



HAL
open science

**Variabilité interindividuelle de la réponse
pharmacocinétique et pharmacodynamique, évaluée par
thrombinographie, aux anticoagulants oraux directs chez
le patient de 80 ans et plus traité pour fibrillation atriale**

Geoffrey Foulon-Pinto

► **To cite this version:**

Geoffrey Foulon-Pinto. Variabilité interindividuelle de la réponse pharmacocinétique et pharmacodynamique, évaluée par thrombinographie, aux anticoagulants oraux directs chez le patient de 80 ans et plus traité pour fibrillation atriale. Pharmacologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5017 . tel-04051503

HAL Id: tel-04051503

<https://theses.hal.science/tel-04051503>

Submitted on 30 Mar 2023

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

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

École doctorale **Médicament Toxicologie Chimie Imagerie** (ED 563)

UMR_S1140 Innovations thérapeutiques en hémostase

Variabilité interindividuelle de la réponse
pharmacocinétique et pharmacodynamique,
évaluée par thrombinographie, aux
anticoagulants oraux directs chez le patient
de 80 ans et plus traité pour fibrillation
atriale

Par Geoffrey FOULON-PINTO

Thèse de doctorat de Pharmacologie

Dirigée par le professeur Virginie SIGURET

et par le docteur Emmanuel CURIS

Présentée et soutenue publiquement le 29 mars 2021

Devant un jury composé de

Docteur Corinne FRERE, MCU-PH (HDR), Sorbonne Université, rapporteuse ;
Docteur Aurélien LEBRETON, MCU-PH (HDR), Université Clermont Auvergne, rapporteur ;
Professeur Elena PAILLAUD, PU-PH, Université de Paris (Médecine), examinatrice ;
Professeur Thomas LECOMPTE, PU-PH, Université de Genève, examinateur ;
Professeur Virginie SIGURET, PU-PH, Université de Paris (Pharmacie), directrice de thèse ;
Docteur Emmanuel CURIS, MCU, Université de Paris (Pharmacie), directeur de thèse.



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Titre : Variabilité interindividuelle de la réponse pharmacocinétique et pharmacodynamique, évaluée par thrombinographie, aux anticoagulants oraux directs chez le patient de 80 ans et plus traité pour fibrillation atriale

Résumé : Les anticoagulants oraux directs (AOD) sont recommandés en première intention dans fibrillation atriale non valvulaire (FANV) pour prévenir le risque thrombo-embolique. Très peu de patients âgés de plus de 80 ans ont été inclus dans les essais cliniques pivots et les données spécifiques pharmacocinétiques (PK) et pharmacodynamiques (PD) en vie réelle sont très limitées chez ces patients à haut risque à la fois hémorragique et thrombotique.

L'étude ADAGE (*Assessment of Direct oral Anticoagulants in GEriiatrics*) est une étude académique prospective, multicentrique, non interventionnelle de phase IV (NCT 02464488). Un suivi clinique à 6 mois a permis de recueillir les événements hémorragiques et thrombotiques. Les critères d'inclusion des patients étaient d'être âgés de 80 ans ou plus et d'être traités par AOD pour FANV depuis au moins 4 jours. Un à cinq prélèvements ont été réalisés à des heures variables par rapport à la dernière prise sur une période maximale de 20 jours. L'activité anti-Xa plasmatique a été mesurée par méthode chromogénique. La réponse PD a été évaluée à l'aide de deux systèmes innovants de mesure de la génération de thrombine : ST-Genesis® (Stago), avec trois conditions expérimentales (concentration de facteur tissulaire forte ou intermédiaire, ce dernier en présence ou non de thrombomoduline), et Thrombodynamics-4D® (HemaCore-LLC) intégrant en sus une étude de fibrinographie plasmatique. L'influence des caractéristiques des patients sur les paramètres PK et PD a été étudiée en analyse univariée et multivariée.

Nous avons en premier lieu établi les performances analytiques des deux systèmes pour évaluer la réponse aux AOD (Foulon-Pinto et coll., *J Int Lab Hematol* 2020). La génération de thrombine étudiée à l'aide des deux systèmes montre une excellente sensibilité pour évaluer la réponse aux xabans *in vitro* et *ex vivo* (allongement des paramètres temporels, diminution de la hauteur du pic et du potentiel endogène de thrombine concentration-dépendants). Un résultat important est que l'effet du dabigatran n'est évalué de manière fiable que par le Thrombodynamics-4D®.

L'étude ADAGE a inclus prospectivement 265 patients d'âge moyen 86 ans : 104 traités par rivaroxaban, 111 par apixaban et 50 par dabigatran. L'objectif principal de mon travail de thèse était de préciser la variabilité inter-individuelle des profils PK et PD du rivaroxaban et de l'apixaban chez ces patients et d'évaluer l'influence des facteurs individuels cliniques, biologiques, thérapeutiques et pharmacogénétiques sur ces profils. Nous apportons de nouvelles données sur la variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques des xabans chez ces patients, recevant respectivement 15 mg/jour de rivaroxaban ou 2x2,5 mg/jour d'apixaban (moyennes \pm écarts-types) : 273 ± 133 et 195 ± 91 ng/mL au pic, 54 ± 40 et 88 ± 53 ng/mL en résiduel. Les deux systèmes de mesure de la génération de thrombine permettent d'observer une variabilité inter-individuelle des différents paramètres au pic et en résiduel dont l'importance dépend des conditions expérimentales. De plus, cette approche nous a permis de mettre en évidence un état relatif sous-jacent d'hypercoagulabilité globale chez les patients d'ADAGE. À 6 mois de suivi, 11,2 % des patients traités par xaban ont présenté un événement hémorragique ; plus de la moitié de ces événements étaient majeurs. Les caractéristiques basales des patients n'influencent pas la probabilité de survenue d'un événement clinique dans notre étude (3^e article en préparation).

En perspective, les données spécifiques PK et PD évaluées par la génération de thrombine obtenues chez des patients gériatriques traités par AOD devraient nous permettre de construire un modèle PK/PD par une approche de population.

Mots clefs : Anticoagulants oraux directs, variabilité de la réponse, génération de thrombine, pharmacocinétique, pharmacodynamie, sujets âgés

REMERCIEMENTS

Aux docteurs Corinne Frère et Aurélien Lebreton, rapporteurs de ce travail de thèse et aux professeurs Elena Paillaud-Puig et Thomas Lecompte examinateurs ; je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur de juger ce travail. La présente thèse représente pour moi un investissement majeur sur ces trois dernières années, elle est également la conclusion de mes quatre années d'internat à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris. J'espère qu'elle sera à la hauteur de vos attentes.

Au docteur Emmanuel Curis, merci d'avoir bien voulu co-encadrer ce travail de thèse. Vous vous êtes toujours montré disponible et avez beaucoup apporté dans la réalisation de cette thèse.

Au professeur Virginie Siguret, le plus sincère des remerciements pour tout ce que vous m'avez apporté depuis mon arrivée à l'unité 1140. Merci pour la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard tout au long de ces travaux, vraiment, merci pour tout.

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé, et qui continuent à participer à mes travaux de recherche. Tout particulièrement, je souhaite remercier le professeur Pascale Gaussem, directrice de l'unité INSERM 1140 « Innovations Thérapeutiques en Hémostase », de m'avoir accepté au sein de son unité de recherche, d'abord dans le cadre de mon master 2, puis de m'avoir permis de continuer en doctorat, et de contribuer régulièrement à l'avancée de ces travaux par de précieux conseils et suggestions.

J'aimerais également remercier tous les membres de l'unité 1140 ayant été amené à discuter ces travaux et à partager leur expérience avec moi. En particulier, le docteur Isabelle Gouin-Thibault, fréquemment associée à ces travaux et très impliquée dans leur bon déroulement, ainsi que le docteur Georges Jourdi participant également de façon très régulière à la bonne avancée d'ADAGE et des projets associés. Je remercie également le docteur Bernard Le Bonniec, d'avoir bien voulu à plusieurs occasions partager avec moi son expérience sur la génération de thrombine.

Je remercie d'autre part très sincèrement toute l'équipe du service d'hématologie biologique de l'hôpital Lariboisière, et notamment le professeur Agnès Veyradier, en sa qualité de chef de service, d'avoir soutenu mes démarches d'ouverture d'un poste d'interne Innovation Pharmacie Recherche dans le service. J'en profite également pour remercier

tous les biologistes du laboratoire, et notamment le docteur Alain Stépanian, pour leur encadrement et leur participation régulière à ma formation en hémostase. Je voudrais également remercier le docteur Maxime Delrue de m'avoir aidé à compléter mes connaissances sur la fibrillation atriale. Enfin je remercie les docteurs Marie Neuwirth, Nicolas Béranger et Arezki Hadj-Ali d'avoir été de précieux alliés du quotidien au laboratoire.

Je tiens à remercier tous les techniciens du laboratoire, pour leur participation active à ma formation concernant l'aspect technique et le bon usage des automates utiles à mes travaux, tout particulièrement Sylvie, Daniel, Gigi, Christelle, Virginie, Wassila, Thierry, Bruno, Hélène, Vincent, Florian et Wilfried. Je remercie également l'équipe du CNR Maladie de Willebrand : Sandrine, Sophie et Sylvaine pour l'important soutien logistique de tous les instants.

Je souhaite remercier tous ceux qui ont été amenés à participer à l'étude ADAGE dans son ensemble, notamment le docteur Elodie Lesteven pour son encadrement dans la gestion initiale du projet, le docteur Candice Cavalié pour sa participation active, notamment pour l'étude des plasmas apixaban et dabigatran sur le Thrombodynamics® ainsi que Guillaume Paris, élève ingénieur, pour sa participation très dynamique à l'étude sur ST-GENESIA®. Enfin, je remercie sincèrement le docteur Léa Rivière, tant pour m'avoir fait confiance pour encadrer sa thèse d'exercice que pour son implication dans le gros travail de recueil que représentait le suivi clinique des patients ; merci également au docteur Flora Ketz d'avoir accepté de participer à cette partie du travail, la participation des gériatres est indispensable pour la bonne avancée de l'étude. Et tout naturellement, je souhaite remercier tous les cliniciens impliqués dans l'étude ADAGE, notamment le professeur Éric Pautas, le docteur Carmelo Lafuente-Lafuente, le docteur Fatoumata Tall, le docteur Étienne Puymirat, le docteur Julien Le Guen et le professeur François Mullier sans qui ADAGE ne pouvait exister. Merci également à tous les partenaires industriels, notamment Nicolas Nicaise et Dagmar Pratte de 5-diagnostics pour la formation au Thrombodynamics, ainsi qu'à Céline Ayel, Audrey Carlo et Patricia Roger de chez Stago pour la formation et les différents échanges au sujet du ST-Genesisia.

Enfin, je remercie ma famille, qui finira je l'espère par se passionner pour la génération de thrombine.

Je tiens aussi à remercier toutes les techniciennes du laboratoire de Toxicologie, qui m'ont supporté pendant une année entière et dont j'ai apprécié tous les contacts répétés

au laboratoire la semaine et en garde le dimanche ainsi que toute l'équipe de nuit de Lariboisière grâce à qui toutes ces gardes au labo étaient tout sauf une corvée.

Je terminerai par quelques remerciements informels mais non moins importants, à toutes celles et ceux qui m'ont accompagné au fil de ces travaux de thèse et de surcroît au fil de mon internat à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris. Je remercie donc sincèrement le docteur M.M.R.M. et son unique plaquette et le docteur L.T. (si toutefois elle a le temps de lire ces remerciements entre deux *soops*) pour leur soutien indéfectible à grand renfort d'*emojispells*, le docteur C.L., le coup de ciseaux qui manquait à ma vie, le docteur M.D. sauvant des vies à l'aide de son magique tournevis et le docteur I.C. fidèle partenaire de choix de postes. En résumé, merci à vous toutes d'avoir été l'équipage sans lequel nous n'aurions jamais pu traverser cette mer aussi déchaînée qu'une piscine à vagues (et merci au docteur W.A. d'avoir été un fantastique capitaine de navire !). Je souhaite également remercier le docteur G.P. pour avoir été un allié de choix dans ce monde inconnu qu'était pour moi l'hémostase, ainsi qu'à X., si toutefois son esprit s'aventure jusqu'à la lecture de ce manuscrit (tu es en retard, mais possiblement pardonné... !). Je souhaite également adresser un */thanks* à l'équipe PLYCT, qui m'aura accompagné sur la fin de cette thèse et aura joué un très important rôle de soutien moral au fil des mois. Une thèse finalement, n'est-ce pas particulièrement « *Overrated* » ? Allez hop...

Enfin, j'adresse un sincère « Bon remerciement » au docteur V.N. ; sans la bienveillance et l'intérêt que tu as portés au jeune interne que j'étais, je n'aurais probablement jamais envisagé de poursuivre en recherche.

ABRÉVIATIONS et NOTATIONS

AIT	Accident ischémique transitoire
AMC	Aminométhyle coumarine (7-amino-4-méthylcoumarine)
AOD	Anticoagulant oral direct
ARISTOTLE	<i>Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation</i>
ASC	Aire sous la courbe
AVC	Accident vasculaire cérébral
AVK	Antivitamine K
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
CAT	<i>Calibrated Automated Thrombogram</i>
CE	Conformité européenne
CIQ	Contrôle interne de qualité
CIRS	<i>Cumulative Illness Rating Scale</i>
CICr	Clairance de la créatinine
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
C_{max}	Concentration maximale
C_{min}	Concentration minimale
CV	Coefficient de variation
CYP	Cytochrome P450
DS	STG-DrugScreen®
ES	Embolie systémique
ESC	Société européenne de cardiologie (<i>European Society of Cardiology</i>)
ETP	Potentiel endogène de thrombine (<i>Endogenous thrombin potential</i>)
FA	Fibrillation atriale
GP	Glycoprotéine
HAS	Haute autorité de santé
IC95	Intervalle de confiance à 95 %
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IQR	Intervalle interquartiles (<i>Interquartile range</i>)
ISTH	<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i>
LQ	Limite de quantification
LT	Temps de latence (<i>Lag time</i>)
MDRD	<i>Modification in Diet of Renal Disease</i>
PC	Protéine C
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PD	Pharmacodynamie
P-gp	Glycoprotéine P
PH	Hauteur de pic (<i>Peak height</i>)
PK	Pharmacocinétique
RCP	Résumé des caractéristiques du produit
RE-LY	Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy
ROCKET-AF	<i>Rivaroxaban Once Daily Oral Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonist for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation</i>
RRI	Risque relatif instantané (<i>hazard ratio</i>)
TCA	Temps de céphaline avec activateur
TGT	Test de génération de thrombine
TM	Thrombomoduline
TP	Taux de prothrombine
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TS	STG-ThromboScreen®
TTP	Temps au pic (<i>Time to peak</i>)

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
PARTIE I – FIBRILLATION ATRIALE, ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS ET ÉTUDE ADAGE	11
I. LA FIBRILLATION ATRIALE, PATHOLOGIE DU SUJET ÂGÉ.....	11
II. PHYSIOLOGIE DE L'HÉMOSTASE.....	20
III. LES ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS.....	29
IV. ÉTUDE ADAGE ET OBJECTIFS DE MA THÈSE.....	48
V. DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE ADAGE.....	51
VI. LA COHORTE ADAGE : UNE COHORTE DE PATIENTS GÉRIATRIQUES.....	56
VII. CONCLUSION.....	60
PARTIE II – PROFILS PHARMACOCINÉTIQUES DES AOD CHEZ LES PATIENTS D'ADAGE	62
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	62
II. MÉTHODES DE MESURE SPÉCIFIQUE DES CONCENTRATIONS D'AOD.....	69
III. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU RIVAROXABAN.....	71
IV. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DE L'APIXABAN.....	73
V. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU DABIGATRAN.....	76
VI. CONCLUSION.....	77
PARTIE III – PHARMACODYNAMIE DES AOD ET GÉNÉRATION DE THROMBINE ... 78	78
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	78
II. LIMITES DES EXAMENS SEMI-GLOBAUX DE COAGULATION POUR ÉVALUER L'EFFET DES AOD.....	79
III. MESURE DE LA GÉNÉRATION DE THROMBINE : UN BREF HISTORIQUE.....	83
IV. LA GÉNÉRATION DE THROMBINE EN PRATIQUE : LE THROMBOGRAMME.....	89
V. GÉNÉRATION DE THROMBINE AVEC LE SYSTÈME ST-GENESIA®.....	91
VI. GÉNÉRATION DE THROMBINE AVEC LE SYSTÈME THROMBODYNAMICS®.....	110
VII. ÉTUDE DE LA PHARMACODYNAMIE DES AOD PAR THROMBINOGRAPHIE ET FIBRINOGRAPHIE.....	122
VIII. CONCLUSION.....	138
PARTIE IV – FACTEURS DE VARIABILITÉ DE LA RÉPONSE AUX XABANS	141
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	141
II. FACTEURS DÉMOGRAPHIQUES, CLINICO-BIOLOGIQUES, THÉRAPEUTIQUES ET PHARMACOGÉNÉTIQUES : DONNÉES DE LA LITTÉRATURE.....	144
III. FACTEURS THÉRAPEUTIQUES ET PHARMACOGÉNÉTIQUES.....	145
IV. ANALYSE STATISTIQUE.....	152
V. FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE AU RIVAROXABAN.....	153
VI. FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE À L'APIXABAN.....	159
VII. CONCLUSION.....	164
PARTIE V – SUIVI CLINIQUE DES PATIENTS ADAGE	165
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	165
II. SUIVI CLINIQUE DES PATIENTS ADAGE TRAITÉS PAR XABANS.....	165
III. ÉVÉNEMENTS HÉMORRAGIQUES.....	167
IV. COMPLICATIONS THROMBOTIQUES.....	174
V. DÉCÈS TOUTES CAUSES CONFONDUES.....	177
VI. CONCLUSION.....	178
DISCUSSION	179
CONCLUSION	195
ANNEXES	197
BIBLIOGRAPHIE	219
TABLE DES MATIÈRES	237
TABLE DES ILLUSTRATIONS	243

INTRODUCTION

Les anticoagulants oraux directs (AOD) sont utilisés en pratique courante depuis maintenant plus de dix ans dans la prévention du risque thrombo-embolique de la fibrillation atriale (FA), et sont désormais recommandés en première intention dans cette indication. La fibrillation atriale est une pathologie du sujet âgé ; de nombreux octogénaires et nonagénaires prennent quotidiennement des AOD. Pourtant, les essais de phase III n'ont inclus qu'une proportion réduite de patients âgés de 80 ans et plus ; aussi les données spécifiques de pharmacocinétique (PK) et de pharmacodynamie (PD) en vie réelle sont limitées chez ces patients polypathologiques et polymédiqués, connus pour être à la fois à haut risque hémorragique et thrombotique.

Ce travail de thèse porte sur l'étude de la PK/PD des AOD chez des sujets très âgés traités pour fibrillation atriale, inclus dans l'étude ADAGE (*Assessment of Direct oral Anticoagulants in GEriiatrics*), étude académique prospective, multicentrique, non interventionnelle de phase IV (NCT 02464488).

Après un rappel bibliographique, la première partie de ce travail est consacrée à la présentation du protocole de l'étude ADAGE et à la description de la cohorte des inclus. La seconde partie traite de la pharmacocinétique des AOD chez les patients de l'étude et apporte de nouvelles données en vie réelle chez ces sujets âgés telles que les concentrations résiduelles attendues dans cette population et l'importance de la variabilité inter-individuelle. Dans la troisième partie, je me suis intéressé à la pharmacodynamie des AOD chez les patients âgés, étudiée à l'aide de deux systèmes innovants de génération de thrombine : le ST Genesis® et le Thrombodynamics-4D®. Les performances analytiques du ST Genesis ont fait l'objet d'un premier article (Foulon-Pinto et collègues, *J Int Lab Hematol*, 2020). L'intérêt de ce système pour explorer la variabilité pharmacodynamique de la réponse au rivaroxaban et à l'apixaban des patients ADAGE est par ailleurs le sujet d'un second article (Foulon-Pinto et collègues, en préparation). La pharmacodynamie des AOD étudiée en associant thrombinographie et fibrinographie à l'aide du système Thrombodynamics fait l'objet d'un troisième article (Foulon-Pinto et collègues, en préparation). La quatrième partie explore l'influence des caractéristiques démographiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques et génétiques des patients ADAGE sur la réponse pharmacocinétique et pharmacodynamique aux xabans. Enfin, la cinquième et dernière partie de ce travail de thèse présente les données du suivi clinique réalisé six mois après inclusion dans l'étude.

PARTIE I – FIBRILLATION ATRIALE, ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS ET ÉTUDE ADAGE

I. LA FIBRILLATION ATRIALE, PATHOLOGIE DU SUJET ÂGÉ

I.1. Qui sont les sujets âgés ?

Définir un âge à partir duquel un sujet devient « âgé » est peu aisé tant le vieillissement est un processus multifactoriel et progressif. Dans un rapport de l'Organisation mondiale de la santé publié en 2015 et intitulé « Rapport mondial sur le vieillissement et la santé », le docteur Margaret Chan, alors directrice générale, rappelait qu'il « n'existe pas d'âge-type de la personne âgée » [1]. Pour les pays développés, l'âge seuil définissant un sujet âgé est généralement de 60 ou 65 ans, calqué sur l'âge moyen de départ à la retraite. Ce premier seuil ne permet cependant pas de définir une population homogène de sujets âgés. Aussi n'est-il pas rare de retrouver un second seuil fixé à 80 ou 85 ans, formant le groupe du quatrième âge (également appelé grand âge), ou « *oldest old* » en anglais, seuil retenu par les gériatres.

I.1.1. Espérance de vie

D'après l'Institut national de la statistique et des études économiques, l'espérance de vie est définie comme étant « la durée de vie moyenne, autrement dit l'âge moyen au décès d'une génération fictive soumise aux conditions de mortalité de l'année. Elle caractérise la mortalité indépendamment de la structure par âge ». Dans son rapport de 2019, l'Organisation des nations unies estimait que dans le monde, l'espérance de vie à la naissance était de 72,6 ans et projetait qu'elle serait de 77,1 ans en 2050. Un triplement de la population des sujets âgés de 80 ans et plus est attendu, passant de 143 millions en 2019 à 426 millions d'ici 2050 [2]. Dans les pays développés, l'espérance de vie est plus importante chez les femmes que chez les hommes, avec un écart estimé entre 3,9 et 8,5 ans en 2010 mais qui devrait se réduire d'ici 2030. En France, l'espérance de vie en 2010 était de 84,9 ans chez les femmes contre 77,9 ans chez les hommes, avec une évolution attendue en 2030 à 88,6 ans chez les femmes et 81,7 ans chez les hommes [3].

I.1.2. Vieillesse et fragilité

Le vieillissement est un processus physiologique. Il s'agit d'un processus en soi qui n'est pas lié à l'apparition ou la manifestation de pathologies. De façon simplifiée, le processus de vieillissement repose sur des altérations aléatoires apparaissant au niveau moléculaire et cellulaire [4,5]. Les structures endommagées au fil du temps limitent progressivement les capacités de l'individu, le rendant plus enclin à développer telle ou telle pathologie. Par ailleurs, bien que l'âge ne soit pas l'unique déterminant du vieillissement, il n'en reste pas moins un facteur de risque pour diverses manifestations pathologiques. Par exemple, en ce qui concerne le système cardio-vasculaire, les sujets âgés sont connus pour être à haut risque thrombotique [6,7]. Ils sont également à haut risque hémorragique, toutefois celui-ci n'est pas lié directement au vieillissement, mais à des pathologies sous-jacentes (lésions digestives, chutes...).

Néanmoins, deux individus de même âge ne vont pas vieillir de la même façon. En particulier, chez les sujets âgés, il est nécessaire de parler du concept de fragilité. De façon simplifiée, la fragilité est un état de vulnérabilité pouvant se manifester dans le cadre d'un événement mineur (appelé « stress aigu ») : infection mineure, chirurgie, introduction d'un nouveau médicament... [8]. Le sujet non fragile se remettra sans conséquence de ce stress aigu, à l'inverse du sujet fragile chez qui cet état sera propice à l'apparition d'événements intercurrents à type de chute, de démence, d'infection...[8]. En résulte une perte d'autonomie pouvant aller jusqu'à la dépendance. Dans les pays développés, la prévalence de la fragilité augmente avec l'âge et concerne 30 à 40 % des sujets âgés de plus de 85 ans [9,10].

I.1.3. Polypathologie du sujet âgé

Il n'existe pas aujourd'hui de consensus sur la définition de la polypathologie ; cependant plusieurs auteurs utilisent ce terme chez des patients présentant deux pathologies chroniques ou plus [11–13]. Cette notion est à distinguer de la notion de comorbidité : la comorbidité suggère qu'il existe une pathologie principale et des pathologies associées tandis que la notion de polypathologie considère le patient et ses différentes pathologies chroniques comme un ensemble [13]. La prévalence de la polypathologie augmente avec l'âge et une étude canadienne récente estime qu'au-delà de 65 ans, les patients souffrent en moyenne de trois pathologies chroniques et qu'environ les trois quarts de cette population peut être considérée comme polypathologique [11]. Les différentes pathologies d'un patient polypathologique peuvent interagir les unes avec les autres, ce qui complexifie leur prise en charge. Par ailleurs, chez le sujet âgé fragile, le

risque de décompensations organiques et fonctionnelles les unes à la suite des autres est toujours à redouter [14].

Évaluer la polypathologie : le score CIRS-G

Pour évaluer et standardiser la sévérité de la polypathologie en gériatrie, les cliniciens ont à leur disposition un score nommé CIRS pour « *Cumulative Illness Rating Scale* ». Ce score développé par Linn et coll. a été proposé en 1968, dans la revue de la Société américaine de gériatrie [15], puis réadapté par Miller et collègues en 1992, alors nommé CIRS-G pour « *CIRS for Geriatrics* » [16]. Ce score comprend 14 items, chacun représentant un organe ou groupe d'organes (cœur, appareil respiratoire, fonction hépatique, troubles psychiatriques et comportementaux...) et chaque item peut être coté de 0 à 4, suivant la sévérité des pathologies concernant le système en question (Tableau 1). Par exemple, un score de 0 signifie qu'aucune pathologie n'affecte ce système, tandis qu'un score de 4 fait état d'une pathologie très sévère pouvant nécessiter un traitement immédiat ou bien témoignant d'une incapacité fonctionnelle grave, comme un accident vasculaire cérébral (AVC) ou une insuffisance rénale terminale nécessitant la mise sous dialyse [17]. Ainsi, ce score prend en compte le nombre de pathologies de systèmes mais aussi leur fardeau associé (Tableau 1).

La polymédication

À l'instar de la polypathologie, il n'existe pas de consensus sur la notion de polymédication. Dans la littérature, il est commun de parler de polymédication chez les patients prenant régulièrement cinq médicaments différents ou plus par jour [14,18]. La Haute Autorité de santé (H. A. S.) propose cependant la définition suivante comme étant plus adaptée : « prise régulière de plusieurs médicaments nécessaires au traitement de plusieurs maladies chroniques » [14]. Différents risques sont associés à la polymédication : risque de confusion pour le patient, risque d'interactions médicamenteuses notamment dans le cas de médicaments interagissant avec les cytochromes (CYP) ou la glycoprotéine-P (p-gP) pouvant conduire à une majoration d'effets indésirables ou à l'inefficacité d'un médicament ; ou encore risque d'interaction médicament et une pathologie non ciblée par ce médicament [19,20]. Concernant la France, les données de la Caisse nationale de l'assurance maladie montrent que parmi les patients âgés de 75 ans et plus, 10 % d'entre eux prennent 8 à 10 médicaments par jour [14].

Ainsi, ceux que l'on appelle communément « les sujets âgés » ne représentent pas une cohorte homogène de patients mais forment cependant, à partir de 80 ans, un groupe de patients souvent fragiles, polypathologiques et polymédiqués.

Tableau 1 : Le score CIRS-G.

Instructions de cotation du CIRS-G	
0 = aucun	pas de pathologie de l'organe ou du système
1 = léger	pathologie n'affectant pas l'activité normale (un traitement peut être ou ne pas être requis ; pronostic excellent)
2 = modéré	pathologie affectant l'activité normale (un traitement est nécessaire ; pronostic bon)
3 = sévère	pathologie invalidante ou handicapante (un traitement est urgent ; pronostic réservé)
4 = très sévère	pathologie menaçant la vie (traitement urgent ou inefficace ou n'existant pas ; pronostic grave)
Items du CIRS-G	
Cardiaque	cœur seulement
Hématologie	sang, moelle osseuse, rate, vaisseaux sanguins, ganglions
Hypertension	cotation fondée sur sa sévérité (organes touchés cotés séparément)
Respiratoire	poumons, bronches, trachée sous larynx
ORL et ophtalmologique	oreilles, nez, larynx, yeux
Digestif supérieur	œsophage, estomac, duodénum, voies biliaires, pancréas
Digestif inférieur	reste des intestins, dont hernies
Hépatique	foie seulement
Rénal	reins seulement
Génito-urinaire	uretères, urètre, vagin, utérus, prostate, vessie, gonades
Musculosquelettique et téguments	muscles, os, peau
Neurologique	cerveau (démences exclues), moelle épinière, nerfs
Endocrino-métabolique	diabète, infection diffuse, intoxication
Psychiatrie	inclut démences, agitation, dépression, anxiété, psychoses

Le score CIRS-G total est la somme des scores de chaque système.

I.2. La fibrillation atriale

I.2.1. Définition

La fibrillation atriale est une maladie du système cardio-vasculaire. Il s'agit d'une arythmie caractérisée par la disparition du rythme sinusal normal, remplacé par des contractions rapides et inefficaces des oreillettes et provoquant la contraction irrégulière

et souvent rapide des ventricules (tachyarythmie) [21,22]. En l'absence de valvulopathie, la fibrillation atriale est dite non valvulaire [22].

En fonction des manifestations cliniques de la fibrillation atriale, il est possible de la classer en principalement trois catégories [21,22] :

- **fibrillation atriale paroxystique** : elle se manifeste sous forme de crises aiguës qui ne durent pas plus de sept jours et se terminent spontanément, généralement au bout de 48 h ;
- **fibrillation atriale persistante** : les crises durent plus de sept jours ; en l'absence de résolution spontanée, une cardioversion pharmacologique ou électrique peut normaliser le rythme cardiaque ;
- **fibrillation atriale permanente** : elle reste présente durablement, il n'est pas possible de retrouver un rythme normal.

I.2.2. Physiopathologie

La fibrillation atriale est une pathologie dont les mécanismes, complexes, ne sont pas encore totalement élucidés. Il s'agit d'une altération du tissu atrial faisant suite à un remodelage pathologique d'ordre structurel ou électro-physiologique [22].

Contraction cardiaque et rythme sinusal

Afin d'assurer son rôle de pompe maintenant le flux sanguin, le cœur reçoit des impulsions électriques du nœud sinusal, situé au sommet de l'oreillette droite. Ce courant électrique de quelques millivolts provoque d'abord la contraction des oreillettes, permettant le passage du flux sanguin des oreillettes vers les ventricules. Le courant électrique traverse ensuite un relais, le nœud auriculo-ventriculaire puis se propage dans la partie inférieure du cœur par le réseau de His puis par les fibres de Purkinje (Figure 1), provoquant une contraction des ventricules distincte de la contraction des oreillettes [23]. À l'échelle des cardiomyocytes, la contraction est rendue possible par des échanges d'électrolytes, ions potassium (K^+), sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}), entre les milieux intra- et extra-cellulaires. Au repos, la cellule cardiaque est polarisée, avec l'extérieur chargé positivement et l'intérieur chargé négativement [23]. De façon simplifiée, l'influx électrique provenant du nœud sinusal va provoquer l'ouverture de canaux ioniques transmembranaires : la phase de systole est caractérisée par une entrée de Na^+ et de Ca^{2+} et une sortie de K^+ hors de la cellule en suivant le gradient électrochimique (le milieu extra-cellulaire étant très pauvre en K^+), inversant la polarisation du cardiomyocyte.

