3). Les tests ont été réalisés sur les automates MAX1 et MAX2 (Figure 24) en fonction des qualifications de ces automates.

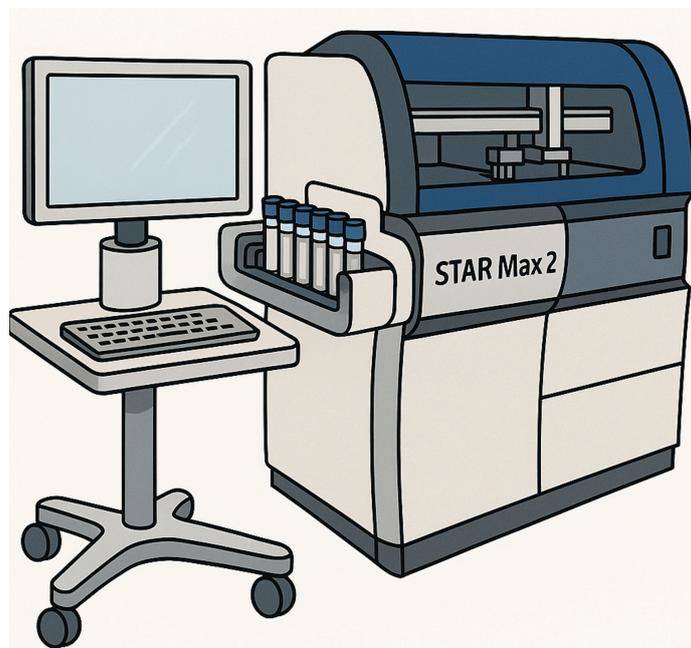


Figure 24: Illustration des STAR MAX2 et MAX1 utilisés au cours de ce travail,

- Réactifs utilisés

Tableau 11: Automates et réactifs utilisés en fonction des tests

Test	Automate	Réactifs
TP	MAX2	STA-Neoptimal 20®
TCA	MAX2	STA-PTT A® STA-CaCl2®
Fibrinogène	MAX2	STA-Liquid Fib®
Facteurs de la coagulation	MAX2	STA-Neoptimal 20® STA-DEFICIENT II/X/V®
Temps de thrombine	MAX2	STA-Thrombin®
Activité anti-Xa Avec calibrants et contrôles spécifiques de l'AOD exploré	MAX2	STA-Liquid anti-Xa® (Réactif 1 :Substrate Réactif 2 : FXa)
Activité anti-IIa	MAX2	STA-ECA II®
Protéine C chromométrique	MAX1	STA-STACLOT-PROTEIN C® (Réactif 1 : Protein C deficient plasma Réactif 2 : PC-activator)
Protéine S chromométrique	MAX1	STA-STACLOT-PROTEIN S® (Réactif 1 :Protein S deficient plasma Réactif 2 : PCa Réactif 3 : FVa) STA-CaCl2®
Antithrombine	MAX1 et MAX 2	STA-STACHROM- ATIII R® (Réactif 1 : Substrate Réactif 2 : FXa Réactif 3 : Thrombin substrat)
DRVV Screen/Confirm	MAX2	STA-STACLOT DRVV SCREEN® STA-STACLOT DRVV CONFIRM®
TCA sensibilisé pour la recherche des anticorps antiphospholipides (PTT-LA)	MAX2	STA-PTT LA® STA-Pool Norm®

II.2. Protocole expérimental

Afin de se confronter aux conditions en vie réelle, le choix a été fait de collecter des échantillons de patients prélevés le jour même au CHU de Limoges et traités par AOD.

Ainsi, nous avons pu avoir un large panel de patients, à des concentrations variées en médicament, reflétant les conditions que nous pourrions retrouver dans le futur au laboratoire.

II.2.1. Protocole de préparation des échantillons

Le protocole expérimental a été basé sur les procédures fournies par le fournisseur, les recommandations des sociétés savantes, (82,83) et les matériels mis à disposition au laboratoire.

- Choix de l'échantillon

La sélection des patients a été réalisée à l'aide d'une requête étendue sur le logiciel métier GLIMS utilisé au laboratoire. Les critères d'inclusion comprenaient la prise documentée d'un AOD et la présence d'un volume de plasma résiduel suffisant (≥ 1 mL) permettant la réalisation des analyses comparatives avant/après traitement par DOAC-Stop™

L'échantillon du patient a été centrifugé une première fois à son arrivée au laboratoire par l'automate de tri pré-analytique COBAS® 8100, situé au laboratoire de biochimie, et les analyses de routine d'hémostase prescrites ont alors été réalisées. Une fois ces analyses terminées, le plasma résiduel a été récupéré et centrifugé une nouvelle fois selon le protocole recommandé afin de réaliser des analyses d'hémostase spécialisée, soit une centrifugation pendant 15 minutes à $2300 \mp 150g$ et $20 \mp 3^{\circ}C$ permettant d'obtenir un plasma ultra pauvre en plaquettes. Un volume de 1 à 1,5 mL de plasma, en fonction des analyses prévues par la suite, a alors été prélevé et transféré dans un tube de congélation puis stocké à $-20^{\circ}C$ jusqu'à la réalisation du protocole de comparaison.

- Préparation et protocole de comparaison

Avant analyse, le tube a été décongelé au bain-marie à $37^{\circ}C$ pendant 4 à 5 minutes selon le volume. Les analyses avant charbon ont alors été réalisées.

Un comprimé de DOAC-Stop™ a ensuite été ajouté au tube, suivi d'une homogénéisation douce sur agitateur pendant 5 à 10 minutes afin d'obtenir sa dissolution complète. Le tube a été centrifugé à nouveau, selon le programme standard, afin de permettre la sédimentation des complexes AOD/ DOAC-Stop™ formés.

Les analyses ont alors été réalisées afin d'établir une comparaison des résultats avant DOAC-Stop™ versus après DOAC-Stop™. (Figure 25)

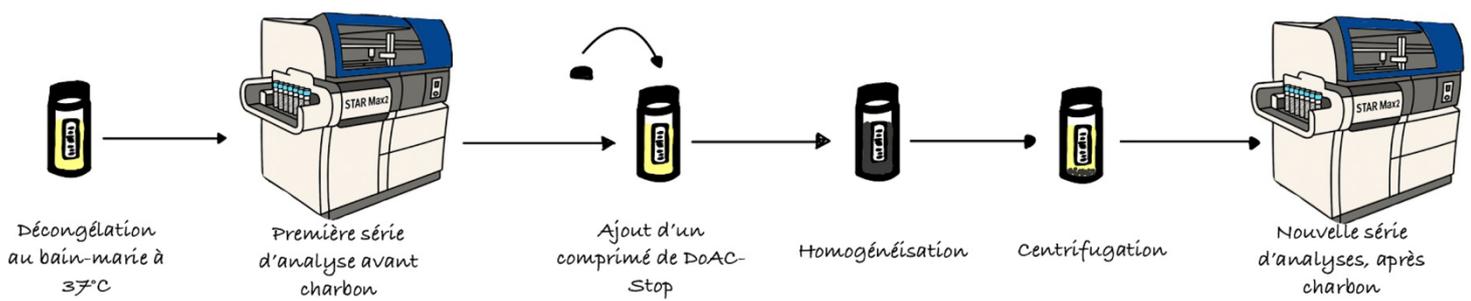


Figure 25: Schéma récapitulatif du protocole de comparaison utilisé

II.2.2. Recueil des résultats

Le recueil et l'organisation des données ont été réalisés à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les échantillons ont été regroupés sur des feuilles de calcul classées en fonction du médicament étudié (apixaban, rivaroxaban, dabigatran).

Pour chaque test d'hémostase, un tableau comparatif avant/après traitement par DOAC Stop™ a été constitué où chaque ligne représentait un même patient, identifié numériquement de manière anonyme et contenait les résultats obtenus sur les automates.

II.3. Analyse statistique

La réalisation des analyses statistiques s'est faite à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Ces analyses correspondaient à une comparaison avant/après des différents tests d'hémostase sur des échantillons appariés.

Les feuilles de données ont été implémentées dans le logiciel GraphPad Prism sans pré-traitement spécifique.

Le test de Shapiro-Wilk a permis de démontrer la normalité de la distribution des données nécessaire pour choisir le bon test statistique afin de déterminer la différence significative ou non entre l'échantillon traité par le charbon et l'échantillon de base :

Lorsque les données ne suivaient pas une distribution normale, ou que l'effectif était inférieur à 30, un test non paramétrique de Wilcoxon pour données appariées a été utilisé.

Lorsque la distribution était jugée compatible avec la normalité et que l'effectif était supérieur ou égal à 30, un test t de Student sur échantillons appariés a été appliqué avec un risque établi à 5%.

Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs pour une valeur de p (p-value) <0,05 correspondant à un intervalle de confiance à 95%.

Dans les cas où cela était réalisable, nous avons cherché à démontrer l'existence ou non d'une corrélation entre le résultat des tests obtenus et la concentration en AOD. Cela a été fait par l'utilisation du test de régression linéaire ou par le test de corrélation de Spearman, lorsque la distribution des données n'était pas normale.

III. Résultats

III.1. Efficacité du DOAC Stop

Les résultats présentés dans cette partie couvrent l'ensemble des analyses réalisées dans le cadre de ce travail. Au total, 111 patients ont été inclus pour lesquels différents tests ont pu à chaque fois être réalisés. En considérant l'ensemble des paramètres évalués, 692 comparaisons avant versus après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™ ont été réalisées soit un total de 1384 mesures. (Annexe 1, Annexe 2, Annexe 3)

Cependant, pour certains paramètres, notamment pour les comparaisons chez les patients traités par dabigatran, la taille de l'échantillon reste faible ce qui limite la représentativité statistique des résultats.

III.1.1. Hémostase de routine

- Activité Anti-Xa

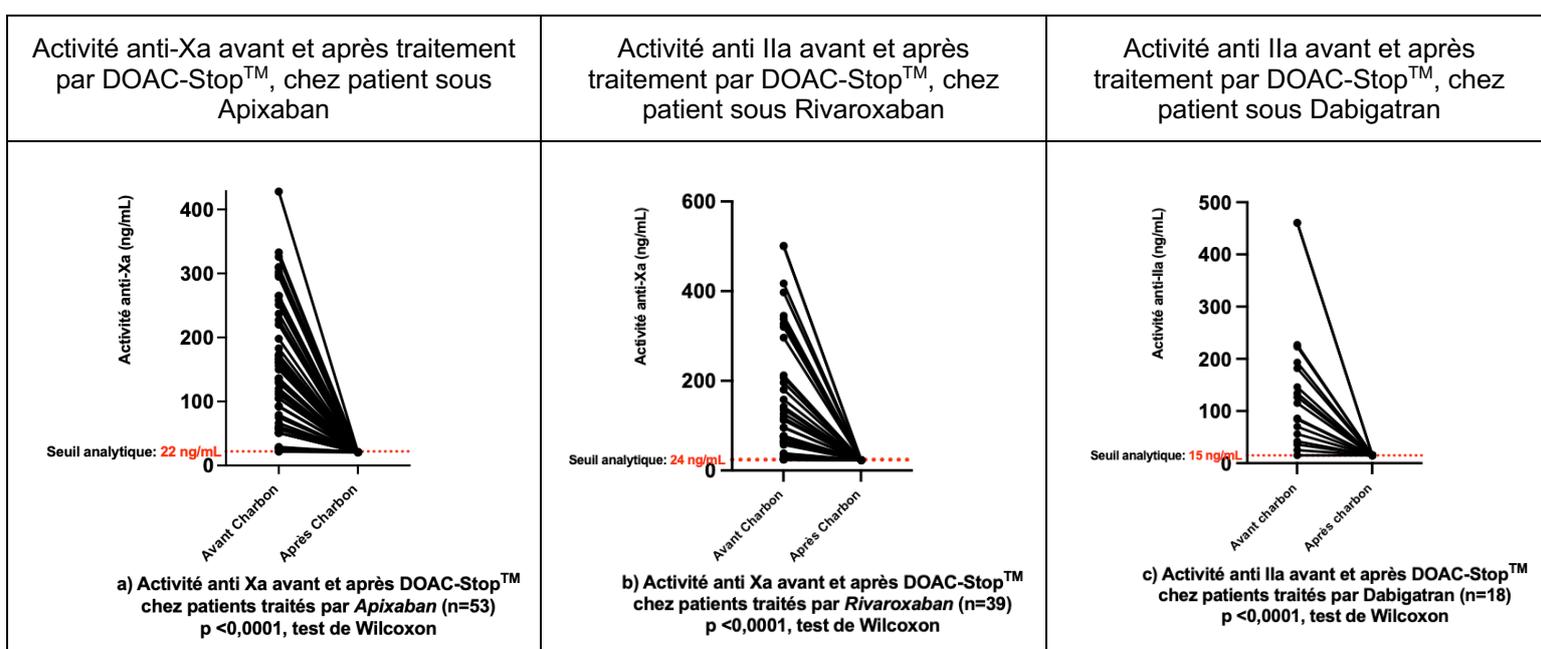


Figure 26 a/b/c : Représentations graphiques de l'impact du DOAC-Stop™ sur l'activité anti Xa en fonction de l'AOD utilisé

La comparaison des valeurs avant et après traitement par DOAC-Stop™ met en évidence, pour les trois groupes de patients – sous apixaban (n = 53), rivaroxaban (n = 39) et dabigatran (n = 18) – une diminution significative de l'activité anti-Xa ou anti-IIa, évaluée par le test de Wilcoxon pour données appariées. (Figure 26)

Il est important de souligner que, dans le cadre de notre étude, le traitement par DOAC-Stop™ a permis d'obtenir une activité anti-Xa et anti-IIa indétectable après neutralisation, quel que soit l'AOD utilisé ou la concentration initiale mesurée.

Autrement dit, dans 100% des cas, aucune activité résiduelle n'a été détectée après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™, la valeur obtenue se situant en dessous du seuil de détection (ou seuil analytique sur le graphique), définie par les recommandations fournisseur et spécifique de chaque AOD.

Pour information, les concentrations avant pré-traitement allaient de 28 à 428 ng/mL pour l'apixaban, de 28 à 501 ng/mL pour le rivaroxaban et de 25 à 461 ng/mL pour le dabigtran.

- TP

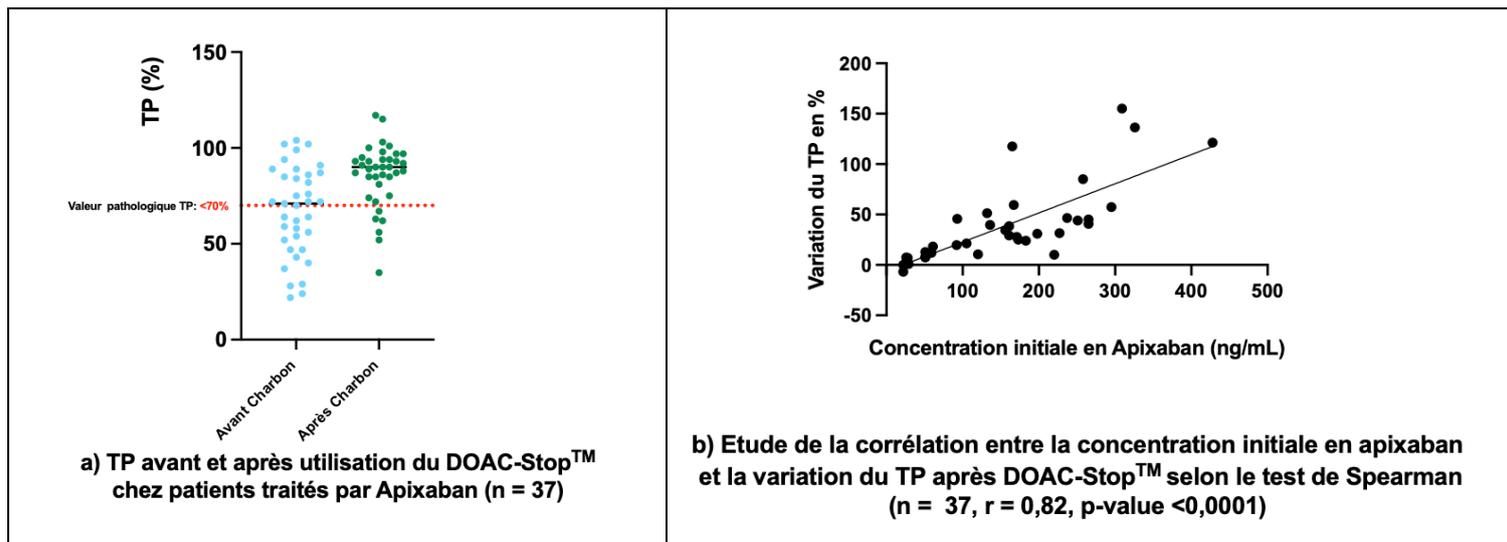


Figure 27: Impact du DOAC-Stop™ sur le TP (a) et impact de l'apixaban sur les variations du TP (b)

Pour l'**apixaban**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après DOAC-Stop™. ($p < 0,0001$ et $n = 37$).

Le DOAC-Stop™ permet une normalisation du TP. En effet, avant pré-traitement analytique, 43% des patients présentaient une valeur de TP inférieure à la normale tandis qu'après utilisation du DOAC-Stop™, seuls 16% des patients conservaient un TP diminué. (Figure 27)

Ainsi, dans cet échantillon, 27% des patients présentaient un TP sous-estimé avant traitement par DOAC-Stop™ à cause de l'interférence liée à l'apixaban.

L'étude de la corrélation réalisée à l'aide du test de corrélation de Spearman permet de montrer une corrélation positive significative ($p < 0,0001$ et $r = 0,82$) mettant en évidence l'effet concentration-dépendant de l'apixaban sur le TP.

En conclusion, avec notre échantillon, plus la concentration en apixaban est élevée, plus le TP est faussement diminué.

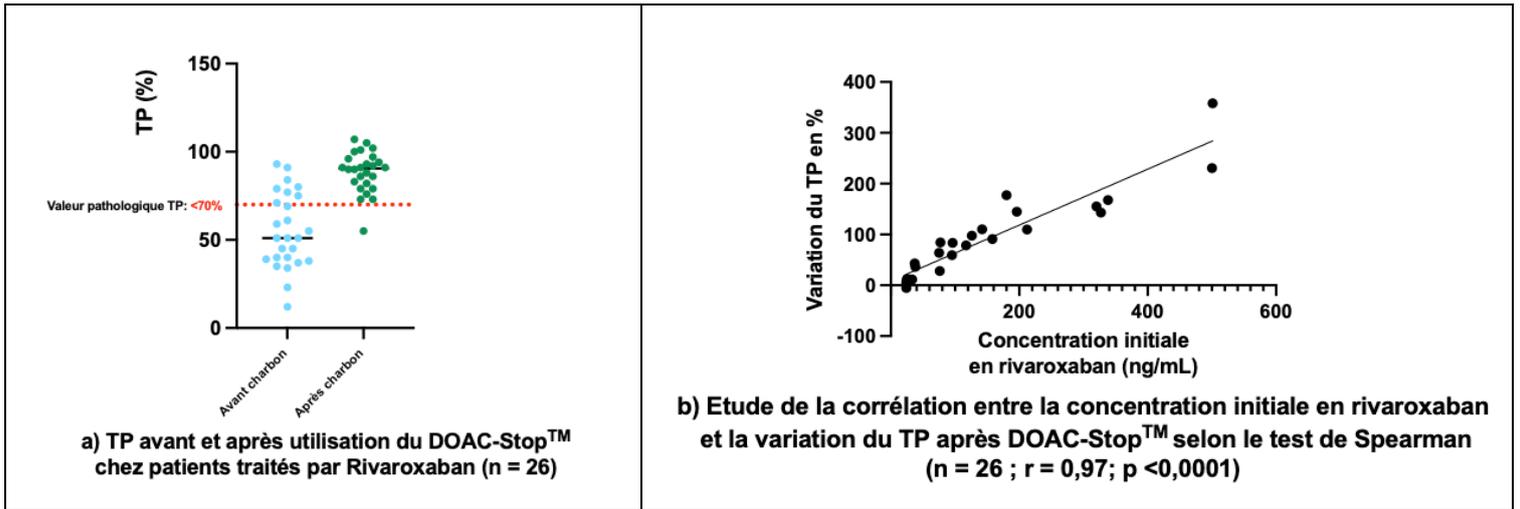


Figure 28 : Impact du DOAC-Stop™ sur le TP (a) et impact du rivaroxaban sur les variations du TP (b)

Pour le **rivaroxaban**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après DOAC-Stop™. ($p < 0,0001$ et $n = 26$).

Le DOAC-Stop™ permet une normalisation du TP. En effet, avant traitement, on observe un TP inférieur à la normale chez 69% des patients alors qu'après utilisation du DOAC-Stop™ seulement un patient ressort avec un TP inférieur à 70%. Il semble donc y avoir une forte sous-estimation du TP lorsqu'il est dosé chez un patient sous rivaroxaban. (Figure 28)

Ainsi, dans cet échantillon, 65% des patients présentaient un TP faussement diminué avant traitement par DOAC-Stop™, en raison de l'interférence liée à la présence de rivaroxaban.

L'étude de la corrélation permet de montrer une corrélation significative positive d'après le test de Spearman ($p < 0,0001$ et $r = 0,97$). Ce résultat met en évidence un effet concentration-dépendant du rivaroxaban sur le TP.

En conclusion, avec notre échantillon, plus la concentration en rivaroxaban est élevée, plus le TP est faussement abaissé.

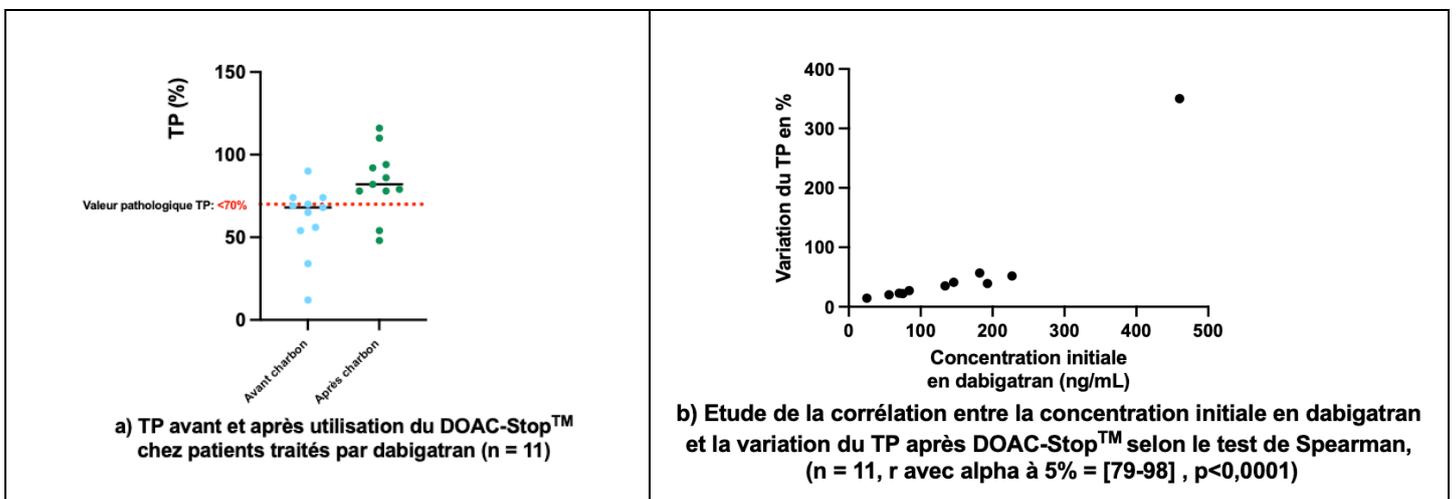


Figure 29: Impact du DOAC-Stop™ sur le TP (a) et impact du dabigatran sur les variations du TP (b)

Pour le **dabigatran**, l'interprétation reste limitée en raison de la taille réduite de l'échantillon observé.

Le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après DOAC-Stop™. ($p : 0,0010$ et $n = 11$).

Le DOAC-Stop™ semble permettre la normalisation du TP. La proportion de patients avec un TP inférieur à la normale s'élevait à 64% avant neutralisation du dabigatran par le DOAC-Stop™ contre 18% des patients après traitement. (Figure 29)

Ainsi, dans cet échantillon, 46% des patients présentaient un TP faussement diminué avant traitement par DOAC-Stop™, en raison de l'interférence due à la présence de dabigatran.

D'après l'étude de la corrélation entre la concentration initiale en dabigatran et la variation du TP après utilisation du DOAC-Stop™, il semble exister une corrélation positive du dabigatran sur le TP notamment dans la gamme de concentration allant de 0 à 200 ng/mL. Néanmoins, le faible échantillon de patient rend limite l'évaluation de la significativité de cette corrélation.

À titre informatif, sous réserve de résultats représentatifs et extrapolables, le test de corrélation de Spearman appliqué à cet échantillon de valeurs montre une corrélation positive significative entre la concentration en dabigatran et la variation de TP observée ($r = [79;98]\%$ et $p < 0,0001$), ce qui reste à confirmer sur une cohorte plus large.

- TCA

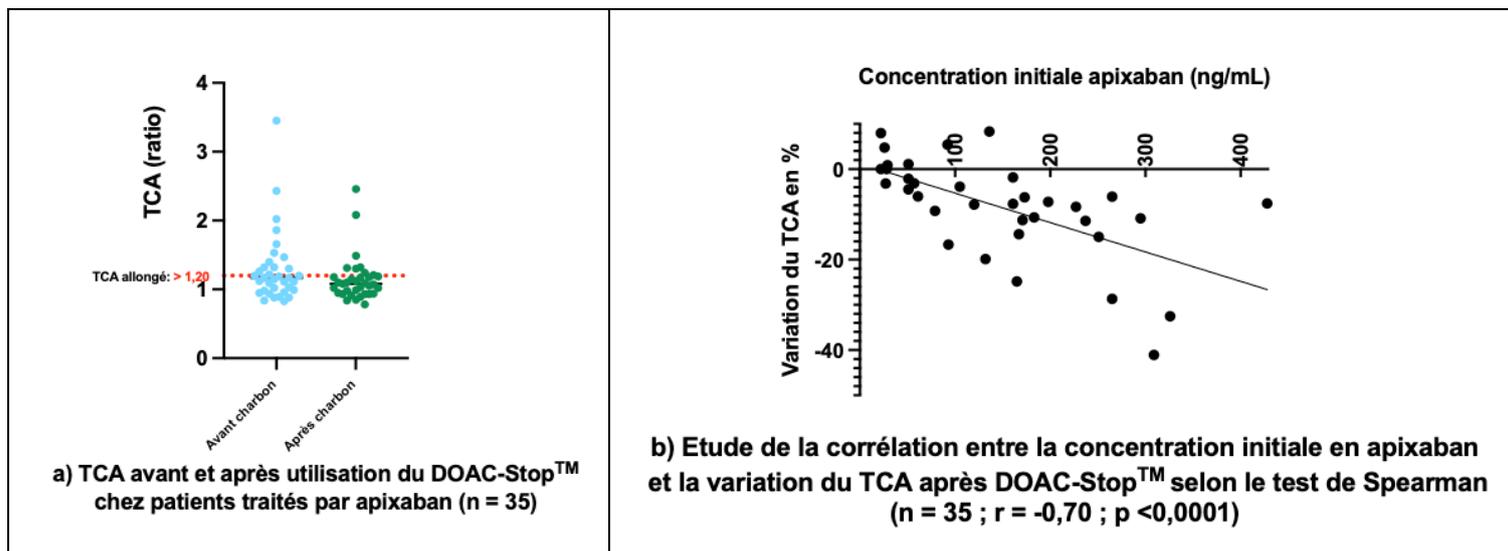


Figure 30: Impact du DOAC-Stop™ sur le TCA (a) et impact de l'apixaban sur les variations du TCA (b)

Pour l'**apixaban**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après DOAC-Stop™. ($p : <0,0001$ et $n = 35$).

Le DOAC-Stop™ permet une normalisation du TCA. En effet, avant pré-traitement analytique, 29% des patients présentaient un TCA allongé, contre 17% après utilisation du DOAC-Stop™. (Figure 30)

Ces résultats montrent une surestimation du TCA en présence d'apixaban. Toutefois, le retentissement clinique de cette interférence semble relativement modéré dans la mesure où seuls 12% des patients présentent un TCA faussement allongé attribuable à l'apixaban.

L'étude de la corrélation réalisée avec le test de Spearman, permet de montrer une corrélation significative négative de l'apixaban sur le TCA ($p < 0,0001$ et $r = -0,70$) suggérant un effet concentration dépendant de l'apixaban sur le TCA.

En conclusion, dans le cas de notre échantillon, plus la concentration en apixaban est élevée, plus le TCA est faussement allongé.

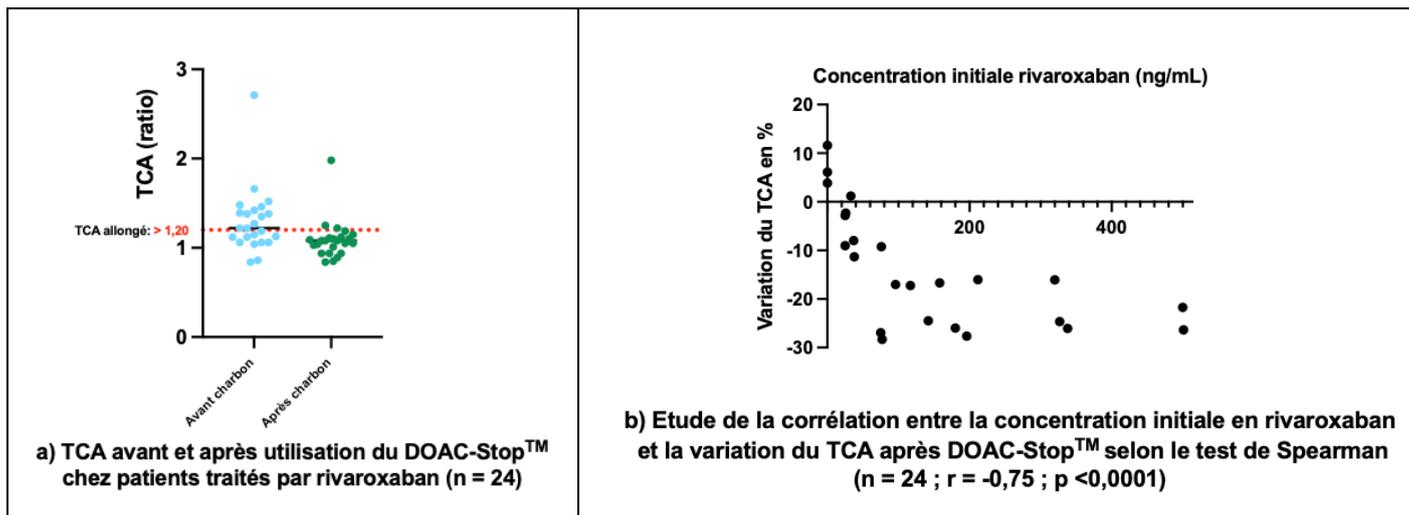


Figure 31: Impact du DOAC-Stop™ sur le TCA (a) et impact du rivaroxaban sur les variations du TCA (b)

Pour le **rivaroxaban**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après DOAC-Stop™. ($p : < 0,0001$ et $n = 24$).

Avant pré-traitement analytique, 54% des patients ont un TCA allongé, contre 12,5% après utilisation du DOAC-Stop™. Dans notre cohorte, cela montre que le rivaroxaban induit un TCA faussement allongé chez 41,5% des patients. (Figure 31)

L'étude de la corrélation entre la concentration en rivaroxaban et son impact sur le TCA semble montrer une sensibilité forte du TCA à des faibles concentrations de rivaroxaban, pour atteindre un plateau à partir de 200 ng/mL.

Le test de corrélation de Spearman nous permet de montrer une corrélation significative négative entre concentration en rivaroxaban et TCA, traduisant un effet concentration-dépendant non linéaire.

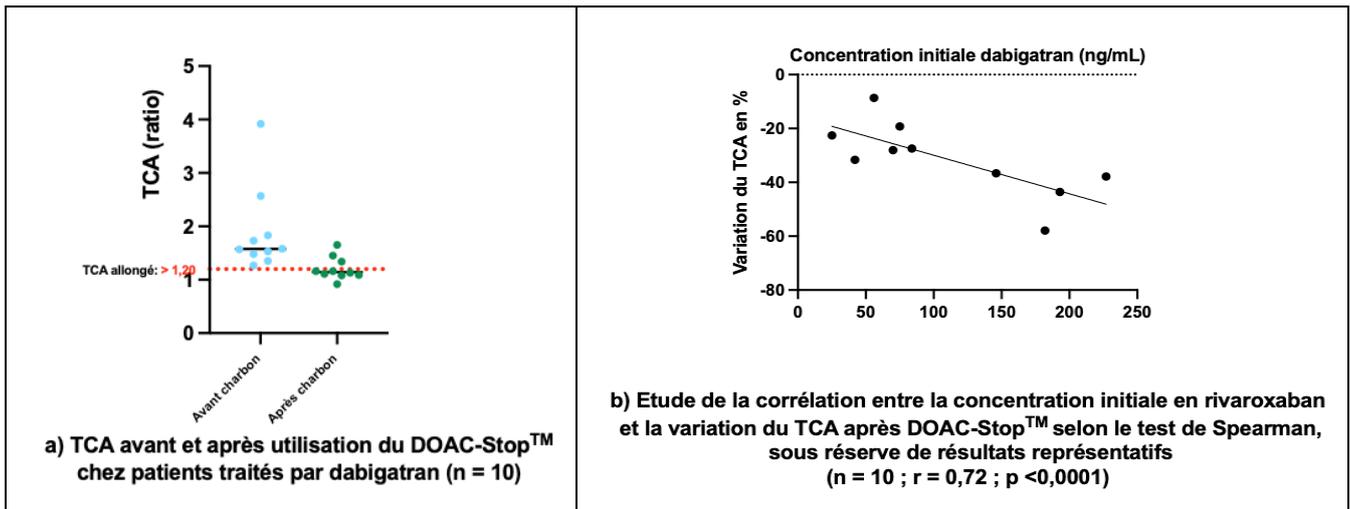


Figure 32: Impact du DOAC-Stop™ sur le TCA (a) et impact du dabigatran sur les variations du TCA (b)

Pour le **dabigatran**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après DOAC-Stop™. (p : <0,0020 et n = 10).

Avant pré-traitement analytique par DOAC-Stop™, 100% des patients présentent un TCA allongé contre 27% après pré-traitement. En supposant la représentativité de notre effectif, cela suggère que le dabigatran est responsable d'un TCA faussement allongé chez 73% des patients de notre cohorte. (Figure 32)

L'étude de corrélation réalisée à l'aide du test de Spearman permet de montrer une corrélation significative négative (r = 0,72 et p <0,0001) du dabigatran sur le TCA à l'échelle de notre échantillon.