Pendant la diastole, un courant inverse se produit pour rétablir les concentrations ioniques initiales [23].

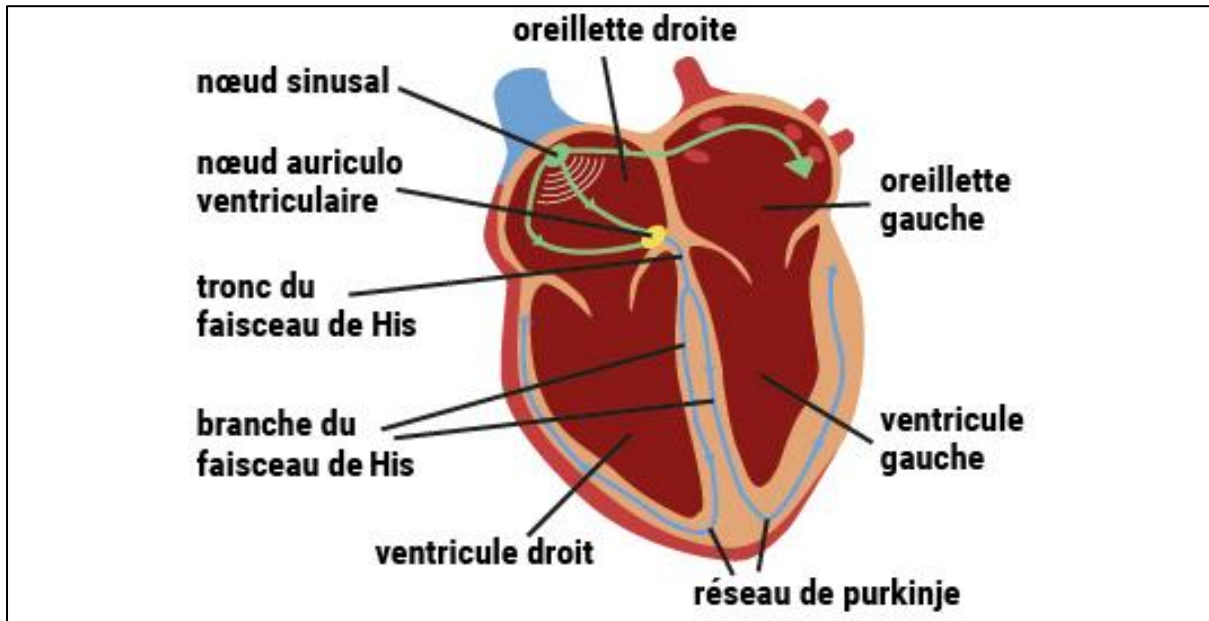


Figure 1 : Influx électrique et contraction cardiaque.

Chez le sujet sain, l'influx électrique généré par le nœud sinusal se propage dans le cœur, permettant une contraction des oreillettes puis des ventricules. D'après la Société française de cardiologie [23].

Mécanismes de la fibrillation atriale

Comme l'illustre la Figure 2, au niveau structurel, les altérations du tissu atrial sont liées au processus du vieillissement, favorisées par des pathologies cardio-vasculaires, l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque mais également par des pathologies extra-cardiaques comme l'hyperthyroïdie [21,22,24,25]. Au niveau électrophysiologique, la perturbation des échanges sodium-calcium peut favoriser le développement de la fibrillation atriale. De façon simplifiée, une fuite d'ions Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire peut provoquer une dépolarisation transitoire du potentiel de membrane. Ceci a pour conséquence un allongement de la période dite « réfractaire » pendant laquelle la cellule atriale est incapable, à la suite d'une contraction, de se contracter à nouveau [21,24,26]. Des facteurs cardio-vasculaires (hypertension artérielle, obésité...), environnementaux (alcool) et génétiques contribuent à l'installation d'une fibrillation atriale.

I.3. Fibrillation atriale, et accident vasculaire cérébral ischémique

Les tableaux cliniques de la fibrillation atriale sont assez frustes et peuvent être silencieux. La fibrillation atriale expose cependant à un important risque thrombo-embolique, avec un risque annuel d'AVC qui peut atteindre 20 % [27]. Ce risque de thrombose vient du fait que, dans la fibrillation atriale, les oreillettes ne se contractent

plus de façon régulière, pouvant entraîner une stase au niveau de l'auricule (partie antérieure de l'oreillette). Des embolies peuvent s'y former et être à l'origine d'AVC ischémiques dont le retentissement clinique et la gravité dépendent du territoire atteint [28].

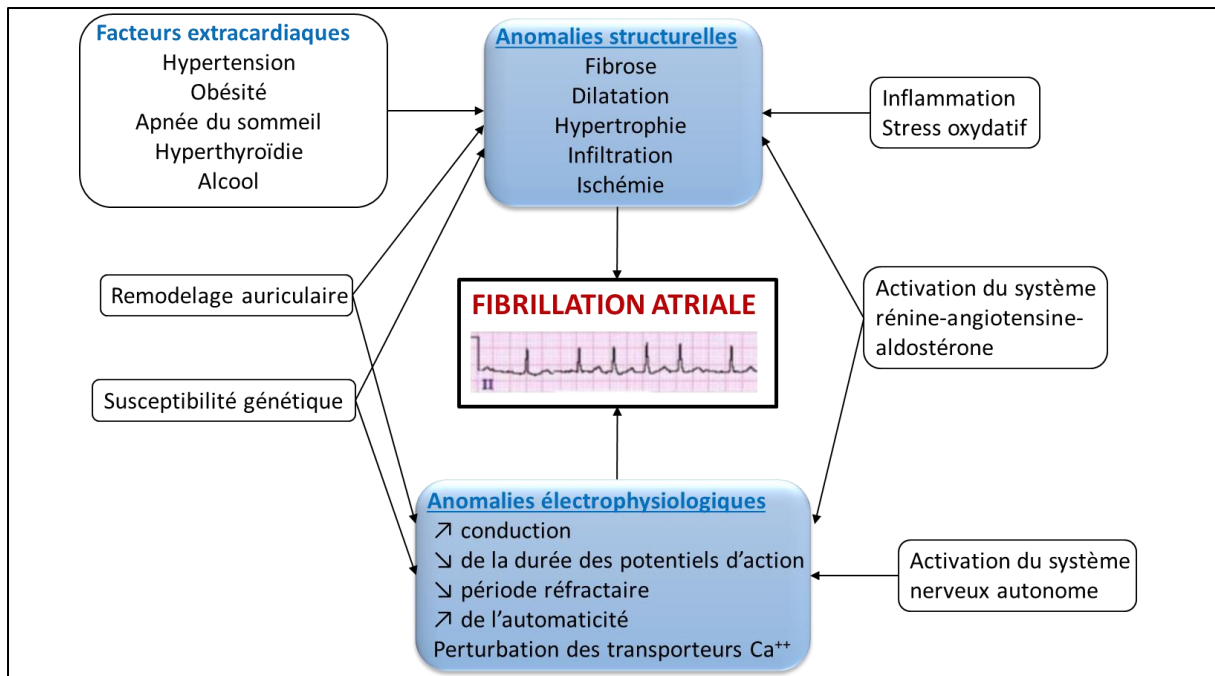


Figure 2 : Mécanismes de la fibrillation atriale.

Les facteurs favorisant l'apparition de la fibrillation atriale sont d'origines très variées et conduisent à des altérations à la fois structurales et fonctionnelles, d'après January et coll. [22].

I.4. Données épidémiologiques

I.4.1. Prévalence de la fibrillation atriale

Parmi les différents troubles du rythme cardiaque, la fibrillation atriale est le plus fréquent : d'après les données de 2010, 12,6 millions de femmes et 20,9 millions d'hommes sont concernés dans le monde entier, avec une prévalence plus importante dans les pays développés [29]. La prévalence de la fibrillation atriale augmente avec l'âge [29–32] et plusieurs études ont montré que cette prévalence était supérieure à 10 % chez les octogénaires [32–34]. Par ailleurs, la prévalence est plus importante chez les hommes que chez les femmes avec un sex-ratio compris entre 1,5 et 2 [29,30,32,35]. En Europe, les données épidémiologiques de 2010 estimaient que 8,8 millions d'adultes souffraient de fibrillation atriale [36] et il a été montré récemment qu'environ 30 % des patients atteints de cardiomyopathies étaient concernés [37]. Du fait du vieillissement de la population, les données suggèrent que plus de 15 millions d'européens seront concernés à l'horizon 2040, dont environ 11 millions seront âgés de plus de 75 ans [36].

I.4.2. Incidence

Deux études rapportent des incidences annuelles similaires, de 20,7/1000 patients pour les patients âgés de 80 à 85 ans dans une cohorte néerlandaise [32] et de 20,0/1000 patients chez des patients de 80 à 90 ans en Suède [30]. Par ailleurs, l'étude de Piccini et collègues rapporte une incidence annuelle de 28,3/1000 patients pour des patients âgés de plus de 65 ans vivant aux États-Unis [38]. Similairement aux données de prévalence, l'incidence augmente avec l'âge [29,30,32,38], avec une incidence plus importante chez les hommes que chez les femmes [24,29,30,32,38,39]. En revanche, le taux de mortalité toute cause confondue, d'une part, et des suites d'un AVC, d'autre part, chez les patients souffrant de fibrillation atriale est plus important chez les femmes que chez les hommes [35].

I.4.3. Scores cliniques utilisés dans la fibrillation atriale

Évaluation du risque thrombotique

Les scores CHADS₂ et CHA₂DS₂-VASc sont des scores cliniques, en 5 et 8 items respectivement, visant à estimer le risque embolique chez les patients souffrant de fibrillation atriale (Tableau 2). Le score CHA₂DS₂-VASc prend en compte certaines comorbidités (hypertension artérielle, diabète...), l'existence d'éventuels antécédents thrombotiques (AVC...) mais aussi à l'âge et le sexe du patient. Un score CHA₂DS₂-VASc de 1 est associé à un risque annuel d'AVC de 1,19 % ; un score de 4 à 6 correspond à un risque annuel de 6,34 % [40].

Dans ses recommandations de 2016, la Société européenne de cardiologie (*European Society of Cardiology*, ESC) rappelle que la valeur du score CHA₂DS₂-VASc permet de justifier la mise en place ou non d'une anticoagulation par voie orale : ce traitement est nécessaire pour prévenir le risque thromboembolique en cas de score ≥ 2 et peut être considéré en cas de score égal à 1 [21].

Tableau 2 : Le score CHA₂DS₂-VASc.

ITEM	SCORE
Âge > 75 ans	+2
Sexe féminin	+1
Insuffisance cardiaque	+1
Hypertension artérielle	+1
Vasculopathie	+1
Diabète	+1
Antécédent d'AVC ou d'AIT	+2

AVC : accident vasculaire cérébral. AIT : accident ischémique transitoire.

Évaluation du risque hémorragique

Deux scores permettent d'évaluer le risque hémorragique des patients avec fibrillation atriale, les scores HAS-BLED et HEMORR₂HAGES, en 7 et 11 items respectivement, comprenant certains critères tels que l'âge, les antécédents d'AVC ou d'accident ischémique transitoire (AIT), la notion d'alcoolisme (Tableau 3 et Tableau 4).

Pour le score HAS-BLED, un score de 0 correspond à un risque hémorragique annuel de 1,13 % contre 3,74 % pour un score de 3 [41]. Pour le score HEMORR₂HAGES, un score de 1 correspond à un risque hémorragique annuel de 0,7 à 3,0 %, un score ≥ 4 correspond à un risque compris entre 4,0 et 19,3 % par an [41].

Tableau 3 : Le score HAS-BLED.

ITEM	SCORE
Pression artérielle systolique > 160 mm Hg	+1
Dialyse / transplantation rénale / créatinine sérique > 200 μ M	+1
Cirrhose / bilirubine > 2N / ASAT, ALAT, PAL > 3N	+1
Antécédent d'AVC ou d'AIT	+1
Saignements	+1
INR labiles	+1
Âge > 65 ans	+1
Prise d'AINS ou d'antiagrégants	+1
Alcoolisme	+1

ASAT : aspartate aminotransférase. ALAT : alanine aminotransférase. PAL : phosphatase alcaline. AVC : accident vasculaire cérébral ; AIT : accident ischémique transitoire. INR : International Normalized Ratio. AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien.

Tableau 4 : Le score HEMORR₂HAGES.

ITEM	SCORE
Âge > 75 ans	+1
Saignement majeur	+2
Hépatopathie / néphropathie	+1
Alcoolisme	+1
Cancer	+1
Hypertension artérielle non traitée	+1
Anémie	+1
Risque de chute	+1
Antécédent d'AVC ou d'AIT	+1
Thrombopénie	+1

AVC : accident vasculaire cérébral. AIT : accident ischémique transitoire.

I.5. La fibrillation atriale : conclusion

La fibrillation atriale est donc bien une pathologie du sujet âgé et sa prévalence augmente avec l'âge. Si les mécanismes de sa physiopathologie ne sont pas encore complètement élucidés, la majoration du risque thrombo-embolique chez les sujets atteints de fibrillation atriale en fonction de différents facteurs de risque est clairement établie. Pour prévenir ce risque, les stratégies thérapeutiques consistent à prévenir la formation d'un caillot au niveau de l'auricule chez les patients, en prescrivant un anticoagulant. Néanmoins, chez des sujets très âgés fragiles, la bonne gestion de l'anticoagulation est toujours très délicate, ces derniers étant à haut risque à la fois hémorragique et thrombotique et connus pour être généralement polyopathologiques et polymédiqués.

II. PHYSIOLOGIE DE L'HÉMOSTASE

II.1. L'hémostase : définition

Le terme « hémostase » provient des mots grecs « αἷμα – *aima* » sang, et « στάσις – *stasis* » arrêt. Le dictionnaire de français Larousse la définit comme suit : « arrêt de l'écoulement du sang, spontané (coagulation du sang) ou provoqué par différents moyens médicaux ou chirurgicaux » [42]. Il existe de nombreux mécanismes de régulation participant au maintien du sang dans un état optimal de fluidité en équilibre permanent entre deux situations extrêmes, pouvant engager le pronostic vital : l'hémorragie et la thrombose. En conditions physiologiques, le sang est maintenu dans le système vasculaire. Néanmoins, un traumatisme d'intensité variable peut engendrer une brèche vasculaire. Différents mécanismes sont activés afin de limiter l'importance du saignement, conduisant à la formation rapide d'un caillot de fibrine insoluble pour colmater la brèche, lequel se résorbera lentement afin de rétablir l'intégrité du vaisseau. Ces processus sont traditionnellement présentés en trois étapes interdépendantes : l'hémostase dite « primaire », la coagulation et la fibrinolyse.

II.2. L'hémostase primaire

L'objectif de cette première phase est l'obturation rapide de la brèche vasculaire afin de limiter au plus vite les pertes sanguines. Différents acteurs majeurs participent à cette première phase pour permettre la formation du clou plaquettaire, aussi appelé « thrombus blanc » : la paroi vasculaire elle-même, le facteur Willebrand les plaquettes et le fibrinogène.

II.2.1. La paroi vasculaire

En l'absence d'activation, l'endothélium vasculaire possède une propriété remarquable : la thromborésistance (ou non thrombogénicité). La thromborésistance est fondamentale au maintien de la fluidité sanguine car elle prévient la formation spontanée et anarchique de caillots sanguins.

En revanche, les éléments du sous-endothélium vasculaire sont hautement thrombogènes : en cas de brèche vasculaire, l'exposition d'éléments sous-endothéliaux tels que le collagène ou le facteur Willebrand vont permettre d'initier l'hémostase primaire.

II.2.2. Le facteur Willebrand

Le facteur Willebrand est une protéine multimérisée, synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Il est stocké dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules α des plaquettes avant d'être libéré dans la circulation ou au niveau du sous-endothélium [43]. Dans l'hémostase primaire, son rôle est de permettre aux plaquettes d'adhérer au sous-endothélium via le complexe membranaire plaquettaire constitué par les glycoprotéines (GP) Ib-IX-V. Par ailleurs, cette protéine permet le transport du facteur VIII qu'il protège de la dégradation protéolytique. Un déficit en facteur Willebrand, qualitatif ou quantitatif, est à l'origine de la maladie de Willebrand, maladie hémorragique constitutionnelle la plus fréquente.

II.2.3. Les plaquettes

Les plaquettes sont des éléments figurés du sang anucléés, issus de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes présents dans la moelle osseuse [44]. La membrane phospholipidique des plaquettes comprend de nombreux récepteurs glycoprotéiques, parmi lesquels ceux permettant l'adhésion des plaquettes à différents constituants du sous-endothélium : la GPIa permet la liaison au collagène et la GPIb-IX-X permet la liaison au facteur Willebrand. Au contact d'une surface thrombogène, les plaquettes s'activent et subissent des modifications conformationnelles (étalement et émission de pseudopodes) et fonctionnelles, avec notamment le réarrangement des récepteurs GPIIb/IIIa (ou intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) à leur surface.

II.2.4. Formation du clou plaquettaire

Le fibrinogène, mais aussi le facteur Willebrand dans les vaisseaux de petit calibre, sont les ligands physiologiques de GPIIb/IIIa qui vont permettre la formation de ponts inter-plaquettaires et *in fine*, la formation du clou plaquettaire [45,46].

II.3. Les facteurs de la coagulation

II.3.1. Nomenclature

La découverte des facteurs de la coagulation remonte pour la majorité d'entre eux au XX^e siècle. Afin d'éviter que les différentes équipes ne donne des noms distincts à un même facteur, des efforts pour harmoniser la nomenclature seront entrepris dès les années 1950. De fait, un unique et même facteur a pu se voir attribuer jusqu'à 14 noms différents [47]. Cette définition d'une nomenclature unique a été l'une des premières missions de l'ICTH – *International Committee on Thrombosis and Haemostasis*, fondé en 1954. Cette nomenclature fut réalisée par un comité nommé « *International Committee for the Standardization of the Nomenclature of the Blood Clotting Factors* », qui deviendra ensuite l'actuel SSC - *Scientific and Standardization Committee* quand l'ICTH deviendra, en 1969, l'actuelle ISTH – *International Society of Thrombosis and Haemostasis* [48]. Le comité de nomenclature recommandera tout d'abord l'emploi des chiffres romains pour distinguer les différents facteurs [47]. De façon non officielle, Robert G. Macfarlane généralisera, en 1964, l'emploi du suffixe « a » pour désigner un facteur activé, comme l'avait utilisé Peter Esnouf dans ses travaux sur le facteur X [49,50]. De nos jours, les noms des facteurs ont peu changé et l'emploi des chiffres romains est toujours la règle. Des synonymes sont apparus, empruntant notamment leurs noms aux patients chez lesquels un déficit avait été identifié [51] (Tableau 5).

Tableau 5 : Nomenclature des facteurs de la coagulation.

I	Fibrinogène	VIII	Facteur antihémophilique A
II	Prothrombine	IX	Facteur antihémophilique B
III	Facteur tissulaire / thromboplastine	X	Facteur Stuart-Prower
IV	Calcium	XI	Facteur Rosenthal
V	Proaccélérine	XII	Facteur Hageman
VII	Proconvertine	XIII	Facteur stabilisant de la fibrine

Les facteurs II, VII, IX et X, notés en gras, sont des facteurs vitamine K dépendants. Le facteur VI n'existe pas dans la nomenclature, il faisait anciennement référence au FVa.

II.3.2. Protéines vitamine K dépendantes impliquées dans la coagulation

La vitamine K (pour « *Koagulation* ») est une vitamine liposoluble jouant un rôle essentiel dans les mécanismes de la coagulation au niveau de l'hépatocyte [52]. Sous sa forme réduite (vitamine K hydroquinone), elle intervient notamment comme co-substrat lors de la gamma-carboxylation post-traductionnelle des résidus glutamiques des facteurs vitamine K-dépendant, à savoir les facteurs II (prothrombine), VII (proconvertine), IX (antihémophilique B) et X (Stuart), précurseurs de sérine-protéases. Deux protéines

inhibitrices physiologiques de la coagulation sont également vitamine-K dépendantes, la protéine C (PC) et la protéine S [53] (*vide infra*). Cette vitamine est apportée par l'alimentation, notamment les légumes verts, mais surtout produite de manière endogène par les bactéries du tube digestif. Le cycle de la vitamine K, qui permet la régénération de la forme vitamine K époxyde en forme réduite quinone puis hydroquinone via deux vitamine K oxydo-réductases, est la cible d'une des grandes familles d'anticoagulants, les médicaments antivitamine K (AVK), avec pour chef de file la warfarine [54].

II.3.3. Le fibrinogène

Le fibrinogène est un homodimère hexamérique de 340 kDa, soluble et synthétisé par l'hépatocyte. En plus de sa synthèse hépatique basale, sa production est accrue par les processus inflammatoires. Outre son rôle dans l'hémostase primaire, le fibrinogène est le substrat spécifique de la thrombine, qui le transforme en fibrine insoluble, constituant principal du caillot [55].

II.4. La thrombine, enzyme centrale de la coagulation

II.4.1. La thrombine, une sérine-protéase de la coagulation

La thrombine est une sérine-protéase dont le rôle principal est de permettre la transformation du fibrinogène soluble en caillot de fibrine insoluble [56]. Les sérine-protéases impliquées dans l'hémostase ont un mode d'action commun : elles clivent les protéines par hydrolyse de liaisons peptidiques, libérant ainsi un peptide d'activation. Le terme sérine-protéase vient du fait qu'elles possèdent en leur site actif, constitué de la triade catalytique Ser-His-Asp, un résidu sérine [57] qui joue un rôle clef dans la catalyse de la réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique. Sur le plan structural, la thrombine est un hétérodimère ayant un poids moléculaire de 37 kDa, composé d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde reliées l'une à l'autre par un pont disulfure [58]. La thrombine est produite à partir de la prothrombine circulante, après activation par le complexe prothrombinase [58] (*vide infra*).

II.4.2. Générer de la thrombine : la clé de la coagulation

Pour former un caillot de fibrine, de la thrombine doit être générée à proximité directe de la brèche vasculaire. Cette génération résulte de la succession de l'activation des sérine-protéases à la surface des plaquettes activées, en présence d'ions Ca^{2+} – on parle de cascade de la coagulation (Figure 3). Il existe deux grandes voies réactionnelles conduisant à cette génération de thrombine à partir de la prothrombine : la voie du facteur tissulaire et la voie des facteurs « contacts ».

La voie du facteur tissulaire

Dans le cas d'une lésion, la brèche vasculaire va provoquer la libération locale de facteur tissulaire, débutant les mécanismes de la coagulation par la voie dite « voie du facteur tissulaire ». Le facteur tissulaire forme alors un complexe avec le facteur VIIa présent à l'état de traces dans la circulation. Ce complexe va pouvoir à son tour activer d'autres facteurs, principalement le facteur X en facteur Xa, mais aussi le facteur IX en facteur IXa lorsque peu de facteur tissulaire est présent (amplification par le phénomène de la boucle de Josso) [59,60]. Cette voie de l'hémostase est également appelée « voie extrinsèque », car elle fait appel au facteur tissulaire, protéine physiologiquement absente du sang.

Les premières traces de facteur Xa générées vont permettre la génération des premières traces de thrombine et donc faire coaguler le plasma, le caillot de fibrine apparaissant dès que seulement 5 % de la thrombine totale a été générée. Immédiatement après avoir été générée, la thrombine va exercer un rétrocontrôle positif sur sa propre génération entraînant une production explosive de thrombine.

La voie des facteurs contacts

Les principaux acteurs de cette voie sont la prékallicroïne et le kininogène de haut poids moléculaire, ainsi que les facteurs XII et XI. Cette voie est ainsi nommée car son activation fait suite au contact avec une surface étrangère, phénomène initialement mis en évidence avec le verre [61]. *In vivo*, cette phase peut être activée par différents éléments comme le collagène [62] ou les polyphosphates libérés par les plaquettes activées [63,64]. La première étape de cette voie est l'activation du facteur XII dont l'ensemble des rôles physiologiques n'est pas encore complètement connu. Le facteur XIIa va catalyser l'activation du facteur XI, lui-même catalysant l'activation du facteur IX. Le facteur XIIa est également impliqué dans le clivage de la prékallicroïne en kallicroïne, cette dernière potentialisant en retour l'activation du facteur XII, en plus de transformer le kininogène de haut poids moléculaire en kininogène de bas poids moléculaire [65].

Le facteur IXa et son cofacteur, le facteur VIIIa, forment un complexe catalysant la formation de facteur Xa à partir du facteur X [66]. Le complexe composé de facteur IXa-facteur VIIIa, fixé aux phospholipides plaquettaires en présence d'ions Ca^{2+} , est appelé « complexe ténase ». Ce terme, proposé en 1967 par Hemker & Kahn lors de la première description du complexe facteur IXa-facteur VIIIa [67], est désormais un terme

générique, désignant un complexe dont le rôle est d'activer le facteur X (« ténase » dérivant de *ten-* pour dix et *-ase*, suffixe propre aux enzymes).

Le complexe prothrombinase

Le facteur Xa permet la transformation de la prothrombine en thrombine mais lentement et de manière limitée. La génération massive de thrombine est catalysée par le complexe prothrombinase. Ce dernier, décrit pour la première fois en 1967 [68] est constitué du facteur Xa, et de son cofacteur le facteur Va, de phospholipides et d'ions Ca^{2+} . La vitesse de conversion de prothrombine en thrombine par le complexe prothrombinase est très largement supérieure à celle du seul facteur Xa [69].

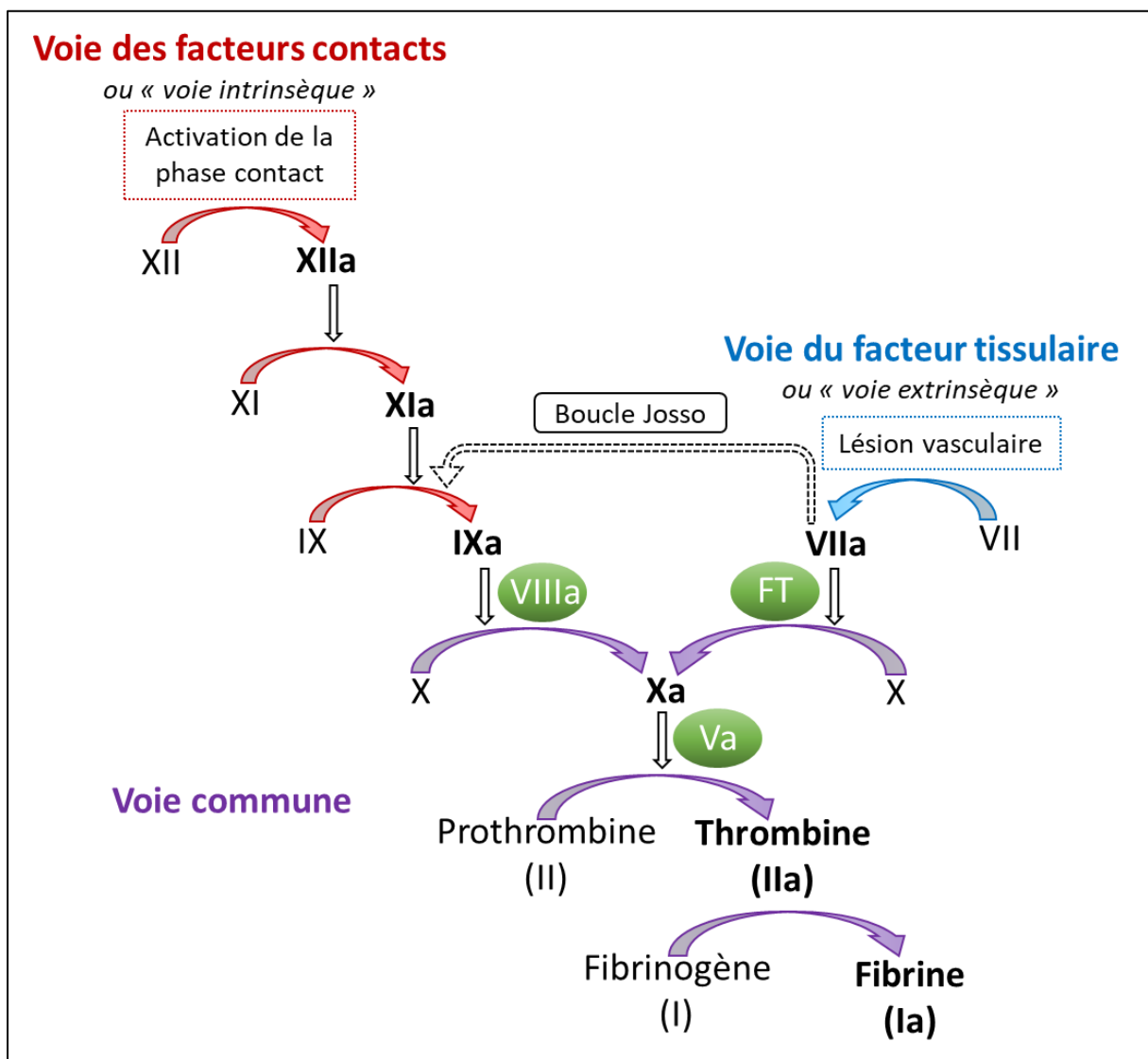


Figure 3 : Schéma simplifié des mécanismes de la coagulation.

Une fois qu'un facteur est activé (nom en gras), il permet l'activation du facteur suivant (flèches blanches), formant une cascade réactionnelle : elle permet l'amplification d'un faible signal, la libération de facteur tissulaire conduisant à une génération importante de thrombine. Ces réactions ont lieu à la surface de la membrane phospholipidique des plaquettes activées en présence de Ca^{2+} . La boucle Josso s'active notamment en cas de faible concentration de facteur tissulaire pour maintenir une génération suffisante de thrombine.

II.5. Inhibiteurs physiologiques de la coagulation

Afin d'éviter un emballement des processus qui conduirait à une extension généralisée du caillot de fibrine, la thrombine générée active aussi des mécanismes inhibant sa production. Une grande partie des protagonistes de cette régulation appartiennent à la superfamille des serpinés, signifiant littéralement « inhibiteur de sérine-protéase » (en anglais : *serpin*, pour *serine protease inhibitor*).

II.5.1. Antithrombine

L'antithrombine est une protéine dont l'activité antagoniste de la thrombine a été décrite pour la première fois en 1939 [70,71]. D'emblée, son activité a été associée à celle de l'héparine. En effet, la première observation sur le sujet est que l'héparine est incapable d'inhiber la coagulation d'une solution de fibrinogène purifiée (en présence des facteurs de coagulation adéquats), mais que cet effet est rétabli par ajout de sérum : le sérum contient donc un élément nécessaire à l'action anticoagulante de l'héparine [70,71]. L'antithrombine appartient à la superfamille des serpinés : elle a donc une action inhibitrice envers la thrombine mais également envers d'autres facteurs de la coagulation comme le facteur Xa, IXa ou XIa en formant des complexes covalents avec ces sérine-protéases de manière irréversible [72,73]. On désigne l'antithrombine comme un « cofacteur de l'héparine » car si l'action inhibitrice de l'antithrombine envers la thrombine est lente, celle-ci est 1000 à 4000 fois plus rapide en présence d'héparine [74,75]. *In vivo*, ce sont les glycosaminoglycanes présents à la surface de l'endothélium vasculaire qui potentialisent l'effet de l'antithrombine. Ainsi, l'antithrombine est l'un des principaux systèmes physiologiques contrôlant l'effet de la thrombine : un déficit en antithrombine est associé à un risque thrombotique élevé [76].