- Facteurs de la coagulation

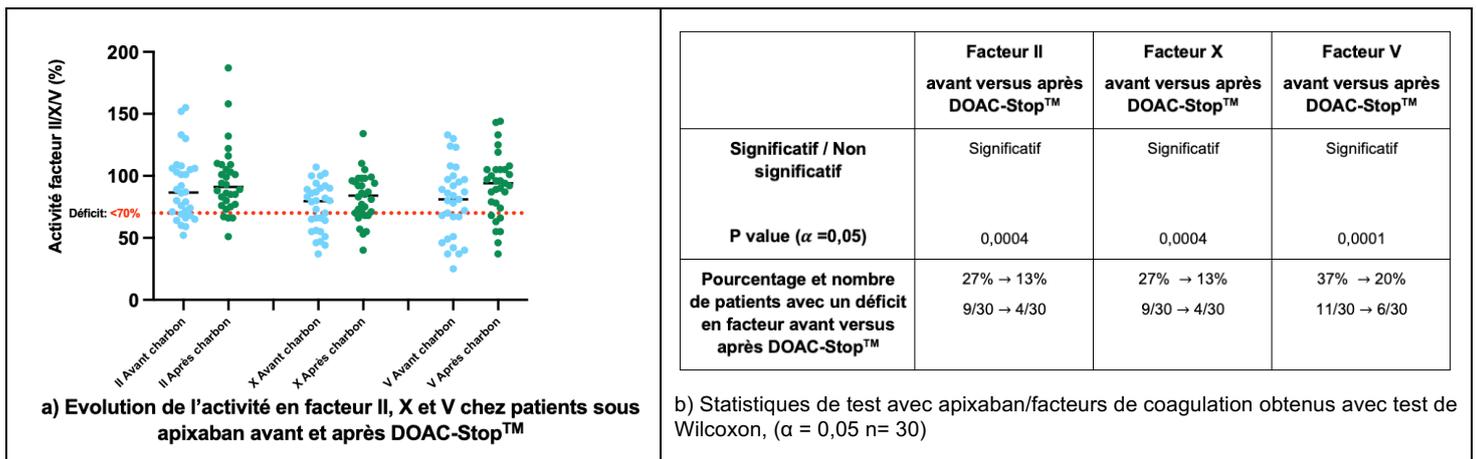


Figure 33: Évolutions (a) et statistiques de tests (b) de l'impact du DOAC-Stop™ et de l'apixaban sur les activités des facteurs II, X et V

Pour l'**apixaban**, le test de Wilcoxon sur échantillon appariés indique la présence d'une différence significative entre les activités en facteurs obtenues avant versus après utilisation

du DOAC-Stop™. Tout comme dans le cas du dosage du TP, l'apixaban induit une sous-estimation de l'activité en facteurs. Cette proportion reste néanmoins assez faible avec, dans le cas de notre échantillon, 14% de patients présentant un résultat faussement abaissé sous apixaban pour les facteurs II et X et 12% pour le facteur V. (Figure 33)

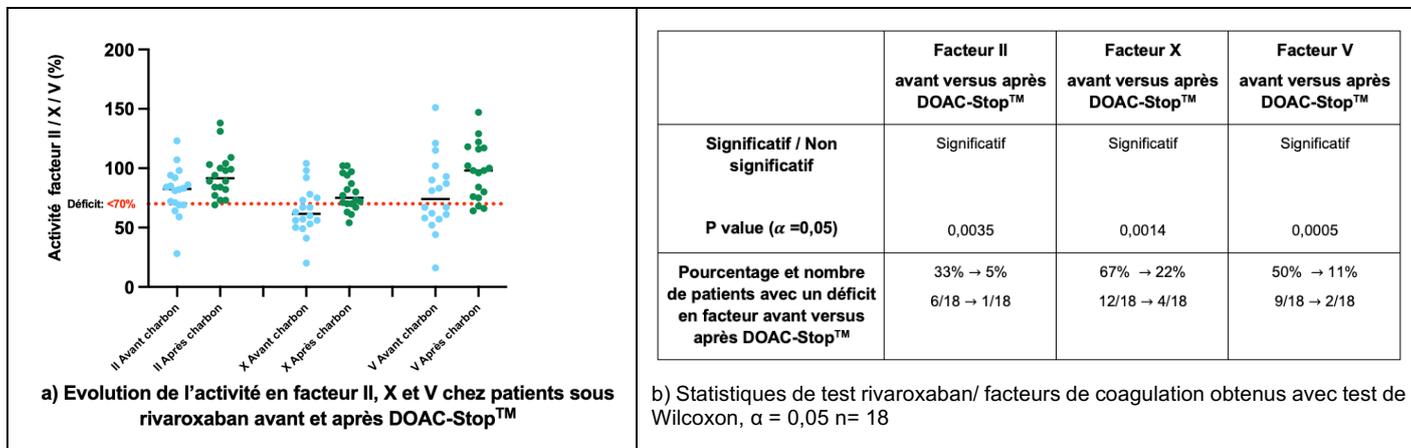


Figure 34: Évolutions (a) et statistiques (b) de tests de l'impact du DOAC-Stop™ et du rivaroxaban sur les activités des facteurs II, X et V

Pour le **rivaroxaban**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence, pour les trois facteurs, une différence significative entre les résultats obtenus avant et après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™. Le rivaroxaban est donc responsable d'une sous-estimation des activités en facteurs de la coagulation. Cet effet est marqué avec un rendu de résultat faussement abaissé sous rivaroxaban pour 27% des patients dans le cas du facteur II, 45% dans le cas du facteur X et 39% dans le cas du facteur V. (Figure 34)

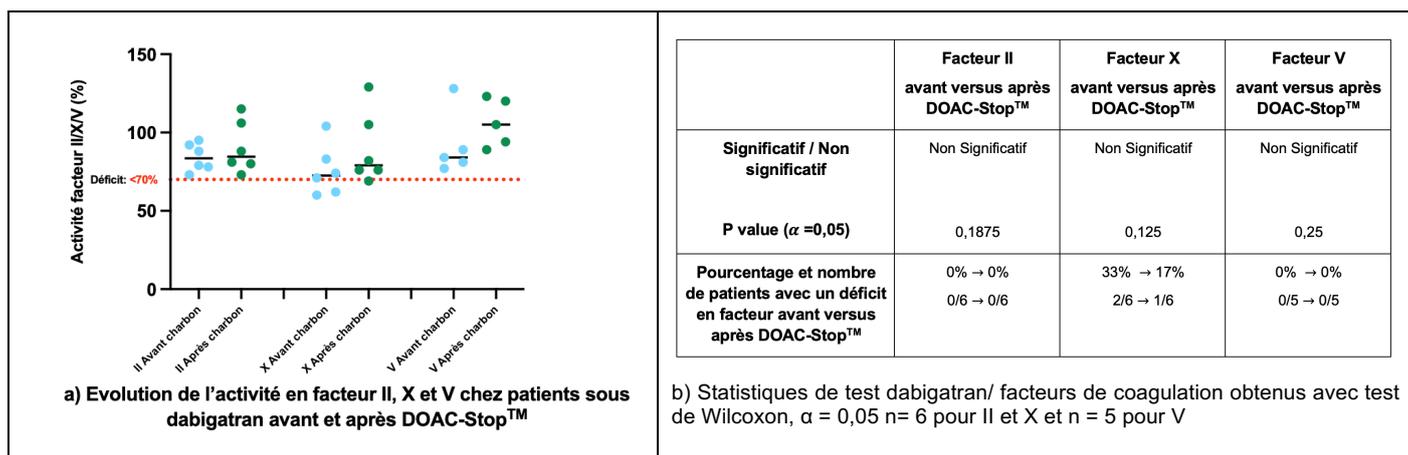


Figure 35: Évolutions (a) et statistiques (b) de tests de l'impact du DOAC-Stop™ et du dabigatran sur les activités des facteurs II, X et V

Pour le **dabigatran**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés, réalisé sur les activités en facteur II, X et V, ne met pas en évidence de différence statistiquement significative entre les valeurs d'activité en facteur obtenues avant et après traitement pré-analytique par DOAC-

Stop™. Toutefois, en raison de la taille limitée de l'échantillon, ces résultats doivent être interprétés avec prudence et mériteraient d'être recontrôlés sur une cohorte plus large. (Figure 35)

- Fibrinogène

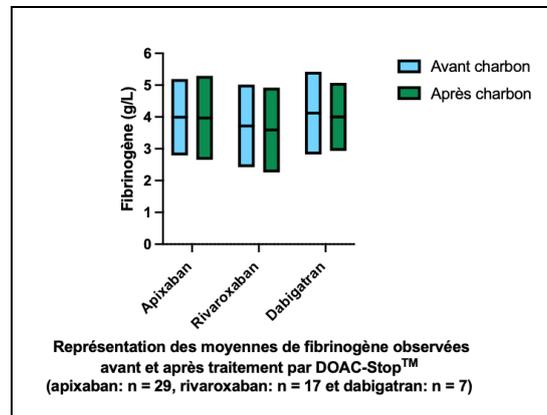


Figure 36: Graphique des moyennes observées du fibrinogène avant et après utilisation du DOAC-Stop™

Pour le **fibrinogène**, les moyennes observées avant et après traitement par DOAC-Stop™ ne présentaient pas de différence significative avec un risque $\alpha = 5\%$ selon le test de Wilcoxon sur données appariées, aussi bien chez les patients sous apixaban ($p = 0,36$, $n = 29$) que chez ceux sous dabigatran, sous réserve de la représentativité des données disponibles ($p = 0,61$, $n = 7$). L'apixaban et le dabigatran n'ont donc pas d'impact sur le dosage du fibrinogène. (Figure 36)

Chez les patients traités par rivaroxaban, une différence significative a été observée, selon le test de Wilcoxon sur échantillons appariés ($p = 0,0049$, $n = 17$) entre les valeurs de fibrinogène obtenues avant ($\mu = 3,72$ g/L) et après utilisation du DOAC-Stop™ ($\mu = 3,59$ g/L). Néanmoins, en se basant sur l'intervalle de mesure du fibrinogène calculé au laboratoire qui est de 8%, les moyennes du fibrinogène des patients sous rivaroxaban avant et après DOAC-Stop™ sont dans le même intervalle de confiance.

- Temps de Thrombine

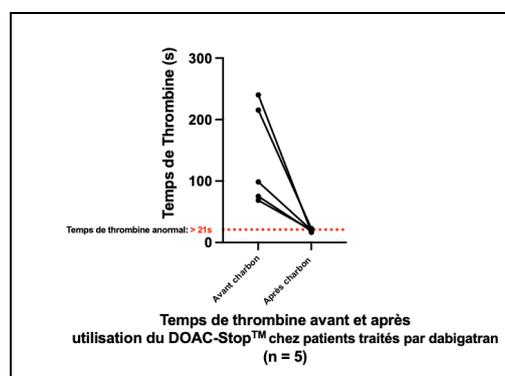


Figure 37: Représentation du temps de thrombine chez patients traités par dabigatran avant et après traitement par DOAC-Stop™

Pour le **temps de thrombine (TT)**, le DOAC-Stop™ permet, comme attendu, une correction systématique de ce paramètre chez les patients traités par dabigatran. (Figure 37)

Le dabigatran induit un allongement du TT dans 100% des cas observés et une correction de ce temps après pré-traitement analytique par DOAC-Stop™ et donc neutralisation du dabigatran. Cela confirme la spécificité du temps de thrombine envers le dabigatran.

III.1.2. Hémostase spécialisée

III.1.2.1. Recherche d'anticorps anti-phospholipides

- DRVVT Screen et DRVVT Confirm

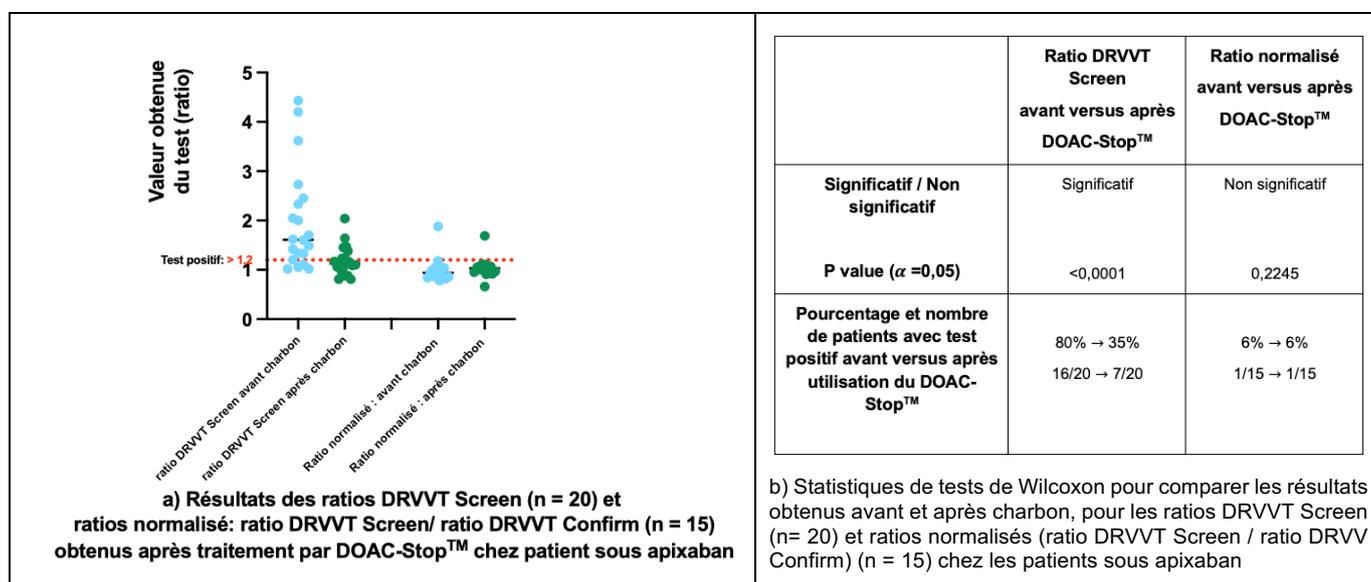


Figure 38: Représentation graphique et statistiques de tests des comparaisons des ratios DRVVT Screen et ratios normalisés obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban

Pour l'**apixaban**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés montre une différence significative ($p < 0,0001$) entre les résultats obtenus avant versus après pré-traitement par DOAC-Stop™. (Figure 38)

L'apixaban, dans notre travail, est responsable de 45% de résultats de ratio DRVVT Screen faux positifs.

Cependant, en regardant le ratio normalisé, le nombre de patients positifs avant versus après DOAC-Stop™, reste le même, soit 6% (1 patient sur 15, connu pour avoir des anticorps anti-phospholipides). Cela laisse supposer que le ratio normalisé pourrait être utilisé chez tout DRVVT Screen positif sous apixaban pour conclure sur la présence ou non d'anticorps anti-phospholipides.

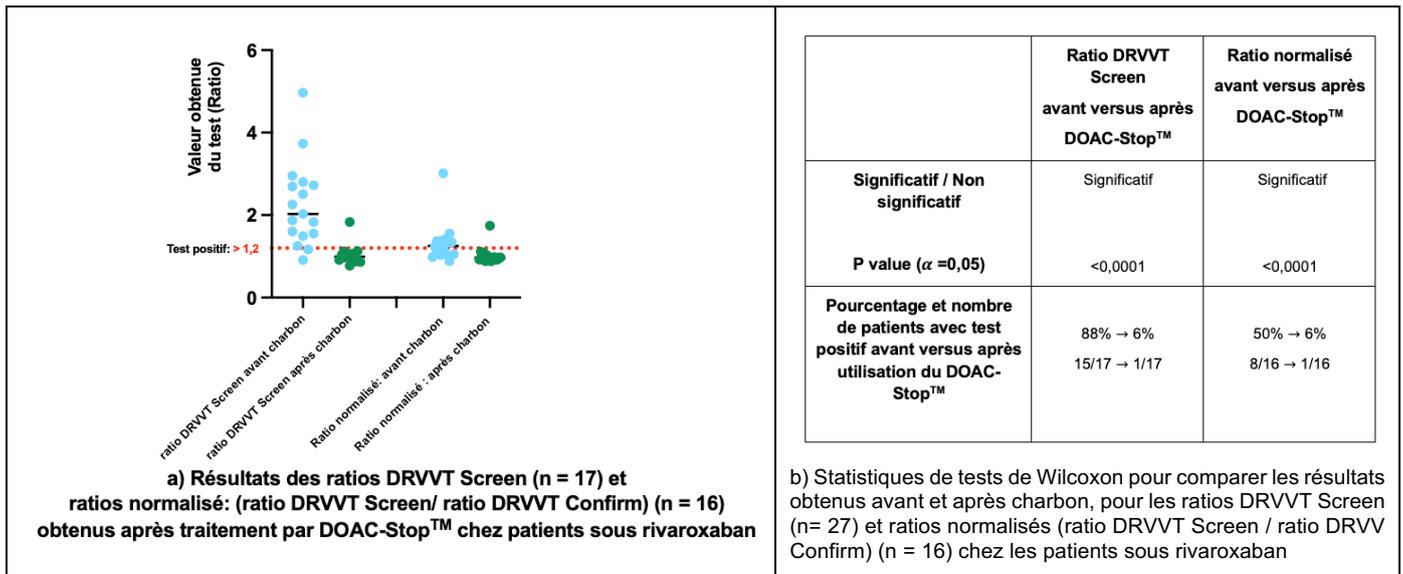


Figure 39: Représentation graphique et statistiques de tests de comparaisons des ratios DRVVT Screen et ratios normalisés obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par rivaroxaban

Pour le **rivaroxaban**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés montre une différence significative entre les résultats de DRVVT Screen obtenus avant versus après traitement par DOAC-Stop™ ($p < 0,0001$) ainsi que pour les ratios normalisés (ratio DRVVT Screen/ ratio DRVVT Confirm) ($p < 0,0001$). (Figure 39)

À l'échelle de notre échantillon, le rivaroxaban est responsable de 82% de bilans faussement positifs au niveau du ratio DRVVT Screen et 44% de bilans faussement positifs au niveau du ratio normalisé.

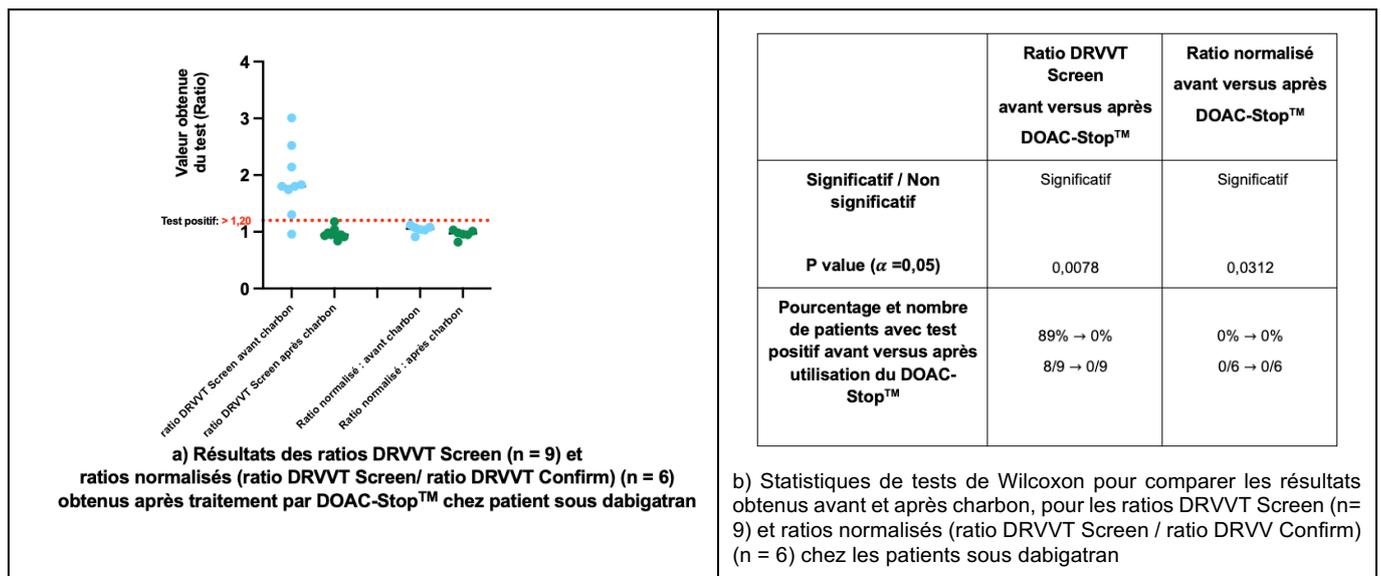


Figure 40: Représentation graphique et statistiques de test des comparaisons des ratios DRVVT Screen et normalisés obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par dabigatran

Pour le **dabigatran**, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés montre une différence significative ($p = 0,0078$) entre les résultats de DRVVT Screen obtenus avant versus après traitement par DOAC-Stop™. (Figure 40)

Le dabigatran est responsable, dans le cas de notre échantillon, d'un rendu de DRVVT Screen faussement positifs chez 88% des patients.

Dans le cas du ratio DRVVT Screen / DRVVT Confirm, il est également mis en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après DOAC-Stop™. Néanmoins, celle-ci ne semble pas avoir de répercussion clinique, avec 0% de patients rendus faussement positif en se basant sur le ratio DRVVT Screen / DRVVT Confirm.

Ces résultats, bien que suggestifs, doivent être interprétés avec prudence compte tenu de la taille réduite de l'échantillon.

- TCA sensibilisé (réactif PTT-LA)

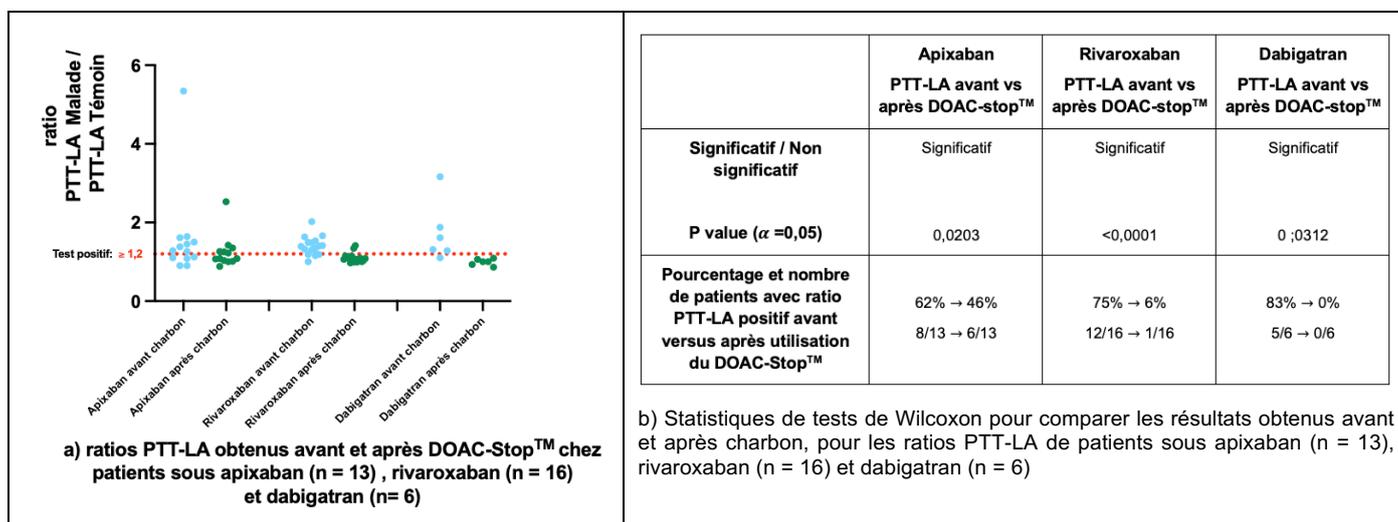


Figure 41: Représentation graphique et statistiques de test des comparaisons des PTT-LA obtenus avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran

Les résultats de PTT-LA obtenus avant versus après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™ sont significativement différents d'après le test de Wilcoxon sur échantillons appariés, et ce dans le cas des 3 anticoagulants oraux directs. (apixaban : $p = 0,0203$; rivaroxaban : $p < 0,0001$ et dabigatran : $p = 0,0312$). (Figure 41)

Ces résultats traduisent une interférence des AOD avec ce test, conduisant à des taux non négligeables de patients rendus faussement positifs par les AOD. Ce résultat de faux positifs est plus important pour le rivaroxaban (69%) et le dabigatran (83%) que pour l'apixaban (16%).

III.1.2.2. Bilan de thrombophilie

- Antithrombine

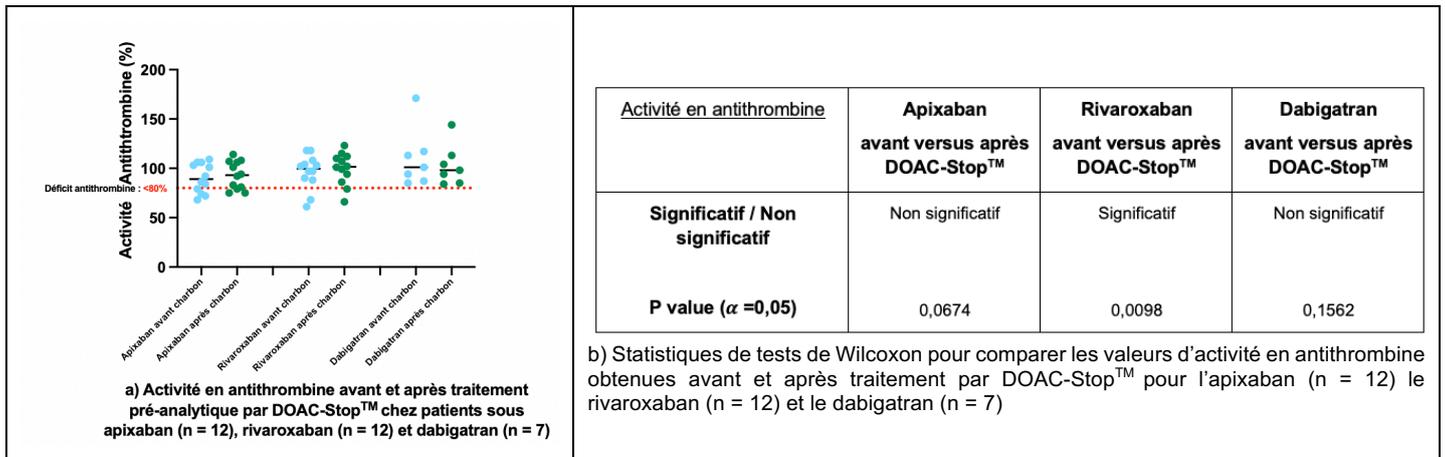


Figure 42: Représentation graphique et statistiques des tests de comparaison des activités en antithrombine obtenues avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran

Le dosage d'antithrombine semble peu influencé par la présence des différents AOD. Pour les patients sous apixaban et dabigatran, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés n'a pas montré de différences significatives (apixaban $p = 0,0674$ et dabigatran $p = 0,1562$) entre les résultats obtenus avant versus après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™. (Figure 42)

En revanche, dans le cas du rivaroxaban, le test de Wilcoxon montre une différence significative ($p = 0,0098$) entre les résultats obtenus avant versus après traitement par DOAC-Stop™. Toutefois, cette variation significative ne changeait pas l'interprétation du résultat dans notre cohorte, les activités en antithrombine basses avant DOAC-Stop™ restaient basses après DOAC-Stop™ de même que les activités en antithrombine normales avant DOAC-Stop™ restaient normales après DOAC-Stop™ (μ antithrombine avant DOAC-Stop™ = 90% et μ antithrombine après DOAC-Stop™ = 92,9% avec μ la moyenne d'activité de l'antithrombine de la cohorte).

- Protéine C

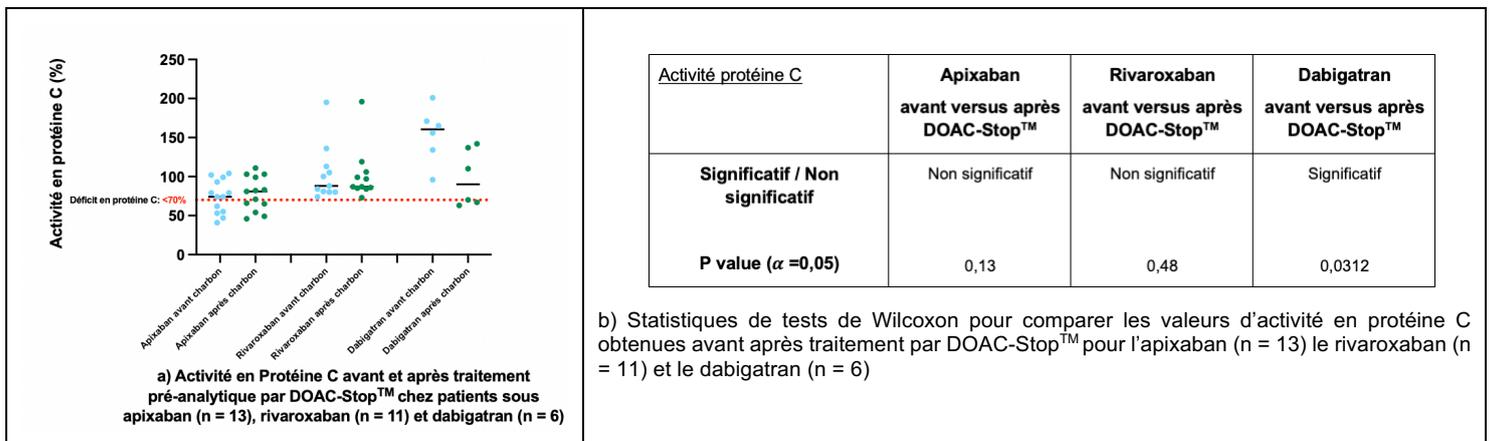


Figure 43: Représentation graphique et statistiques des tests de comparaison des activités en protéine C obtenues avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran

Dans notre travail, le dosage de l'activité de la protéine C ne semble pas être significativement influencé par la présence d'apixaban ($p = 0,13$) ou de rivaroxaban ($p = 0,48$), selon le test de Wilcoxon sur échantillons appariés. Aucune différence significative n'a été observée entre les résultats obtenus avant versus après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™. (Figure 43)

Pour le dabigatran, le test de Wilcoxon met en évidence une différence significative ($p = 0,0312$) suggérant une surestimation du dabigatran sur le dosage de l'activité de la protéine C. En effet, dans notre échantillon, les activités en protéine C étaient normales chez 100% des patients alors qu'après DOAC-Stop™, 50% des patients avaient une activité en protéine C diminuée.

Néanmoins, compte tenu du faible nombre de patients, cette observation nécessiterait d'être contrôlée sur une cohorte plus importante.

- Protéine S

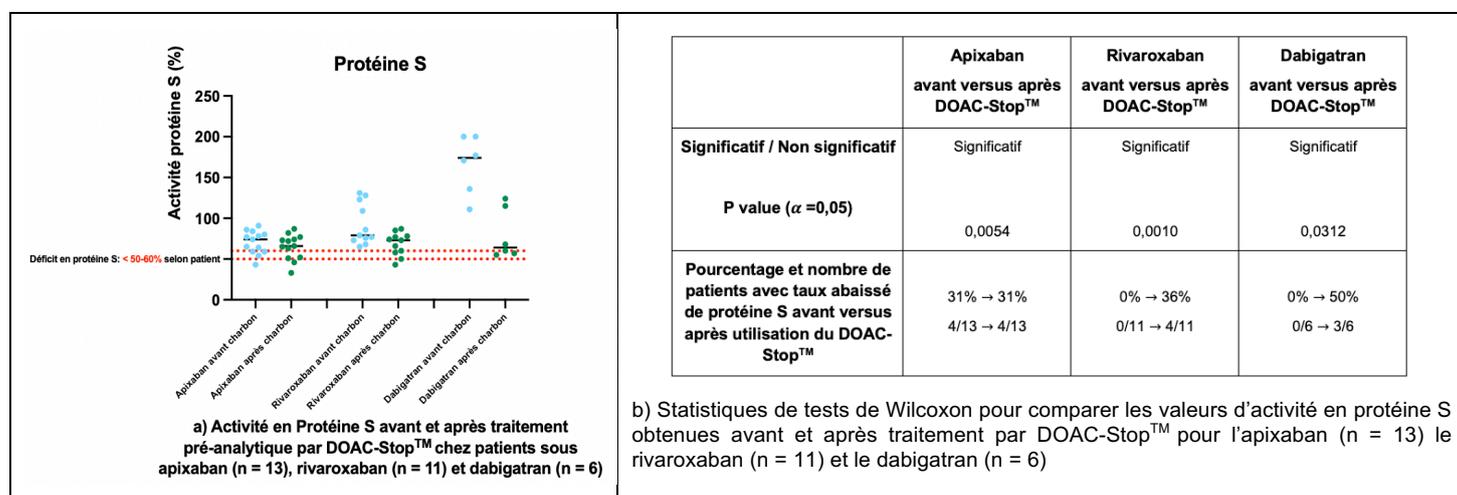


Figure 44: Représentation graphique et statistiques de tests de comparaison des activités en protéine S obtenues avant versus après DOAC-Stop™ chez les patients traités par apixaban, rivaroxaban et dabigatran

Pour la protéine S, le test de Wilcoxon sur échantillons appariés met en évidence une différence significative entre les résultats obtenus avant versus après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™ et ce pour les 3 AOD. (apixaban : $p = 0,0054$, rivaroxaban : $p = 0,0010$ et dabigatran : $p = 0,0312$) (Figure 44)

Cette interférence se traduit par une surestimation de l'activité en protéine S en présence des AOD.

Avant neutralisation, 36% des patients sous rivaroxaban et 50% des patients sous dabigatran présentaient une activité faussement normale, alors qu'elle s'avérait diminuée après utilisation du DOAC-Stop™.

IV. Discussion

IV.1. Choix des patients

La majorité des travaux publiés portant sur l'impact des différents AOD sur les tests d'hémostase repose sur des modèles expérimentaux utilisant des gammes de concentrations croissantes d'AOD ajoutées à des échantillons de plasma. Dans notre travail, le choix d'utiliser les plasmas de patients issus de la vie réelle avec des plasmas déjà imprégnés d'AOD s'inscrit dans un but complémentaire de cette méthode. Dans une optique de mise en place d'un protocole de traitement pré-analytique des échantillons, il semblait pertinent d'utiliser directement des échantillons issus de la routine.

Ces patients traités par AOD à dose thérapeutique ou préventive reflètent les situations auxquelles seront confrontées les biologistes et les techniciens à l'avenir. Cette approche permettait également d'adapter le protocole au niveau du laboratoire (contraintes matérielles...) afin d'anticiper son intégration dans la routine.

L'objectif principal était dans un premier temps d'évaluer la praticabilité et l'efficacité du DOAC-Stop™ dans les conditions représentatives de la pratique courante, et dans un second temps, d'observer l'impact des différents AOD sur les tests d'hémostase perturbés. Ce choix offre ainsi une forte valeur pratique mais s'accompagne de certaines limites. En effet, nous étions dépendant des prescriptions qui sont plus ou moins fréquentes en fonction de l'AOD, notamment pour le dabigatran dont l'utilisation reste moins fréquente que le rivaroxaban ou l'apixaban.(84,85)

IV.2. Analyse des résultats

Les dosages de l'activité anti-Xa (pour l'apixaban et le rivaroxaban) et de l'activité anti-IIa (pour le dabigatran) constituaient les tests centraux de notre travail afin de démontrer l'effet de neutralisation du DOAC-Stop™ sur les AOD.

Nos résultats ont montré une diminution significative de ces activités avant et après traitement pré-analytique, avec des valeurs devenues inférieures au seuil de détection dans 100% des cas. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature qui rapportent une efficacité de neutralisation du DOAC-Stop™ comprise entre 95% et 100% selon les molécules. (76,86,87)

Ce seuil de détection est spécifique de chaque AOD et définit par le fabricant : 22 ng/mL pour l'apixaban, 24 ng/mL pour le rivaroxaban et 15 ng/mL pour le dabigatran. Il est à noter que d'un point de vue clinique, une concentration inférieure à 30 ng/mL est généralement considérée comme cliniquement non significative, ne nécessitant pas d'antidote en cas d'urgence hémorragique ou de geste invasif. (88,89)

Ces données confirment les études déjà réalisées et montrent que le DOAC-Stop™ permet une élimination efficace des AOD présents dans les échantillons rendant possible une interprétation des bilans d'hémostase réalisés chez les patients traités par AOD sans nécessiter de fenêtre thérapeutique ou de relais par HBPM.

La démonstration de cette efficacité, nous a ensuite permis d'étudier l'impact analytique des AOD sur les tests d'hémostase, en comparant les mêmes plasmas avant et après neutralisation, c'est-à-dire en présence d'AOD versus en l'absence d'AOD quantifiable.

IV.2.1. Hémostase de routine

Pour le **TP et le TCA**, les différences entre les valeurs obtenues avant versus après traitement pré-analytique par DOAC-Stop™ se révèlent toutes significatives, quelle que soit la molécule étudiée. Le rivaroxaban apparaît comme ayant l'effet le plus important sur le TP, tout comme le dabigatran avec le TCA, ce qui rejoint la littérature existante sur les différents profils d'impact des AOD sur ces paramètres (60,64,90–93). L'apixaban présente un effet plus faible sur le TP et le TCA avec des pourcentages de patients sous-estimés (pour le TP) ou surestimés (pour le TCA) plus faibles que le dabigatran ou l'apixaban.