II.5.2. Protéine C, protéine S et thrombomoduline

La protéine C et son cofacteur la protéine S sont deux protéines vitamine K dépendantes [77]. Leur découverte remonte au début des années 60, par la mise en évidence d'une activité anticoagulante lors de la mise en contact de thrombine avec un concentré de facteurs vitamine K dépendants : la protéine C est alors appelée « autoprotrombine-IIa » [78]. La protéine C est une peptidase dont l'activation nécessite la présence de thrombomoduline (TM), protéine membranaire des cellules endothéliales : la thrombine, en se liant à la thrombomoduline, perd ses propriétés procoagulantes et le complexe formé active la protéine C en PCa. Le rôle du récepteur endothélial à la protéine C a été précisé plus tard : fixée à ce récepteur, la protéine C est alors activée en PCa par le complexe thrombine-thrombomoduline trois à cinq fois plus rapidement que la protéine

C circulante. La PCa, en présence de son cofacteur la protéine S, exerce son action inhibitrice par protéolyse des facteurs Va et VIIIa [72,79–83].

II.5.3. L'α-2-macroglobuline

L'α-2-macroglobuline est une glycoprotéine tétramérique ayant la capacité de lier quatre molécules de thrombine ou d'autres sérines-protéases. Contrairement à la thrombine libre, la thrombine liée à l'α-2-macroglobuline est incapable de catalyser la transformation du fibrinogène soluble en caillot de fibrine insoluble, mais reste capable de cliver des substrats synthétiques [84]. Dans ce rôle d'inhibiteur de la coagulation, l'α-2-macroglobuline est en compétition avec l'antithrombine et inhibe environ 20 % de l'activité thrombinique [85].

II.6. La fibrinolyse

La fibrinolyse est l'étape nécessaire pour la reperméabilisation complète du vaisseau. Schématiquement, la fibrinolyse consiste en la génération de plasmine à partir du plasminogène, puis à la lyse lente et progressive du caillot de fibrine [86,87] (Figure 4).

II.6.1. Formation de la plasmine

L'enzyme clé de la fibrinolyse est la plasmine. Il s'agit d'une sérine-protéase provenant de l'activation du plasminogène, son zymogène d'origine hépatique [86]. Pour former de la plasmine, le plasminogène doit subir un clivage protéolytique par l'activateur tissulaire du plasminogène [88] (t-PA), une molécule endogène, synthétisée et sécrétée principalement par les cellules endothéliales suite à différents stimuli, tels que la thrombine [87,89]. Afin d'éviter une production inadaptée de plasmine, l'activation du plasminogène par le t-PA ne peut avoir lieu que si ces deux éléments sont liés à la fibrine [86,88]. Il existe par ailleurs d'autres activateurs du plasminogène, notamment l'urokinase dont le mode d'action est très similaire au t-PA, ainsi que des activateurs associés à la voie des facteurs contacts tels que la kallikréine ou encore les facteurs XIa et XIIa [89], qui ne seront pas détaillés ici.

II.6.2. Action de la plasmine

Puisque l'activation du plasminogène ne peut avoir lieu que si celui-ci est lié au caillot de fibrine, la plasmine va être produite directement au sein du caillot. La digestion de la fibrine par la plasmine entraîne la destruction du caillot. De la lyse du caillot sont libérés des débris de fibrine solubles appelés produits de dégradation de la fibrine ou D-dimères [89].

II.6.3. Mécanismes de régulation

L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène

Le plasminogène est une molécule circulante, mais son activation nécessite la présence de t-PA, qui n'est libéré par les cellules endothéliales qu'à proximité du caillot. Néanmoins, dans le cas où du t-PA serait produit ailleurs dans la circulation, celui-ci est directement inactivé par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène [86,87,89]. Cet inhibiteur forme avec le t-PA un complexe inactif. Ainsi, même à proximité du caillot de fibrine, le t-PA a une demi-vie très courte, de l'ordre de quelques minutes [87].

L' α -2-antiplasmine

L'inhibition de la plasmine est médiée par l' α -2-antiplasmine, une serpine capable de former un complexe inactif avec la plasmine [90–92]. Le système de l' α -2-antiplasmine représente le plus puissant système d'inhibition de la fibrinolyse [90,93] : bien que l' α -2-antiplasmine ne soit présente qu'à une très faible concentration dans le plasma [91] (environ 1 μ M), la demi-vie *in vivo* de la plasmine est de l'ordre de 100 ms [92,94].

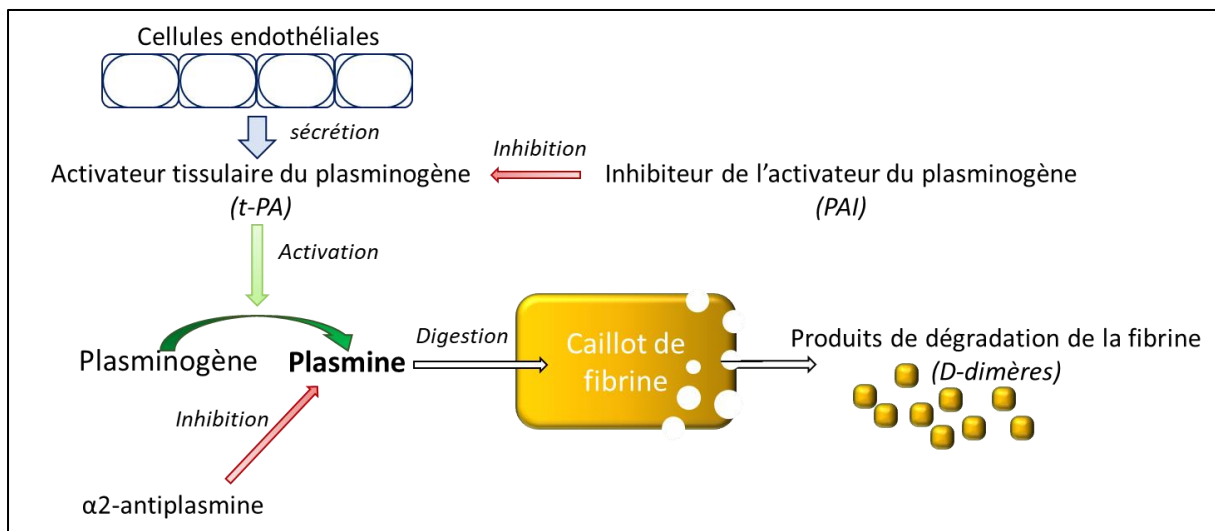


Figure 4 : Schéma simplifié de la fibrinolyse.

L'action de la plasmine, enzyme clé de la fibrinolyse, permet la dissolution du caillot de fibrine une fois la brèche vasculaire réparée.

II.7. L'hémostase : conclusion

La formation *in vivo* d'un caillot fibrino-plaquettaire est un processus hautement complexe faisant intervenir un nombre considérable d'acteurs et presque autant de systèmes d'inhibition et de régulation. Au centre de ces mécanismes se trouve la thrombine, protéine multifonctionnelle (Tableau 6). En plus d'assurer la transformation du fibrinogène en fibrine, la thrombine active les cofacteurs V et VIII, mais aussi les plaquettes, permettant l'amplification de la cascade de la coagulation [95–99]. En activant

le facteur XIII, elle stabilise le caillot de fibrine. En revanche, en se liant à la thrombomoduline à la surface de l'endothélium, elle a un rôle déterminant dans l'activation du système de la protéine C [100]. De plus, elle possède des propriétés à la fois profibrinolytiques et antifibrinolytiques. Des dysfonctions pathologiques peuvent toucher tous les niveaux de ces processus, avec des expressions cliniques de forme et de gravité variable, faisant tendre le patient vers le risque hémorragique ou thrombotique. La multiplicité des acteurs intervenant dans ces mécanismes en fait autant de cibles thérapeutiques potentielles, dans la limite d'un rapport bénéfice-risque favorable pour le patient. En pratique, les thérapeutiques anticoagulantes ciblent principalement un ou plusieurs facteurs de la coagulation, directement ou indirectement.

Tableau 6 : Diversité des rôles de la thrombine.

Propriétés procoagulantes	transformation du fibrinogène en fibrine activation des facteurs V, VIII, XI et XIII activation plaquettaire
Propriétés anticoagulantes	liaison à la thrombomoduline et activation de la protéine C diminution de la liaison du facteur Willebrand à la GPIIb
Propriétés antifibrinolytiques	activation de l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine libération de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène
Propriétés profibrinolytiques	libération de l'activateur du plasminogène tissulaire

La thrombine est au centre des processus de la coagulation, en plus de jouer un rôle dans les mécanismes de fibrinolyse. D'après Siller-Matula et collègues [100].

III. LES ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS

À l'heure de la rédaction de cette thèse, plusieurs familles d'anticoagulants sont utilisées en thérapeutique (toutes indications confondues), dont principalement trois : les héparines et leurs dérivés, les AVK et les anticoagulants oraux directs. Les dérivés de l'héparine, administrés par voie parentérale, potentialisent l'action de l'antithrombine et inhibent ainsi indirectement le facteur Xa et à des degrés variables la thrombine ; les AVK sont des anticoagulants oraux d'action indirecte, conduisant à la synthèse de facteurs vitamine K-dépendants hypo-gamma-carboxylés non fonctionnels ; enfin les AOD inhibent directement la thrombine ou le facteur Xa libre ou lié au caillot. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à trois des AOD indiqués dans la prévention du risque thrombo-embolique dans la fibrillation atriale : le rivaroxaban (XARELTO[®], Bayer AG, Leverkusen, Allemagne [101], l'apixaban (ELIQUIS[®], Bristol-Myers Squibb/Pfizer EEIG, Dublin, Irlande) [102] et le dabigatran (PRADAXA[®], Boehringer Ingelheim International

GmbH, Ingelheim am Rhein, Allemagne) [103]. Malgré l'existence d'autres AOD, rivaroxaban, apixaban et dabigatran sont, à l'heure actuelle, les seuls à posséder une autorisation de mise sur le marché et un remboursement en France dans cette indication.

III.1. Développement des AOD : un bref historique

III.1.1. L'âge d'or des AVK

Les premiers antithrombotiques dans la fibrillation atriale

Depuis le milieu du XX^e siècle, deux thérapeutiques ont été principalement utilisées en prévention du risque thrombo-embolique dans la fibrillation atriale : soit l'aspirine, à dose anti-agrégante plaquettaire, soit un anticoagulant de la famille des AVK. La warfarine (COUMADINE®), chef de file des AVK, a démontré sa supériorité face à l'aspirine dans cette indication [39]. Bien que la warfarine soit l'AVK le plus prescrit au monde, c'est la fluindione (PREVISCAN®) qui est l'AVK le plus utilisé en France, représentant à elle seule 70 % des prescriptions d'AVK [104].

Particularités d'emploi des AVK

Malgré cette efficacité, les AVK sont des anticoagulants oraux de maniement complexe : en raison d'un index thérapeutique étroit et d'une réponse pharmacologique caractérisée par une importante variabilité interindividuelle [105–107], il est nécessaire d'avoir recours à un suivi biologique régulier. Par ailleurs, leur mécanisme d'action implique un temps de latence de plusieurs jours avant l'apparition d'un effet pharmacodynamique (tout comme à l'arrêt du traitement pour la disparition de l'effet), pouvant compliquer certaines situations [105].

Ainsi, la bonne gestion de l'anticoagulation par AVK peut être problématique, en particulier chez le sujet âgé : dans cette population, différentes enquêtes rapportaient dès 2010 une sous-prescription des AVK [108,109]. Cette sous-prescription s'explique par leurs inconvénients chez le patient âgé : iatrogénie fréquente liée à leur marge thérapeutique étroite, complexité de leur maniement, risque d'interactions médicamenteuses chez des patients nécessitant souvent une polymédication [110]. La surveillance biologique des AVK par l'INR (*International Normalized Ratio*) doit donc être rigoureuse chez le patient âgé, d'autant que la variabilité des INR et la fréquence des surdosages semblent plus importantes dans la population gériatrique [111,112].

III.1.2. Mélagatran et ximélagatran : débuts difficiles pour les AOD

La première molécule développée dans cette nouvelle famille des AOD est le mélagatran (injectable), découvert à la fin des années 1990 [113] avec son équivalent administrable *per os*, le ximélagatran, tous deux inhibiteurs directs de la thrombine. Ce dernier présentait un meilleur rapport bénéfice/risque que les autres anticoagulants oraux AVK alors disponibles [114], mais les deux composés furent finalement retirés du marché du fait d'une toxicité hépatique [115]. Trois nouvelles molécules seront ensuite développées : le dabigatran, le rivaroxaban et l'apixaban (Figure 5). Les principaux arguments avancés en faveur de ces AOD, par rapport aux AVK, sont un effet immédiat, la prédictibilité de leur effet pharmacodynamique permettant de s'affranchir d'un suivi biologique et l'existence de moins d'interactions médicamenteuses [116–118].

III.2. Rivaroxaban et apixaban

III.2.1. Mécanisme d'action commun

Ces deux AOD sont des inhibiteurs directs, sélectifs et réversibles du facteur Xa libre ou lié au caillot. Il en résulte une diminution de la formation de thrombine et de la progression du caillot. Contrairement aux héparines, leur action inhibitrice s'exerce directement sur le facteur Xa, sans interaction avec l'antithrombine. Ils n'ont pas d'action directe sur la thrombine et ne modifient pas les fonctions plaquettaires [119–122].

III.2.2. Relation structure-activité du rivaroxaban

Le rivaroxaban ($C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$) comporte un noyau oxazolidinone, dont la conformation (S) assure la bonne spécificité pour le facteur Xa. À ce noyau est greffé un groupement identifié comme nécessaire à l'inhibition du facteur Xa, le 5-chlorotiophène-2-carboxamide, ainsi qu'un noyau aryle nécessaire à la bonne conformation spatiale. Enfin, l'inhibition du facteur Xa est renforcée par une morpholinone [122] (Figure 6). Ce composé possède une sélectivité pour le facteur Xa de l'ordre de 10000 fois plus grande que pour d'autres sérine-protéases [122].

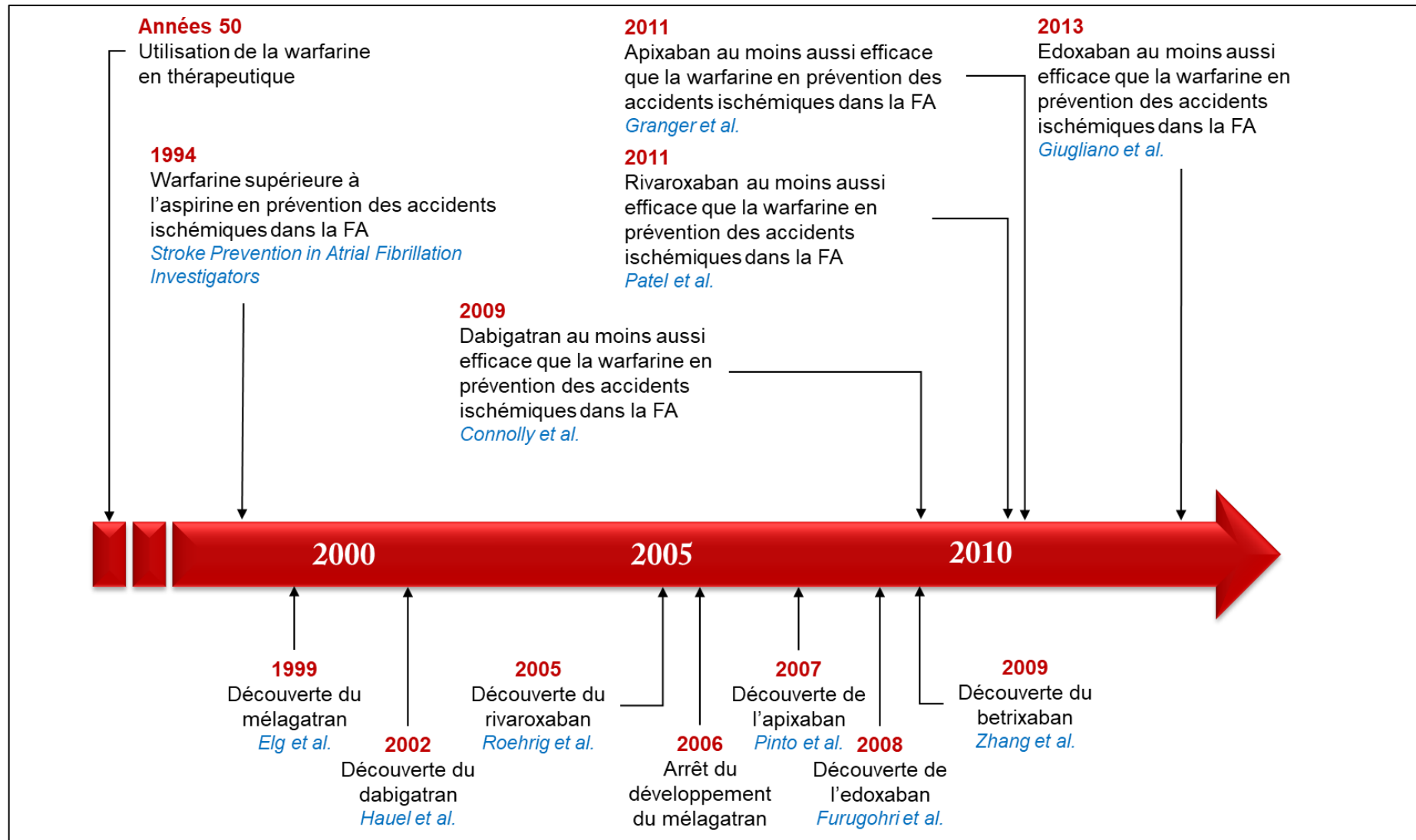


Figure 5 : Chronologie du développement des AOD.

En France, seuls le dabigatran, le rivaroxaban et l'apixaban sont remboursés par l'assurance maladie.

L'atome d'oxygène du groupement carbonyle du noyau oxazolidinone ainsi que l'azote du chlorothiophène-carboxamide sont engagés dans des liaisons hydrogène avec le facteur Xa. Le noyau oxazolidinone est coplanaire du phényle : des substitutions sur ce groupement phényle réduisent l'affinité pour le facteur Xa. Ce phényle, ainsi que la morpholinone, engagent des liaisons hydrophobes avec la poche S4 du facteur Xa. Enfin, l'atome de chlore du motif chlorothiophène interagit avec un cycle aromatique situé au fond de la poche S1 [122] (Figure 7).

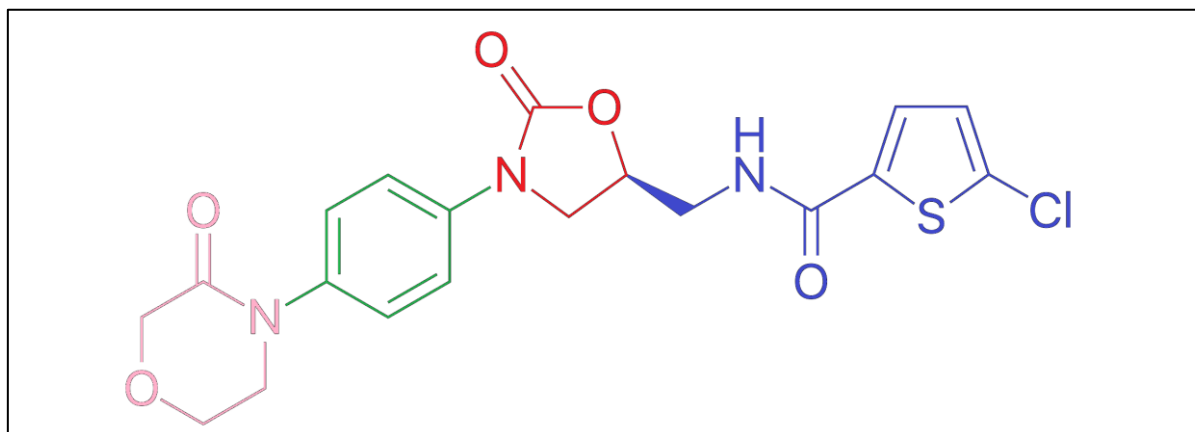


Figure 6 : Structure du rivaroxaban.

Le noyau 2-oxazolidinone (rouge) de conformation (S) apporte la géométrie spatiale requise pour interagir avec le facteur Xa. Le groupement 5-chlorothiophène-2-carboxamide (bleu) est essentiel à l'activité anti-Xa, renforcée par la présence d'un phényle (vert) et d'une morpholinone (rose).

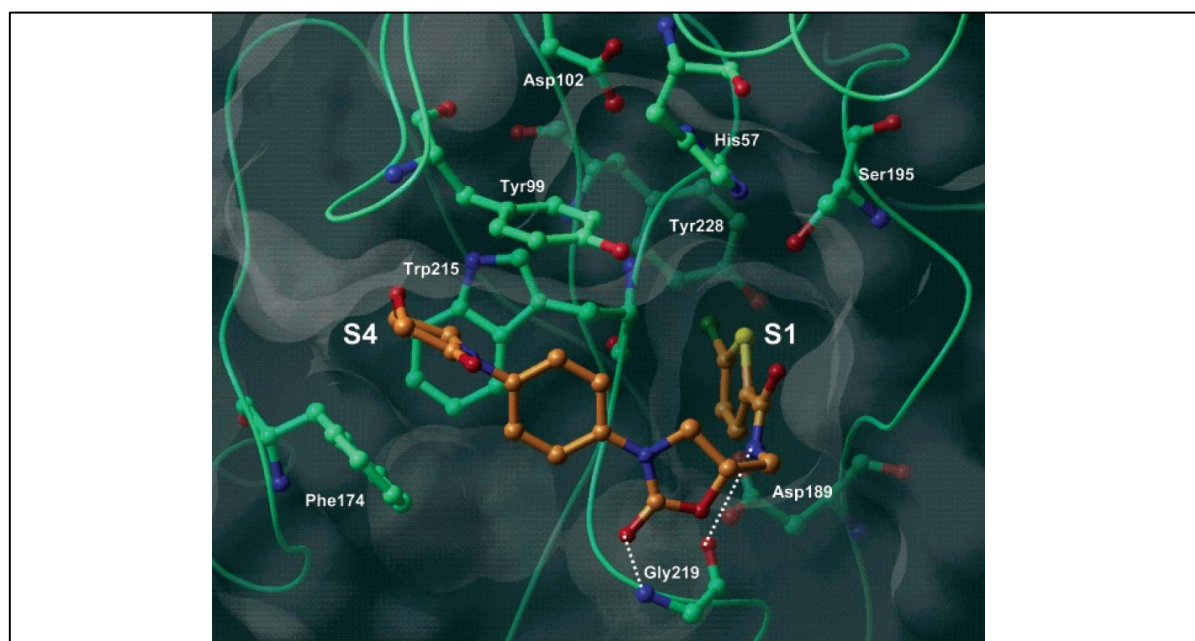


Figure 7 : Interactions entre le rivaroxaban et le FXa.

La structure du rivaroxaban (squelette carboné en orange) forme un « L » dans l'espace du fait de la conformation (S) du noyau oxazolidinone. Le carbonyle du groupement morpholinone n'intervient pas dans les interactions faibles mais permet de placer la morpholinone à la perpendiculaire du groupement aryle. La haute affinité du rivaroxaban pour le facteur Xa est due à la fois à des liaisons hydrogène avec différents acides aminés (Gly219, Asp189) et à des interactions hydrophobes dans les poches S1 et S4. D'après Roehrig et collègues, J Med Chem 2005 [122].

III.2.3. Profil pharmacocinétique du rivaroxaban

Après administration par voie orale, les concentrations plasmatiques maximales de rivaroxaban sont atteintes en 2 à 3 heures. Sa biodisponibilité par voie orale est d'environ 66 %, améliorée par la prise alimentaire concomitante. Ce médicament est fortement lié aux protéines plasmatiques (92 à 95 % de la dose) et a un volume de distribution d'environ 50 L [123]. La pharmacocinétique du rivaroxaban est décrite par un modèle bi-compartimental avec absorption de premier ordre [124].

Le rivaroxaban est substrat des CYP3A4 et 2J2, ainsi que de certaines protéines d'efflux, P-glycoprotéine (P-gp) et BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) [125,126]. Sa clairance systémique est faible, de l'ordre de 10 L/h, avec une demi-vie d'élimination de 5 à 9 h chez le sujet jeune contre 11 à 13 h chez le sujet âgé. Un tiers de la dose administrée est éliminée sous forme active par voie rénale. Les deux tiers restants sont éliminés à part équivalente, après métabolisation hépatique, dans les fèces et dans les urines. Son élimination globale est donc influencée par la fonction rénale, avec une aire sous la courbe (ASC) d'autant plus grande que la clairance de la créatinine (ClCr) est réduite [124] :

- insuffisance rénale modérée (ClCr = 30–49 mL/min) : ASC augmentée d'un facteur 1,5
- insuffisance rénale sévère (ClCr = 15–29 mL/min) : ASC augmentée d'un facteur 1,6

Enfin, une étude comparant la pharmacocinétique du rivaroxaban chez des sujets jeunes et chez des sujets de plus de 75 ans a montré que chez ces derniers, l'ASC était majorée de 41 % environ, effet majoritairement attribué à la diminution de la fonction rénale chez les sujets plus âgés (environ 120 mL/min chez les sujets jeunes contre environ 50 mL/min chez les sujets de plus de 75 ans) [127]. Ces données sont résumées dans le Tableau 7.

III.2.4. Relation structure-activité de l'apixaban

La structure moléculaire de l'apixaban (C₂₅H₂₅N₅O₄) est construite autour d'un noyau pyrazole nécessaire aussi bien à son inhibition du facteur X activé qu'à sa biodisponibilité orale. Ce noyau est greffé d'un carboxamide cyclique formant un 7-oxo-pyrazolo[3,4-c]pyridine, dont l'oxygène du carbonyle est engagé dans une liaison hydrogène avec le facteur X activé [119] (Figure 8). Il existe deux autres liaisons H, l'une impliquant l'azote en position 2 du pyrazole, et l'autre impliquant le groupement amine du carboxamide en position 3 du pyrazole. L'apixaban interagit avec la poche S1 du facteur X activé grâce à un groupement méthoxyphényle, et avec la poche S4 grâce à un groupement phényllactame [119] (Figure 9).

III.2.5. Profil pharmacocinétique de l'apixaban

La pharmacocinétique de l'apixaban a été décrite avec un modèle à deux compartiments avec absorption de premier ordre et élimination de premier ordre [128]. La biodisponibilité par voie orale de l'apixaban est de 50 % environ et n'est pas modifiée par la prise alimentaire. Les concentrations maximales sont atteintes en 3 à 4 h. Environ 87 % de la dose administrée sont liés aux protéines plasmatiques, et son volume de distribution est de l'ordre de 21 L. A l'instar du rivaroxaban, sa métabolisation est médiée par les CYP3A4 et 2J2, et il est également substrat de P-gp et BCRP. Sa clairance plasmatique est d'environ 3,3 L/h, et l'élimination rénale concerne environ 27 % de la dose totale administrée. La demi-vie d'élimination plasmatique de l'apixaban est de l'ordre de 12 h [129,130]. Chez les sujets âgés, l'exposition à l'apixaban est plus importante, avec une augmentation de 32 % de l'ASC [131] (Tableau 7).

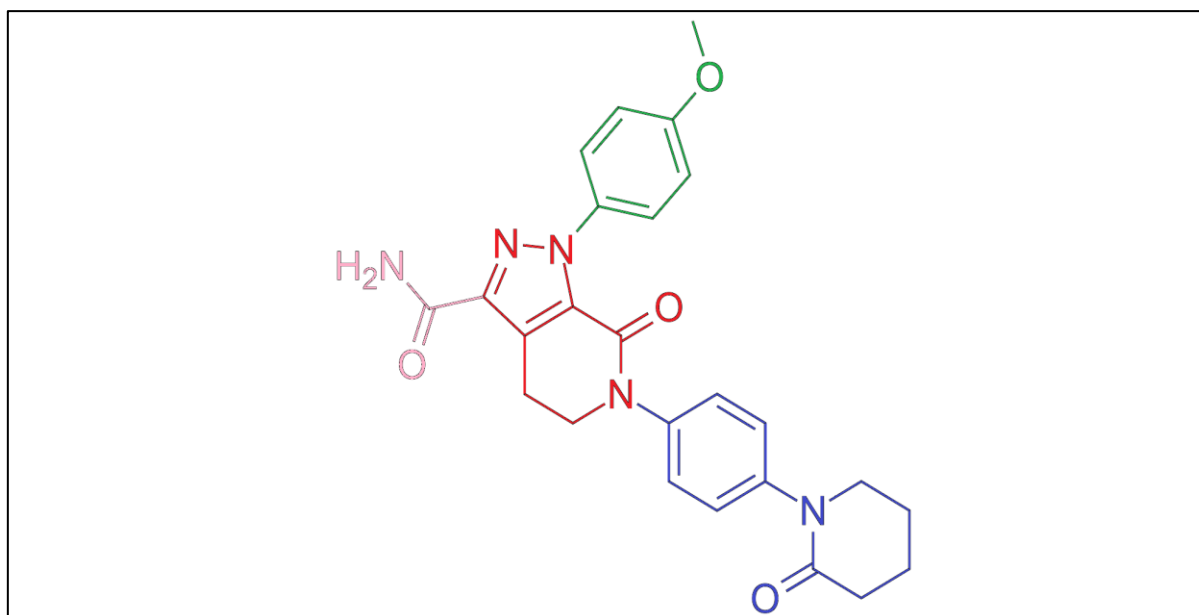


Figure 8 : Structure de l'apixaban.

Le noyau 7-oxo-pyrazolo[3,4-c]pyridine représenté en rouge est nécessaire à l'inhibition du FXa. La structure bicyclique évite la libération d'aniline mutagène. Les groupements phényllactame (bleu), méthoxyphényle (vert) et carboxamide (rose) contribuent à l'inhibition spécifique du FXa. D'après Pinto et collègues, J Chem Med 2007 [119].

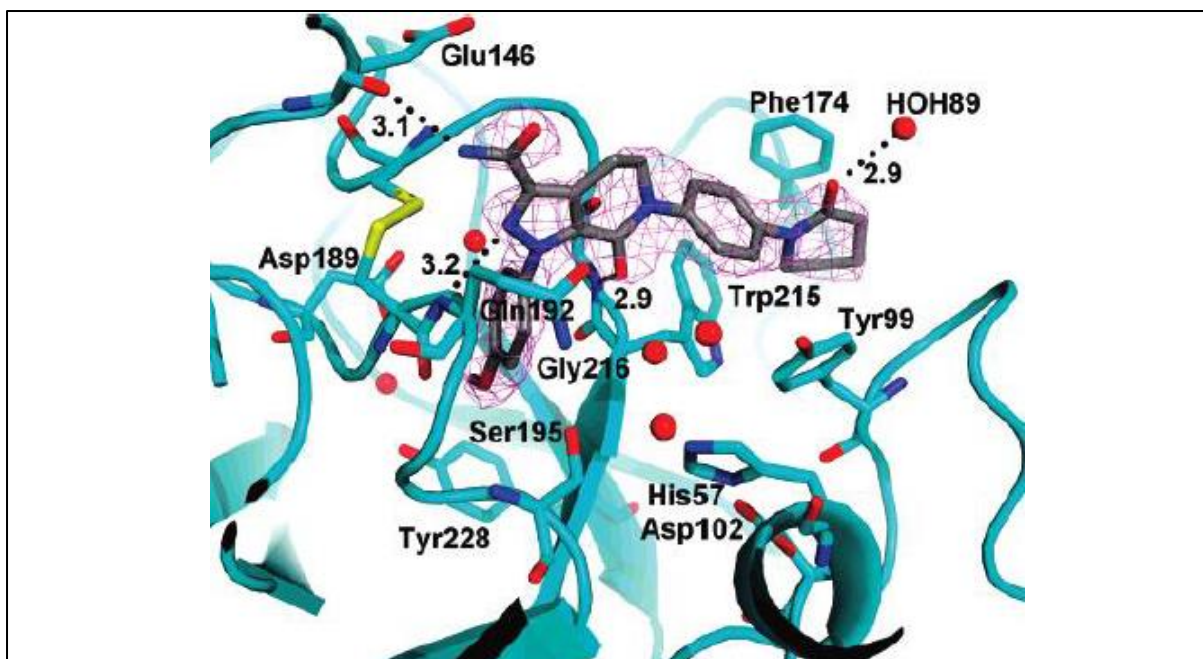


Figure 9 : Interactions entre l'apixaban et le facteur Xa.