Le dabigatran montre un profil de variation différentiel avec un impact plus important sur le TCA que le TP à des concentrations équivalentes. À l'inverse, le rivaroxaban exerce un effet prédominant sur le TP. Cette différence est cohérente avec leurs mécanismes d'actions respectifs. Le dabigatran est un inhibiteur direct de la thrombine (anti-IIa) agissant en aval de la cascade de coagulation, ce qui allonge le TCA ainsi que le temps de thrombine. Le rivaroxaban est un inhibiteur du facteur Xa (anti-Xa), intervenant plus en amont dans la voie commune, ce qui affecte principalement le TP.

Enfin, les tests de corrélation se montrent tous significatifs et confirment l'existence d'une relation concentration effet entre AOD et résultat du test.

Pour les **facteurs de la coagulation II, X et V**, les différences observées avant versus après pré-traitement analytique par DOAC-Stop™ se révèlent toutes significatives pour l'apixaban et le rivaroxaban.

Ces sous-estimations sont liées à la présence de l'AOD qui induit des interférences dépendantes de la molécule, du type de réactif utilisé, du couple automate-réactif, mais également de la technique elle-même. Les dosages des facteurs de la coagulation sont réalisés après dilution du plasma au 1/10^{ème}, ce qui peut théoriquement diminuer la sensibilité du test à l'effet des AOD mais n'empêche pas les autres interférences.

L'impact des AOD vis-à-vis des facteurs varie selon la molécule utilisée. Le rivaroxaban, semble avoir un effet plus important avec des facteurs faussement diminués allant de 27% des patients pour le facteur II à 45% des patients pour le facteur X. En comparaison, l'apixaban semble avoir un impact moins important avec des facteurs faussement diminués dans 14% des cas pour les facteurs II et X et 12% des cas pour les facteurs V. Cela vient renforcer l'hypothèse d'un impact analytique plus important du rivaroxaban sur les tests de coagulation, en lien notamment avec ses caractéristiques pharmacodynamiques.

Aucune différence significative n'est observée entre le dabigatran et les dosages de facteurs de la coagulation obtenus avant versus après pré-traitement par DOAC-Stop™. Cette observation s'étant faite sur un échantillon restreint, elle mériterait d'être contrôlée sur une cohorte plus importante afin de confirmer l'impact du dabigatran sur les facteurs de la coagulation normalement retrouvé dans la littérature (94,95).

Pour conclure sur les facteurs de la coagulation, nos observations sur les impacts de l'apixaban et du rivaroxaban rejoignent la littérature existante (96) tandis que celles sur le dabigatran semblent différer mais restent à contrôler sur un nombre de patients plus important.

Le **fibrinogène** est un paramètre normalement insensible à la présence d'AOD lorsqu'il est mesuré avec la méthode de Von Clauss. Néanmoins, il a été montré dans certaines études qu'en fonction des réactifs utilisés le fibrinogène pouvait être faiblement sous-estimé par le dabigatran (90,91).

Dans le cadre de notre travail, nous n'observons pas de différence significative entre les moyennes de fibrinogène mesurées avant versus après DOAC-Stop™ dans les groupes de patients traités par apixaban et dabigatran, ce qui est en accord avec la littérature.

En revanche, dans le groupe de patients sous rivaroxaban, la différence entre les moyennes observées avant versus après DOAC-Stop™ s'avère significative. Cette observation doit cependant être interprétée avec prudence, d'une part, la taille de l'échantillon reste faible et d'autre part l'écart observé reste minime. Lorsque les résultats sont analysés à l'aide des incertitudes de mesures calculées au laboratoire, les moyennes obtenues avant et après pré-traitement analytiques restent situées dans les mêmes intervalles de confiance.

L'analyse de ce paramètre mériterait d'être contrôlée sur un échantillon plus large afin de confirmer une potentielle sous-estimation du fibrinogène en présence de dabigatran ainsi que l'absence de l'impact du rivaroxaban sur le fibrinogène.

Pour conclure sur le fibrinogène, les AOD n'ont pas d'impact significatif sur l'interprétation clinique des résultats avec notre couple réactif-automate.

Le **temps de thrombine (TT)** est un test global sensible aux inhibiteurs de thrombine. Il est utilisé dans certains laboratoires pour détecter la présence de dabigatran, dans le cas où le dosage quantitatif n'est pas disponible. Il existe deux types de quantification de la concentration plasmatique du dabigatran dont une basée sur le test de temps de thrombine dilué.

Il constitue donc, au même titre que l'activité anti-IIa, un test « témoin » pour confirmer la neutralisation totale du dabigatran pour le DOAC-Stop™. Les résultats obtenus pour le TT confirment ceux observés avec l'activité anti-IIa : 100% des échantillons présentaient un temps de thrombine prolongé (> 21 secondes) avant pré-traitement analytique, traduisant la présence de dabigatran. Après traitement par le DOAC-Stop™, 100% des TT sont redevenus normaux, indiquant probablement une neutralisation complète du médicament.

Ces résultats concordent avec les données de la littérature qui montrent que le dabigatran prolonge significativement le temps de thrombine, y compris à de faibles concentrations. En effet, des études ont démontré qu'une concentration aussi basse que 25 ng/mL peut suffire à allonger le TT, en fonction du réactif utilisé. (97)

IV.2.2. Hémostase spécialisée

- Recherche d'anticorps anti-phospholipides

Les tests utilisés dans la recherche d'anticorps anti-phospholipides (APL) sont connus pour leur sensibilité aux AOD entraînant un rendu de résultats faussement positifs. Ce travail nous

a permis de mettre en évidence cette problématique, en cohérence avec les données de la littérature.(98–106)

Les **ratios DRVVT Screen** obtenus dans les trois différents groupes étaient significativement différents avant versus après DOAC-Stop™. Comme pour le TP et le TCA, le rivaroxaban et le dabigatran étaient responsables du plus grand nombre de faux positifs 82% et 88% respectivement par rapport à l'apixaban (35%).

Pour le **TCA sensibilisé**, réalisé avec le réactif PTT-LA, l'impact est également plus important pour le rivaroxaban et le dabigatran avec 69% et 83% de résultats faussement pathologiques respectivement tandis que pour l'apixaban nous retrouvons 16% de patients faussement positifs, ce qui rejoint également la littérature existante. (107)

L'analyse du **ratio normalisé** (Ratio DRVVT Screen / Ratio DRVVT Confirm) apporte un éclairage complémentaire. Pour les patients sous apixaban et dabigatran, ce ratio semble compenser l'effet de l'AOD : les proportions de résultats pathologiques restent similaires avant et après traitement des échantillons par DOAC-Stop™, suggérant que ce ratio pourrait être moins influencé par la présence d'un AOD. Par exemple, pour le groupe apixaban, le seul patient présentant un ratio normalisé pathologique avant et après DOAC-Stop™ est un patient connu pour avoir des anticorps anti-phospholipides.

En revanche, sous rivaroxaban, le ratio normalisé reste sensible à la présence d'AOD avec 44% de patients présentant des résultats faussement positifs. Ces résultats confirment l'intérêt de l'utilisation du DOAC-Stop™ dans le cadre de la recherche d'anticorps anti-phospholipides.

- Bilan de thrombophilie

D'après les observations de la littérature, les AOD sont censés surestimer les activités en protéine C et S et ne pas avoir d'impact sur le dosage de l'antithrombine en fonction de la méthode de dosage utilisée pour cette dernière. (58,74,87,108)

La mesure de l'**antithrombine** utilisée au laboratoire repose sur une méthode chromogénique utilisant une quantité fixe et en excès de thrombine en présence d'héparine. La quantité de thrombine neutralisée est proportionnelle à la quantité d'antithrombine présente dans le plasma. Cette technique de dosage est donc sensible à la présence de dabigatran mais insensible à l'apixaban et au rivaroxaban.

Chez les patients traités par apixaban, nous n'avons pas observé de différence significative entre les valeurs mesurées avant et après pré-traitement par le DOAC-Stop™, ce qui concorde avec les données de la littérature. En revanche chez les patients sous rivaroxaban, une différence statistiquement significative a été mise en évidence. Toutefois, cette variation reste contenue dans les intervalles de mesures calculés au laboratoire pour ce test, et ne présente pas de conséquences sur l'interprétation biologique : les patients ayant une antithrombine basse restaient classés comme tels après DOAC-Stop™, tout comme les patients avec une activité normale.

Concernant le dabigatran, aucune différence significative n'a été mise en évidence alors que cet AOD est connu pour être responsable d'une surestimation de l'activité de l'antithrombine. Cette absence de différence significative peut s'expliquer par le nombre réduit de patients, limitant la puissance de l'analyse. Cependant, l'observation des moyennes avant ($\mu = 109,7\%$) et après ($\mu = 103\%$) DOAC-Stop™ suggère une légère diminution de l'activité mesurée, ce qui

pourrait traduire une légère surestimation en présence de dabigatran. Cela n'a pas d'impact au laboratoire car du fait de notre technique utilisée, nous ne réalisons jamais le dosage d'antithrombine chez les patients sous dabigatran.

Pour la **protéine C**, les AOD sont censés être responsables d'une surestimation de son activité.

Dans le cadre de notre travail, une différence significative a été observée entre les moyennes observées avant et après DOAC-Stop™ pour les patients sous dabigatran ce qui rejoint les données de la littérature.

En revanche, aucune différence significative n'a été retrouvée chez les patients sous apixaban ou rivaroxaban à l'échelle de notre travail. À ce stade, aucune explication claire ne peut être avancée pour cette observation, toutefois, il convient de noter que les analyses n'ont pas pu être répétées par manque de réactifs ou de volume d'échantillons, dans le cas où une relance aurait pu être intéressante pour confirmer cette observation. Il serait donc pertinent de reconduire cette analyse sur une cohorte de patients plus large, afin de déterminer s'il s'agit d'une particularité de notre série ou d'un résultat plus généralisable. Cela permettrait de confirmer ou d'infirmer les conclusions que nous observons dans la littérature.

Il convient de rappeler que les tests ont été réalisés après neutralisation complète des AOD, comme en atteste l'activité anti-Xa indétectable. Nous pouvons donc considérer que les résultats obtenus après traitement par le DOAC-Stop™ reflètent fidèlement l'activité réelle de la protéine C chez ces patients.

Pour la **protéine S**, les trois AOD étudiés ont induit une différence significative entre les activités mesurées avant et après pré-traitement par DOAC-Stop™ avec un impact différent selon la molécule.

Pour le rivaroxaban, et le dabigatran, les résultats montrent une surestimation de l'activité de la protéine S par ces molécules entraînant un masquage du déficit chez respectivement 36% et 50% de patients.

En revanche, dans le cas de l'apixaban, bien qu'une différence statistique ait été observée, elle n'a pas modifié l'interprétation biologique : les patients présentant une activité en protéine S basse avant DOAC-Stop™ le restaient après, suggérant l'impact limité de l'apixaban sur ce dosage.

Ces résultats concordent avec les données de la littérature, qui rapportent également la surestimation de l'activité de la protéine S en présence d'AOD ce qui souligne l'utilité d'un traitement pré-analytique pouvant neutraliser ces AOD.

IV.2.3. Quelques cas particuliers

Notre travail a permis de faire remonter des situations particulières, intéressantes pour justifier la mise en routine d'une méthode de neutralisation des AOD.

- Patiente connue pour un diagnostic d'anticorps anti-phospholipides

Le but principal de notre travail était de démontrer la neutralisation complète des AOD responsables de bilans faussement pathologiques. Il nous semblait également pertinent d'évaluer la situation inverse, un bilan réellement pathologique sous AOD afin de vérifier que l'utilisation du DOAC-Stop™ ne masquait pas une réelle pathologie sous-jacente.

Un tel cas a pu être identifié dans le groupe traité par apixaban : une patiente connue pour être porteuse d'anticorps anti-phospholipides, avec un bilan antérieur, sans prise d'AOD documentée. Dans ce contexte, nous nous attendions à observer après traitement par DOAC-Stop™, une disparition des interférences liées à l'AOD, tout en conservant les anomalies liées à la pathologie. (Tableau 12)

Les résultats observés ont confirmé cette hypothèse. Après neutralisation de l'apixaban, les paramètres perturbés en liens avec l'effet de l'AOD, comme le TP et les facteurs II, X et V (ces deux derniers restant légèrement en dessous de la valeur seuil de 70%), se sont normalisés après DOAC-Stop™.

En revanche, les anomalies caractéristiques de la présence d'anticorps anti-phospholipides, à savoir le TCA, le ratio DRVVT Screen, le ratio normalisé et le TCA sensibilisé, sont restées pathologiques. L'interprétation de la recherche d'APL devient alors possible sous AOD, contrairement à la situation actuelle où ces bilans sont rendus ininterprétables imposant le recours à une fenêtre thérapeutique.

Tableau 12: Résultats biologiques d'une patiente porteuse d'anticorps anti-phospholipides, sous apixaban, avant et après utilisation du DOAC-Stop™, avec les valeurs pathologiques surlignées

	Anti-Xa (ng/mL)	TCA (ratio)	TP (%)	II (%)	X (%)	V (%)	Ratio DRVVT Screen	Ratio normalisé	TCA sensibilisé (ratio)
Avant DOAC- Stop™	167	2,43	47	69	56	51	4,2	1,88	5,34
Après DOAC- Stop™	<23	2,08	75	77	66	66	2,04	1,69	2,53

- Bilan de routine perturbé même en absence d'AOD

Ce postulat est également intéressant à vérifier dans un contexte d'hémostase de routine. En pratique courante, les dosages de facteurs de la coagulation des patients sous AOD ne sont pas réalisés et rendus ininterprétables en raison des interférences connues. Néanmoins, certains patients peuvent présenter de véritables déficits en facteurs de coagulation, masqués par la présence d'AOD rendant le diagnostic plus complexe. Dans ces situations, les résultats des tests globaux d'hémostase apparaissent discordants en regard du type ou de la concentration d'AOD observé, laissant suspecter l'existence d'un trouble sous-jacent.

Il a donc été intéressant d'illustrer cette situation par un cas concret. Le patient présenté dans le tableau ci-dessous en est l'exemple. Sous apixaban, son TP était très abaissé, bien en dessous des valeurs de TP habituellement observées chez les patients sous apixaban, même

à forte concentration. Après neutralisation de l'AOD par le DOAC-Stop™, le TP et les facteurs de la coagulation sont restés effondrés, confirmant un déficit réel et la présence d'une pathologie sous-jacente. (Tableau 13)

La consultation du dossier médical a révélé un sepsis, compatible avec les anomalies observées. Dans ce contexte, la neutralisation de l'apixaban aurait permis de confirmer le déficit réel et de poursuivre l'exploration de l'hémostase, notamment à la recherche d'une coagulation intravasculaire disséminée.

Ce cas souligne l'intérêt de disposer d'un outil de neutralisation comme le DOAC-Stop™ dans certaines situations de routine, lorsque les résultats sont discordants ou fortement perturbés, afin de ne pas négliger une potentielle pathologie sous-jacente.

Tableau 13: Exploration d'un patient avec bilan perturbé même après DOAC-Stop™ avec les valeurs pathologiques surlignées

	Anti-Xa (ng/mL)	TCA (Ratio)	TP (%)	II (%)	X (%)	V (%)	Fibrinogène (g/L)
Avant DOAC- Stop™	93	1,32	24	52	37	42	2,77
Après DOAC- Stop™	<23	1,10	35	51	40	46	2,66

IV.3. Aspects économiques et indications potentielles

Le prix d'achat d'un flacon de 100 comprimés de DOAC-Stop™ est de 326€ HT, ramenant ainsi le prix d'un comprimé à 3,26€ HT. Ce coût, bien que relativement modeste devient un facteur limitant lorsqu'on envisage une utilisation systématique en routine.

En effet, au vu de la fréquence élevée des demandes de bilans d'hémostase standard sous AOD (environ une dizaine de patients par jour), et compte tenu du coût actuel de ces examens, l'ajout systématique de DOAC-Stop™ ajouterait un coût supérieur au coût de l'analyse elle-même. Par ailleurs, la majorité de ces bilans standards restent interprétables en présence d'un AOD, dès lors que le traitement est correctement renseigné et que les cliniciens et biologistes en tiennent compte dans l'interprétation.

Il pourrait cependant être pertinent, dans certaines situations de routine, d'envisager l'utilisation du DOAC-Stop™ de manière ciblée, notamment lorsque les résultats apparaissent fortement perturbés, discordants par rapport à la posologie du traitement, le délai entre la dernière heure d'administration ou lorsqu'ils sont cliniquement inattendus malgré des posologies en accord avec les recommandations. Dans ces cas, un avis d'un biologiste

spécialisé permettrait d'orienter une neutralisation ciblée à la recherche d'une anomalie sous-jacente comme un déficit en facteur de la coagulation ou un TCA prolongé inexplicé.

En revanche, pour les bilans d'hémostase spécialisés, plus coûteux, moins fréquemment prescrits, et ayant un impact direct sur le diagnostic et la prise en charge du patient, l'utilisation systématique du DOAC-Stop™ apparaît justifiée.

IV.4. Limites du travail

Il existe néanmoins plusieurs limites à ce travail :

Une première limite majeure de ce travail réside dans le choix méthodologique d'utiliser des échantillons issus de la routine, afin de se rapprocher au maximum des conditions réelles d'utilisation du DOAC-Stop™. Ce choix, bien que complémentaire des approches habituelles nous a rendus dépendants des prescriptions médicales. En effet, les cliniciens sont au fait qu'un certain nombre de bilans d'hémostase ne peuvent être interprétés sous AOD, ce qui limite la fréquence des prélèvements réalisés sous traitement. Par ailleurs, les AOD ne sont pas prescrits de manière homogène en pratique courante : l'apixaban est très largement utilisé, suivi du rivaroxaban, tandis que le dabigatran reste plus rarement prescrit. Le choix de prendre des patients reflétant la prescription en vie réelle a donc limité le nombre de patients pouvant être inclus sous dabigatran, et explique, pour certains tests, le faible effectif de ce sous-groupe, rendant certaines comparaisons plus fragiles. L'ensemble de ces éléments contribue à limiter la portée de certaines observations, en particulier lorsque nos résultats s'écartent de ceux rapportés dans la littérature. Il serait donc pertinent de reconduire ces analyses sur des cohortes plus larges afin de confirmer ou nuancer nos conclusions.

Une deuxième limite de cette étude réside dans le fait que nous nous sommes volontairement concentrés sur les tests connus pour être sensibles à la présence d'AOD. Dans certains cas étudiés, notamment les recherches de déficit en protéine C, S ou en antithrombine, des examens complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer la présence réelle d'un déficit biologique. Par ailleurs, certains facteurs biologiques susceptibles d'interférer avec ces dosages, comme une élévation du facteur VIII ou de la protéine C réactive (CRP), n'ont pas été mesurés. Leur présence, pourrait expliquer dans certains cas, des variations ou des incohérences observées.

Malgré ces limitations, nos observations restent en grande partie cohérentes avec les données de la littérature, montrant l'impact constant et significatif des AOD sur les tests d'hémostase et justifiant pleinement la mise en place d'une méthode de neutralisation telle que le DOAC-Stop™, afin de garantir la fiabilité du rendu et de l'interprétation des bilans d'hémostase chez les patients traités par AOD.

IV.5. Perspectives

La démonstration de l'efficacité et de l'utilité du DOAC-Stop™ comme moyen de neutralisation des AOD dans les bilans d'hémostase ouvre la voie au déploiement en routine au laboratoire de ce procédé. Plusieurs étapes devront être mises en œuvre pour procéder à ce déploiement.

Une première étape sera de définir un cadre précis d'application de ce traitement pré-analytique. Au vu des résultats obtenus, et des surcoûts engendrés, il paraît justifié d'utiliser le DOAC-Stop™ pour tout bilan d'hémostase spécialisé réalisé sous AOD. Il serait également pertinent de l'appliquer dans les situations de bilans fortement perturbés, ou les AOD pourraient masquer une véritable pathologie sous-jacente ou encore de réaliser le dosage du facteur V, indispensable dans l'interprétation de l'insuffisance hépatique. En effet, notre travail a mis en évidence que les AOD pouvaient fausser les dosages de facteurs de la coagulation, du TP ou du TCA, cachant ainsi une potentielle pathologie sous-jacente. L'avis d'un biologiste spécialisé ou l'établissement de seuils décisionnels pour ces tests, au-delà desquels une neutralisation peut être nécessaire doit être envisager et pourrait contribuer à améliorer la fiabilité des interprétations.

À titre d'exemple, le laboratoire du CH de Guéret utilise le DOAC-Remove comme méthode de neutralisation des AOD. Ce dispositif est employé à l'ensemble des bilans d'hémostase sous AOD avec comme indications les plus courantes : la recherche d'anticoagulant circulant et les relais AOD-Héparine. En 2024, 157 bilans ont été traités par DOAC-Remove, soit un nombre de bilans plus importants que le nombre de bilans non rendus pour cause d'AOD au CHU de Limoges. Cette comparaison suggère une potentielle sous-prescription actuelle au CHU de Limoges de bilans d'hémostase sous AOD en raison de l'impossibilité de rendre ces résultats.

Il faudra également intégrer cette méthode dans les comptes-rendus de résultats, en précisant, pour les plasmas concernés, qu'ils ont été pré-analytiquement traités par DOAC-Stop™. En parallèle, une note d'information sera adressée aux services prescripteurs, et une participation au Staff Thrombose permettra de sensibiliser les cliniciens principalement concernés par ces prescriptions afin de lever les freins entourant la prescription de bilans d'hémostases sous AOD au niveau du CHU.

Au niveau du laboratoire, le protocole d'utilisation du DOAC-Stop™ a d'ores et déjà été rédigé et intégré au logiciel de gestion documentaire QUALIMS-DOC. (Annexe 5) Une formation du personnel concerné sera également à mettre en place.

Enfin, il serait utile de compléter ce travail en étudiant d'autres paramètres comme les facteurs de la voie endogène (VIII, IX et XI) dans les situations de TCA allongé, ou les contextes de relais thérapeutique avec co-présence d'AOD et d'héparine. Il conviendrait également de poursuivre les analyses déjà réalisées sur des cohortes plus larges afin de confirmer ou réviser les observations issues de ce travail. Il peut également être intéressant d'évaluer les autres méthodes de neutralisation comme le DOAC-Stop Liquid™, permettant de s'affranchir des étapes de centrifugation et d'optimiser le temps en routine.

Conclusion

Ce travail a permis de démontrer l'efficacité et l'intérêt du DOAC-Stop™ en tant que méthode de neutralisation des anticoagulants oraux directs (AOD) dans les échantillons de plasma. Les dosages d'activité anti-Xa et anti-IIa ont montré une élimination complète et reproductible des AOD après traitement pré-analytique, rendant interprétables de nombreux tests d'hémostase jusque-là inexploitable.

Notre étude a également mis en évidence, en corrélation avec la littérature, les différents profils d'interférence des AOD sur les tests d'hémostase selon la molécule : un impact particulièrement marqué du rivaroxaban, à l'origine de fausses anomalies biologiques (sur le TP, les facteurs de la coagulation, le bilan de recherche d'anticorps anti-phospholipides, le bilan de thrombophilie) ; un effet plus modéré de l'apixaban ; et un profil analytique distinct du dabigatran avec une interférence notable sur le TCA, le temps de thrombine, et les tests précédemment cités. Ces différences peuvent être corrélées ou non à la concentration circulante du type d'AOD utilisé, rendant délicate l'interprétation des bilans sous AOD et nécessitant l'utilisation d'un moyen de neutralisation de ces molécules.

Ce travail a aussi permis d'initier une réflexion concrète sur l'intégration du DOAC-Stop™ en routine au sein du laboratoire d'hémostase du CHU de Limoges, avec l'élaboration d'un protocole interne, une prise en compte de cette méthode dans les comptes-rendus biologiques et la préparation à l'information des prescripteurs. La neutralisation ne pouvant être appliquée systématiquement à tous les patients en raison de son coût et de la fréquence élevée des bilans de routine sous AOD, ce projet a contribué à définir les indications prioritaires :

- En hémostase spécialisée : en systématique dans le cas de l'emploi d'un test connu comme sensible aux AOD, à savoir le bilan de recherche d'anticorps anti-phospholipides et l'exploration du bilan de thrombophilie
- Dans certains cas ciblés de bilans de routine fortement perturbés, en particulier lorsque les résultats sont discordants avec le profil de l'AOD utilisé et pourraient masquer une pathologie sous-jacente ainsi que dans le cas du dosage du facteur V nécessaire au suivi de l'insuffisance hépatique.

Enfin, cette étude s'inscrit dans une démarche de validation méthodologique locale, mais qui pourrait être étendue à d'autres centres. L'utilisation du DOAC-Stop™ ouvre la voie à une amélioration significative de l'interprétation des tests d'hémostase chez les patients sous AOD, tout en posant les bases d'une évolution des pratiques et des recommandations locales.

Références bibliographiques

1. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*. mai 1964;202(4931):498-9.
2. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*. 18 sept 1964;145(3638):1310-2.
3. Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine*. 2005;257(3):209-23.
4. Cortes GA, Moore MJ, El-Nakeep S. Physiology, Von Willebrand Factor. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cité 12 juin 2025]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559062/>
5. Budzynski AZ. Fibrinogen and fibrin: biochemistry and pathophysiology. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1986;6(2):97-146.
6. McRae S. Physiological Haemostasis. In: Fitzridge R, Thompson M, éditeurs. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011 [cité 12 juin 2025]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534253/>
7. Grover SP, Mackman N. Tissue Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. avr 2018;38(4):709-25.
8. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. juin 2001;85(6):958-65.
9. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia*. juill 1998;4(4):331-4.
10. Samama CM. Les troubles graves de l'hémostase. *Réanimation*. 1 nov 2007;16(7):673-7.
11. Le Cam-Duchez V, Barbay V, Soria C, Borg JY. Protéine Z, polymorphismes du gène de la protéine Z et thromboses. *La Revue de Médecine Interne*. août 2010;31(8):551-7.
12. Risman RA, Kirby NC, Bannish BE, Hudson NE, Tutwiler V. Fibrinolysis: an illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost*. 17 févr 2023;7(2):100081.
13. Masson E. EM-Consulte. [cité 2 mars 2025]. Les recommandations pré-analytiques du GFHT en hémostase. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1099356/les-recommandations-pre-analytiques-du-gfht-en-hem>
14. MP-recommandations-preanalytiques-hemostase-GEHT.pdf [Internet]. [cité 25 mars 2025]. Disponible sur: <https://www.chu-tours.fr/wp-content/uploads/2020/01/MP-recommandations-preanalytiques-hemostase-GEHT.pdf>
15. Masson E. EM-Consulte. [cité 7 avr 2025]. Mesures chromogéniques en hémostase. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/61475/mesures-chromogeniques-en-hemostase>

16. Clauser S, Calmette L. Orientation diagnostique devant une anomalie du TP ou du TCA. *La Revue de Médecine Interne*. 1 sept 2024;45(9):549-58.
17. EAHAD_web-Un-nouveau-pas-en-avant-pour-comprendre-les-déficits-acquis-en-facteur-X-de-la-coagulation.
18. Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, et al. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost*. févr 2018;16(2):209-19.
19. Connors JM. Testing and monitoring direct oral anticoagulants. *Blood*. 8 nov 2018;132(19):2009-15.
20. Samama M. Gestion périopératoire des anticoagulants oraux directs. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux - Pratique*. févr 2019;2019(275):2-6.
21. Qiao J, Tran MH. Challenges to Laboratory Monitoring of Direct Oral Anticoagulants. *Clin Appl Thromb Hemost*. 1 mars 2024;30:10760296241241524.
22. Leimgruber A, Périard D, Bart PA, Deruaz CA, Spertini F. Le syndrome des antiphospholipides. *Med Hyg*. 25 févr 2004;2471:438-42.
23. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 30 oct 2010;376(9751):1498-509.
24. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. juin 2011;7(6):330-9.
25. Devreese KMJ, De Groot PG, De Laat B, Erkan D, Favaloro EJ, Mackie I, et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. nov 2020;18(11):2828-39.
26. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. oct 2009;7(10):1737-40.
27. Méan M, Angelillo-Scherrer A. Thrombophilie : investiguer ou ne pas investiguer ? *Rev Med Suisse*. 11 mai 2011;294(18):1025-7.
28. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis | *Blood* | American Society of Hematology [Internet]. [cité 25 avr 2025]. Disponible sur: <https://ashpublications.org/blood/article/95/12/3678/267353/High-levels-of-factor-IX-increase-the-risk-of>
29. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 17 août 2000;343(7):457-62.
30. 2020_gfht_recherche_de_thrombophilie_biologique.pdf [Internet]. [cité 17 avr 2025]. Disponible sur: https://www.portailvasculaire.fr/sites/default/files/docs/2020_gfht_recherche_de_thrombophilie_biologique.pdf

31. Sanchez O, Benhamou Y, Bertoletti L, Constant J, Couturaud F, Delluc A, et al. Recommandations de bonne pratique pour la prise en charge de la maladie veineuse thromboembolique chez l'adulte. Version courte. *Revue des Maladies Respiratoires*. févr 2019;36(2):249-83.
32. Rev-Francoph-Hemost-Thromb-2022-4-3-133-52-Dossier-thematique-PartI.pdf [Internet]. [cité 18 avr 2025]. Disponible sur: <https://gemmat-thrombose.fr/wp-content/uploads/2023/02/Rev-Francoph-Hemost-Thromb-2022-4-3-133-52-Dossier-thematique-PartI.pdf>
33. 0109F.pdf [Internet]. [cité 20 mai 2025]. Disponible sur: <https://documents.labcerba.com/files/FR/0109F.pdf>
34. Guermazi S, Znazen R. Résistance à la protéine C activée et facteur V Leiden : intérêt clinique. *Pathologie Biologie*. 1 oct 2011;59(5):281-5.
35. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: routine testing for Factor V Leiden (R506Q) and prothrombin (20210G>A) mutations in adults with a history of idiopathic venous thromboembolism and their adult family members. *Genet Med*. janv 2011;13(1):67-76.
36. Granel B, Morange PE, Serratrice J, Ene N, Cremades S, Swiader L, et al. Mutation G20210A du gène de la prothrombine à l'état hétérozygote et pathologies associées. *La Revue de Médecine Interne*. 1 mai 2003;24(5):282-7.
37. Simioni P, Prandoni P, Lensing AW, Manfrin D, Tormene D, Gavasso S, et al. Risk for subsequent venous thromboembolic complications in carriers of the prothrombin or the factor V gene mutation with a first episode of deep-vein thrombosis. *Blood*. 15 nov 2000;96(10):3329-33.
38. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 15 nov 1996;88(10):3698-703.
39. Pernod G, Godier A, Gozalo C, Blanchard P, Sié P. Prise en charge des surdosages en antivitamines K, des situations à risque hémorragique et des accidents hémorragiques chez les patients traités par antivitamines K en ville et en milieu hospitalier. *Journal des Maladies Vasculaires*. sept 2008;33:S70-1.
40. Bouvenot G, Bounhoure JP, Montastruc JL, Vacheron A. Rapport sur les anticoagulants oraux directs (AOD) (antérieurement appelés « nouveaux anticoagulants oraux » ou NACO). *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. juin 2014;198(6):1157-95.
41. 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: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *J Am Coll Cardiol*. 4 févr 2014;63(4):321-8.
42. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJV, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 15 sept 2011;365(11):981-92.

43. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 8 sept 2011;365(10):883-91.
44. Chen X, Wang L, Li H, Huang W, Zhao L, Guo W. Comparative differences in the risk of major gastrointestinal bleeding among different direct oral anticoagulants: An updated traditional and Bayesian network meta-analysis. *Front Pharmacol* [Internet]. 4 janv 2023 [cité 7 avr 2025];13. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2022.1049283/full>
45. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus Warfarin in Nonvalvular Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*. 8 sept 2011;365(10):883-91.
46. Hellwig T, Gulseth M. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug Interactions With New Oral Anticoagulants: What Do They Mean for Patients With Atrial Fibrillation? *Ann Pharmacother*. nov 2013;47(11):1478-87.
47. vd_El_jerdi_Georges.pdf [Internet]. [cité 15 mars 2025]. Disponible sur: https://theses-doctorat.u-paris.fr/gedfs/these/2017/8/28140927/vd_El_jerdi_Georges.pdf
48. Jourdi G, Siguret V, Martin AC, Golmard JL, Godier A, Samama CM, et al. Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban. *Thromb Haemost*. juill 2015;114(1):78-86.
49. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 21 mai 2025]. Disponible sur: <https://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0362749.htm>
50. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 21 mai 2025]. Disponible sur: <https://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0315725.htm>
51. Bornet S, Dolapsakis C, Petignat PA, Gobin N. Anticoagulants oraux directs : quelques considérations pratiques. *Rev Med Suisse*. 7 sept 2016;529:1453-9.
52. Connolly SJ, Crowther M, Eikelboom JW, Gibson CM, Curnutte JT, Lawrence JH, et al. Full Study Report of Andexanet Alfa for Bleeding Associated with Factor Xa Inhibitors. *N Engl J Med*. 4 avr 2019;380(14):1326-35.
53. gestion-de-lanticoagulation-dans-un-contexte-durgence.pdf [Internet]. [cité 26 mars 2025]. Disponible sur: <https://sfar.org/download/gestion-de-lanticoagulation-dans-un-contexte-durgence/?wpdmdl=62045&refresh=67e4258cb80311743005068>
54. pradaxa-epar-product-information_fr.pdf [Internet]. [cité 16 mars 2025]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/fr/documents/product-information/pradaxa-epar-product-information_fr.pdf
55. praxbind_synthese_ct14918.pdf [Internet]. [cité 15 mars 2025]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2016-10/praxbind_synthese_ct14918.pdf
56. Pollack CV, Reilly PA, Eikelboom J, Glund S, Verhamme P, Bernstein RA, et al. Idarucizumab for Dabigatran Reversal. *N Engl J Med*. 6 août 2015;373(6):511-20.
57. Favaloro EJ, Lippi G. Laboratory testing in the era of direct or non-vitamin K antagonist oral anticoagulants: a practical guide to measuring their activity and avoiding diagnostic errors. *Semin Thromb Hemost*. mars 2015;41(2):208-27.

58. Siriez R, Dogné JM, Gosselin R, Laloy J, Mullier F, Douxfils J. Comprehensive review of the impact of direct oral anticoagulants on thrombophilia diagnostic tests: Practical recommendations for the laboratory. *Int J Lab Hematol*. févr 2021;43(1):7-20.
59. Douxfils J, Mullier F, Loosen C, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thromb Res*. déc 2012;130(6):956-66.
60. Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *J Thromb Haemost*. janv 2011;9(1):133-9.
61. Questions et réponses sur l'utilisation du rivaroxaban (Xarelto) dans la pratique. *Rev Med Suisse*. 26 juin 2013;392(25):1375-85.
62. Tripodi A, Padovan L, Testa S, Legnani C, Chantarangkul V, Scalabrino E, et al. How the direct oral anticoagulant apixaban affects hemostatic parameters. Results of a multicenter multiplatform study. *Clin Chem Lab Med*. févr 2015;53(2):265-73.
63. Douxfils J, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM, Mullier F. Impact of apixaban on routine and specific coagulation assays: a practical laboratory guide. *Thromb Haemost*. août 2013;110(2):283-94.
64. Bonar R, Favalaro EJ, Mohammed S, Pasalic L, Sioufi J, Marsden K. The effect of dabigatran on haemostasis tests: a comprehensive assessment using in vitro and ex vivo samples. *Pathology*. juin 2015;47(4):355-64.
65. Douxfils J, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring of dabigatran etexilate. *Thromb Haemost*. mai 2012;107(5):985-97.
66. Halbmayer WM, Weigel G, Quehenberger P, Tomasits J, Haushofer AC, Aspöck G, et al. Interference of the new oral anticoagulant dabigatran with frequently used coagulation tests. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(9):1601-5.
67. Thomas B. Anticoagulants oraux directs : impacts des résultats du bilan d'hémostase de routine dans le dialogue clinico-biologique. 2014;
68. rapport_reev_aco_cteval234_2018-02-09_15-38-37_999.pdf [Internet]. [cité 13 avr 2025]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-02/rapport_reev_aco_cteval234_2018-02-09_15-38-37_999.pdf
69. Mégarbane B, Oberlin M, Alvarez JC, Balen F, Beaune S, Bédry R, et al. Management of pharmaceutical and recreational drug intoxications.
70. Frackiewicz A, Kalaska B, Miklosz J, Mogielnicki A. The methods for removal of direct oral anticoagulants and heparins to improve the monitoring of hemostasis: a narrative literature review. *Thromb J*. 19 mai 2023;21:58.
71. Exner T, Ahuja M, Ellwood L. Effect of an activated charcoal product (DOAC Stop™) intended for extracting DOACs on various other APTT-prolonging anticoagulants. *Clin Chem Lab Med*. 24 avr 2019;57(5):690-6.