Le squelette carboné de l'apixaban est représenté en gris et sa surface électronique en treillis rose. L'atome d'oxygène du phényllactame interagit avec une molécule d'eau (sphères rouges) permettant le maintien du groupement dans la poche S4. D'après Pinto et collègues, J Chem Med 2007 [119].

III.3. Dabigatran

III.3.1. Mécanisme d'action

Le dabigatran ($C_{25}H_{25}N_7O_3$) est un inhibiteur direct puissant, compétitif et réversible de la thrombine, empêchant ainsi la formation du caillot. Le dabigatran inhibe aussi bien la thrombine libre que la thrombine liée au caillot [132–134].

III.3.2. Relation structure-activité

Le dabigatran a une structure pseudo-peptidique avec un noyau benzimidazole. Il a la particularité d'être un zwitterion, avec la présence d'un groupement carboxyle et d'un groupement amidine [134] (Figure 10). Le carboxylate se retrouve en dehors du site de liaison du dabigatran à la thrombine, mais permet d'augmenter l'hydrophilie du dabigatran et donc de limiter la liaison aux protéines plasmatiques. L'amidinium quant à lui est lié à la thrombine par un pont salin bidentate. Par ailleurs, deux zones sont ciblées pour la liaison à la thrombine, la poche D et la poche P, pour des liaisons hydrophobes. Le noyau benzimidazole interagit principalement avec la poche P, tandis que le groupement 2-pyridyle interagit avec la poche S, en plus d'augmenter l'hydrophilie de la molécule. Le groupement amine favorise le placement du groupement aryle dans la poche D [134] (Figure 11).

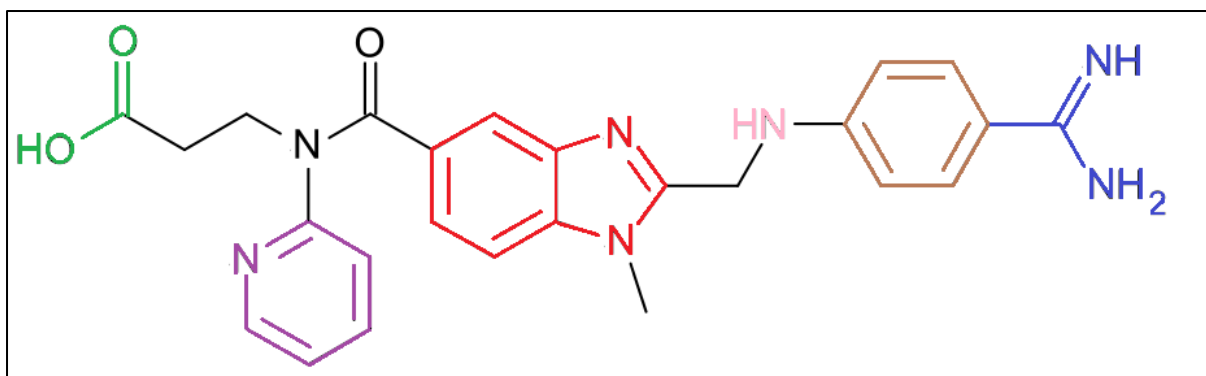


Figure 10 : Structure du dabigatran.

Le dabigatran, qui possède un noyau benzimidazole (rouge), existe principalement sous la forme d'un zwitterion comme en témoignent la présence d'un groupement amidine (bleu) basique et d'un carboxyle (vert) acide. Les groupements 2-pyridyle (violet), amino (rose) et aryle (marron) participent à liaison du dabigatran à la thrombine. D'après Huel et collègues., *J Med Chem* 2002 [134].

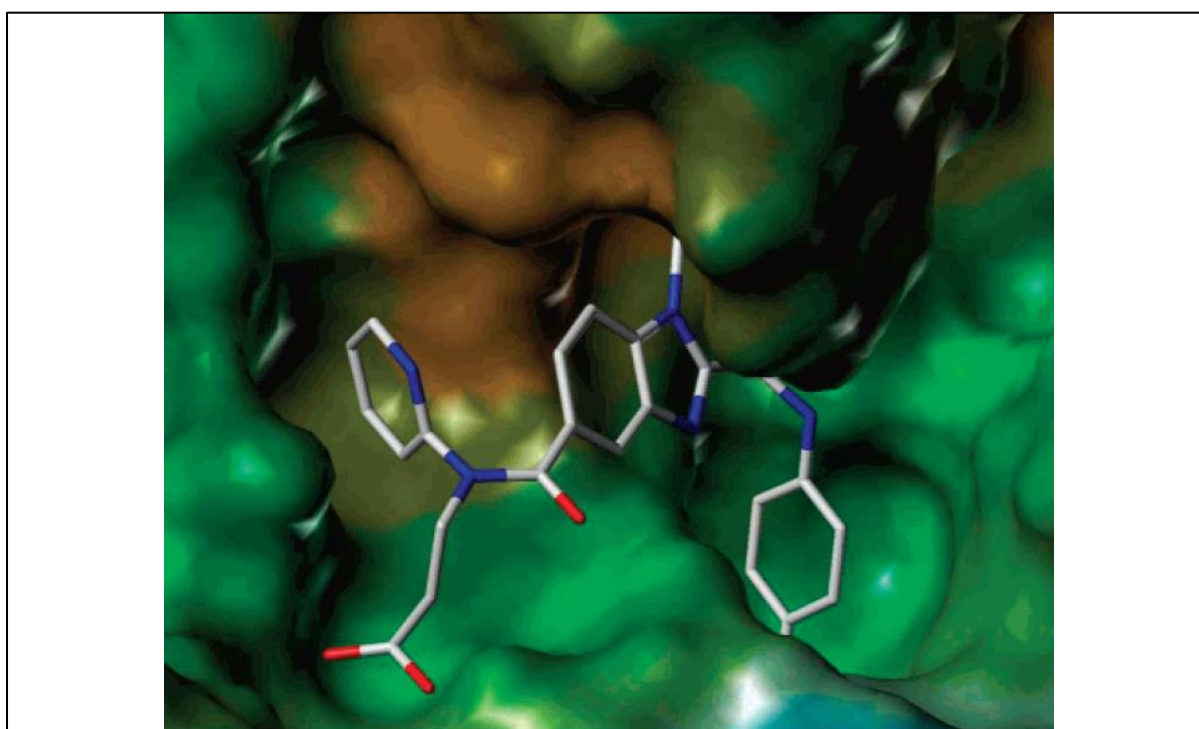


Figure 11 : Interactions entre le dabigatran et la thrombine.

Le squelette carboné du dabigatran (gris) interagit principalement par liaisons hydrophobes avec la thrombine, liaisons représentées par les nuances orangées dans le site actif. D'après Huel et collègues., *J Chem Med* 2002 [134].

III.3.3. Profil pharmacocinétique du dabigatran

La pharmacocinétique du dabigatran suit un modèle bi-compartmental avec une absorption de premier ordre et une élimination du premier ordre [135]. Le dabigatran ayant une biodisponibilité par voie orale nulle, il est administré sous forme de prodrogue inactive, l'étextilate de dabigatran. Cette prodrogue a une biodisponibilité par voie orale faible, de l'ordre de 6,5 %. La métabolisation de l'étextilate de dabigatran en dabigatran actif est rendue possible par les carboxy-estérases sériques et hépatiques. Les concentrations maximales en dabigatran sont atteintes environ 1,5 h après la prise. La

biodisponibilité n'est pas impactée par la prise alimentaire, alors que le temps pour atteindre la concentration maximale en principe actif est dans ce cas allongé de deux heures environ [136]. La liaison du dabigatran aux protéines plasmatiques est de l'ordre de 35 % et le volume de distribution moyen est d'environ 65 L, correspondant à une diffusion tissulaire modérée. Il n'y a pas d'interaction connue entre le dabigatran et les CYP3A4/5 et 2C9, ni avec la P-gp [137]. Sa prodrogue, l'étxilate de dabigatran, est quant-à-elle substrat de la P-gp au niveau intestinal [103]. L'élimination du dabigatran se fait à 80 % par voie rénale sous forme inchangée, avec une clairance plasmatique d'environ 50 à 100 mL/min. Par ailleurs, environ actifs sur le plan pharmacodynamique [136]. La demi-vie d'élimination est de 11 h, elle n'est pas influencée par la dose et est allongée en cas de diminution du débit de filtration glomérulaire [137] (Tableau 7). Ainsi, l'exposition au médicament, représentée par l'aire sous la courbe des concentrations, est plus importante pour les patients dont la fonction rénale est réduite :

- insuffisance rénale modérée (ClCr = 30 – 50 mL/min) : ASC augmentée d'un facteur 2,7 ;
- insuffisance rénale sévère (ClCr = 10 – 29 mL/min) : ASC augmentée d'un facteur 6 ;
- les patients âgés sont également plus exposés au médicament : l'ASC est augmentée de 40 à 60 % et la concentration maximale de 25 % [138].

III.4. Utilisation des AOD dans la prévention du risque thromboembolique au cours de la fibrillation atriale

III.4.1. Anticoagulants oraux directs *versus* warfarine

Pour obtenir une autorisation de mise sur le marché, des études pivots de phase III ont été menées afin de comparer ces AOD par rapport au traitement de référence, la warfarine :

- l'étude **RE-LY** [118,139] (*Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy*) pour le dabigatran (NCT 00262600) ;
- l'étude **ROCKET-AF** [117,140] (*Rivaroxaban Once Daily Oral Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation*) pour le rivaroxaban (NCT 00403767) ;
- l'étude **ARISTOTLE** [116,141] (*Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation*) pour l'apixaban (NCT00412984).

Tableau 7 :Résumé des principales caractéristiques pharmacocinétiques des AOD.

	rivaroxaban	apixaban	dabigatran
Administration			
Prodrogue	non	non	étexilate de dabigatran
Biodisponibilité orale	80 – 100 %	50 %	3 – 7 %
T _{max}	2 – 3 h	3 – 4 h	1,5 – 3 h
Distribution			
Liaison aux protéines plasmatiques	92 – 95 %	87 %	35 %
Volume de distribution	50 L	21 L	65 L
Métabolisme			
Métabolisme	CYP3A4 et CYP2J2	CYP3A4 et CYP1A1/2	estérases CES1 (prodrogue) glucuroconjugaison (dabigatran)
Transport	P-glycoprotéine	P-glycoprotéine	P-glycoprotéine (prodrogue)
Interactions	Modulateurs de CYP3A4/5 / P-gp	Modulateurs de CYP3A4/5 / P-gp	Modulateurs de P-gp
Élimination			
Demi-vie	7 – 11 h	8 – 15 h	7 – 17 h
Élimination rénale	33 % sous forme inchangée	25 % sous forme inchangée	80 % sous forme inchangée
Concentrations observées dans les essais cliniques			
C _{max} (ng/mL)	249 ^a (184 – 343)	171 ^b (91 – 321)	175 ^c (117 – 275)
C _{min} (ng/mL)	44 ^a (12 – 137)	103 ^b (41 – 230)	91 ^c (61 – 143)

*Les concentrations sont celles observées dans les essais cliniques de phase III en prévention du risque thromboembolique dans la fibrillation atriale pour une posologie à dose usuelle (20 mg de rivaroxaban ; 5 mg ×2 d'apixaban ou 150 mg ×2 de dabigatran) exprimées comme a/- moyenne (5^e – 95^e percentiles), b/- médiane (5^e – 95^e percentiles) et c/- moyenne (25^e – 75^e percentiles). T_{max} = temps pour atteindre la concentration maximale. C_{max} = concentration au pic, C_{min} = concentration résiduelle. D'après Gosselin et coll., *Thromb Haemost* 2018 [142].*

Ces trois études avaient pour objectif d'établir la non-infériorité de l'AOD concerné, par rapport à la warfarine (doses ajustées à l'aide de l'INR). L'objectif principal portait sur

l'efficacité, avec dans les trois cas, la survenue d'un AVC ou d'une embolie systémique (ES) comme issue principale (Tableau 8).

Le schéma de ces trois essais randomisés était proche, avec certaines différences :

- dans l'essai RE-LY portant sur 18113 patients d'âge moyen $71,5 \pm 8,7$ ans, les patients du bras dabigatran étaient en aveugle pour les doses 110 mg $\times 2$ et 150 mg $\times 2$, mais en ouvert dans le bras warfarine pour l'ajustement des doses en fonction de l'INR. La marge de non-infériorité était de 1,46 ;
- dans ROCKET-AF portant sur 14264 patients d'âge médian 73 ans (intervalle interquartiles – IQR : 65 – 78), l'étude était menée en double aveugle, les patients du bras rivaroxaban recevaient 20 mg par jour, ou une dose réduite à 15 mg par jour si leur clairance de la créatinine était inférieure à 50 mL/min. La marge de non-infériorité était de 1,46 ;
- dans ARISTOTLE portant sur 18201 patients d'âge médian 70 ans (IQR 63 – 76), l'étude était menée en double aveugle, les patients du bras apixaban recevaient 5 mg $\times 2$, ou une dose réduite à 2,5 mg $\times 2$ si leur ClCr était inférieure à 30 mL/min, ou bien s'ils présentaient deux des critères suivants : âge ≥ 80 ans, poids ≤ 60 kg, créatinine sérique ≥ 133 μ M. La marge de non-infériorité était de 50 %.

Ces trois essais ont montré la non-infériorité de l'AOD concerné par rapport à la warfarine dans la prévention des événements thrombo-emboliques liés à la fibrillation atriale et la supériorité du dabigatran à la dose de 150 mg deux fois par jour [116–118]. Pour chaque AOD, le risque relatif instantané (RRI – aussi appelé *hazard ratio*) ou le risque relatif (intervalle de confiance à 95% – IC95) était le suivant :

- dabigatran 110mg : 0,91 (0,74 – 1,11) – $p < 0,001$ pour la non-infériorité et $p = 0,34$ pour la supériorité (risque relatif) ;
- dabigatran 150mg : 0,66 (0,53 – 0,82) – $p < 0,001$ pour la supériorité (risque relatif) ;
- rivaroxaban : 0,79 (0,66 – 0,96) – $p < 0,001$ pour la non-infériorité (RRI) ;
- apixaban : 0,79 (0,66 – 0,95) – $p < 0,001$ la non-infériorité et $p = 0,01$ pour la supériorité (RRI).

Par ailleurs, ces essais avaient pour objectif secondaire de comparer la sécurité de chaque AOD à la warfarine, en s'intéressant à la survenue éventuelle d'événements hémorragiques. Les trois AOD ont montré une diminution significative des saignements intracrâniens, mais une augmentation des saignements digestifs pour le dabigatran 150 mg $\times 2$ et le rivaroxaban [116–118].

Une méta-analyse récente portant sur 35 études (soit 2 356 201 patients traités pour fibrillation atriale par dabigatran, rivaroxaban, apixaban, edoxaban ou betrixaban) montre que pris dans leur ensemble, les AOD sont supérieurs à la warfarine (prise comme comparateur) en terme de risque de saignement majeur, avec un risque relatif instantané à 0,78 avec comme intervalle de confiance à 95 % [0,71 ; 0,85] ($p < 10^{-3}$) en faveur des AOD [143] (Figure 12). En revanche, étudié isolément, le risque de saignement majeur avec le rivaroxaban est similaire à celui de la warfarine (RRI 0,98 ; IC95 [0,91 ; 1,06] ; $p < 0,60$) tandis qu'il est réduit de 40 % avec l'apixaban (RRI 0,60 ; IC95 [0,50 ; 0,71] ; $p < 10^{-3}$) [143]. Enfin, l'étude ARISTOPHANES menée chez 153 002 patients d'âge moyen $73,4 \pm 10,8$ ans traités pour fibrillation atriale par rivaroxaban et 108 852 patients d'âge moyen $75,3 \pm 10,4$ ans traités pour fibrillation atriale par apixaban montre la supériorité de l'apixaban par rapport au rivaroxaban en termes de survenue d'AVC/embolies systémiques et de saignements majeurs [144].

III.4.2. Études de phase IV et registres : données en vie réelle dans la fibrillation atriale

Les études de phase IV permettent d'apporter de nouvelles données sur l'utilisation en vie réelle d'un médicament. Dans le cas du rivaroxaban et de l'apixaban, ces études s'intéressent principalement à l'efficacité et à la sécurité d'utilisation, utilisant essentiellement comme critères de jugement l'éventuelle survenue d'événements thrombotiques (AVC, embolie systémique) ou hémorragiques. La part d'octogénaires et de nonagénaires dans ces études reste toutefois très limitée (Tableau 9). Concernant le rivaroxaban, l'essai XANTUS a inclus 6784 patients (en Europe, en Israël et au Canada), d'âge moyen 71 ans parmi lesquels seuls 37 % des patients avaient plus de 75 ans ; il est rapporté un taux de 2,1 cas de saignements majeurs pour 100 patients-année [145]. Des essais similaires ont été menés dans d'autres régions du monde [146–148]. Concernant l'apixaban, l'essai AUGUSTUS a comparé son efficacité et sa sécurité à la warfarine chez 4614 patients avec syndrome coronaire aigu ou angioplastie programmée dans un contexte de fibrillation atriale [149].

En plus de ces essais, différents registres de patients avec fibrillation atriale traités par AOD ont été constitués. À titre d'exemple, le registre AOD de Dresde (*Dresden NOAC Registry*) [150] qui inclut depuis 2011 des patients dans le district de Dresde (Saxe, Allemagne), traités par AOD pour fibrillation atriale ou thrombose veineuse profonde (TVP). À plus grande échelle, le registre GARFIELD-AF débuté en 2009 a pour objectif d'inclure environ 55 000 patients à travers le monde [151]. Ce registre s'intéresse aux

patients avec une fibrillation atriale récemment diagnostiquée et au moins un facteur de risque d'AVC, toute thérapie anticoagulante confondue. Au Japon, un registre nommé GENeRAL a été ouvert en 2015 et s'intéresse spécifiquement aux patients traités pour fibrillation atriale par rivaroxaban et dont le suivi est réalisé par un médecin généraliste [152]. Enfin, le registre XARENO ouvert en Europe en 2016 recrute des patients souffrant à la fois de fibrillation atriale et d'insuffisance rénale chronique, définie par une clairance de la créatinine inférieure à 50 mL/min [153].

Tableau 8 : Récapitulatif des données des essais cliniques randomisés.

	RE-LY [118] <i>dabigatran</i>	ROCKET-AF [117] <i>rivaroxaban</i>	ARISTOTLE [116] <i>apixaban</i>
Dose Dose réduite Critère de réduction	150 mg ×2 110 mg ×2 (doses randomisées)	20 mg 15 mg (ClCr 30-49 mL/min)	5 mg ×2 2,5 mg ×2 (>80 ans / poids <60 kg / créat. <133 µM)
Patients (n) Âge médian ≥ 75 ans ≥ 80 ans CHADS ₂ moyen ≥ 3 AVC/AIT	18 113 72 ans 40 % 22 % 2,2 33 % 20 %	14 269 73 ans 43 % 18 % 3,5 87 % 55 %	18 205 70 ans 31 % N.D. 2,1 30 % 19 %
Événements thrombotiques <i>N, n (taux pour 100 patients/année)</i>			
AOD	6076 ; 134 (1,11)	6958 ; 188 (1,7)	9120 ; 212 (1,3)
Warfarine	6022 ; 199 (1,69)	7004 ; 241 (2,2)	9081 ; 265 (1,6)
Degré de signification (p)	< 0,001	< 0,001	0,01
Saignements majeurs <i>N, n (taux pour 100 patients/année)</i>			
AOD	6076 ; 375 (3,11)*	7111 ; 395 (5,6)	9088 ; 327 (2,1)
Warfarine	6022 ; 397 (3,36)	7125 ; 386 (5,4)	9052 ; 462 (3,1)
Degré de signification (p)	0,052	0,58	< 0,001

*Données issues du groupe de patients recevant la pleine dose. ClCr = clairance de la créatinine. Créat : créatinine sérique. AVC : accident vasculaire cérébral. AIT : accident ischémique transitoire. N.D. : non disponible.

Tableau 9 : Données en vie réelle sur l'utilisation du rivaroxaban et de l'apixaban dans la fibrillation atriale.

Étude	Zones géographiques	Schéma de l'étude	Patients inclus	Âge moyen (% > 75 ans)	Durée du suivi	Saignements majeurs, n (%)	Saignements non majeurs n (%)	AVC / ES, n (%)	Décès toute cause, n (%)	Autres informations
X-TRA [154] (rivaroxaban)	Europe, Brésil	Prospective, interventionnelle, simple bras, ouvert	60	70 ± 11 (N.D.)	30 jours	0 (0)	5 (8,3)	0 (0)	1 (1,7)	Patients avec FA ou <i>flutter</i> atrial ou LAA
XAPASS [148] (rivaroxaban)	Japon	Prospective, observationnelle	9578	73 ± 10 (49)	5 ans	143 (1,5)	473 (4,9)	144 (1,5)	202 (2,1)	Patients naïfs de traitement pour prévention du risque d'AVC/ES dans la FA
XANTUS XANAP XANTUS-EL [155] (rivaroxaban)	Monde	Prospective, observationnelle	11121	70 ± 10 (35)	1 an	172 (1,5)	1195 (10,7)	179 (1,6)	187 (1,7)	Patients naïfs de traitement pour prévention du risque d'AVC/ES dans la FA
EXPAND [156] (rivaroxaban)	Japon	Prospective, observationnelle	7141	72 ± 9 (N.D.)	2,5 ans	215	856	176	281	-
RELAXED [157] (rivaroxaban)	Japon	Prospective, observationnelle	1308	77 ± 10 (63)	90 jours	11 (0,8)	N.D.	30 (2,3 %)	N.D.	Patients avec FA compliquée d'un AVC ischémique ou AIT
EMANATE [158] (apixaban)	Monde	Randomisée, en ouvert	753	65 ± 12 (N.D.)	30 jours	3 (0,4)	11 (1,5)	0	2	Patients avec FA récemment diagnostiquée et cardioversion prévue
AUGUSTUS [149] (apixaban)	Monde	Prospective, randomisée	546	70 ± 10 (N.D.)	6 mois	13 (2,4)	17 (3,1)	N.D.	21 (3,8)	Patients avec SCA
			869	70 ± 9 (N.D.)	6 mois	27 (3,1)	71 (8,2)	N.D.	30 (3,4)	Patients avec SCA et angioplastie
			868	71 ± 9 (N.D.)	6 mois	29 (3,3)	92 (10,6)	N.D.	26 (3,0)	Angioplastie programmée
STANDARD [159] (apixaban)	Japon	Prospective, observationnelle	5128	74 ± 10 (N.D.)	104 semaines	153	N.D.	43	N.D.	Prévention primaire
			1101	77 ± 9 (N.D.)	104 semaines	54	N.D.	45	N.D.	Prévention secondaire

Récapitulatif non exhaustif des études de phase IV apportant des données en vie réelle. Avec un âge moyen autour de 71 ans et un faible taux de sujets de plus de 75 ans, les données en vie réelle sur les sujets très âgés sont limitées. Les événements cliniques sont présentés sous forme de valeur absolue (pourcentage). AIT : accident ischémique transitoire. AVC : accident vasculaire cérébral. ES : embolie systémique. FA : fibrillation atriale. LAA : ablation de l'auricule gauche. N.D. : donnée non disponible. SCA : syndrome coronaire aigu.

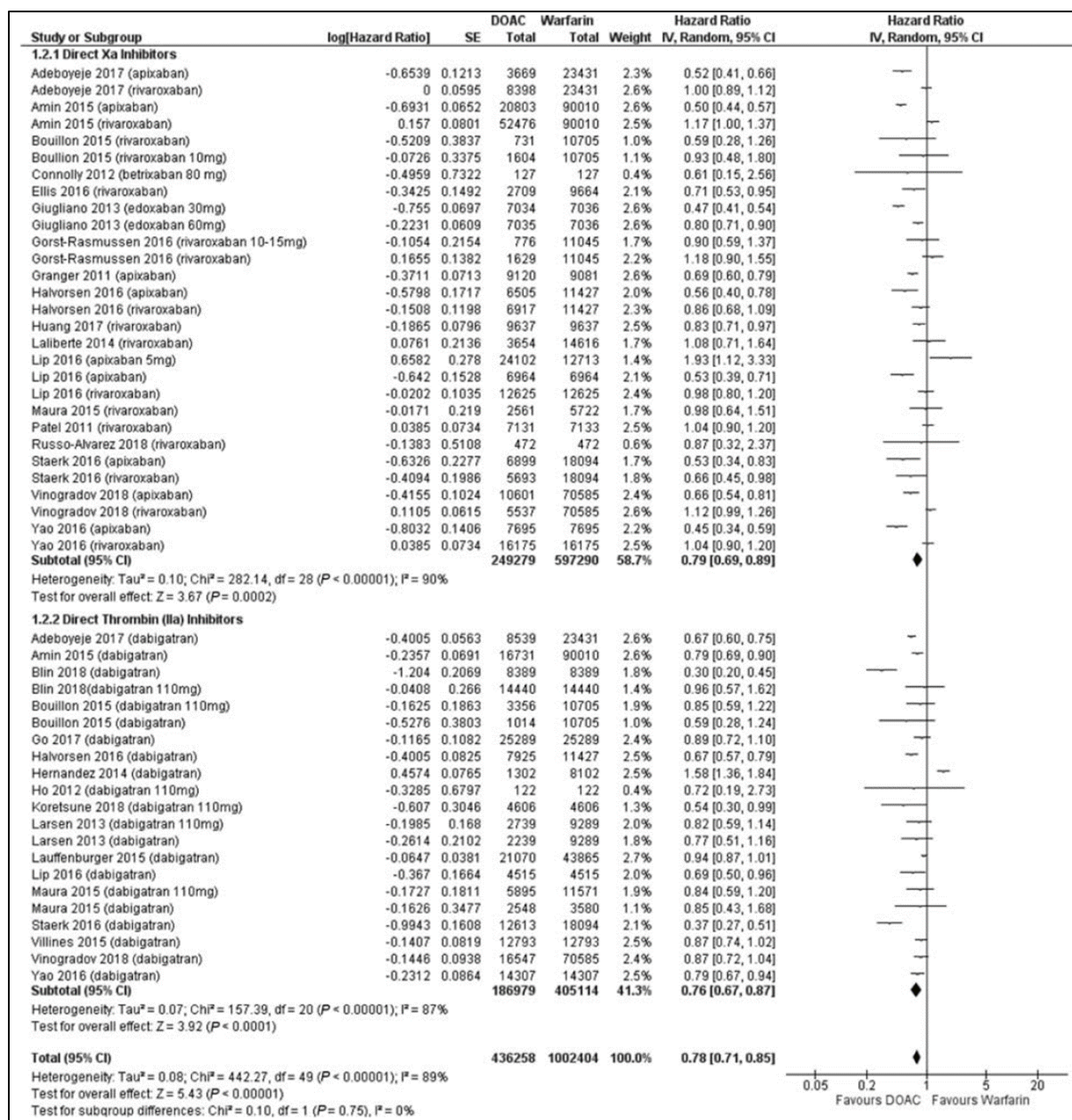


Figure 12 : Risque de saignement majeur avec les AOD comparé à la warfarine.
Le risque de saignements majeurs est moins important avec les AOD, aussi bien les anti-Xa que le dabigatran, comparativement à la warfarine. . D'après Wang et coll., TH Open 2020 [143].

III.4.3. Recommandations européennes

Recommandations de la Société européenne de cardiologie

A l'origine placés au même niveau de recommandations que les AVK, les AOD sont désormais à privilégier dans la majorité des cas, en particulier dans le cas d'une instauration de traitement. En 2016, l'ESC a émis la recommandation suivante : « quand un traitement anticoagulant par voie orale est instauré chez un patient souffrant de fibrillation atriale qui est éligible pour un AOD [...], l'usage d'un AOD est recommandé plutôt qu'un AVK » [21]. Cette recommandation est de classe I, correspondant à un niveau

de « preuve ou accord professionnel selon lequel le traitement donné est bénéfique, utile, efficace », et de niveau A, c'est-à-dire que le niveau de preuve est apporté par plusieurs essais randomisés ou méta-analyses.

À la date de rédaction de cette thèse, la Société européenne de cardiologie n'a pas émis de recommandation privilégiant, de façon générale, l'utilisation de l'un des 3 AOD étudiés plus que les autres, dans la prévention du risque thromboembolique lié à la fibrillation atriale. En revanche, elle rappelle que le choix de l'AOD doit être influencé en priorité par certains critères du patient tels que l'âge, le poids, l'état de la fonction rénale ainsi que l'importance des différentes comorbidités.

Ces recommandations ESC 2016 émanant de la « *Task Force for the management of atrial fibrillation* » ont été complétées en 2018 par un guide pratique concernant l'usage des anticoagulants non-AVK dans la fibrillation atriale, rédigé par l'EHRA (*European Heart Rhythm Association*), dépendant également de l'ESC, qui précise que la fonction rénale doit être estimée à l'aide de la formule de Cockcroft & Gault, car c'est cette dernière qui a été principalement employée dans les différentes études pivots [160].

Les AVK restent néanmoins indiqués en première intention chez les porteurs de valves cardiaques mécaniques [21].

En France, que recommande la Haute Autorité de santé ?

En France, les recommandations émises par la H. A. S. en 2018 au regard de l'usage des anticoagulants oraux dans la fibrillation atriale placent les AVK et les AOD en première intention. Suivant ces recommandations, le choix entre AVK et AOD doit être fait au cas par cas en tenant compte des différentes caractéristiques du patient. La H. A. S. considère cependant que l'âge, le faible poids et l'insuffisance rénale chronique sont des facteurs pour lesquels « une anticoagulation avec les AVK qui permet un suivi du degré d'anticoagulation est particulièrement indiquée » [104].

III.4.4. Schémas posologiques

Pour la prévention du risque thrombotique dans la fibrillation atriale, les posologies usuelles des AOD sont les suivantes :

- dabigatran – 150 mg deux fois par jour ;
- rivaroxaban – 20 mg une fois par jour ;
- apixaban – 5 mg deux fois par jour.

Néanmoins, certaines situations sont considérées comme étant à haut risque hémorragique et nécessitent une dose réduite [104,160]. Les critères d'ajustement de dose sont détaillés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Schémas posologiques des AOD dans la fibrillation atriale.