72. Riva N, Vella K, Hickey K, Gatt P, Grima C, Zammit D, et al. The effect of DOAC-Stop® on several oral and parenteral anticoagulants. *Int J Lab Hematology* [Internet]. août 2021 [cité 11 juin 2025];43(4). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.13487>
73. Melicene S, Habay C, Ghammad W, Carré J, Diehl JL, Smadja DM, et al. DOAC-Remove to counteract the interference of anti-Xa oral anticoagulants on the monitoring of heparin. *Int J Lab Hematol.* oct 2024;46(5):953-62.
74. Malik NEH, Ward A, Erskine B. Comparing the Effect of DOAC-Stop® and DOAC-Remove® on Apixaban, Rivaroxaban and Dabigatran Prior to Thrombophilia and Lupus Testing. *Br J Biomed Sci.* 2024;81:13359.
75. Wang J, Lim HY, Nandurkar H, Ho P. DOAC -stop can remove direct oral anticoagulants and allow analysis by global coagulation assays. *Int J Lab Hematology.* juin 2023;45(3):360-7.
76. Ariouat I. Évaluation et mise en place d'un agent neutralisant les anticoagulants oraux directs au laboratoire d'hématologie du CHU de Caen. 6 oct 2023;136.
77. Exner T, Dangol M, Favaloro EJ. Simplified Method for Removing Direct Oral Anticoagulant Interference in Mechanical Coagulation Test Systems—A Proof of Concept. *Journal of Clinical Medicine.* janv 2024;13(4):1042.
78. Jourdi G, Delrue M, Stepanian A, Valaize J, Foulon-Pinto G, Demagny J, et al. Potential usefulness of activated charcoal (DOAC remove®) for dRVVT testing in patients receiving Direct Oral AntiCoagulants. *Thromb Res.* déc 2019;184:86-91.
79. Al-Qawzai Z, Dale C, Dave M, Yartey N, Platton S. Effect of DOAC-Remove on coagulation screening assays in samples from patients receiving oral or parenteral anticoagulation. *Int J Lab Hematol.* juin 2022;44(3):e95-9.
80. Savola P, Lemponen M, Joutsu-Korhonen L, Helin TA. Novel Ex Vivo DOAC Removal Methods Reduce Interference in Lupus Anticoagulant Testing. *Diagnostics.* oct 2022;12(10):2520.
81. Sevenet PO, Cucini V, Hervé T, Depasse F, Carlo A, Contant G, et al. Evaluation of DOAC Filter, a new device to remove direct oral anticoagulants from plasma samples. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2020;42(5):636-42.
82. [Tableau-delais-plasma-congele-GFHT_decembre-2018.pdf](https://sfth.fr/app/uploads/2024/01/Tableau-delais-plasma-congele-GFHT_decembre-2018.pdf) [Internet]. [cité 24 mai 2025]. Disponible sur: https://sfth.fr/app/uploads/2024/01/Tableau-delais-plasma-congele-GFHT_decembre-2018.pdf
83. Desconclois C, Flaujac C, Crepin O, Gelas A, Giannoli JM, Gouin I, et al. Propositions pré-analytiques en hémostase : Stabilité des paramètres d'hémostase spécialisée et délais de réalisation des examens (partie 3).
84. Nahornyj E, Goutelle S, Bourguignon L, de la Gastine B. Évaluation des prescriptions d'anticoagulants oraux directs (AOD) en gériatrie hospitalière sur 3 ans. *Therapies.* 1 mai 2021;76(3):191-200.
85. Durand A, Baltora E, Pelloquin N, Soudet S, Lenglet A. Bon usage des anticoagulants oraux et conformité de l'analyse pharmaceutique : audit sur les prescriptions hospitalières.

Pharmactuel [Internet]. 30 sept 2021 [cité 4 juin 2025];54(3). Disponible sur: <https://pharmactuel.com/index.php/pharmactuel/article/view/1387>

86. Slavik L, Jacova J, Friedecky D, Ulehlova J, Tauber Z, Prochazkova J, et al. Evaluation of the DOAC-Stop Procedure by LC-MS/MS Assays for Determining the Residual Activity of Dabigatran, Rivaroxaban, and Apixaban. *Clin Appl Thromb Hemost*. 16 sept 2019;25:1076029619872556.
87. Favresse J, Lardinois B, Sabor L, Devalet B, Vandepapeliere J, Braibant M, et al. Evaluation of the DOAC-Stop® Procedure to Overcome the Effect of DOACs on Several Thrombophilia Screening Tests. *TH Open*. avr 2018;2(2):e202-9.
88. Gendron N, Billoir P, Siguret V, Le Cam-Duchez V, Proulle V, Macchi L, et al. Is there a role for the laboratory monitoring in the management of specific antidotes of direct oral anticoagulants? *Thrombosis Research*. 1 mai 2024;237:171-80.
89. Dunois C. Laboratory Monitoring of Direct Oral Anticoagulants (DOACs). *Biomedicines*. 21 avr 2021;9(5):445.
90. Van Blerk M, Bailleul E, Chatelain B, Demulder A, Devreese K, Douxfils J, et al. Influence of apixaban on commonly used coagulation assays: results from the Belgian national External Quality Assessment Scheme. *Int J Lab Hematology*. août 2017;39(4):402-8.
91. Blerk MV, Bailleul E, Chatelain B, Demulder A, Devreese K, Douxfils J, et al. Influence of dabigatran and rivaroxaban on routine coagulation assays: A nationwide Belgian survey. *Thromb Haemost*. janv 2015;113(01):154-64.
92. Gosselin R, Grant RP, Adcock DM. Comparison of the effect of the anti-Xa direct oral anticoagulants apixaban, edoxaban, and rivaroxaban on coagulation assays. *International Journal of Laboratory Hematology*. 1 oct 2016;38(5):505-13.
93. Hillarp A, Gustafsson KM, Faxälv L, Strandberg K, Baghaei F, Blixter IF, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor apixaban on routine coagulation assays and anti-FXa assays. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 sept 2014;12(9):1545-53.
94. Tsutsumi Y, Shimono J, Ohhigashi H, Ito S, Shiratori S, Teshima T. Analysis of the influence of dabigatran on coagulation factors and inhibitors. *Int J Lab Hematology*. avr 2015;37(2):225-30.
95. Favalaro EJ, Gilmore G, Bonar R, Dean E, Arunachalam S, Mohammed S, et al. Reducing the effect of DOAC interference in laboratory testing for factor VIII and factor IX: A comparative study using DOAC Stop and andexanet alfa to neutralize rivaroxaban effects. *Haemophilia*. mars 2020;26(2):354-62.
96. Scheres LJJ, Lijfering WM, Middeldorp S, Cheung YW, Barco S, Cannegieter SC, et al. Measurement of coagulation factors during rivaroxaban and apixaban treatment: Results from two crossover trials. *Res Pract Thromb Haemost*. 18 août 2018;2(4):689-95.
97. Samuelson BT, Cuker A. Measurement and Reversal of the Direct Oral Anticoagulants. *Blood Rev*. janv 2017;31(1):77-84.
98. De Kesel PM, Devreese KMJ. Direct oral anticoagulant adsorption: Impact on lupus anticoagulant testing-Review of the literature and evaluation on spiked and patient samples. *J Thromb Haemost*. août 2020;18(8):2003-17.

99. Martinuzzo ME, Barrera LH, D'adamo MA, Otaso JC, Gimenez MI, Oyhamburu J. Frequent false-positive results of lupus anticoagulant tests in plasmas of patients receiving the new oral anticoagulants and enoxaparin. *Int J Lab Hematol.* avr 2014;36(2):144-50.
100. Ząbczyk M, Kopytek M, Natorska J, Undas A. The effect of DOAC-Stop on lupus anticoagulant testing in plasma samples of venous thromboembolism patients receiving direct oral anticoagulants. *Clin Chem Lab Med.* 27 août 2019;57(9):1374-81.
101. Baker SA, Jin J, Pfaffroth C, Vu T, Zehnder JL. DOAC-Stop in lupus anticoagulant testing: Direct oral anticoagulant interference removed in most samples. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis.* 1 févr 2021;5(2):314-25.
102. De Kesel PM, Devreese KMJ. Direct oral anticoagulant adsorption: Impact on lupus anticoagulant testing—Review of the literature and evaluation on spiked and patient samples. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 1 août 2020;18(8):2003-17.
103. Malik NEH, Ward A, Erskine B. Comparing the Effect of DOAC-Stop® and DOAC-Remove® on Apixaban, Rivaroxaban and Dabigatran Prior to Thrombophilia and Lupus Testing. *Br J Biomed Sci.* 29 oct 2024;81:13359.
104. Exner T, Michalopoulos N, Pearce J, Xavier R, Ahuja M. Simple method for removing DOACs from plasma samples. *Thromb Res.* mars 2018;163:117-22.
105. Exner T, Dangol M, Favaloro EJ. Simplified Method for Removing Direct Oral Anticoagulant Interference in Mechanical Coagulation Test Systems—A Proof of Concept. *JCM.* 12 févr 2024;13(4):1042.
106. Jamati S. Application of DOAC-Stop in a diagnostic laboratory.
107. Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A, Pengo V. Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants. *Autoimmun Rev.* févr 2017;16(2):173-8.
108. 2023_REGNART_Chloe.pdf [Internet]. [cité 11 juin 2025]. Disponible sur: https://publication-theses.unistra.fr/public/theses_exercice/PHA/2023/2023_REGNART_Chloe.pdf

Annexes

Annexe 1. Résultats obtenus chez patients sous Apixaban.....	103
Annexe 2. Résultats obtenus chez patients sous Rivaroxaban.....	108
Annexe 3. Résultats obtenus chez patients sous Dabigatran	112
Annexe 4. Protocole DOAC-Stop™ au laboratoire d'hémostase du CHU de Limoges	116

Annexe 1. Résultats obtenus chez patients sous Apixaban

<u>Apixaban</u>	Anti-Xa Avant charbon (ng/mL)	Anti-Xa Après charbon (ng/mL)		TP Avant Charbon (%)	TP Après charbon (%)		TCA Avant Charbon (ratio)	TCA Après Charbon (Ratio)		Fibrinogène avant Charbon (g/L)	Fibrinogène après charbon (g/L)
Patient 1	51	<22		102	115		0,95	0,93		3,46	3,48
Patient 2	61	<22		99	117		0,83	0,78		2,93	3,02
Patient 6	237	<22		43	63		1,4	1,24			
Patient 7	309	<22		29	74		2,02	1,19			
Patient 9	251	<22		59	85		1,2	1,02			
Patient 10	132	<22		37	56		1,86	1,49			
Patient 11	79	<22		84			1,3	1,18			
Patient 14	57	<22		96			0,96	0,93			
Patient 15	136	<22		58	81		1,2	1,3		7,44	7,98
Patient 17	220	<22		89	98		1,37			4,13	3,81
Patient 18	28	<22		85	91		0,84	0,84		2,86	2,7
Patient 20	156	<22		64	86		0,97			3,12	3,09
Patient 21	258	<22		47	87		1,55			3,27	3,17
Patient 22	59	<22		84	94		1			4,37	4,54
Patient 24	165	<22		40	87		1,53	1,15			
Patient 29	27	<22		91	97		0,94	0,91			
Patient 30	29	<22		102	103		1,17	1,18		4,89	5,21
Patient 31	120	<22		86	95		1,02	0,94		4,26	4,15
Patient 32	24	<22		104	97		0,88	0,95		1,98	1,95
Patient 33	198	<22		71	93		1,11	1,03		4,01	4,27
Patient 34	173	<22		72	90		1,12	1,05		3,33	3,35
Patient 35	171	<22		72	92		1,15	1,02		5,68	5,77
Patient 36	22	<22		89	89		0,98	0,98		4,73	4,69
Patient 37	295	<22		54	85		1,47	1,31		6,1	5,9
Patient 38	92	<22		56	67		1,11	1,17		3,97	4,1
Patient 39	265	<22		64	90		0,99	0,93		3,21	3,21
Patient 40	428	<22		28	62		1,19	1,1		3,26	2,61

Patient 42	51	<22		87	94		0,88	0,89		2,15	2,09
Patient 43	161	<22		72	93		1,09	1,07		5,3	5,09
Patient 45	161	<22		52	72		1,17	1,08		3,86	3,88
Patient 46	183	<22		75	93		1,22	1,09		4,74	4,95
Patient 47	227	<22		76	100		1,32	1,21			
Patient 48	51	<22		94	101		0,89	0,85		3,31	3,12
Patient 50	105	<22		70	85		1,03	0,99		4,03	3,75
Patient 53	93	<22		24	35		1,32	1,1		2,77	2,66
Patient 54	265	<22		62	90		3,45	2,46		4,96	4,84
Patient 55	326	<22		22	52		1,66	1,12		2,63	2,59
Patient 80	26	<22		82	88		1,26	1,32		5,06	5,06
Patient 88	75	<22									
Patient 89	105	<22									
Patient 90	57	<22									
Patient 91	310	<22									
Patient 92	150	<22									
Patient 107	302	<22									
Patient 108	111	<22									
Patient 109	298	<22									
Patient 110	51	<22									
Patient 111	115	<22									
Patient 112	333	<22									
Patient 113	66	<22									
Patient 114	129	<22									
Patient 115	136	<22									
Patient 116	167	<22		47	75		2,43	2,08			

Apixaban	Facteur II Avant charbon (%)	Facteur II Après charbon (%)		Facteur X Avant Charbon (%)	Facteur X Avant Charbon (%)		Facteur V Avant Charbon (%)	Facteur V Après Charbon (%)
Patient 7	66	89		64	95		37	74
Patient 9	76	83		86	99		80	101
Patient 10	71	67		80	81		84	96
Patient 15	130	122		83	98		97	108
Patient 17							72	92
Patient 18	105	103		90	87		97	119
Patient 20	86	88		66	73		70	79
Patient 21	59	66		47	57		49	63
Patient 22	103	109		87	92		87	90
Patient 24	68	80		55	71		68	96
Patient 30	108	116		89	96		130	143
Patient 31	133	132		100	105		100	105
Patient 32	109	101		90	85		123	105
Patient 33	92	99		65	71		133	144
Patient 34	87	94		73	77		78	87
Patient 35	106	110		100	94		108	125
Patient 36	101	101		92	83		107	100
Patient 37	74	86		66	75		67	87
Patient 38	64	76		51	55		81	89
Patient 39	89	93		55	68		89	105
Patient 40	65	73		46	70		37	55
Patient 42	80	85		80	86		86	94
Patient 43	72	75		70	68		95	105
Patient 45	60	66		79	98		40	55
Patient 46	101	109		82	92		67	78
Patient 47	152	158		107	134		124	133
Patient 48	106	105		94	98		92	97
Patient 53	52	51		37	40		42	46
Patient 54	155	187		102	110		46	68
Patient 55	79	85		44	53		25	37

Patient 116	69	77		56	66		51	66
-------------	----	----	--	----	----	--	----	----

Apixaban	AT Avant charbon (%)	AT Après charbon (%)		Protéine C Avant charbon (%)	Protéine C Après charbon (%)		Protéine S Avant charbon (%)	Protéine S Après charbon (%)
Patient 6	74	75		74	65		79	73
Patient 91				53	54		91	87
Patient 92	84	83		47	46		80	77
Patient 107	109	114		55	71		59	51
Patient 108	92	94		62	82		78	82
Patient 109	103	106		99	111		86	72
Patient 110	106	101		41	49		84	74
Patient 111	106	107		93	99		43	33
Patient 112	68	81		74	66		59	46
Patient 113	86	92		79	83		65	66
Patient 114	101	108		102	103		64	63
Patient 115	72	79		79	81		77	73
Patient 116	79	75		104	103		54	52

Apixaban	Ratio DRVVT Screen Avant Charbon	Ratio DRVVT Screen Après Charbon		Ratio normalisé avant charbon	Ratio normalisé après charbon		TCA sensibilisé, PTT-LA Avant Charbon	TCA sensibilisé, PTT-LA Après Charbon	
Patient 1	1,02	0,81							
Patient 2	1,11	0,81							
Patient 6	2,73	1,23		1,18	1,03				
Patient 10	3,62	1,64		1,11	1,07				
Patient 11	1,34	1,04		0,99	1,05				

Patient 14	1,05	0,88		0,87	0,92				
Patient 15							1,28	1,42	
Patient 17	1,7	0,88							
Patient 18	1,02	0,96					0,9	0,88	
Patient 24	4,43	1,47					1,64	1,25	
Patient 50	1,42	1,1		0,82	1,00		1,1	1,03	
Patient 80	1,2	1,13		0,88	0,97				
Patient 88	1,62	1,16		1,04	1,09		1,12	1,07	
Patient 89	1,6	1,17		0,78	1,02		1,45	1,08	
Patient 90	2	1,38		1,04	1,06		1,38	1,08	
Patient 91	2,05	1,24		0,87	1,11		0,9	1	
Patient 112	2,33	1,06		0,94	0,95		1,61	1,35	
Patient 113	1,33	1,13		0,86	0,66		1,26	1,22	
Patient 114	1,49	1,09		0,84	0,91		1,08	1,01	
Patient 115	2,45	1,45		1,00	1,07		1,5	1,26	
Patient 116	4,2	2,04		1,88	1,69		5,34	2,53	