AOD	Critères de réduction de dose
rivaroxaban posologie usuelle : 20 mg ×1 posologie réduite : 15 mg ×1	ClCr comprise entre 15 et 49 mL/min
apixaban posologie usuelle : 5 mg ×2 posologie réduite : 2,5 mg ×2	ClCr comprise entre 15 et 29 mL/min <i>ou deux critères parmi :</i> âge ≥ 80 ans poids ≤ 60 kg créatinine sérique ≥ 133 µM
dabigatran posologie usuelle : 150 mg ×2 posologie réduite : 110 mg ×2	âge ≥ 80 ans traitement concomitant par vérapamil <i>en fonction du risque hémorragique si :</i> âge entre 75 et 79 ans ClCr entre 30 et 50 mL/min gastrite, œsophagite ou reflux gastro-œsophagien tout patient avec un risque augmenté de saignement

D'après les recommandations de la Haute Autorité de santé [104].

III.5. Les AOD : conclusion

La découverte des AOD a permis d'apporter de nouvelles solutions aux patients souffrant de fibrillation atriale, avec des traitements au moins aussi efficaces que la warfarine et globalement moins de saignements graves tels que les saignements intracrâniens. À noter que la fluindione, AVK le plus prescrit en France n'a pas été directement testée dans ces études ; toutefois pour la fluindione comme pour la warfarine, l'ajustement posologique se fait par rapport à l'INR. Les résultats des études pivots sont rassurants, cependant ces données restent celles d'essais cliniques randomisés et non de patients en vie réelle. De surcroît, les proportions de sujets très âgés dans ces essais sont plutôt faibles : il y a donc nécessairement un manque de données en vie réelle chez les patients très âgés, fragiles, pourtant à haut risque à la fois hémorragique et thrombotique.

IV. ÉTUDE ADAGE ET OBJECTIFS DE MA THÈSE

IV.1. Rationnel de l'étude ADAGE

Malgré les données rassurantes fournies par les essais cliniques randomisés, il restait encore lors du déploiement de l'étude ADAGE un certain nombre d'incertitudes concernant l'utilisation de ces AOD chez les patients les plus âgés [161]. Même si l'âge moyen ou médian des patients dépassait 70 ans dans les essais cliniques mentionnés, peu d'octogénaires, et à plus forte raison très peu de nonagénaires, étaient inclus dans ces essais. Dans ces tranches d'âge, dans lesquelles la fibrillation atriale est très fréquente, les données étaient donc encore assez limitées.

De même que pour les données cliniques, les données disponibles sur la pharmacologie de ces médicaments chez les patients âgés restent très limitées. Les premières études de pharmacocinétique menées chez des « sujets âgés » concernaient de très petits nombres de sujets relativement jeunes et en bonne santé : 36 sujets d'âge moyen 68 ans pour le dabigatran [137] ; 16 sujets d'âge moyen 77 ans pour le rivaroxaban [127] et 39 sujets d'âge moyen 70 ans pour l'apixaban [131]. Toutes ces études montrent que chez les patients âgés l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques des AOD est augmentée d'environ 30 % à 40 %, en comparaison aux patients plus jeunes. Le mécanisme à l'origine de cette augmentation de concentrations chez les personnes âgées n'a pas été bien établi ; dans ces études, l'augmentation de l'aire sous la courbe n'était pas complètement expliquée par le degré d'altération de la fonction rénale observée chez les patients âgés. Enfin, dans les cas rapportés dans la littérature d'accidents hémorragiques liés aux anticoagulants oraux directs, l'âge avancé, avec l'insuffisance rénale, le sexe féminin et le faible poids corporel étaient des facteurs de risque indépendants fréquemment présents [162].

La variabilité de la réponse aux AOD serait particulièrement importante chez les patients âgés, augmentant les risques de surdosage et donc d'hémorragie. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette variabilité :

- les AOD ont une part variable d'élimination rénale sous forme active (dabigatran 80 %, rivaroxaban 33 %, apixaban 27 %). Les patients âgés sont fréquemment polyopathologiques et ont une prévalence élevée d'insuffisance rénale, avec un risque d'accumulation des médicaments à élimination rénale ;

- les sujets âgés ont fréquemment un poids corporel réduit par rapport aux poids standards pour lesquels les dosages de ces médicaments ont été développés. Ils présentent aussi souvent des modifications de la composition corporelle, avec une sarcopénie, diminution de la masse maigre et augmentation de la proportion de tissu gras, ce qui peut réduire le volume de distribution des médicaments très hydrosolubles, comme les AOD ici étudiés. Les sujets âgés avec des maladies chroniques ont, enfin, une fréquence élevée d'hypoalbuminémie, ce qui pourrait majorer les concentrations plasmatiques libres du rivaroxaban et apixaban, fortement liés aux protéines ;
- les AOD sont transportés par la P-gp, avec un risque d'interactions potentielles avec les médicaments modulateurs de cette protéine, risque plus prononcé chez les patients âgés, souvent polymédiqués ;
- des facteurs génétiques pourraient moduler l'effet des AOD : polymorphismes d'*ABCB1* codant la P-gp ; polymorphismes de *CES1* codant l'estérase impliquée dans la transformation de la prodrogue du dabigatran ; polymorphismes des gènes codant pour les cytochromes impliqués dans leur métabolisme : *CYP3A5* et *CYP2J2* (rivaroxaban, apixaban).

Nous avons fait l'hypothèse que des facteurs individuels non-génétiques (âge, poids, comorbidités, albumine plasmatique, clairance de la créatinine, médicaments associés...) et génétiques (polymorphismes d'*ABCB1*, *CYP3A5* et *CYP2J2*) contribuent à la variabilité inter-individuelle de la réponse aux AOD chez les patients très âgés.

IV.2. Objectifs de l'étude ADAGE

Pour apporter des éléments de réponse à ces questions, notre groupe a mis en place l'étude ADAGE (*Assessment of Direct oral Anticoagulants in GEriatrics*), qui est une étude académique européenne prospective, multicentrique, non interventionnelle de phase IV (NCT 02464488) (Investigateurs principaux : Dr C. Lafuente-Lafuente, Dr J. Le Guen – responsable scientifique : Pr V. Siguret).

L'objectif principal de l'étude ADAGE est de préciser les profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, du rivaroxaban, de l'apixaban et du dabigatran chez des patients de 80 ans et plus, traités pour une fibrillation atriale non valvulaire par une approche de population, et évaluer l'influence des facteurs individuels clinico-biologiques, thérapeutiques et génétiques sur ces profils. Citons parmi les facteurs individuels étudiés :

- âge, poids corporel, comorbidités (scores CIRS-G, insuffisance rénale, hépatique ou cardiaque), albumine plasmatique, clairance de la créatinine, médicaments associés

(notamment présence de substrats, inhibiteurs ou activateurs de la P-gp et du CYP3A4/5), polymédication (nombre total de médicaments...).

— facteurs génétiques : polymorphismes d'*ABCB1*, *CYP3A5* et *CYP2J2*.

L'objectif secondaire est de recueillir les événements hémorragiques, thrombotiques et les décès au terme de six mois de suivi.

Un avis favorable a été émis pour cette étude par le Comité de protection des personnes – Île de France VI (11 juillet 2013) ainsi que par le Comité consultatif sur le traitement de l'information en recherche dans le domaine de la santé (avis 15.074bis en date du 12 novembre 2015).

IV.3. Objectifs de ce travail de thèse

L'objectif principal de mon travail de thèse est de préciser la variabilité inter-individuelle des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du rivaroxaban, de l'apixaban et du dabigatran chez les patients inclus dans ADAGE. La réponse à cet objectif s'articule autour des trois points décrits ci-après. La difficulté de recrutement de patients traités par dabigatran nous a conduit à limiter certains objectifs aux patients traités par xaban.

IV.3.1. Pharmacocinétique

Décrire la pharmacocinétique des AOD dans cette cohorte de patients très âgés, de manière à disposer à la fin de l'étude d'une étendue de la variabilité des concentrations mesurées pour chaque AOD, et ainsi faciliter l'interprétation des résultats chez les patients de plus de 80 ans.

IV.3.2. Pharmacodynamie

Évaluer la génération de thrombine à l'aide de deux systèmes innovants de génération de thrombine : le ST-Genesis® (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) et le Thrombodynamics-4D® (Hemacore LLC, Moscou, Russie) (incluant en sus, pour ce dernier, la fibrinographie) chez les patients ADAGE (*ex vivo*) ; compléter cette étude par des analyses *in vitro* à l'aide de plasmas surchargés en AOD. Cet objectif secondaire comprend l'évaluation préalable des performances analytiques de ces deux méthodes de génération de thrombine.

Au terme des analyses de pharmacocinétique et de pharmacodynamie, rechercher les relations potentielles entre les caractéristiques individuelles démographiques, clinico-

biologiques, thérapeutiques et pharmacogénétiques sur les profils obtenus chez les patients traités par xaban.

IV.3.3. Suivi clinique des patients traités par xaban

Par un suivi clinique à 6 mois, apporter des données en vie réelle sur la survenue des événements hémorragiques, thrombotiques et des décès au décours du traitement par xaban dans cette population de patients très âgés et fragiles. Rechercher l'existence potentielles de relations entre la survenue de tels événements et les données de pharmacocinétique et de pharmacodynamie chez ces patients à l'inclusion.

V. DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE ADAGE

Sept centres de recrutement de patients répartis sur cinq hôpitaux, à savoir quatre hôpitaux franciliens de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP) et un hôpital en Wallonie, dans la province de Namur, ont participé à étude.

V.1. Centres participants

- Hôpital Charles Foix, service de gériatrie à orientation cardiologique et neurologique, ci-après dénommé « Triade » (Pr Joël Belmin) – investigateur principal : Dr Carmelo Lafuente Lafuente ;
- Hôpital Charles Foix, service de court séjour gériatrique, ci-après dénommé « UGA » (Pr Éric Pautas) ;
- Hôpital européen Georges Pompidou, service de gériatrie (Pr Olivier Saint-Jean) – investigateur : Dr Julien Le Guen ;
- Hôpital européen Georges Pompidou, service de cardiologie (Pr Albert Hagege) – investigateur : Dr Étienne Puymirat ;
- Hôpital Rothschild, service de gériatrie (Dr Anne Sophie Grancher) – investigateur : Dr Fatoumata Tall ;
- Hôpital Lariboisière, service de cardiologie (Pr Alain Cohen-Solal) – investigateurs Dr Jean-Guillaume Dillinger et consultation clinique d'hémostase – Dr Maxime Delrue ;
- Centre hospitalier Universitaire de Namur (Belgique), service de gériatrie (Dr Marie de Saint-Hubert).

V.2. Recrutement de patients dans l'étude

V.2.1. Critères d'inclusion

- Patient de 80 ans ou plus, hospitalisé dans un des centres participants pour une durée prévisible de plus de 7 jours ou suivi régulièrement en consultation dans le service

pour fibrillation atriale non valvulaire et traité par AOD depuis au moins 4 jours (posologie à la discrétion du clinicien) ;

- obtention des consentements écrits du patient ou de son représentant légal pour la participation à l'étude et la réalisation d'analyses pharmacogénétiques ;
- patient affilié à un régime de la Sécurité sociale.

V.2.2. Critères d'exclusion

- Espérance de vie estimée à moins d'un an ou patient dont l'état clinique était jugé par le médecin en charge du patient comme instable ou très grave ;
- impossibilité d'obtenir le consentement du patient ou de son représentant légal, ou refus de consentement.

V.3. Recueil des données des patients

V.3.1. Données recueillies à l'inclusion

Les données des patients ont été recueillies prospectivement et consignées dans un cahier d'observations par le clinicien référent de l'étude dans chacun des services participants :

- données démographiques (âge, sexe, poids, taille) ;
- données cliniques (comorbidités, type de fibrillation atriale, facteurs de risque cardiovasculaire, scores cliniques) ;
- données biologiques dont la clairance rénale de la créatinine (estimée par la formule de Cockcroft & Gault), l'hémogramme, le bilan hépatique ;
- données thérapeutiques (AOD et médicaments associés).

Par ailleurs, les scores cliniques suivants ont été calculés pour chaque patient : scores CHA₂DS₂-VASc, HAS-BLED, HEMORR₂HAGES, CIRS-G. Un extrait du cahier d'observation est disponible en Annexe 1. Par ailleurs, le codage des données sera détaillé dans la partie IV du manuscrit.

V.3.2. Réalisation du suivi clinique

Le protocole de l'étude ADAGE prévoyait un suivi clinique réalisé 6 mois après l'inclusion, qui sera détaillé dans la partie V de la thèse.

V.4. Prélèvements sanguins

V.4.1. Plan de prélèvements

Compte tenu du capital veineux réduit des patients âgés, un seul tube de sang a été prélevé spécifiquement pour l'étude, à l'occasion d'un prélèvement fait dans le cadre des soins habituels, sans piqûre supplémentaire pour le patient, et ceci pour un maximum de 5 prélèvements sur une période maximale de 20 jours. Les prélèvements ont été effectués de préférence selon des plages horaires préétablies, d'ordre indifférent (Figure 13). Il convient de noter que dans l'approche de population, et contrairement à ce qui est pratiqué en pharmacocinétique classique, il n'est pas nécessaire que tous les individus aient des prélèvements aux mêmes temps, ni qu'ils soient traités par les mêmes doses. L'essentiel est que l'ensemble des prélèvements réalisés sur la population renseigne sur le profil complet des concentrations en fonction du temps et tenant compte de la dose du médicament pour avoir une estimation précise du modèle [163]. Cette approche permet donc d'obtenir un modèle avec un faible nombre de prélèvements par patient, au prix d'un nombre plus important de patients par rapport à ce qui se fait en pharmacocinétique classique. Le rivaroxaban étant administré en une prise quotidienne, le plan de prélèvements proposé était le suivant :

- un prélèvement effectué juste avant la prise (résiduelle) ;
- un prélèvement effectué entre 1 et 4 h après la prise ;
- un prélèvement effectué entre 4 h et 8 h après la prise ;
- un prélèvement effectué entre 8 et 24 h après la prise ;
- un prélèvement à un horaire indifférent.

Concernant l'apixaban et le dabigatran, tous deux administrés en deux prises quotidiennes, le plan de prélèvement proposé était le suivant :

- un prélèvement effectué juste avant la prise (résiduelle) ;
- un prélèvement effectué entre 1 et 4 h après la prise ;
- un prélèvement effectué entre 4 et 8 h après la prise ;
- un prélèvement effectué entre 8 et 12 h après la prise ;
- un prélèvement à un horaire indifférent.

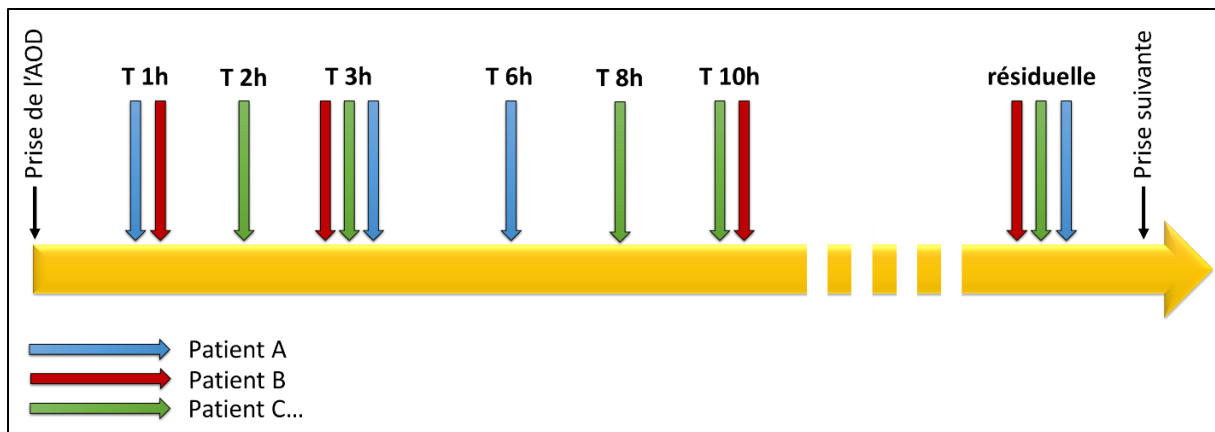


Figure 13 : Plan de prélèvement proposé pour l'étude ADAGE.

Dans le cadre de l'approche de population, adaptée aux patients gériatriques, les prélèvements sont réalisés à des horaires variables, avec un délai entre le prélèvement et la dernière prise connu. Il est possible de réaliser plusieurs prélèvements à des heures distinctes après une même prise d'AOD.

Pour chaque patient, la concentration maximale (C_{max}) observée en AOD a été définie par l'activité anti-Xa la plus élevée mesurée dans un échantillon prélevé à T_{max} , c'est-à-dire entre T1h et T4h après la dernière prise d'AOD. La concentration minimale (C_{min}) observée a été définie comme l'activité anti-Xa mesurée dans un échantillon prélevé à T_{min} , c'est-à-dire entre T20h et T24h après la dernière prise de rivaroxaban. Pour les patients traités par apixaban et dabigatran, administrés en deux prises quotidiennes, le T_{min} était compris entre T10h et T12h après la prise. Les valeurs médianes des activités anti-Xa ont été calculées, ainsi que le premier et le troisième quartile.

V.4.2. Traitement pré-analytique des échantillons

Le sang veineux a été recueilli dans un tube avec un volume de remplissage de 3,5 mL (citrates de sodium 0,109 M, 9 vol/1 vol), acheminé au laboratoire de chaque centre dans les deux heures suivant le prélèvement. Après double centrifugation pendant 15 min à 2000 g à 15-22 °C, le plasma pauvre en plaquettes a été réparti en aliquotes de 500 µL, conservés à -80 °C [164]. Les échantillons ont été centralisés pour analyse dans le Service d'hématologie de l'hôpital Lariboisière après transport dans de la carboglace. Avant analyse, les échantillons ont été décongelés dans un bain-marie à 37 °C pendant 3 minutes. Les culots globulaires ont été également conservés à -80 °C jusqu'à extraction de l'ADN.

V.5. Calcul des effectifs de l'étude ADAGE par groupe

Étant donné les fréquences alléliques des polymorphismes d'*ABCB1* rs2032582 (c.2677T>A/G), situé dans l'exon 21, en fort déséquilibre de liaison avec le polymorphisme rs1045642 (c.3435T>C), situé dans l'exon 26, qui sont respectivement de 0,42 et 0,50 dans la population caucasienne, il est attendu que 25 % des patients soient homozygotes

sauvages, 25 % soient homozygotes mutés et 50 % hétérozygotes pour chacun des polymorphismes [165]. Compte tenu des aires sous la courbe moyennes observées chez les patients traités par 15 mg de rivaroxaban [166] et de celles observées chez les patients traités par 110 mg ×2 de dabigatran [136], avec un coefficient de variation, dans les deux cas, de l'ordre de 30 %, l'effectif nécessaire calculé a été de 75 patients traités par rivaroxaban et de 75 patients traités par dabigatran, en considérant un nombre moyen de trois prélèvements par patient, soit 225 points. Cet effectif devrait nous permettre de mettre en évidence une différence d'ASC d'au moins 20 % entre les groupes homozygotes sauvages et homozygotes mutés avec une puissance de 80 % et un risque de première espèce de 5 %. De manière arbitraire et du fait de l'absence de données publiées sur la variabilité avec l'apixaban, il a été décidé d'inclure également 75 patients dans le groupe apixaban, en considérant un nombre moyen de trois prélèvements par patient, soit 225 points.

V.6. Mon rôle dans l'étude ADAGE

À mon arrivée, seuls quatre centres de recrutement étaient ouverts (ceux de l'hôpital Charles Foix et de l'hôpital Européen Georges Pompidou, *vide infra*) et une cinquantaine de patients inclus. Ma première mission a été de coordonner l'étude avec les cliniciens des différents centres et de tracer l'ensemble des prélèvements déjà reçus. J'ai ensuite eu pour missions au sein de l'étude :

- l'ouverture de nouveaux centres de recrutement ;
- la mise en place de la logistique du transport des prélèvements des centres vers Lariboisière et la gestion sur site de leur bonne conservation ;
- la réalisation des différentes analyses pour l'étude (sans technicien dédié) :
 - mesure des concentrations en AOD et du fibrinogène ;
 - installation au laboratoire des deux systèmes de thrombinographie, Thrombodynamics-4D et ST Genesia et établissement de leurs performances analytiques ;
 - étude *in vitro* de l'effet des AOD sur la génération de thrombine et la fibrinographie ;
 - étude de la thrombinographie et de la fibrinographie chez les patients ADAGE à l'aide du système Thrombodynamics-4D, avec le concours de Candice Cavalié, interne en biologie médicale ;

- étude de la génération de thrombine à l'aide du système ST-Genesia®, chez les patients ADAGE avec le concours de Guillaume Paris, élève ingénieur en première année que j'ai encadré pour ce travail ;
 - extraction d'ADN à partir des culots globulaires et génotypage des patients ;
 - participation à l'organisation du suivi clinique, celui-ci ayant été notamment réalisé Léa Rivière, interne en gériatrie, que j'ai co-encadrée pour sa thèse d'exercice de Médecine (Paris Sorbonne Université) ;
- la constitution des différentes bases de données et leur gestion, saisie et interprétation des résultats.

Enfin, j'ai participé aux différentes analyses statistiques encadrées par le Dr. Emmanuel Curis. J'ai participé à la valorisation du travail en présentant les travaux à différents congrès nationaux et internationaux, en rédigeant la première version des articles et en suivant leur révision et leur publication.

VI. LA COHORTE ADAGE : UNE COHORTE DE PATIENTS GÉRIATRIQUES

VI.1. Description de la cohorte

De novembre 2015 à janvier 2020, 265 patients ont été inclus dans l'étude ADAGE. Ces patients venaient principalement de l'hôpital Charles-Foix, qui représente à lui seul 65 % des inclusions, parmi lesquels 57 % venaient de l'UGA et 43 % venaient de la Triade. Les autres patients provenaient à 15 % de l'HEGP, à 12 % de l'hôpital Lariboisière, à 5 % de l'hôpital Rothschild et à 2 % du Centre hospitalier universitaire de Namur.

Parmi ces 265 patients inclus, 104 (39,2 %) étaient traités par rivaroxaban, 111 (41,9 %) étaient traités par apixaban et 50 (18,9 %) recevaient du dabigatran. Quand l'effectif initialement prévu de 75 patients a été atteint dans les groupes traités par apixaban et rivaroxaban, le nombre moyen d'échantillons par patient était de deux, et non de trois comme celui prévu (*vide infra* : VI.2). C'est la raison pour laquelle les inclusions ont été poursuivies de manière à atteindre environ 225 prélèvements pour ces deux groupes. La rareté grandissante de la prescription de dabigatran chez les patients de 80 ans et plus a été telle que l'inclusion des patients traités par dabigatran a été interrompue.

Les caractéristiques démographiques, cliniques, biologiques et thérapeutiques sont détaillées dans le Tableau 11. La comparaison entre les trois groupes d'une part, et celle

entre le groupe apixaban et rivaroxaban d'autre part, sont également précisées dans ce Tableau 11.

VI.1.1. Caractéristiques démographiques

Dans cette cohorte de 265 patients, l'âge moyen était de $86,4 \pm 4,3$ ans (min-max 80 – 100), avec une majorité de femmes (69,1 %) comme attendu dans une cohorte de gériatrie. Le poids médian chez les femmes était de 61,3 kg (IQR 53,1 – 70,0), contre 73,0 kg (IQR 63,0 – 85,0) chez les hommes. Aucune différence significative, au seuil 5%, n'a été détectée entre les trois groupes (même sans correction de multiplicité).

VI.1.2. Caractéristiques cliniques

Présentation clinique de la fibrillation atriale

Les patients ADAGE souffraient pour 34,2 % de fibrillation atriale paroxystique tandis que 9,4 % avaient une fibrillation atriale persistante et 56,4 % une fibrillation atriale permanente. Le risque thrombotique était élevé dans cette cohorte puisque le score CHA₂DS₂-VASc moyen était de $5,0 \pm 1,4$ (min-max 2 – 9). D'autre part, les scores de risque hémorragique moyens étaient respectivement de $1,6 \pm 0,7$ et de $2,3 \pm 1,0$ pour les scores HAS-BLED et HEMORR₂HAGES.

Polypathologie dans la cohorte ADAGE

Le niveau de polypathologie était élevé dans cette cohorte de patients âgés, caractérisée par un score CIRS-G moyen de $10,3 \pm 4,4$. En plus de leur fibrillation atriale, 76,1 % des patients étaient hypertendus et 44,3 % souffraient d'insuffisance cardiaque. Ils étaient 19,4 % à être diabétiques et 25,6 % avaient reporté un antécédent d'AVC ou d'AIT.

Il est important de noter que les scores CHA₂DS₂-VASc, HEMORR₂HAGES et CIRS-G sont significativement différents dans les trois groupes, avec notamment les scores CIRS-G et HEMORR₂HAGES plus élevés dans le groupe apixaban que dans le groupe rivaroxaban (respectivement $11,4 \pm 4,8$ et $9,3 \pm 3,7$ pour CIRS-G, $p = 0,0022$ et respectivement $2,5 \pm 1,0$ et $2,1 \pm 1,0$ pour HEMORR₂HAGES, $p = 0,02176$).

VI.1.3. Caractéristiques biologiques

Fonction rénale

Avec une créatinine sérique moyenne de $82,7 \pm 24,5$ µM, la clairance de la créatinine moyenne estimée par la formule de Cockcroft et Gault était de $50,3 \pm 18,0$ mL/min. Ainsi, 66,1 % des patients inclus étaient en insuffisance rénale modérée (ClCr comprise entre 30 et 59 mL/min), 7,8 % et insuffisance rénale sévère (ClCr comprise entre 15 et 29 mL/min).

De façon intéressante, la ClCr moyenne dans la cohorte était de $70,7 \pm 23,2$ mL/min/1,73m² quand celui-ci était estimé par la formule du *Modification in Diet of Renal Disease* (MDRD) rappelant, que chez le sujet très âgé, la formule de Cockcroft et Gault génère des résultats discordants par rapport à celle de MDRD [167]. Pour la prescription d'anticoagulants, la H. A. S. recommande de n'utiliser que la formule de Cockcroft et Gault pour estimer la clairance de la créatinine, ce qui sera le cas pour la suite de ce travail, sauf mention contraire.

Fonction hépatique

Les différents marqueurs étudiés, à savoir aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), phosphatases alcalines (PAL) et bilirubine étaient pour la grande majorité des patients dans les intervalles de références. Chez quelques patients néanmoins, une élévation des GGT autour de 10 fois la valeur normale a été retrouvée.

Marqueurs de l'inflammation

Environ 30,5 % des patients avaient une concentration en protéine C réactive inférieure à 5 mg/L. Dans l'ensemble de la cohorte, la concentration médiane (IQR) était de 11,6 (5,0 - 33,8) mg/L. La fibrinogénémie était assez élevée dans la cohorte, comme attendu chez des sujets âgés, avec une valeur moyenne de $4,8 \pm 1,5$ g/L. Enfin, l'albuminémie moyenne était de $33,1 \pm 5,2$ g/L.

Hémogramme

Les paramètres de l'hémogramme étaient assez peu perturbés dans la cohorte ADAGE. Les taux moyens d'hémoglobine étaient de $12,1 \pm 1,6$ g/L et $12,4 \pm 1,9$ g/L chez les femmes et les hommes respectivement, valeurs attendues chez des sujets très âgés. La numération plaquettaire était dans les intervalles de références pour 88,7 % de patients, les autres patients ne présentant cependant que de légers écarts par rapport aux bornes de ces intervalles. Enfin, 22,4 % des patients présentaient une hyperleucocytose. À noter l'absence de différences significatives entre les trois groupes (Tableau 11).

VI.1.4. Caractéristiques thérapeutiques

AOD et posologies

Parmi les 104 patients traités par rivaroxaban, 3 (2,9%), 83 (79,8%) et 18 (17,3%) recevaient la posologie de 10, 15 et 20 mg par jour. Rappelons que la posologie de 10 mg par jour n'est pas recommandée dans la fibrillation atriale. Pour l'apixaban, 85 patients

(76,6%) recevaient 2,5 mg deux fois par jour et 26 (23,4%) recevaient 5 mg deux fois par jour. Enfin, 7 (14%) et 43 (86%) des 50 patients traités par dabigatran recevaient respectivement 75 et 110 mg deux fois par jour. Il convient là de rappeler que la posologie de 75 mg deux fois par jour n'est pas recommandée dans la fibrillation atriale en Europe.

Les résultats montrent que 31 % ($n = 67$) des patients ne recevaient pas une posologie d'AOD conforme aux stricts critères que sont la créatinine sérique, le poids et l'âge, pour l'apixaban, la fonction rénale pour le rivaroxaban au moment de l'inclusion dans ADAGE. Au total, 60 des 67 patients (89,5 %) recevaient une posologie plus faible que celle préconisée et 7 patients recevaient une dose plus élevée.

Patients traités par rivaroxaban

Trente-deux patients (30 %) traités par rivaroxaban ne recevaient pas la posologie attendue : 27 patients (84 % d'entre eux) recevaient la posologie réduite (15 mg/j), alors que leur clairance de la créatinine (Cockcroft) était supérieure à 50 mL/min ; de plus, 3 patients recevaient même une dose unique de 10 mg par jour, sans raison particulière, alors qu'ils auraient dû recevoir 20 mg pour deux d'entre eux, et 15 mg pour l'un d'entre eux. Enfin, 5 patients (16 % d'entre eux) recevaient une dose majorée alors que leur clairance de la créatinine (Cockcroft) était inférieure à 50 mL/min (comprise toutefois entre 45 et 49 mL/min pour 4 d'entre eux).

Patients traités par apixaban

Trente-cinq patients (31,5%) traités par apixaban ne recevaient pas la posologie attendue : 33 d'entre eux recevaient la posologie réduite (2,5 mg \times 2/j) alors que leur créatininémie était inférieure 133 μ mol/L et leur poids supérieur à 60 kg ; les deux autres recevaient la dose de 5 mg \times 2/j malgré un poids inférieur à 60 kg.

Polymédication dans la cohorte ADAGE

En moyenne, les patients de la cohorte ADAGE prenaient, en plus de leur AOD (et hors suppléments vitaminiques) une moyenne de 6 ± 3 médicaments par jour. La polymédication concernait principalement les médicaments du système cardiovasculaire, avec 53,9% de patient traités par β -bloquant, et 43,4% par antihypertenseur de la famille des inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou antagoniste de récepteurs de l'angiotensine (aussi appelés sartans). Par ailleurs, 21,0% des patients recevaient de l'amiodarone, médicament antiarythmique.

En accord avec les recommandations, peu de patients (12,9 %) étaient traités par médicament de la famille des antiplaquettaires (aspirine, clopidogrel...), dont l'association avec les AOD est déconseillée car majorant le risque hémorragique. Cette association AOD / antiplaquettaire était toutefois retrouvée chez deux fois plus de patients traités par apixaban que par rivaroxaban, témoignant d'une polyopathie vasculaire chez ces patients.

VI.2. Description des échantillons prélevés

Au total, 529 prélèvements ont été réalisés chez les patients ADAGE avec, respectivement, 232, 224 et 73 prélèvements réalisés parmi les patients traités par rivaroxaban, apixaban et dabigatran, soit, en moyenne, environ deux prélèvements par patient. Sur ces 529 prélèvements, 169 (32,1 %) sont des prélèvements en résiduel, c'est-à-dire réalisés juste avant la prise suivante de l'AOD, et 124 (23,5 %) sont prélevés au pic apparent des concentrations. Pour la suite de ce travail, la C_{max} sera représentée par les prélèvements réalisés à la T_{max} , c'est-à-dire entre 1h et 4h après la dernière prise d'AOD. Dans le cas où plusieurs prélèvements auraient été réalisés pour un même patient dans cet intervalle temporel, la plus haute concentration sera retenue comme étant la C_{max} . La C_{min} se représentée par la concentration à T_{min} .