Annexe 2. Résultats obtenus chez patients sous Rivaroxaban

<u>Rivaroxaban</u>	Anti-Xa Avant charbon (ng/mL)	Anti-Xa Après charbon (ng/mL)		TP Avant Charbon (%)	TP Après charbon (%)		TCA Avant Charbon (ratio)	TCA Après Charbon (Ratio)		Fibrinogène avant Charbon (g/L)	Fibrinogène après charbon (g/L)
Patient 3	26	<24		84	91		0,86	0,84			
Patient 8	33	<24		71	79		0,84	0,85			
Patient 13	75	<24		61	100		2,71	1,98			
Patient 19	126	<24		40	79					4,75	4,36
Patient 23	25	<24		79	86		1,06	1,03		3,22	3,09
Patient 26	196	<24		38	93		1,52	1,1		3,75	3,81
Patient 28	37	<24		51	73		1,13	1,04			
Patient 44	26	<24		69	73		1,15	1,22		2,14	2,06
Patient 49	27	<24		93	88		1,12	1,25		1,86	1,4
Patient 51	38	<24		77	105		1,06	0,94		4,56	4,83
Patient 52	327	<24		37	90		1,46	1,1		3,06	2,9
Patient 66	25	<24		91	92		1,04	1,08		7,3	7,15
Patient 67	338	<24		34	91		1,42	1,05		2,88	2,9
Patient 68	25	<24		80	90		1,22	1,11		3,71	3,59
Patient 69	500	<24		23	76		1,38	1,08		2,72	2,7
Patient 72	76	<24		75	96		1,19	1,08		3,67	3,49
Patient 74	501	<24		12	55		1,48	1,09			
Patient 75	320	<24		40	102		1,12	0,94			
Patient 78	117	<24		51	91		1,22	1,01		4,25	4,13
Patient 79	96	<24		55	101		1,35	1,12		2,62	2,49
Patient 81	95	<24		59	94					3,1	2,97
Patient 82	72	<24									
Patient 83	296	<24									
Patient 84	30	<24									
Patient 85	397	<24									
Patient 86	345	<24									
Patient 87	417	<24									

Patient 93	61	<24									
Patient 94	66	<24									
Patient 95	64	<24									
Patient 96	142	<24		39	82		1,39	1,05		5,24	5,03
Patient 97	158	<24		45	86		1,38	1,15		4,34	4,21
Patient 103	180	<24		35	97		1,27	0,94			
Patient 104	212	<24		51	107		1,06	0,89			
Patient 105	77	<24		45	83		1,66	1,19			
Patient 119	57	<24									
Patient 120	207	<24									
Patient 121	136	<24									
Patient 122	112	<24									

Rivaroxaban	Facteur II Avant charbon (%)	Facteur II Après charbon (%)		Facteur X Avant Charbon (%)	Facteur X Avant Charbon (%)		Facteur V Avant Charbon (%)	Facteur V Après Charbon (%)
Patient 3								
Patient 8	94	99		98	97		93	98
Patient 13								
Patient 19	82	98		57	71		52	66
Patient 23	84	82		67	72		102	102
Patient 26								
Patient 28	69	73		50	54		58	68
Patient 44	69	73		63	61		62	64
Patient 49	86	89		92	102		90	84
Patient 51	98	94		75	94		121	129
Patient 52	64	89		41	82		44	96
Patient 66	107	104		78	73		151	147
Patient 67	81	138		56	96		67	118
Patient 68	92	100		104	102		81	80
Patient 69	28	69		20	67		16	75
Patient 72	123	103		73	70		115	122

Patient 96	71	84		49	63		83	98
Patient 97	85	109		56	77		87	100
Patient 103	59	77		53	70		61	116
Patient 104	83	131		60	87		67	117
Patient 105	72	84		67	80		57	76

Rivaroxaban	AT Avant charbon (%)	AT Après charbon (%)		Protéine C Avant charbon (%)	Protéine C Après charbon (%)		Protéine S Avant charbon (%)	Protéine S Après charbon (%)
Patient 87				136	119		123	73
Patient 93	118	123		80	85		77	66
Patient 94	97	102		81	87		86	78
Patient 95	118	115		88	86		79	74
Patient 96	103	110						
Patient 97	104	107						
Patient 103	102	99		100	84		131	87
Patient 104	108	112		195	196		128	85
Patient 105	90	94		84	87		76	58
Patient 119	97	101		113	106		73	60
Patient 120	68	79		80	73		65	43
Patient 121	88	86		105	99		109	77
Patient 122	61	66		74	97		68	50

<u>Rivaroxaban</u>	Ratio DRVVT Screen Avant Charbon	Ratio DRVVT Screen Après Charbon		Ratio normalisé avant charbon	Ratio normalisé après charbon		TCA sensibilisé, PTT-LA Avant Charbon	TCA sensibilisé, PTT-LA Après Charbon
Patient 3	1,25	1,07		1,33	1,11			
Patient 13	4,97	1,83		3,01	1,74			
Patient 26							1,63	1,1
Patient 74	3,73	0,99					1,48	1,08
Patient 75	2,51	1,06		1,11	0,93		1,4	1,09
Patient 78	2,26	1,03		1,42	0,98		1,3	1,07
Patient 79	1,55	0,77		1,24	0,88		1,39	1,15
Patient 81	2,03	0,99		1,34	0,96		1,19	0,99
Patient 82	1,17	0,86		0,98	0,92		1,41	0,99
Patient 83	1,87	0,97		1,06	0,97		1,53	1,41
Patient 84	0,91	0,87		0,88	0,88		1	0,97
Patient 85	2,95	1,12		1,37	1,08		1,66	1,14
Patient 86	2,72	1,04		1,37	1,03		1,49	1,06
Patient 87	2,8	1,13		1,16	1,01		2,02	1,34
Patient 119	1,83	1,03		1,26	0,97		1,16	1,03
Patient 120	2,69	0,91		1,55	0,92		1,32	1,06
Patient 121	1,6	0,97		1,05	0,92		1,34	1,14
Patient 122	1,49	0,91		1,03	0,89		1,19	1

Annexe 3. Résultats obtenus chez patients sous Dabigatran

<u>Dabigatran</u>	Anti-IIa Avant charbon (ng/mL)	Anti-IIa Après charbon (ng/mL)		TP Avant charbon (%)	TP Après charbon (%)		TCA Avant Charbon (ratio)	TCA Avant Charbon (ratio)		Fibrinogène Avant Charbon (g/L)	Fibrinogène Après Charbon (g/L)
Patient 4	223	<15									
Patient 5	25	<15		69	79		1,73	1,34			
Patient 12	42	<15					1,58	1,08			
Patient 16	15	<15								3,39	3,43
Patient 41	134	<15		68	92					3,32	3,39
Patient 61	227	<15		54	82		1,48	0,92			
Patient 62	193	<15		56	78		2,57	1,45			
Patient 63	146	<15		34	48		1,83	1,16			
Patient 64	75	<15		90	110		1,35	1,09		4,31	4,30
Patient 65	460	<15		12	54						
Patient 71	56	<15		65	78		1,27	1,16		6,87	6,12
Patient 77	182	<15		74	116		3,92	1,65		3,4	3,41
Patient 98	461	<15									
Patient 99	127	<15									
Patient 100	86	<15									
Patient 101	70	<15		70	86		1,57	1,13		3,16	2,97
Patient 102	84	<15		74	94		1,53	1,11		4,41	4,39
Patient 117	115	<15									
Patient 118	36	<15									

Dabigatran	TT (s) Avant charbon	TT (s) Après charbon		Facteur II Avant charbon (%)	Facteur II Après charbon (%)		Facteur X Avant Charbon (%)	Facteur X Avant Charbon (%)		Facteur V Avant Charbon (%)	Facteur V Après Charbon (%)
Patient 41				92	106		60	105		77	105
Patient 64	98,6	20									
Patient 71	68,7	20,4		78	73		83	76		128	120
Patient 77	215,3	20,7		85	115		104	129		84	123
Patient 101	156	18,7		79	81		62	69		89	94
Patient 102	240	16,6		73	80		74	82		81	89

Dabigatran	AT Avant charbon (%)	AT Après charbon (%)		Protéine C Avant charbon (%)	Protéine C Après charbon (%)		Protéine S Avant charbon (%)	Protéine S Après charbon (%)	
Patient 4	113	98		156	70		200	60	
Patient 5	85	84		96	67		111	55	
Patient 92	171	144		201	142		200	124	
Patient 93	87	85		134	63		136	57	
Patient 101	117	113							
Patient 102	101	94							
Patient 117	94	104		171	110		177	68	
Patient 118				165	137		171	115	

<u>Dabigatran</u>	Ratio DRVVT Screen Avant Charbon	Ratio DRVVT Screen Après Charbon		Ratio normalisé avant charbon	Ratio normalisé après charbon		TCA sensibilisé, PTT-LA Avant Charbon	TCA sensibilisé, PTT-LA Après Charbon	
Patient 4	2,52	0,93							
Patient 5	1,8	1,18		1,07	0,98				
Patient 12	1,8	1,04		1,08	0,95				
Patient 16	0,96	0,98					1,1	1,09	
Patient 41							1,61	1	
Patient 92	3,01	0,96		1,04	1,01		3,16	1	
Patient 93	1,83	0,84		0,91	0,82				
Patient 94	1,74	0,95		1,12	1,03		1,31	0,86	
Patient 117	2,14	0,95		1,03	0,96		1,88	1,06	
Patient 118	1,3	0,91					1,28	0,93	

Annexe 4. Notice produit DOAC-Stop™

RÉACTIFS AUXILIAIRES
20-HX9904-100

RÉACTIFS AUXILIAIRES

DOAC-Stop™

Neutralisant



Référence	Présentation	Format	Nombre de tests
20-HX9904-100	Tablettes	1 x 100	100
20-HX9904-50	Tablettes	1 x 50	50

Informations sur l'usage thérapeutique

L'usage thérapeutique des DOACs est en croissance. Les DOACs sont connus pour leur interférence à degrés divers avec pratiquement tous les tests de coagulation et parfois, des patients ayant besoin d'un test de coagulation à cause de problèmes sous-jacents se révèlent recevoir des DOACs.

Des antidotes spécifiques pour DOAC individuel sont en cours de développement thérapeutique, mais ne sont pas largement disponibles pour usage au laboratoire.

DOAC-Stop est le premier produit conçu pour résoudre les problèmes diagnostics dus aux DOACs. Après traitement au DOACStop, les échantillons de plasma peuvent être analysés pour tout défaut de coagulation tel qu'un manque de facteur coagulant, présence d'héparine, d'anticoagulant lupus ou d'autre anticorps susceptible d'interférer avec la coagulation.

DOAC-Stop™ est un test de diagnostic innovant pouvant être utilisé afin d'éliminer efficacement tout type d'anticoagulant oral direct (« DOAC ») tels que dabigatran, apixaban, rivaroxaban et edoxaban d'un échantillon de plasma à tester sans affecter les protéines du plasma responsable du processus de coagulation.

DOAC-Stop™ est un test de diagnostic innovant, conçu pour simplifier vos diagnostics en éliminant les interférences des anticoagulants oraux directs. Il vous permet de tester la thrombophilie, le lupus anticoagulant (LA) et de réaliser des dosages de facteurs sur des plasmas contenant des DOAC.

Ce produit extrait efficacement tous les types de DOAC (dabigatran, rivaroxaban, apixaban, édoxaban, bétrixaban et argatroban) sans affecter les protéines plasmatiques de coagulation. En moins de 10 minutes, il absorbe jusqu'à 2 000 ng/ml de DOAC et ne laisse aucun effet résiduel.

Il permet ainsi de vérifier la présence de DOAC dans vos échantillons et d'éviter les faux résultats positifs, notamment dans les tests de lupus anticoagulant. Les plasmas traités peuvent ensuite être utilisés pour des dosages de facteurs et des tests de risque thrombotique.

Composants du coffret

- 1 flacon de 50 ou 100 tablettes

Avantages

Une mini-tablette de DOAC-Stop dans 1 ml de plasma normal auquel a été ajouté 500 mg/ml de dabigatran, edoxaban, bétrixaban, rivaroxaban ou apixaban ou edoxaban permet d'éliminer plus de 95% du DOAC en 5 minutes.

Il n'y a aucun effet sur la ligne de base du TCA jusqu'à 3 heures d'incubation suivant le traitement. Sur 92 échantillons de plasma



Tél: +33(0)4 67 10 71 20 - Fax: +33(0)4 67 10 71 21 - CRYOPEP, 83 rue Yves Montand, 34 080 Montpellier, FRANCE - www.cryopep.fr
CRYOPEP - La cryogénie au service de l'hémostase - Edition du 2025-06-11 13:06:23

Annexe 5. Protocole DOAC-Stop™ au laboratoire d'hémostase du CHU de Limoges

 <p>Laboratoire du CHU de Limoges</p>	UTILISATION DU DOAC STOP Instruction	LHEM AHEMO 0164 A
		Approuvé par : MAGALI DONNARD BIOL. RESP. SECTEUR HEMOSTASE
		Page 1/1

I. PRINCIPE

Les Anticoagulants Oraux Directs (AOD) inhibent de façon spécifique et directe les facteurs de la coagulation activés qui sont soit la thrombine, facteur IIa (Dabigatran) soit le facteur de Stuart activé, Xa (Apixaban et Rivaroxaban). Les AOD sont connus pour leur interférence à degrés divers avec pratiquement tous les tests de coagulation. DOAC-Stop est un produit conçu pour résoudre les problèmes diagnostics dus aux AOD. Après traitement au DOAC-Stop, les échantillons de plasma peuvent être analysés pour tout défaut de coagulation.

II. RÉACTIF

Commercialisé par Cryopep. Flacon contenant 100 comprimés. À conserver entre 2 et 8°C au sec jusqu'à la date de péremption.

III. MODE D'EMPLOI

DOAC-Stop est conçu pour un usage sur échantillon suspecté de contenir des DOAC sur plasma au citrate.

Préparation du plasma similaire aux procédures habituelles idem pour la congélation du plasma. CF LHEM AHEMO 0002H et LHEM AHEMO 0016.

Ensuite, il faut préparer le tube pour l'ajout du DOAC-Stop

1. Ajouter 0,5 à 1,5mL d'échantillon de plasma au citrate dans un tube à centrifugation.
2. Ajouter 1 comprimé DOAC-Stop et homogénéiser sur l'agitateur de cytologie jusqu'à ce qu'il se soit dispersé pendant 5-10 minutes.
3. Centrifuger l'échantillon au programme habituel, 2300g pendant 15 minutes.
4. Le surnageant du plasma peut alors être utilisé pour les tests de coagulation

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.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

Évaluation du DOAC Stop™ pour la neutralisation des AOD dans les bilans d'hémostase au CHU de Limoges

Les anticoagulants oraux directs (AOD) font partie d'une classe de médicaments de plus en plus prescrite dans la prise en charge des pathologies thromboemboliques. Cependant, leur présence dans le plasma est à l'origine de nombreuses interférences analytiques sur les tests d'hémostase les rendant ininterprétables. Cette situation contraint à différer les examens ou à instaurer une fenêtre thérapeutique, source de contraintes logistiques et médicales. En réponse à ces problématiques, des moyens de neutralisations des AOD ont été développés. L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer l'efficacité d'un dispositif, le DOAC-Stop™, composé de charbon activé, à neutraliser les AOD in vitro dans les échantillons de plasma. L'étude a porté sur les plasmas de 111 patients traités par apixaban (n= 53), rivaroxaban (n= 39) ou dabigatran (n= 19), en conditions réelles d'utilisation. Les résultats ont démontré une neutralisation complète des AOD, avec des activités anti-Xa et anti-IIa indétectables après pré-traitement analytique. Cette efficacité a permis de confirmer l'impact des AOD sur les différents tests d'exploration de l'hémostase, qu'ils soient de routine ou spécialisés, mettant en évidence des résultats faussement abaissés, normaux ou des recherches d'anticorps anti-phospholipides faussement positives. Ces interférences expliquent l'absence actuelle de rendu pour ces examens chez les patients sous AOD et soulignent la nécessité d'une méthode de neutralisation de ces traitements comme le DOAC-Stop™. In fine, ce travail montre l'efficacité et la possibilité de rendre des résultats d'hémostase de manière sécurisée chez des patients sous AOD grâce au DOAC-Stop™.

Mots-clés : Anticoagulants oraux directs (AOD), DOAC-Stop™, interférences analytiques, bilan d'hémostase, traitement pré-analytique, thrombose, anticorps anti-phospholipides

Evaluation of DOAC-Stop™ for the neutralisation of DOAC's in haemostasis tests at Limoges University Hospital

Direct Oral Anticoagulants (DOAC's) are part of a class of drugs that is increasingly prescribed for the treatment of thromboembolic diseases. However, their presence in plasma is responsible for numerous analytical interferences with haemostasis tests, rendering them uninterpretable. This situation means that tests have to be postponed or a therapeutic window opened, which is a source of logistical and medical constraints. In response to these problems, means of neutralising DOACs have been developed. The aim of this thesis work was to evaluate the effectiveness of a device, DOAC-Stop™, composed of activated charcoal, in neutralising DOACs in vitro in plasma samples. The study involved the plasma of 111 patients treated with apixaban (n= 53), rivaroxaban (n= 39) or dabigatran (n= 19), under actual conditions of use. The results demonstrated complete neutralisation of the DOACs, with undetectable anti-Xa and anti-IIa activity after analytical pre-treatment. This efficacy has made it possible to confirm the impact of DOACs on the various haemostasis tests, whether routine or specialised, showing falsely lowered or normal results, or falsely positive tests for anti-phospholipid antibodies. These interferences explain the current lack of results for these tests in patients on AODs and underline the need for a neutralisation method for these treatments such as DOAC-Stop™. Ultimately, this study demonstrates the efficacy and feasibility of using DOAC-Stop™ to provide haemostasis results safely in patients on DOACs.

Keywords : Direct Oral Anticoagulants (DOAC), DOAC-Stop™, analytical interferences, haemostasis tests, pre-analytical treatment, thrombosis, antiphospholipid antibodies