VII. CONCLUSION

Avec un âge moyen de 86 ans, une proportion importante de femmes dans la cohorte et une clairance de la créatinine moyenne de 50 mL/min, la cohorte ADAGE présente les caractéristiques attendues d'une cohorte de patients gériatriques. Les différents scores cliniques ainsi que le nombre élevé de médicaments pris quotidiennement par les patients montre bien qu'il s'agit d'une cohorte de patients fragiles, polyopathologiques et polymédiqués, à haut risque à la fois hémorragique et thrombotique. De façon intéressante, les scores CIRS-G et HEMORR₂HAGES moyens sont plus élevés chez les patients traités par apixaban comparativement à ceux traités par rivaroxaban, et ils sont plus nombreux à recevoir des antiplaquettaires.

Tableau 11 : Caractéristiques clinico-biologiques et thérapeutiques des patients ADAGE.

	rivaroxaban	apixaban	dabigatran	Total	Comparaisons trois groupes*	Comparaisons rivaroxaban & apixaban
	n = 104	n = 111	n = 50	n = 265	significativité	significativité
Caractéristiques démographiques						
Âge, années – (m ± e.t.)	86,4 ± 4,4	86,8 ± 4,3	85,6 ± 4,2	86,4 ± 4,3	0,2367	0,4904
Femmes (%)	68,3	73,9	60	69,1	0,2065	0,3646
Poids (kg)	64,9 ± 12,6	66,4 ± 16,5	69,2 ± 17,6	66,2 ± 15,3	0,5482	0,5422
Caractéristiques cliniques						
FA persistante (%)	8,7	9,4	12,0	9,4	0,9806	0,9516
FA paroxysmale (%)	35,0	33,0	36,0	34,2	0,9806	0,9516
FA permanente (%)	56,3	57,5	52,0	56,4	0,9806	0,9516
Score CHA ₂ DS ₂ VASc – (m ± e.t.)	4,9 ± 1,4	5,2 ± 1,4	4,3 ± 1,6	5,0 ± 1,4	0,0134	0,1220
Score HEMORR ₂ HAGES – (m ± e.t.)	2,1 ± 1,0	2,5 ± 1,0	2,0 ± 0,7	2,3 ± 1,0	0,0398	0,0218
Antécédent d'AVC / AIT (%)	21,4	28,2	28,6	25,6	0,4526	0,2498
Diabète (%)	10,9	26,6	21,9	19,4	0,0149	0,0038
Hypertension (%)	72,8	79,1	76,3	76,1	0,5619	0,2835
Insuffisance cardiaque (%)	46,6	52,7	20,4	44,3	0,0006	0,3716
Dyslipidémie (%)	24,3	28,4	55,0	31,0	0,0013	0,4914
Score CIRS-G – (m ± e.t.)	9,3 ± 3,7	11,4 ± 4,8	8,8 ± 3,4	10,3 ± 4,4	0,0026	0,0022
Caractéristiques biologiques						
Clairance de la créatinine, mL/min – (m	50,5 ± 17,1	47,9 ± 15,9	56,5 ± 23,9	50,3 ± 18,0	0,2085	0,3163
Albuminémie, g/L – (m ± e.t.)	33,4 ± 4,2	33,0 ± 5,9	32,6 ± 5,9	33,1 ± 5,2	0,7872	0,6057
Protéine C réactive, mg/L – médiane (IQR)	11,0 (5,0 – 35,5)	13,0 (5,5 – 33,5)	8,0 (4,0 – 32,5)	11,6 (5,0 – 33,8)	0,2844	0,3733
Hémoglobine, g/dL – (m ± e.t.)	12,2 ± 1,7	12,0 ± 1,8	12,4 ± 1,6	12,1 ± 1,7	0,4039	0,4771
Données thérapeutiques						
Nombre de médicaments associés – (m ± e.t.)	5,9 ± 2,5	6,5 ± 2,9	5,5 ± 2,2	6,1 ± 2,6	0,2286	0,2553
≥ 1 inhibiteur de P-gp (%)	44,6	51,8	43,5	47,5	0,4790	0,2915
≥ 1 inhibiteur du CYP3A4/5 (%)	17,8	26,4	21,7	22,2	0,3276	0,1363
Anti-arythmiques (%)	18,3	28,8	18,8	22,3	0,1576	0,0689
Amiodarone (%)	17,8	25,5	17,4	21,0	0,3181	0,1798
Antiplaquettaires (%)	10,0	20,0	2,17	12,9	0,0055	0,0440

*Les comparaisons sont « globales » (un seul p, significatif si au moins l'un des trois groupes est différent des deux autres) sans dire quel groupe diffère (tests utilisés : analyse de variance à un facteur classique ; test de Kruskal-Wallis ou test du khi-deux d'indépendance). m ± e.t. : moyenne ± écart-type. Seuil de significativité : p < 0,05. FA : fibrillation atriale. AVC : accident vasculaire cérébral. AIT : accident ischémique transitoire.

PARTIE II – PROFILS PHARMACOCINÉTIQUES DES AOD CHEZ LES PATIENTS D’ADAGE

I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Les études pivots ont montré que le suivi biologique des AOD n’était pas nécessaire du fait d’une marge thérapeutique large. Toutefois, une mesure des concentrations plasmatiques d’AOD peut s’avérer utile lors de la nécessité de pratiquer une chirurgie ou un geste invasif en urgence, lors d’une indication de thrombolyse, lors de saignements graves ou lors d’intoxication médicale volontaire. Le dosage du médicament en résiduel, c’est-à-dire juste avant la prise d’AOD suivante, permet de s’assurer que le patient n’a pas accumulé le médicament en cas de dégradation majeure de la fonction rénale par exemple. Enfin, mesurer les concentrations en AOD dans les heures qui suivent la prise permet d’estimer les concentrations maximales atteintes.

Les données concernant les valeurs attendues au pic et en résiduel existent mais résultent en majorité d’études menées dans les essais de phase II chez des volontaires sains ou des essais pivots (c’est-à-dire les essais de phase III permettant l’obtention de l’autorisation de mise sur le marché). Comme nous l’avons vu dans la partie précédente, les études évaluant l’effet de l’âge sur la pharmacocinétique des AOD concernaient de petits groupes de patients en bonne santé, d’âge moyen 68, 77 et 70 ans pour le dabigatran, le rivaroxaban et l’apixaban respectivement [127,131,138]. Extrapoler ces données chez le patient âgé est délicat : de nombreux facteurs sont susceptibles de modifier le devenir de l’AOD, pouvant se traduire par un allongement des temps d’élimination et une augmentation de l’exposition au médicament [168].

La modification des paramètres pharmacocinétiques chez le sujet âgé est liée à différents phénomènes dont les modifications organiques intrinsèques à la physiologie du vieillissement. Avec l’âge, la part des graisses corporelles augmente et le volume d’eau corporelle diminue, allongeant la demi-vie des médicaments lipophiles et augmentant les concentrations des médicaments hydrophiles, respectivement [168]. Les principales modifications pharmacocinétiques du sujet âgé sont résumées dans le Tableau 12. Ces paramètres pharmacocinétiques peuvent également être modifiés par l’apparition et l’évolution de pathologies, aiguës mais surtout chroniques. En particulier, l’insuffisance

rénale chronique influence l'élimination de la plupart des médicaments. Chez les sujets âgés de 80 ans et plus, sa prévalence est voisine de 80 %, avec un nombre de cas et une sévérité qui augmentent avec l'âge [169,170]. La diminution du débit de filtration glomérulaire implique une réduction de la clairance des médicaments (pour leur part d'élimination rénale), avec un risque d'accumulation pouvant nécessiter une réduction posologique. Enfin, la polymédication est également source de modulation des paramètres pharmacocinétiques du sujet âgé, mais ses implications seront étudiées dans la partie IV.

Tableau 12 : Modification des paramètres pharmacocinétiques du sujet âgé.

Modifications physiologiques chez le sujet âgé	Conséquences sur les paramètres pharmacocinétiques
augmentation du pH gastrique ralentissement de la vidange gastrique diminution du flux sanguin splanchnique surface d'absorption réduite motilité gastro-intestinale réduite	réduction discrète de l'absorption (rarement significatif)
augmentation du taux de graisse corporelle diminution de la masse corporelle	augmentation du volume de distribution et de la demi-vie des médicaments lipophiles
diminution de l'eau corporelle totale	augmentation des concentrations plasmatiques des médicaments hydrophiles
taux réduit d'albumine	augmentation de la fraction libre de certains médicaments (acides) très liés aux protéines plasmatiques
augmentation de l' α 1-glycoprotéine acide	diminution de la fraction libre des médicaments basiques
flux sanguin hépatique réduit	effet de premier passage hépatique moins important
masse hépatique réduite	réduction modérée des réactions de phase I pour certains médicaments
réduction du flux sanguin rénal et du débit de filtration glomérulaire	diminution de l'élimination de certains médicaments

Traduit de Klotz, Drug. Metab. Rev. 2009 [168].

Ainsi, les données spécifiques aux patients gériatriques concernant les AOD manquent cruellement comme le montre tableau 13, récapitulant les principales études aujourd'hui disponibles dans la fibrillation atriale. L'objectif de ce chapitre est de décrire la pharmacocinétique des AOD chez les patients inclus dans ADAGE.

Tableau 13 : Principales études mentionnant les concentrations plasmatiques en AOD dans la fibrillation atriale (non exhaustif).

Auteur, journal – année	AOD, dosage	Taille cohorte	Âge (moyenne ± écart-type ou médiane (IQR))	Femmes (%)	Clairance de la créatinine (mL/min)	Concentration maximale	CV (%)	Concentration résiduelle	CV (%)	Expression des concentrations
Bendayan M. et collègues, Journal of The American Geriatrics Society – 2021 [171]	apixaban 2,5 mg 5 mg	46	77 ± 6	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	210 (150 – 254)	<i>N.D.</i>	99 (56 – 175)	<i>N.D.</i>	médiane (IQR)
	rivaroxaban 20 mg	16	77 ± 6	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	279 (200 – 368)	<i>N.D.</i>	61 (45 – 73)	<i>N.D.</i>	médiane (IQR)
Sinigoj P. et collègues, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology – 2020 [172]	dabigatran 110 mg	21	48	<i>N.D.</i>	68 ± 21	153 ± 61	<i>N.D.</i>	84 ± 68	<i>N.D.</i>	moyenne ± écart-type
	dabigatran 150 mg	23	39	<i>N.D.</i>	92 ± 24	187 ± 138	<i>N.D.</i>	74 ± 55	<i>N.D.</i>	moyenne ± écart-type
Miklič M. et collègues, European Journal of Clinical Pharmacology – 2019 [173]	rivaroxaban 15 mg	30	76 ± 6	63	<i>N.D.</i>	278 (163 – 540)	<i>N.D.</i>	30 (6 – 130)	<i>N.D.</i>	médiane (IQR)
	rivaroxaban 20 mg	30	71 ± 6	30	<i>N.D.</i>	223 (159 – 573)	<i>N.D.</i>	24 (7 – 127)	<i>N.D.</i>	médiane (IQR)
Suwa M. et collègues, Circulation Journal – 2019 [174]	rivaroxaban 10 mg (japon)	90	74 ± 7	28	51 ± 10	270 (155 – 440)	<i>N.D.</i>	26 (<i>N.D.</i>)	<i>N.D.</i>	médiane (5 ^e –95 ^e)
	rivaroxaban 15 mg (japon)	46	64 ± 9	41	85 ± 29	348 (219 – 544)	<i>N.D.</i>	28 (<i>N.D.</i>)	<i>N.D.</i>	médiane (5 ^e –95 ^e)
	apixaban 2,5 mg (japon)	61	80 ± 6	26	46 ± 12	157 (90 – 322)	<i>N.D.</i>	67 (<i>N.D.</i>)	<i>N.D.</i>	médiane (5 ^e –95 ^e)
	apixaban 5 mg (japon)	58	73 ± 6	34	65 ± 20	237 (125 – 436)	<i>N.D.</i>	108 (<i>N.D.</i>)	<i>N.D.</i>	médiane (5 ^e –95 ^e)

Auteur, journal – année	AOD, dosage	Taille cohorte	Âge (moyenne ± écart-type ou médiane (IQR))	Femmes (%)	Clairance de la créatinine (mL/min)	Concentration maximale	CV (%)	Concentration résiduelle	CV (%)	Expression des concentrations
Rosian A. et collègues, Genes – 2019 [175]	apixaban 5 mg	53	70 (65 – 77)	40	77 (64 – 90)	287 (199 – 397)	<i>N.D.</i>	132 (90 – 184)	<i>N.D.</i>	médiane (IQR)
Testa S. et collègues, Journal of Thrombosis and Haemostasis – 2018 [176]	dabigatran toute dose	185	78 (44 – 94)	42	70 (39 – 149)	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	82 (36 – 324)	<i>N.D.</i>	médiane (min – max)
	rivaroxaban toute dose	172	82 (57 – 97)	45	66 (36 – 117)	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	39 (17 – 273)	<i>N.D.</i>	médiane (min – max)
	apixaban toute dose	208	80 (49 – 94)	45	69 (33 – 117)	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	111 (22 – 515)	<i>N.D.</i>	médiane (min – max)
Al-Aieshy F. et collègues, European Journal of Clinical Pharmacology – 2016 [177]	rivaroxaban 15 mg	10	77 ± 4	90	48 (40 – 63)	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	23 (16 – 66)	<i>N.D.</i>	médiane (IQR)
	rivaroxaban 20 mg	61	71 ± 8	38	85 (45 – 182)	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	28 (4 – 67)	<i>N.D.</i>	médiane (IQR)
Testa S. et collègues, Thrombosis Research – 2016 [178]	dabigatran 110 mg	160	75 ± 8	39	<i>N.D.</i>	211 (31 – 595)	71	115 (30 – 324)	64	moyenne (min – max)
						172 (38 – 394)	56	92 (36 – 208)	64	moyenne (min – max)
						155 (50 – 334)	64	60 (30 – 109)	36	moyenne (min – max)
						224 (46 – 651)	65	107 (14 – 386)	72	moyenne (min – max)

Auteur, journal – année	AOD, dosage	Taille cohorte	Âge (moyenne ± écart-type ou médiane (IQR))	Femmes (%)	Clairance de la créatinine (mL/min)	Concentration maximale	CV (%)	Concentration résiduelle	CV (%)	Expression des concentrations
Testa S. et collègues, Thrombosis Research – 2016	dabigatran 150 mg	160	75 ± 8	39	N.D.	187 (77 – 427)	45	89 (30 – 175)	42	moyenne (min – max)
						191 (104 – 435)	51	54 (16 – 130)	70	moyenne (min – max)
						222 (112 – 447)	46	95 (24 – 232)	52	moyenne (min – max)
						240 (43 – 538)	56	125 (33 – 494)	92	moyenne (min – max)
Testa S. et collègues, Thrombosis Research – 2016 (suite)	rivaroxaban 20 mg	71	74 ± 6	37	N.D.	247 (61 – 449)	49	39 (16 – 74)	40	moyenne (min – max)
						229 (65 – 370)	37	41 (16 – 106)	67	moyenne (min – max)
						231 (138 – 341)	32	43 (5 – 119)	103	moyenne (min – max)

Auteur, journal – année	AOD, dosage	Taille cohorte	Âge (moyenne ± écart-type ou médiane (IQR))	Femmes (%)	Clairance de la créatinine (mL/min)	Concentration maximale	CV (%)	Concentration résiduelle	CV (%)	Expression des concentrations
Reilly P. et collègues, Journal of the American College of Cardiology – 2014 [179]	dabigatran 110 mg	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	133 (52 – 275)	<i>N.D.</i>	66 (28 – 155)	<i>N.D.</i>	médiane (10 ^e –90 ^e)
	dabigatran 150 mg	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	184 (74 – 383)	<i>N.D.</i>	93 (40 – 215)	<i>N.D.</i>	médiane (10 ^e –90 ^e)
Girgis I. et collègues, Journal of Clinical Pharmacology – 2014 [180]	rivaroxaban 15 mg	136	64 ± 9	<i>N.D.</i>	> 50	249 (184 – 343)	<i>N.D.</i>	44 (12 – 137)	<i>N.D.</i>	moyenne géométrique (5 ^e – 95 ^e)
	rivaroxaban 20 mg	25	74 ± 8	<i>N.D.</i>	30-49	229 (178 – 313)	<i>N.D.</i>	57 (18 – 136)	<i>N.D.</i>	moyenne géométrique (5 ^e – 95 ^e)

CV = coefficient de variation. N.D. = non disponible.

II. MÉTHODES DE MESURE SPÉCIFIQUE DES CONCENTRATIONS D'AOD

II.1. CLHP-MS/MS : méthode de référence

L'acronyme CLHP-MS/MS fait référence à deux méthodes d'analyse distinctes : d'une part la chromatographie liquide haute performance (CLHP), méthode de séparation, et d'autre part la spectrométrie de masse en tandem, méthode de détection et d'identification.

II.1.1. Principe

La CLHP est une méthode de chromatographie c'est-à-dire de séparation des différents composés d'un même échantillon (ici, en phase liquide) suivant leurs propriétés physico-chimiques à l'aide d'une colonne adaptée [181]. La spectrométrie de masse quant à elle est une technique physique d'analyse permettant de détecter (qualitatif) et quantifier une molécule d'intérêt en étudiant le rapport masse sur charge, noté m/z , de fragments ionisés caractéristiques de la molécule d'intérêt, générés par bombardement électronique [182]. Le couplage de ces deux méthodes permet d'avoir une séparation préalable par CLHP qui facilite l'identification des molécules par spectrométrie de masse [183].

II.1.2. Utilisation pour la mesure des concentrations en AOD

Cette méthode d'analyse tient lieu de technique de référence pour doser les AOD grâce à sa haute performance analytique, avec notamment une limite de détection inférieure à 2,5 ng/mL [184,185]. La CLHP-MS/MS n'est cependant pas une méthode adaptée à la pratique de routine d'un laboratoire d'hémostase (temps de préparation des échantillons et durée d'analyse, disponibilité de ces appareils...) : aussi, les méthodes chromogéniques et chromométriques (*vide infra*) sont privilégiées. Bien que moins performantes sur le plan analytique, ces méthodes ont cependant montré une bonne corrélation à la spectrométrie de masse avec des performances tout à fait satisfaisantes permettant leur utilisation en pratique clinique [186].

II.2. Analyse pharmacocinétique des prélèvements ADAGE : mesure des activités anti-Xa et anti-IIa

Les concentrations plasmatiques en AOD des patients inclus dans ADAGE ont été mesurées sur un automate STA-R Evolution® (Stago).

II.2.1. L'activité anti-Xa : une méthode chromogénique

L'activité anti-Xa plasmatique du rivaroxaban et de l'apixaban a été déterminée par une méthode amidolytique (STA[®]-Liquid Anti-Xa, Stago). L'étalonnage est réalisé à l'aide de plasmas calibrants de rivaroxaban ou d'apixaban spécifiques (STA[®]-Rivaroxaban Calibrator, Stago), dont les titres ont été déterminés par le fournisseur par chromatographie liquide couplée à la masse, permettant ainsi d'exprimer les résultats en ng/mL. Le domaine de mesure s'étend entre 20 ng/mL et 500 ng/mL. Au-delà, le plasma est dilué au demi dans un mélange de plasmas normaux (Cryocheck[®], Cryopep, Montpellier, France). Des contrôles de qualité internes (Stago) et externes (Probioqual) sont utilisés.

Il s'agit d'une méthode chromogénique en un temps, fondée sur l'hydrolyse spécifique par du facteur Xa bovin d'un substrat chromogène MAPA-Gly-Arg-pNa (CBS 0244, Stago) en condition compétitive à 37 °C. Ce substrat libère sous l'action du facteur X activé de la paranitroaniline dont l'absorbance est mesurée à 405 nm. Le plasma dilué du patient contenant le rivaroxaban ou l'apixaban est mélangé avec le facteur X activé en excès. Deux réactions se développent alors simultanément : l'inhibition du facteur X activé par le xaban d'une part et l'hydrolyse du substrat par ce même facteur X activé d'autre part. À l'équilibre de la réaction, la libération de paranitroaniline est inversement proportionnelle à la concentration de xaban présent dans le milieu.

II.2.2. L'activité anti-IIa : méthode chromométrique

L'activité anti-IIa plasmatique du dabigatran a été mesurée par une méthode chromométrique à l'aide d'un temps de thrombine dilué (Hemoclot DTI[®], Hyphen BioMed-Sysmex, Neuville-sur-Oise, France) dans lequel le plasma est dilué dans un mélange de plasmas normaux. Le processus de coagulation est déclenché par l'ajout d'une quantité constante d' α -thrombine humaine. L'étalonnage est réalisé à l'aide de plasmas calibrants de dabigatran spécifiques (Hyphen), dont les titres ont été déterminés par le fournisseur par chromatographie liquide couplée à la masse, permettant ainsi d'exprimer les résultats en ng/mL. Le domaine de mesure s'étend entre 20 et 550 ng/mL. Des contrôles de qualité internes (Hyphen) et externes (Probioqual) sont utilisés.

III. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU RIVAROXABAN

III.1. Description générale des résultats

Les concentrations en rivaroxaban ont été mesurées sur un total de 230 prélèvements provenant de 104 patients de l'étude ADAGE (Figure 14). Parmi ces prélèvements, 48 ont été réalisés à T_{max} et 78 ont été réalisés à T_{min} . Pour mémoire, 79,8 % des patients recevaient une posologie réduite de rivaroxaban, 15 mg ou 10 mg, que cette diminution soit conforme ou non. La Figure 15 représente la pharmacocinétique du rivaroxaban dans la cohorte ADAGE comparée aux données des essais cliniques.

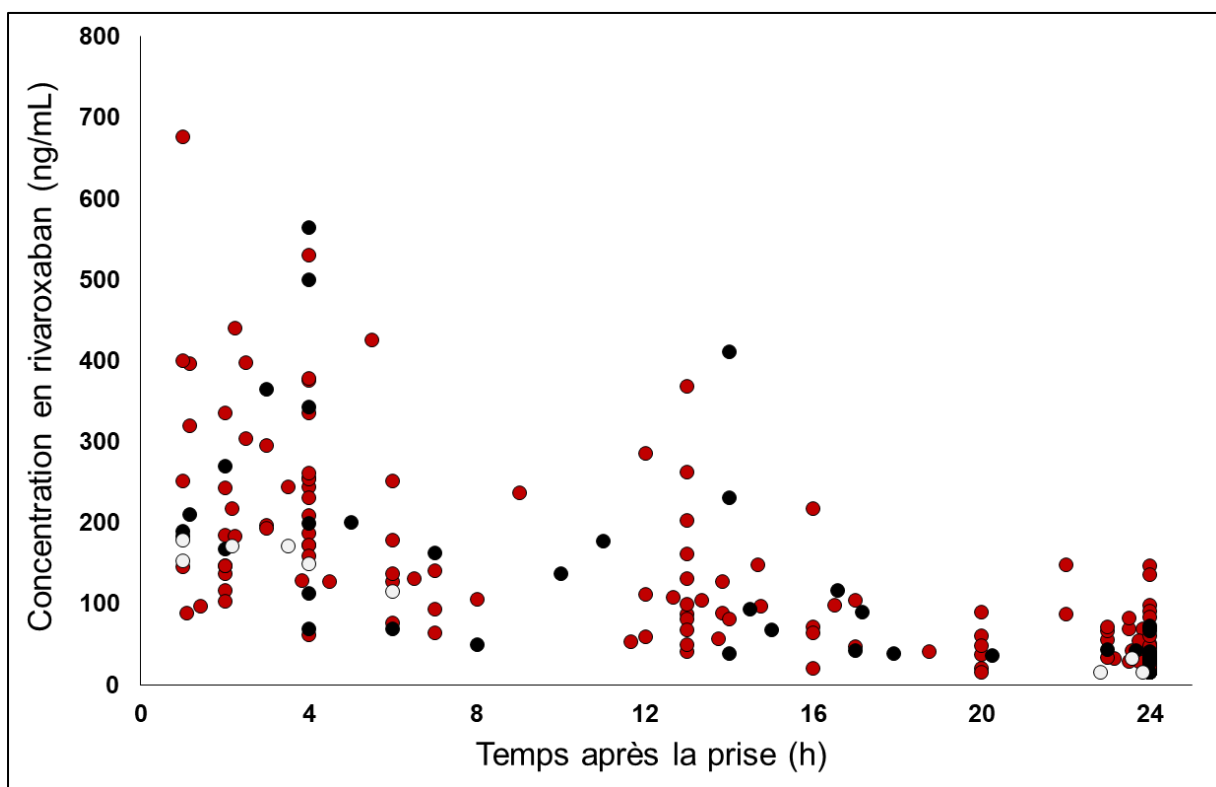


Figure 14 : Concentrations en rivaroxaban en fonction du temps écoulé après la prise.
Les prélèvements des 83 patients recevant 15 mg/jour sont représentés en rouge, ceux des 18 patients recevant 20 mg/j en noir et ceux des 3 patients recevant 10 mg/j en blanc. Une importante variabilité s'observe au pic des concentrations aussi bien chez les patients recevant 15 mg que chez ceux recevant 20 mg par jour.

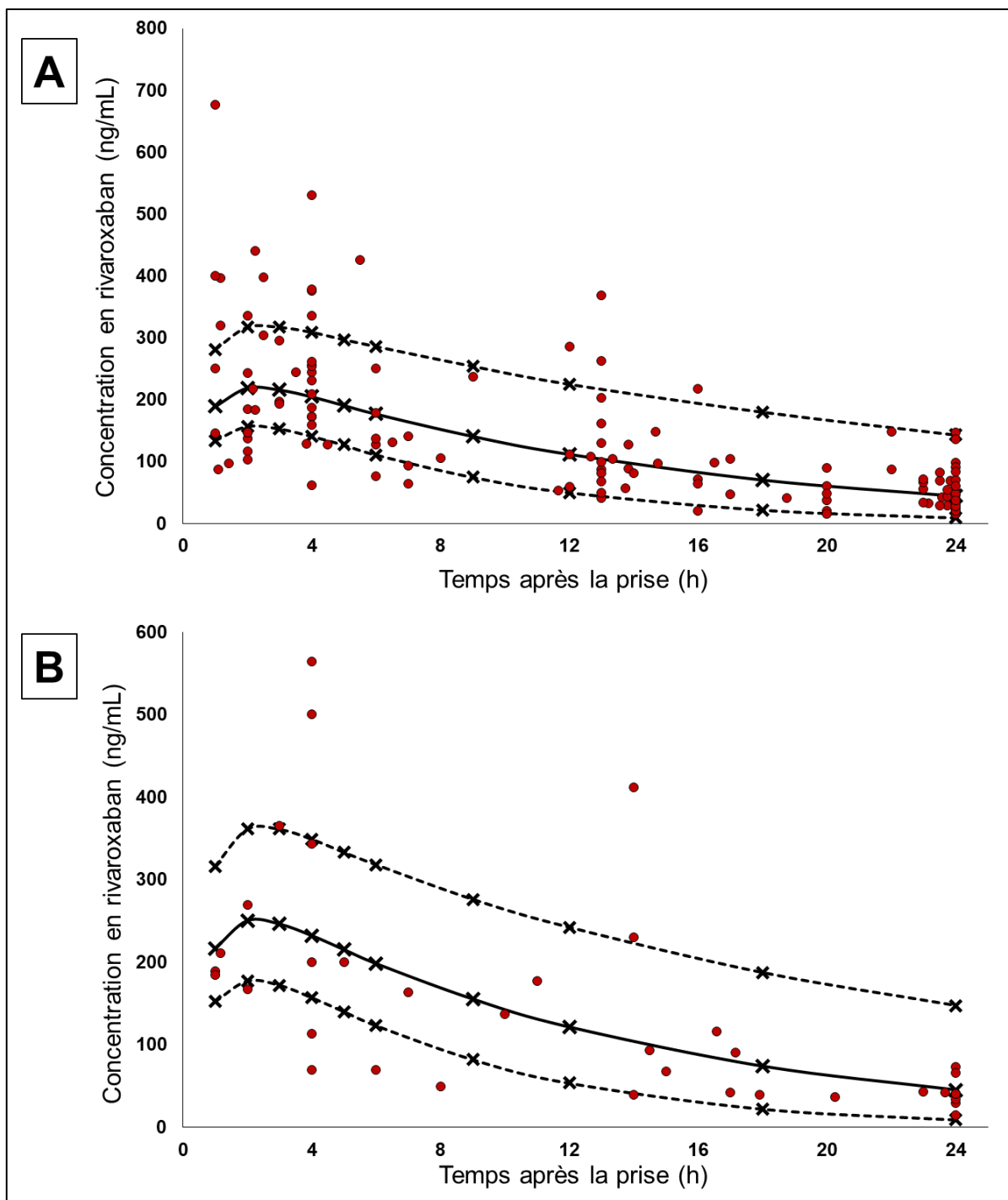


Figure 15 : Évolution des concentrations en rivaroxaban comparée à celle des essais cliniques.

Le graphique A représente les concentrations mesurées chez les 83 patients ADAGE recevant 15 mg/jour, comparées à la moyenne géométrique des concentrations (trait plein) et aux 5^e et 95^e percentiles (tirets) chez les patients des essais cliniques recevant 15 mg/jour (clairance de la créatinine < 50mL/min). Le graphique B compare les concentrations mesurées chez les 18 patients ADAGE recevant 20 mg/jour à ceux des essais cliniques recevant 20 mg/jour (ClCr ≥ 50mL/min). D'après Mueck et coll., *Thromb. J.* 2013 [125]. Comparaison non réalisée pour les patients recevant 10 mg par jour en raison de l'absence de données disponibles (posologie non recommandée dans la fibrillation atriale).

III.2. Concentrations moyennes en rivaroxaban chez les patients ADAGE

Chez les patients recevant 15 mg par jour, la concentration moyenne en rivaroxaban des prélèvements au pic apparent était de $272,8 \pm 133,0$ ng/mL, avec des valeurs s'échelonnant de 64,3 à 676,4 ng/mL. Le coefficient de variation des concentrations au pic était de 48,7 % IC95 [40,6 ; 56,8]. La concentration résiduelle moyenne était de $52,2 \pm 33,6$ ng/mL ; pour 15,2 % de ces prélèvements, la concentration en rivaroxaban était inférieure à la limite de quantification (LQ). Les concentrations variaient de $< 20,0$ (LQ) à 241,0 ng/mL. Le coefficient de variation était de 64,1 % IC95 [58,3 ; 69,9].

Dans le groupe des patients recevant la posologie de 20 mg par jour, la concentration moyenne au pic apparent était de $321,4 \pm 150,8$ ng/mL ; avec des concentrations allant de 163,0 à 564,1 ng/mL et un coefficient de variation (CV) de 46,9 %. En résiduel, la concentration moyenne mesurée chez ces patients était de $46,1 \pm 17,6$ ng/mL avec un CV de 38,2 %.

IV. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DE L'APIXABAN

IV.1. Description générale des résultats

L'évolution des concentrations en apixaban a été analysée sur un total de 222 prélèvements provenant de 111 patients traités par apixaban (Figure 16). Parmi ces prélèvements, 55 ont été réalisés au pic théorique des concentrations (soit entre 1 et 4 h après la prise) et 88 ont été réalisés en résiduel (10 à 12 h après la prise). Pour mémoire, 76,6 % des patients recevaient une dose réduite d'apixaban (soit 2,5 mg \times 2 /jour au lieu de 5 mg \times 2 /jour). La Figure 17 représente la pharmacocinétique de l'apixaban dans la cohorte ADAGE comparées aux données du résumé des caractéristiques du produit (RCP).

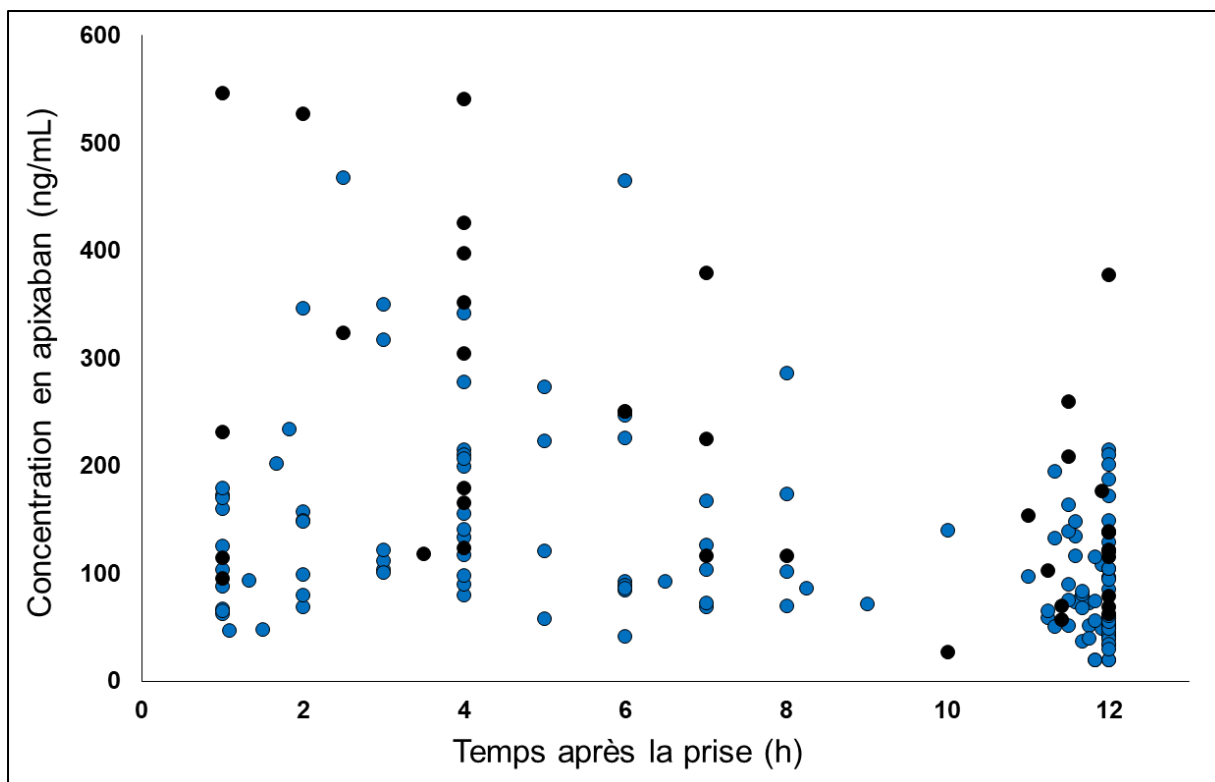


Figure 16 : Concentrations en apixaban en fonction du temps écoulé après la prise.
Les prélèvements des 85 patients recevant 2,5 mg ×2/jour sont représentés en bleu et ceux des 26 patients recevant 5 mg ×2/j sont représentés en noir. Une importante variabilité de la réponse est observée en particulier en résiduel avec une large plage de valeurs mesurées.

IV.2. Concentrations moyennes en apixaban chez les patients ADAGE

En moyenne, le pic des concentrations en apixaban était de $195,2 \pm 91,4$ ng/mL chez les patients traités par 2,5 mg ×2 /jour, avec des valeurs s'échelonnant de 69,0 à 468,5 ng/mL. Le coefficient de variation des concentrations au pic était de 46,8 % IC95 [39,3 ; 54,3]. La concentration résiduelle était en moyenne de $87,7 \pm 52,9$ ng/mL, avec seulement 5,7 % des patients ayant des concentrations résiduelles inférieures à la limite de quantification. Les concentrations variaient de < 20,0 (LQ) à 251,0 ng/mL et le coefficient de variation en résiduel était de 60,4 % IC95 [54,6 ; 66,2].

La concentration maximale apparente chez les patients recevant 5 mg ×2 /jour était en moyenne de $285,5 \pm 131,5$ ng/mL ; avec des valeurs allant de 115,0 à 541,1 ng/mL et un CV de 46,1 %. En résiduel, la concentration moyenne chez ces patients était de $130,1 \pm 106,7$ ng/mL pour un CV de 66,3 %.

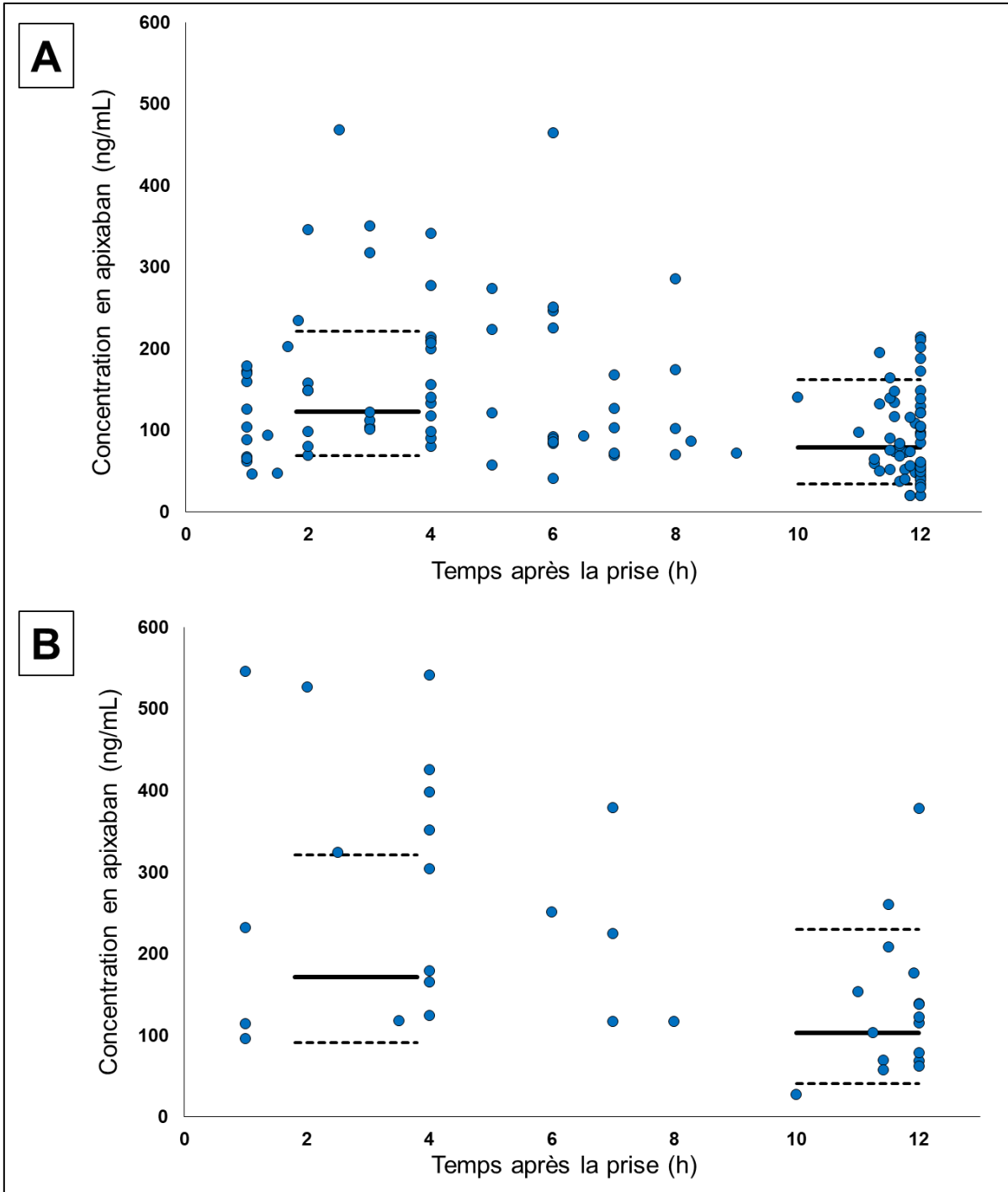


Figure 17 : Évolution des concentrations en apixaban comparée aux données du RCP.

Le graphique A représente les concentrations mesurées chez les 85 patients ADAGE recevant 2,5 mg \times 2/jour et le graphique B les concentrations mesurées chez les 26 patients recevant 5 mg \times 2/j. Les données du résumé des caractéristiques produit (RCP) sont représentées en médiane (trait plein) et 5^e – 95^e percentile (tirets) [102].

V. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU DABIGATRAN

V.1. Description générale des résultats

L'étude de la pharmacocinétique du dabigatran a porté sur 75 prélèvements provenant de 50 patients. Parmi ces prélèvements 20 ont été réalisés au pic théorique des concentrations (c'est-à-dire entre 1 et 4 h après la prise) et 30 ont été réalisés en résiduel (10 à 12 h après la prise). Pour mémoire, 86 % des patients recevaient une posologie réduite de dabigatran (soit 110 mg \times 2 /jour au lieu de 150 mg \times 2 /jour). La Figure 18 représente ces données.

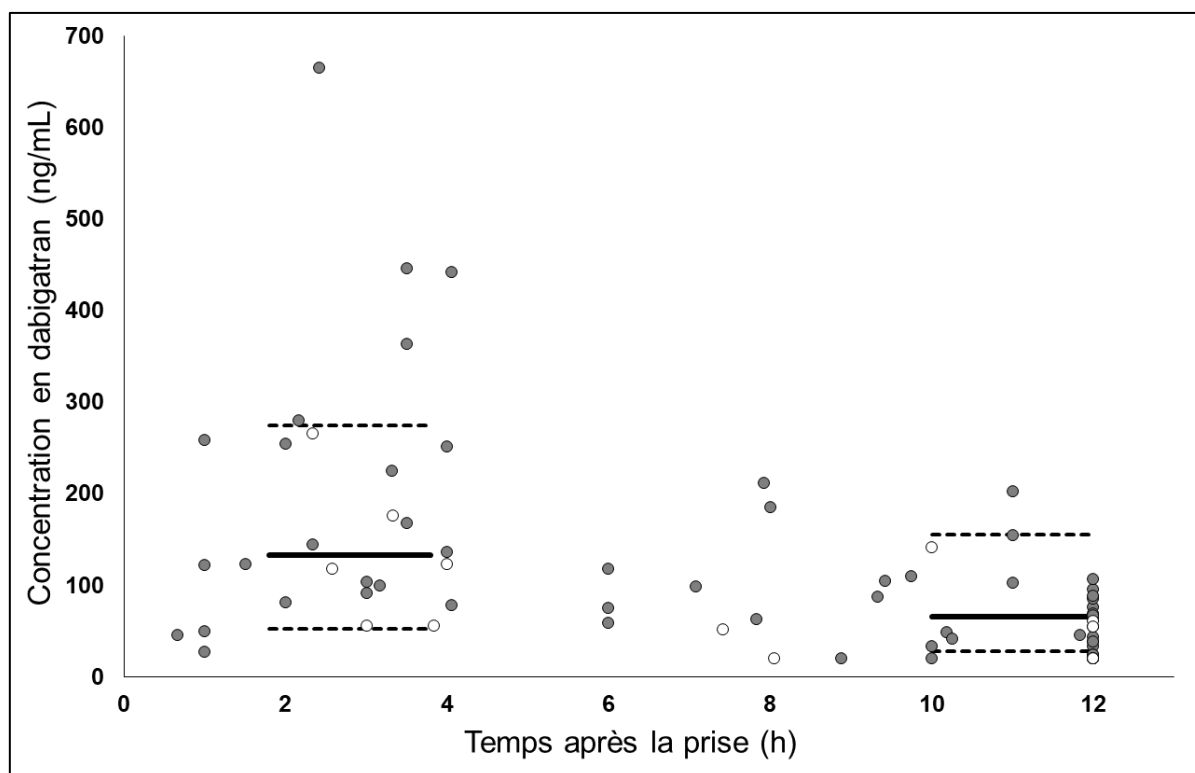


Figure 18 : Concentrations en dabigatran en fonction du temps écoulé après la prise. Les prélèvements réalisés chez les 43 patients recevant 110 mg \times 2 par jour sont en gris, ceux provenant des 7 patients traités par 75 mg \times 2 par jour sont en blanc. Les données de l'essai RE-LY (Phase III) chez les patients recevant 110 mg \times 2 par jour sont représentées en médiane (trait plein) et 10^e – 90^e percentile (tirets) [179].

V.2. Concentrations moyennes en dabigatran chez les patients ADAGE

Dans le groupe des patients traités par dabigatran 110 mg \times 2 /jour, au pic théorique des concentrations, la valeur moyenne mesurée était de $227,3 \pm 155,6$ ng/mL. Des valeurs allant de 78,8 à 665,0 ng/mL ont été mesurées, avec un coefficient de variation de 68,5%. La concentration résiduelle moyenne de dabigatran était de $54,4 \pm 38,5$ ng/mL, avec des

valeurs allant de < 20,0 (LQ) à 155,0 ng/mL et un CV de 70,7 %. Dans ce groupe, 23% des patients avaient une résiduelle inférieure à la limite de quantification.

VI. CONCLUSION

Ces premières données en vie réelle permettent d'enrichir la littérature dans une population très peu décrite. La comparaison des concentrations mesurées dans la cohorte ADAGE avec les données publiées des essais cliniques randomisés pour le rivaroxaban et le dabigatran ou celles du résumé des caractéristiques produit pour l'apixaban montre une plus grande variabilité des concentrations au pic chez les patients âgés aussi bien avec les posologies pleines que réduites ; en résiduel, les concentrations d'AOD sont proches de celles attendues, excepté pour l'apixaban à 2,5 mg ×2, posologie pour laquelle l'étendue des concentrations est plus importante chez les patients ADAGE. Les facteurs individuels influençant la variabilité pharmacocinétique seront étudiés en partie IV.

PARTIE III – PHARMACODYNAMIE DES AOD ET GÉNÉRATION DE THROMBINE

I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Conceptualisé et développé dans les années 1950, puis modernisé à l'aube de l'an 2000, le test de génération de thrombine (TGT) est un test global mesurant la concentration de thrombine générée et son inactivation en fonction du temps, après ajout d'un activateur, le plus souvent du facteur tissulaire [187,188]. Idéalement, cet examen a pour visée, dans des conditions expérimentales précises, d'évaluer un état d'hypo-, de normo-coagulabilité ou d'hypercoagulabilité et d'associer ces résultats au risque de survenue d'événements cliniques hémorragiques ou thrombotiques [189,190]. En pratique, le TGT a été mis en œuvre dans différents contextes, tels que l'étude des mécanismes de la coagulation, l'exploration d'un saignement inexpliqué ou encore l'évaluation du risque thrombotique, le suivi thérapeutique chez les patients hémophiles ou bien chez ceux traités par anticoagulant [187]. Cette partie s'intéresse à ce dernier champ en particulier : là où les examens usuels d'hémostase ne permettent pas une étude satisfaisante de la pharmacodynamie des AOD, qu'en est-il du TGT ?

Plusieurs équipes se sont intéressées à la génération de thrombine pour évaluer l'effet des AOD dans des études *in vitro*, *ex vivo* chez des volontaires sains après prise unique ou répétée ou enfin chez des patients, et ceci principalement avec la méthode *Calibrated automated thrombogram* (CAT) [191–207] (Tableau 14). Ces études montrent une grande hétérogénéité des données en termes de sujets étudiés, volontaires sains ou patients traités pour différentes pathologies (prévention de la maladie thromboembolique veineuse en chirurgie orthopédique, traitement d'épisodes aigus de maladie thromboembolique veineuse, prévention des AVC dans la fibrillation atriale), en terme d'AOD étudiés (rivaroxaban, apixaban, dabigatran), en termes de nombre de sujets étudiés (cohortes de 6 à 97), et en termes de systèmes utilisés pour mesurer la génération de thrombine. À noter que des interrogations subsistent quant aux conditions expérimentales idéales pour mesurer la génération de thrombine, concernant notamment les concentrations de facteur tissulaire à utiliser chez les patients traités par AOD [208,209]. Par ailleurs, les données traitant de l'amplitude de la variabilité des paramètres de génération de thrombine chez les sujets traités par AOD sont limitées (Tableau 14). Enfin,

la littérature montre qu'il n'existe aucune étude spécifique concernant la réponse aux AOD chez les patients octogénaires, nonagénaires et centenaires fragiles avec fibrillation atriale.

L'objectif de cette partie était donc d'évaluer la génération de thrombine mesurée à l'aide de deux systèmes innovants, le ST-Genesia (Stago) et le Thrombodynamics-4D (Hemacore LLC, Moscou, Russie) chez les patients inclus dans ADAGE. Préalablement, nous avons établi les performances analytiques des deux systèmes et réalisé une étude *in vitro* à l'aide de plasmas surchargés en AOD.

II. LIMITES DES EXAMENS SEMI-GLOBAUX DE COAGULATION POUR ÉVALUER L'EFFET DES AOD

Les examens de première intention pour explorer la coagulation sont réalisés de façon usuelle sur un plasma citraté pauvre en plaquettes et sont dits « semi-globaux ».

II.1. Examens semi-globaux en hémostase

II.1.1. Le TP et l'INR

Le temps de Quick est le temps de coagulation d'un plasma citraté déclenchée par ajout de thromboplastine calcique à 37°C. Ce réactif permet la recalcification du plasma (c'est-à-dire l'apport des ions calcium nécessaires à la coagulation) et le démarrage du processus de coagulation par l'apport de thromboplastine, jouant le rôle du facteur tissulaire, ce qui permet donc d'explorer la voie du facteur tissulaire. En France, les résultats du temps de Quick sont convertis en « taux de prothrombine » (TP) exprimé en pourcentage à l'aide d'une droite d'étalonnage (droite de Thivolle). Suivant les réactifs utilisés, une variabilité importante existe. Pour la pallier, les résultats peuvent être exprimés en rapport normalisé international (*International Normalized Ratio*, INR) et donc standardisés, calculés comme le rapport du temps de Quick du patient sur celui d'un témoin, le tout élevé à une puissance dite « ISI », pour indice de sensibilité international, indice spécifique du réactif utilisé.

Tableau 14 : Récapitulatif des principales publications ayant étudié l'effet des AOD sur la génération de thrombine

Auteurs	Année	Journal	Contexte	AOD	Taille cohorte	Âge (années)	Méthode	Effet sur le TGT			
								LT	TTP	PH	ETP
Metze M. et coll. [210]	2020	<i>Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis</i>	Fibrillation atriale + MTEV	apixaban	20	72 ± 10	ST-Genesisia	+	+	-	N.S.
				dabigatran	20	59 ± 17	ST-Genesisia	+	+	N.S.	N.S.
				rivaroxaban	20	72 ± 13	ST-Genesisia	+	+	-	N.S.
Pfrepper C. et coll. [191]	2020	<i>Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis</i>	Fibrillation atriale + MTEV	apixaban	40	N.D.	ST-Genesisia	+	+	-	N.S.
				dabigatran	20	N.D.	ST-Genesisia	+	+	N.S.	N.S.
				rivaroxaban	32	N.D.	ST-Genesisia	+	+	-	-
Siguret V. et coll. [192]	2019	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>	Volontaires sains	rivaroxaban	59	31 ± 8	ST-Genesisia	N.D.	N.D.	-	-
Bertaglia-Calderara D. et coll. [196]	2018	<i>International Journal of Laboratory Hematology</i>	Chirurgie bariatrique	rivaroxaban	12	N.D.	CAT	+	+	-	N.D.
Kyriakou E. et coll. [193]	2018	<i>Clinical and applied Thrombosis/Hemostasis</i>	Fibrillation atriale	apixaban	20	77 (63-79)	Innovance ETP	+	N.S.	-	-
Zhang C. et coll. [194]	2018	<i>Thrombosis Research</i>	Fibrillation atriale	dabigatran	46	69 ± 10	CAT	+	N.D.	+	+

Tableau 14 (suite).

Auteurs	Année	Journal	Contexte	AOD	Taille cohorte	Âge (années)	Méthode	Effet sur le TGT			
								LT	TTP	PH	ETP
Artang R. et coll. [199]	2017	<i>Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis</i>	Volontaires sains	rivaroxaban	10	41 ± 15	CAT	+	+	-	-
				apixaban	10	41 ± 15	CAT	+	+	-	-
				dabigatran	10	41 ± 15	CAT	+	+	-	-
Helin T. et coll. [198]	2017	<i>Journal of Thrombosis and Thrombolysis</i>	Orthopédie	rivaroxaban	20	67	CAT	+	N.D.	-	-
				apixaban	22	68	CAT	+	N.D.	-	-
Kreutz R. et coll. [197]	2017	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>	Volontaires sains	rivaroxaban	24	40 ± 11	CAT	+	+	-	-
				apixaban	24	40 ± 11	CAT	+	+	-	-
Tsantes A. et coll. [200]	2016	<i>Medicine</i>	Fibrillation atriale	rivaroxaban	20	70 ± 13	Innovance ETP	+	N.S.	-	-
				dabigatran	20	70 ± 12	Innovance ETP	+	+	-	-
Cheug Y.W. et coll. [203]	2015	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>	Volontaires sains	apixaban	6	26 ± 7	CAT	N.D.	N.D.	N.D.	-

Tableau 14 (suite).

Auteurs	Année	Journal	Contexte	AOD	Taille cohorte	Âge (années)	Méthode	Effet sur le TGT			
								LT	TTP	PH	ETP
Freyburger G. et coll. [202]	2015	<i>Blood Coagulation and Fibrinolysis</i>	Orthopédie	rivaroxaban	51	69 ± 11	CAT	+	N.D.	-	-
				apixaban	51	65 ± 12	CAT	+	N.D.	-	-
Helin T. et coll. [201]	2015	<i>Thrombosis Research</i>	Orthopédie + fibrillation atriale	dabigatran	35	N.D.	CAT	+	+	+	+
Herrmann R. et coll. [204]	2014	<i>Thrombosis and Haemostasis</i>	Orthopédie	rivaroxaban	15	N.D.	CAT	+	N.D.	-	-
			Fibrillation atriale	dabigatran	17	N.D.	CAT	+	N.D.	N.S	-
Marlu R. et coll. [205]	2012	<i>Thrombosis and Haemostasis</i>	Volontaires sains	rivaroxaban	10	N.D.	CAT	+	+	-	-
				dabigatran	10	N.D.	CAT	+	+	N.S	-
Eerenberg E.S. et coll. [207]	2011	<i>Circulation</i>	Volontaires sains	rivaroxaban	6	24 ± 4	CAT	N.D.	N.D.	N.D.	-
				dabigatran	6	24 ± 4	CAT	+	N.D.	N.D.	N.D.
Freyburger G. et coll. [206]	2011	<i>Thrombosis Research</i>	Orthopédie	rivaroxaban	97	64 (IQR N.D.)	CAT	+	+	-	-
				dabigatran	94	69 (IQR N.D.)	CAT	+	+	-	-

L'âge est donné sous forme soit de moyenne ± écart-type, soit de médiane (IQR). Le sens de l'effet trouvé est spécifié dans les quatre dernières colonnes. Deux études retrouvent un effet paradoxal du dabigatran à la faveur d'une augmentation de la valeur de PH et ETP. TGT : test de génération de thrombine. LT : temps de latence. TTP : temps au pic. PH : hauteur de pic. ETP : potentiel endogène de thrombine. CAT : calibrated automated thrombogram. N.D. : donnée indisponible. N.S. : non significatif. MTEV : Maladie thromboembolique veineuse.

II.1.2. Le TCA

Le temps de céphaline avec activateur (TCA) se mesure également sur un plasma citraté recalcifié, auquel sont ajoutés de la céphaline et un activateur, à 37 °C. La céphaline (composée notamment de phosphatidyléthanolamine) est riche en phospholipides qui permettent le démarrage de la coagulation comme le feraient les phospholipides des plaquettes activées. Ainsi, ce test permet d'explorer la voie des facteurs contact.

II.1.3. Le Temps de thrombine (TT)

Cet examen mesure le temps de coagulation du plasma citraté en présence d'un excès de thrombine calcique, à 37 °C. Il est ainsi très sensible à la présence d'anticoagulants ciblant la thrombine, comme le dabigatran.

II.2. Limites des examens semi-globaux chez les patients traités par AOD

Le TP et le TCA permettent d'explorer les déficits en facteurs de la coagulation, comme c'est le cas chez les patients ayant une pathologie hémorragique (hémophilies...) ou traités par AVK. En revanche, ces TP, TCA et TT ne sont pas adaptés pour évaluer l'effet des AOD : en retardant la formation du caillot, les AOD interfèrent en effet à des degrés variables selon les AOD considérés et leur concentration, les tests et les réactifs utilisés [142,211]. C'est la raison pour laquelle ils n'ont pas été réalisés sur les échantillons des patients ADAGE.

III. MESURE DE LA GÉNÉRATION DE THROMBINE : UN BREF HISTORIQUE

III.1. Première moitié du XX^e siècle : les balbutiements de l'étude de la génération de thrombine

Les premières méthodes d'exploration de la génération de thrombine sont publiées dans la littérature dans la première moitié du XX^e siècle. En 1936, Warner et son équipe proposent une première méthode dont le but est d'estimer la concentration de prothrombine dans un échantillon de plasma. Brièvement, la méthodologie est la suivante : le plasma à tester est défibriné par l'ajout de thrombine ; ce mélange est conservé jusqu'à ce que l'excès de thrombine soit complètement consommé par l'antithrombine. Le plasma défibriné est ensuite dilué dans une solution saline (oxalate de sodium dans du chlorure de sodium 0,9 %). À ce mélange sont ajoutés des ions calciques

et un extrait tissulaire de poumon de bœuf (pour apporter la thromboplastine). L'activité de la thrombine formée est alors mesurée dans une aliquote prélevée à intervalles réguliers à l'aide d'une méthode chronométrique par ajout de fibrinogène. Les auteurs définissent qu'une « unité de thrombine » équivaut à la quantité de thrombine nécessaire pour faire coaguler une solution de fibrinogène à une concentration donnée en 15 secondes. Ces expériences permettent d'observer qu'après activation de la coagulation, la quantité de thrombine augmente puis atteint un plateau et finalement diminue [212].

Quelques années plus tard, en 1940, Freda Herbert propose une modification de cette méthode, en s'affranchissant du fibrinogène initialement présent dans le plasma. Elle suggère que le plateau décrit par Emory D. Warner en 1936 n'est pas uniquement dû à la transformation de la prothrombine en thrombine, mais qu'il résulte d'un équilibre entre taux de formation et de consommation de la thrombine par les inhibiteurs de celle-ci [213].

III.2. Les années 50 : premières applications en pathologie

Des expérimentations similaires seront menées par la suite chez le sujet hémophile en 1951 [214] et c'est en 1953 que le terme de « génération de thrombine » fait son apparition dans la littérature, avec une méthodologie très similaire à celle proposée par Freda Herbert en 1940. L'expérimentation se fait à nouveau chez des sujets hémophiles [215] ainsi que dans des cas de thrombocytopenie [216]. La Figure 19 extraite des travaux de Robert Gwyn MacFarlane & Rosemary Biggs en 1953 représente les résultats de génération de thrombine obtenus chez 12 volontaires sains. Ces travaux seront poursuivis principalement par le professeur néerlandais Hendrik Coenraad Hemker et son équipe. Les premiers changements majeurs dans la méthodologie seront proposés en 1986 [217], avec trois principales nouveautés :

- l'utilisation d'un substrat chromogène pour évaluer la quantité de thrombine générée : l'intensité du signal mesuré en spectrophotométrie vient remplacer la mesure du temps de coagulation des solutions de fibrinogène ;
- le plasma est préalablement défibriné à l'aide de reptilase : ce venin de serpent permet de transformer le fibrinogène en fibrine sans nécessiter la présence de thrombine. En effet, si le plasma n'était pas défibriné, la génération de thrombine entraînerait la formation de fibrine, insoluble, perturbant la lecture de densité optique par spectrophotométrie ;
- le recours à un logiciel informatique pour transformer les densités optiques mesurées au cours du temps en mesure quantitative de la thrombine générée.

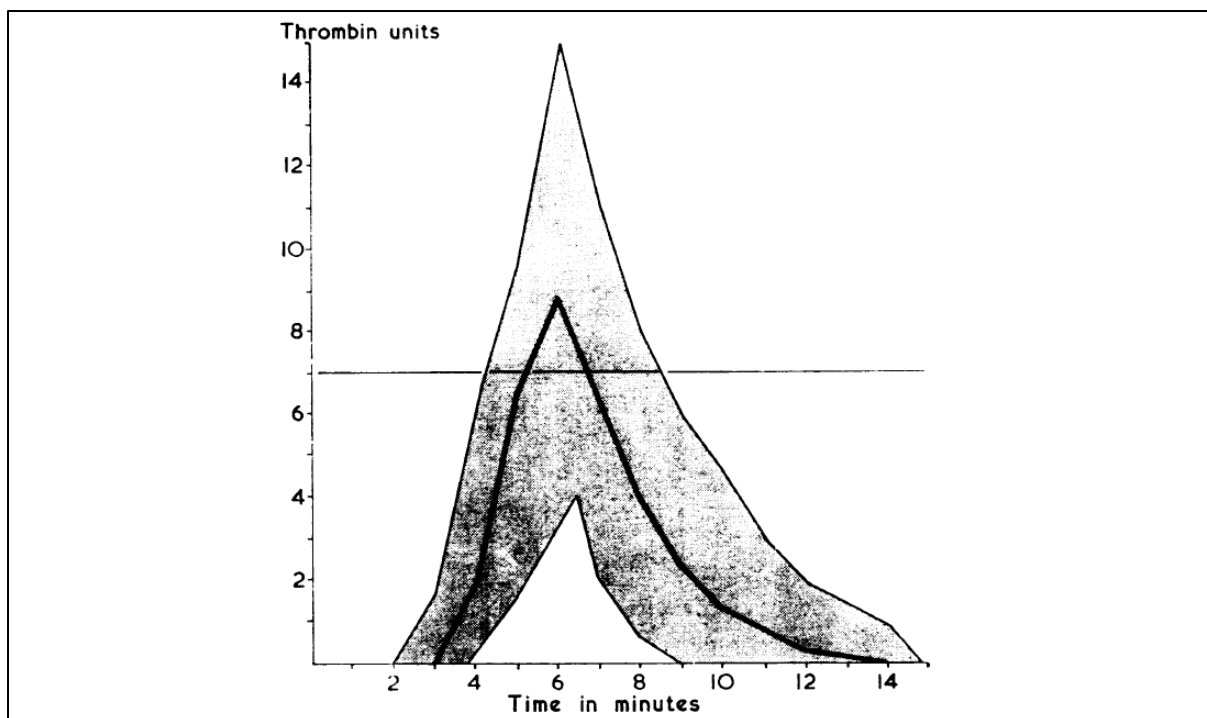


Figure 19 : Prémices de la génération de thrombine.

L'aire grisée contient toutes les courbes obtenues ; la courbe en noir représente la valeur moyenne de 12 volontaires sains. D'après Macfarlane & Biggs, J. Clin. Path. 1953 [216].

Malgré ces innovations, la mesure de la génération de thrombine reste chronophage et délicate. Dans une revue de leurs propres travaux [218], Hemker rappelle la façon de procéder : « la génération de thrombine est mesurée pendant 15 minutes, donc nécessite 120 tubes numérotés à la main, contenant du tampon et le substrat chromogène, qui sont ensuite placés au bain-marie. La génération de thrombine est déclenchée dans quatre tubes. Toutes les 30 secondes, Suzette Béguin, à des intervalles précis de cinq secondes, transfère 10 μ L dans l'un des quatre tubes contenant le chromogène. Hemker, quant à lui, stoppe la réaction par ajout d'acide, après deux minutes précisément. La densité optique est ensuite lue dans chacun des 120 tubes et la concentration en thrombine est calculée. Au total, une demi-journée de travail est nécessaire ».

III.3. De Paris à Maastricht : la mise au point du système CAT

Bien qu'apportant des informations intéressantes, ce test reste très délicat à mettre en œuvre car complexe et chronophage. Néanmoins, les multiples travaux réalisés par Hemker, Béguin et leurs collègues ont permis de rendre ce test utilisable plus facilement en routine.

Le premier axe d'amélioration concerne le substrat chromogène. En 1980, Béguin avait déjà expérimenté une méthode de mesure continue (Figure 20), en ajoutant le substrat chromogène directement au plasma. Cette première tentative se révèle

finalement infructueuse : à la concentration employée, le S2238 inhibe la thrombine [218]. Néanmoins, cette expérimentation permet de démontrer que la mesure continue est possible, à condition d'employer un substrat adéquat. Le premier succès en méthode continue sera obtenu en 1993 avec un substrat nommé SQ68 (méthylmalonyl-méthylalanyl-arginyl-*p*-nitroaniline), dont le clivage par la thrombine libère de la para-nitroaniline [219].

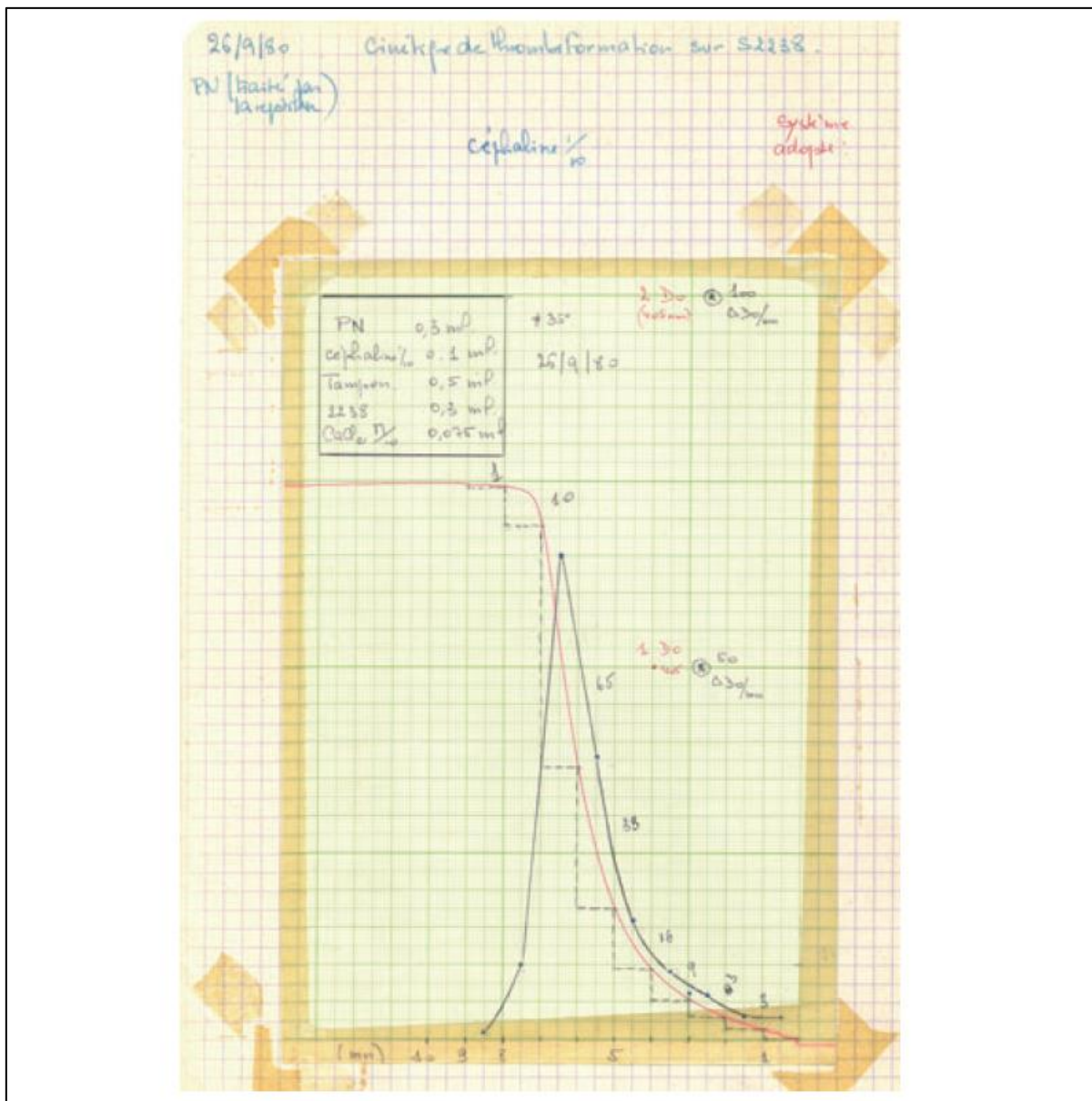


Figure 20 : Cahier de paillasse de S. Béguin, 1980.

Page de cahier faisant référence à ses travaux sur le développement d'une méthode continue de génération de thrombine. D'après Hemker, *J. Thromb. Haemost* 2008.

Si la mesure continue de la génération de thrombine offre un gain d'efficacité considérable, la lecture de la densité optique nécessite de travailler dans une solution limpide. Plutôt que d'utiliser un venin de serpent pour défibriner le plasma, Manosch Ramjee, chercheur à Cambridge, propose le recours à la fluorimétrie, non perturbée par la

formation d'un caillot *in vitro* [220]. Cependant, si la spectrophotométrie permet assez facilement d'obtenir une concentration en thrombine à partir d'une densité optique, Hemker et Béguin constatent que ce n'est pas aussi simple avec un signal de fluorescence : la formation constante du produit provoque une vitesse décroissante de l'augmentation de la fluorescence et cet effet est renforcé par la consommation de substrat (pour 30 %) pendant l'expérience [218]. À faibles concentrations, l'intensité de la fluorescence est généralement proportionnelle à la concentration du fluorophore, mais à concentrations plus élevées, il y a auto-inhibition de la fluorescence, du fait de l'augmentation du nombre de collisions entre les molécules, qui dissipent l'énergie reçue : l'intensité de fluorescence émise ne sera plus proportionnelle à la concentration de fluorophore (Figure 21). De plus, l'épaisseur de la solution traversée par la radiation excitatrice doit être faible, car la concentration optimale diminue quand l'épaisseur augmente ; c'est l'effet de filtre interne, dû à l'absorption par la solution de la lumière d'excitation et de la lumière de fluorescence.

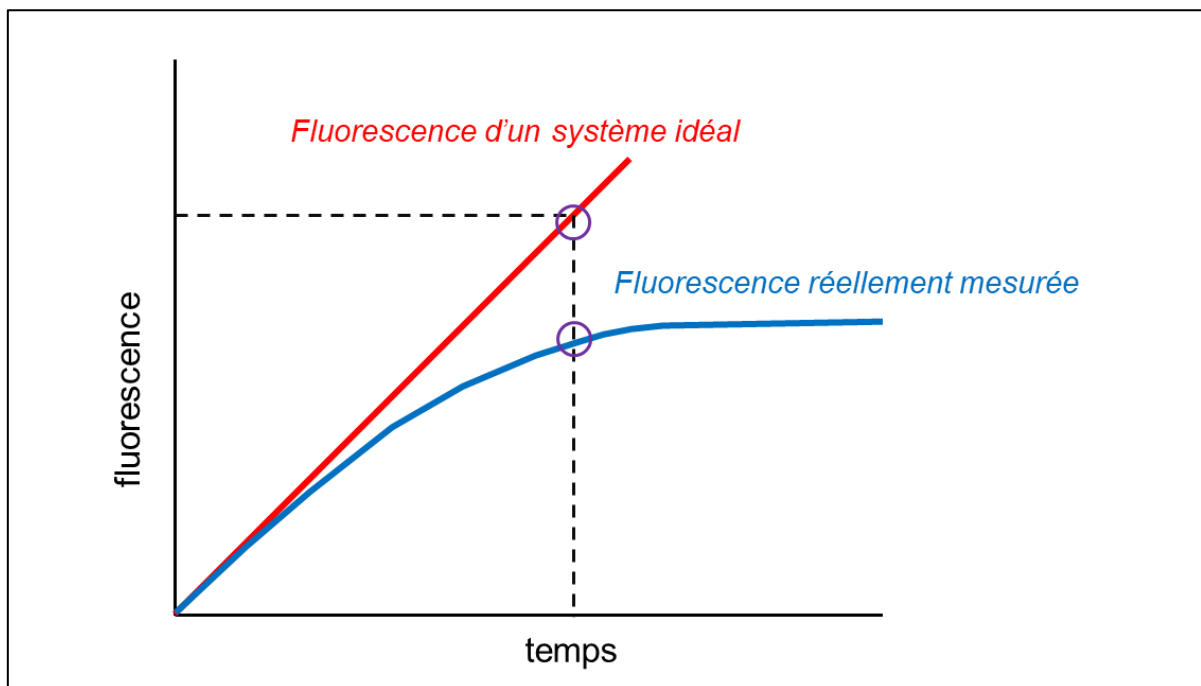


Figure 21 : Fluorescence émise en fonction du temps.

La figure représente schématiquement la fluorescence réellement mesurée et de la fluorescence idéale, affranchie de l'effet de filtre interne et de l'effet de consommation du substrat.

Pour obtenir une mesure fiable, la solution sera une calibration individuelle continue [221,222]. L'ensemble de ces travaux permet la mise au point d'une méthode de génération de thrombine nommée CAT : « *Calibrated Automated Thrombogram* » [222], toujours utilisée aujourd'hui. Ainsi, la méthode développée par Hemker repose sur la capacité de la thrombine à cliver spécifiquement un substrat fluorogène ou chromogène (Figure 22). En pratique, c'est souvent le Z-GGR-AMC qui est utilisé (fluorogène), c'est-à-

dire de l'aminométhyle coumarine (AMC) liée à une courte séquence d'acides aminés (Gly-Arg-Arg). Après clivage par la thrombine, l'AMC libérée dans le plasma fluoresce (Figure 23) ; avec des longueurs d'onde d'excitation de 390 nm et d'émission de 460 nm [222]. La dérivée première de la fluorescence en fonction du temps donne la courbe de génération de thrombine [222]. À partir de la dérivée première de la fluorescence en fonction du temps, le CAT donne la courbe de génération de thrombine en retranchant la part due à la thrombine liée à l' α 2-macroglobuline, cette dernière étant capable de cliver le substrat fluorescent (sans avoir de propriétés procoagulantes) [222,223].

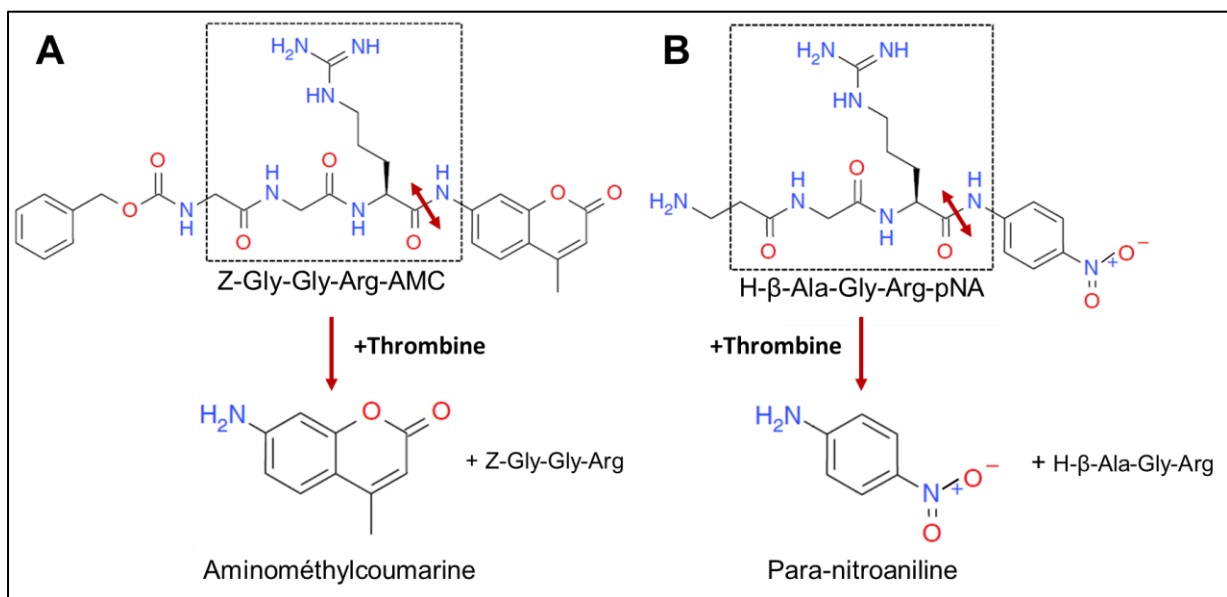


Figure 22 : Exemples de substrats utilisés pour la génération de thrombine.

Le substrat (A) est un substrat fluorogène libérant l'aminométhyle coumarine (AMC) après clivage par la thrombine. Le substrat (B) est un substrat chromogène qui libère de la p-nitroaniline. Le motif encadré est commun aux deux substrats, le site de clivage par la thrombine est symbolisé par une double flèche rouge. D'après Kintigh et coll., *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2018.

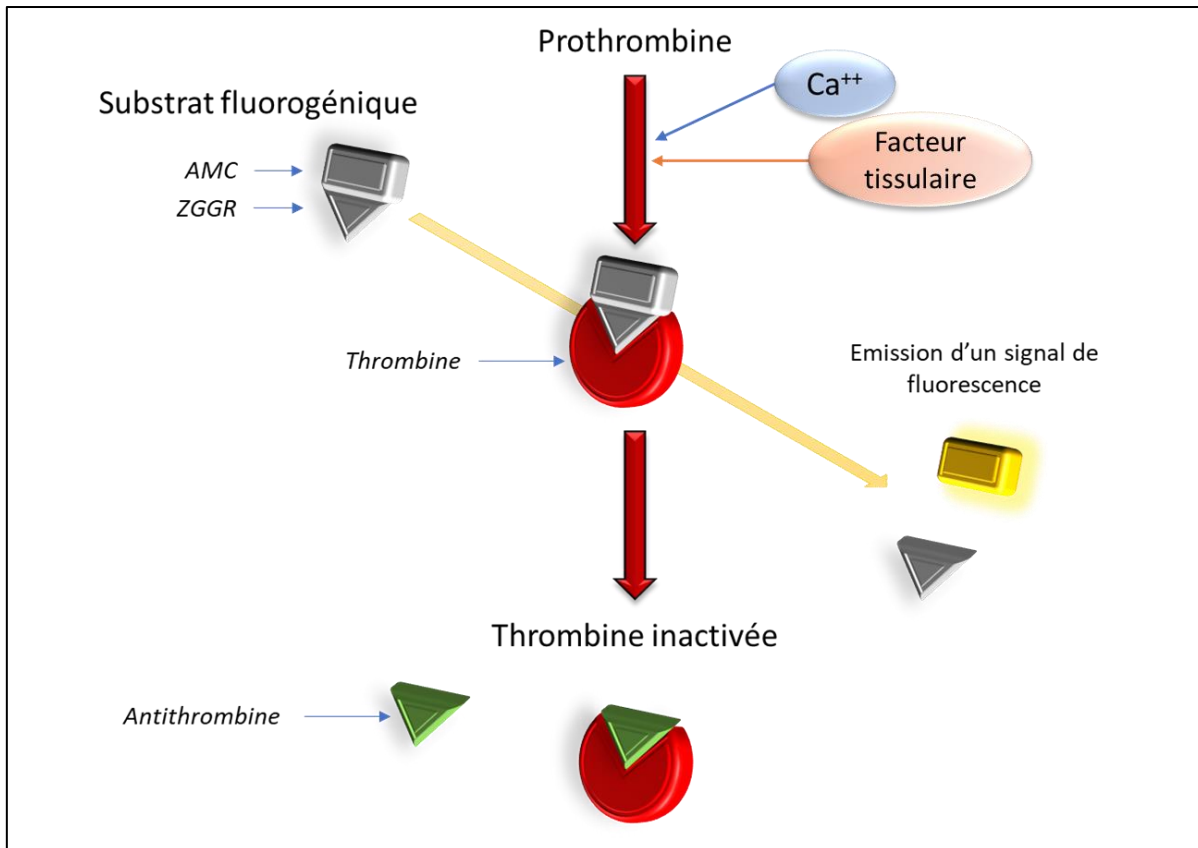


Figure 23 : Mesure de la génération de thrombine en fluorescence.
La thrombine générée clive son substrat le Z-GGR-AMC permettant la libération d'AMC fluorescente.

IV. LA GÉNÉRATION DE THROMBINE EN PRATIQUE : LE THROMBOGRAMME

IV.1. Paramètres principaux

Les résultats d'un test de génération de thrombine sont classiquement présentés sous forme d'un thrombogramme. Il s'agit d'une représentation graphique de la concentration de thrombine en fonction du temps écoulé depuis le déclenchement de la mesure.

Les quatre principaux paramètres étudiés sur cette courbe sont représentés Figure 24 :

- **le temps de latence** (« *lag time* », LT), qui représente le temps écoulé entre le déclenchement du test et la formation initiale de thrombine, selon une définition propre à chaque système ;
- **la hauteur de pic** (« *peak height* », PH), qui correspond à la concentration maximale de thrombine générée après déclenchement ;

- **le temps au pic** (« *time to peak* », TTP), qui est le temps nécessaire pour obtenir la concentration maximale de thrombine (temps pour lequel la hauteur de pic est observée) ;
- **le potentiel endogène de thrombine** (« *endogenous thrombin potential* », ETP), correspondant à l'aire sous la courbe de la concentration de thrombine en fonction du temps.

Il est attendu dans une situation d'hypocoagulabilité, constitutionnelle ou acquise (en cas de traitement par AOD par exemple), un allongement des paramètres temporels (LT, TTP) et une diminution des paramètres dits « quantitatifs » (PH et ETP).

IV.2. Autres paramètres mesurés

Deux autres paramètres sont mesurés en génération de thrombine : l'index de vélocité (nM/min) et la *start tail* (min). Le premier représente la cinétique de formation de la thrombine, calculé d'après la formule suivante : $\frac{\text{Hauteur de pic}}{\text{Temps au pic} - \text{Temps de latence}}$. Le second correspond au temps au bout duquel toute la thrombine initialement générée a été inhibée, c'est-à-dire quand la concentration en thrombine redevient nulle. Pour la suite de ce travail, ces deux paramètres ne seront pas étudiés, c'est pourquoi nous ne détaillerons pas leur définition précise.

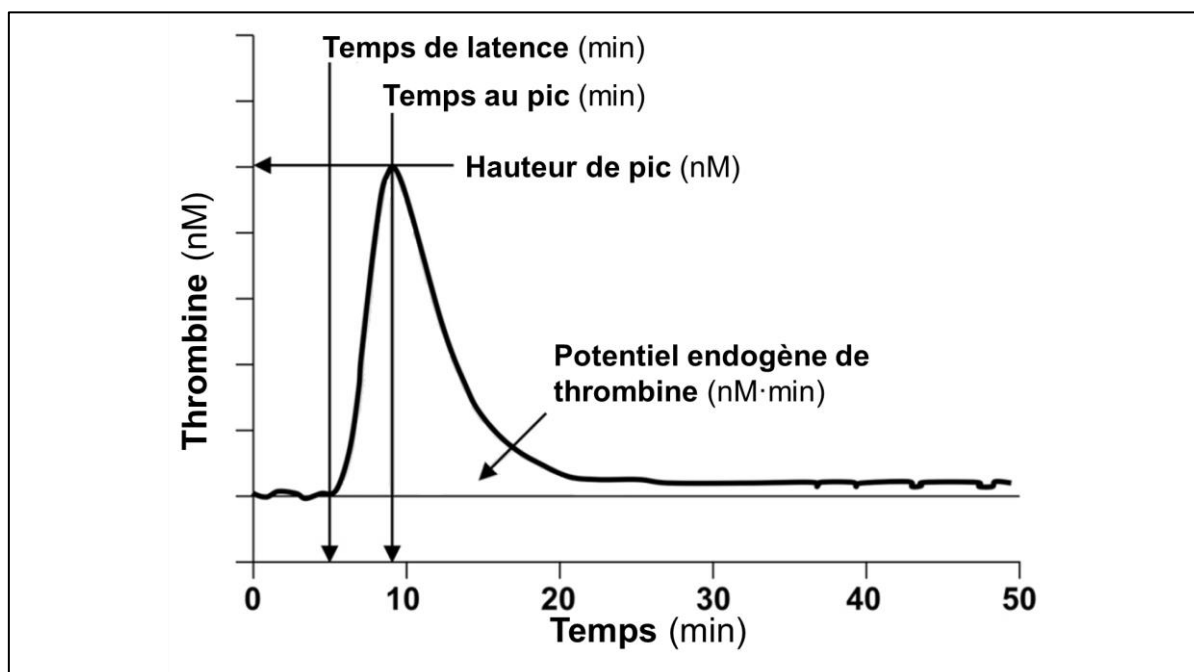


Figure 24 : Thrombogramme et paramètres de génération de thrombine.

De façon simplifiée, le temps de latence est comparable à un temps de coagulation classique, mais est plus sensible car le milieu est plus dilué. Le pic représente la plus haute concentration de thrombine pouvant être générée. Le temps au pic représente la rapidité à laquelle la thrombine est générée. Enfin, l'ETP représente la quantité totale de thrombine qu'un échantillon de plasma peut générer sous l'action des divers facteurs pro- et anticoagulants présents. D'après Tripodi, *Clin. Chem.* 2016 [187].

V. GÉNÉRATION DE THROMBINE AVEC LE SYSTÈME ST-GENESIA®

Développé par l'industriel du diagnostic *in vitro* Stago (Asnières, France) en collaboration avec Synapse (Maastricht, Pays-Bas), le ST-Genesisia® est un système dédié à la génération de thrombine qui bénéficie désormais du marquage CE (Conformité européenne). Il permet une évaluation standardisée et automatisée de la génération de thrombine en système fermé, intégrant ses propres réactifs, calibrants, contrôles de qualité et plasmas de référence. Au moment où nous avons débuté ces travaux de thèse, aucune donnée n'était publiée concernant les performances analytiques du ST-Genesisia ; en 2018, notre groupe ne disposait que de données préliminaires de reproductibilité obtenues à l'aide de contrôles de qualité que nous avons établies sur un prototype de l'instrument, détaillées dans l'article de Siguret et collègues [192]. Depuis, plusieurs études ont été publiées dans différents contextes, en utilisant des concentrations variables de facteur tissulaire correspondant aux réactifs du fournisseur (forte, STG-DrugScreen, intermédiaire, STG-ThromboScreen ou faible, STG-BleedScreen [224–226]). Par ailleurs, les données concernant son intérêt potentiel dans l'étude de la pharmacodynamie des AOD restaient limitées [191,192,210,224].

De ce fait, dans un premier temps, nous avons établi les performances du ST-Genesisia dans le but d'accréditer le TGT sur l'automate installé au laboratoire selon la norme ISO15189, puis nous avons analysé « *in vitro* » la sensibilité du ST-Genesisia aux xabans à l'aide de plasmas surchargés dans différentes conditions expérimentales.

V.1. Présentation du système

V.1.1. Appareillage

Le ST-Genesisia® est constitué d'une enceinte hermétique dans laquelle se trouvent plusieurs éléments :

- deux tiroirs « échantillons » (tiroirs S1 et S2, S pour *Sample*) comportant chacun 12 positions permettant d'insérer les tubes d'échantillons plasmatiques et de les maintenir à 15°C tant qu'ils sont à bord ;
- trois tiroirs réactifs (R1, R2 et R3, R pour *Reagent*) (*vide infra*). Les tiroirs R1 et R2, maintenus à 15° C, comportent 10 positions chacun et permettent de stocker les flacons d'activateur (STG-DrugScreen, STG-ThromboScreen en l'absence de thrombomoduline et STG-ThromboScreen en présence de thrombomoduline), leurs contrôles qualités et

plasmas de référence respectifs ainsi que le calibrant (STG-ThrombiCal[®]) et le nettoyant spécifique (STG-ThrombiClean[®]). Le tiroir R3, maintenu à 37 °C, comporte 4 positions permettant de stocker le STG-FluoStart[®] et le STG-FluoSet[®] (*vide infra*) qui seront ajoutés en dernier au mélange réactionnel pré-incubé à 37 °C ;

- deux portoirs permettant de stocker chacun 40 cuvettes à usage unique.

Dans l'enceinte se trouve également une poubelle de consommables permettant de jeter les cuvettes utilisées, une station de stockage d'une solution de nettoyage (STA-Cleaner[®]) et le bidon poubelle pour les éluants, deux rotors thermostatés à 37 °C, permettant pour l'un de stocker les cuvettes pour incuber plasma et réactifs et pour l'autre de réaliser la mesure de la fluorescence. L'analyse à proprement parler est rendue possible par le bras pipeteur, permettant de pipeter les réactifs et échantillons plasmatiques et de les disposer dans les cuvettes placées dans le rotor d'incubation, et par un bras mécanique permettant le transport de cuvettes dans l'automate, ainsi que le fluorimètre situé à côté du deuxième rotor permettant la mesure de la fluorescence.

Enfin, un écran tactile permet d'accéder aux différents menus de pilotage de l'automate (chargement / déchargement, visualisation des résultats, exports...). Le logiciel intégré permet aussi d'analyser la fluorescence mesurée pour en déduire la courbe de génération de thrombine.

V.1.2. Principe analytique

Le système ST-Genesisia est basé sur le principe de fluorescence d'Hemker [222] décrit précédemment et utilise le Z-GGR-AMC comme substrat fluorogène. Un volume d'environ 300 µL de plasma pauvre en plaquettes est nécessaire pour réaliser un TGT (en duplicat). Avec un volume mort d'environ 100 µL, la prise d'essai était de 1000 µL pour réaliser 3 TGT par échantillon (soit un test avec chaque réactif utilisé, *vide infra*).

V.1.3. La calibration

La calibration du système est réalisée quotidiennement avant toute utilisation. Les réactifs suivants sont nécessaires :

- STG-ThrombiCal : solution de thrombine purifiée à une concentration titrée pour chaque lot ;
- STG-FluoStart : combinaison de substrat fluorogénique (Z-GGR-AMC) et d'ions Ca²⁺ ;
- STG-FluoSet : solution d'AMC à concentration fixe.

Le STG-ThrombiCal doit être reconstitué au préalable avec 2 mL d'eau distillée. Le STG-FluoStart et le STG-FluoSet sont utilisables en l'état, mais nécessitent une

préincubation 10 minutes à 37 °C dans le tiroir R3. Un volume de 100 µL de STG-ThrombiCal est incubé à 37°C dans une cuvette avec 20 µL de STG-FluoStart, permettant ainsi pour chaque série d'établir la calibration. Pour un domaine de mesure donné, la fluorescence mesurée ne croît pas linéairement : en effet, le substrat n'est pas introduit en large excès par rapport à la thrombine. Ainsi, au cours de la réaction, la vitesse d'hydrolyse du substrat par la thrombine diminue, induisant alors la courbure du signal. De plus, l'effet de filtre interne (*vide supra*), participe aussi à l'infléchissement du signal (Figure 21). La calibration, réalisée chaque jour et valable 24 h, est validée si tous les paramètres décrivant la courbe de calibration sont inclus dans les intervalles donnés par le fournisseur.

V.1.4. Réactifs

Différents réactifs de génération de thrombine sont utilisables avec le ST-Genesisia. Dans le cadre de ce travail, les réactifs STG-ThromboScreen® (TS) et STG-DrugScreen® (DS) ont été utilisés. Ces réactifs sont constitués d'un mélange de phospholipides et de facteur tissulaire recombinant humain ; le mélange de l'un de ces réactifs avec le plasma et avec le STG-FluoStart en parallèle constitue le milieu réactionnel pour la génération de thrombine.

D'après les recommandations du fabricant, le STG-DrugScreen est le réactif utilisé pour mesurer la génération de thrombine dans des échantillons plasmatiques de patients recevant un traitement anticoagulant. Le STG-ThromboScreen est quant à lui conçu initialement pour explorer le risque thrombotique. Ce dernier a la particularité d'être fourni à la fois avec de la thrombomoduline (TS+TM) et sans thrombomoduline (TS-TM). La thrombomoduline soluble incluse dans le réactif TS+TM permet d'évaluer le système de la protéine C activée. La principale différence entre DS et TS est la concentration en facteur tissulaire. Cette concentration est dite « intermédiaire » dans le TS et « élevée » dans le DS. À ce jour, les valeurs précises des concentrations en facteur tissulaire dans les réactifs n'ont pas été communiquées par le fabricant.

Un troisième réactif commercial existe et se nomme STG-BleedScreen®. Il se différencie des autres par sa faible concentration en facteur tissulaire et est donc indiqué pour explorer le risque hémorragique. Ce réactif n'a pas été utilisé pour ces travaux.

V.1.5. Contrôles de qualité

Trois niveaux de contrôle de qualité sont disponibles pour le ST-Genesisia, il s'agit des STG-QualiTest Low, STG-QualiTest Norm et STG-QualiTest High correspondant

respectivement à un plasma hypo-coagulable, normo-coagulable et hyper-coagulable. Les trois niveaux de contrôle sont utilisés pour le réactif STG-ThromboScreen tandis que seuls les niveaux « *low* » et « *norm* » sont utilisés pour le réactif STG-DrugScreen étant donné la forte concentration en facteur tissulaire dans ce réactif.

L'ensemble des paramètres décrivant la courbe de génération de thrombine obtenue sur les échantillons de contrôle interne de qualité (CIQ) est comparé à des cibles et intervalles d'acceptation fournis pour chaque lot.

En parallèle des contrôles internes de qualité, la génération de thrombine est mesurée dans des plasmas de référence (STG-RefPlasma® DS et TS), qui sont des plasmas normaux lyophilisés, fournis pour chaque lot. Ils permettent de comparer les paramètres du TGT des contrôles internes de qualité et des échantillons plasmatiques étudiés à ceux d'un plasma normal de référence, et d'en calculer des valeurs normalisées exprimés en rapport ou pourcentage. Ces valeurs normalisées facilitent les comparaisons inter-essais, inter-instruments et inter-laboratoires.

V.1.6. Paramètres mesurés

Le système ST-Genesisia permet, pour chacun des réactifs, de mesurer les six paramètres classiquement retrouvés sur le thrombogramme (*cf Partie III, IV*) : temps de latence (min), temps au pic (min), hauteur de pic (nM), ETP (nM min), index de vélocité (nM/min) et *start tail* (min). En complément, les résultats sont normalisés par rapport au plasma de référence (à l'exception des mesures réalisées avec le STG-ThromboScreen en présence de thrombomoduline qui ne sont rendus qu'en valeurs absolues), sous forme de pourcentage ou de ratio. Des exemples de thrombogrammes sont présentés Figure 25.

V.2. Performances du système

La vérification de méthode permet, entre autres, de s'assurer que le système est utilisé dans son domaine d'application, qu'il correspond aux besoins attendus et que les exigences de qualité selon la norme ISO 15189 sont remplies [227,228]. L'étude des performances analytiques du ST-Genesisia® a été réalisée sur une période de 18 mois.

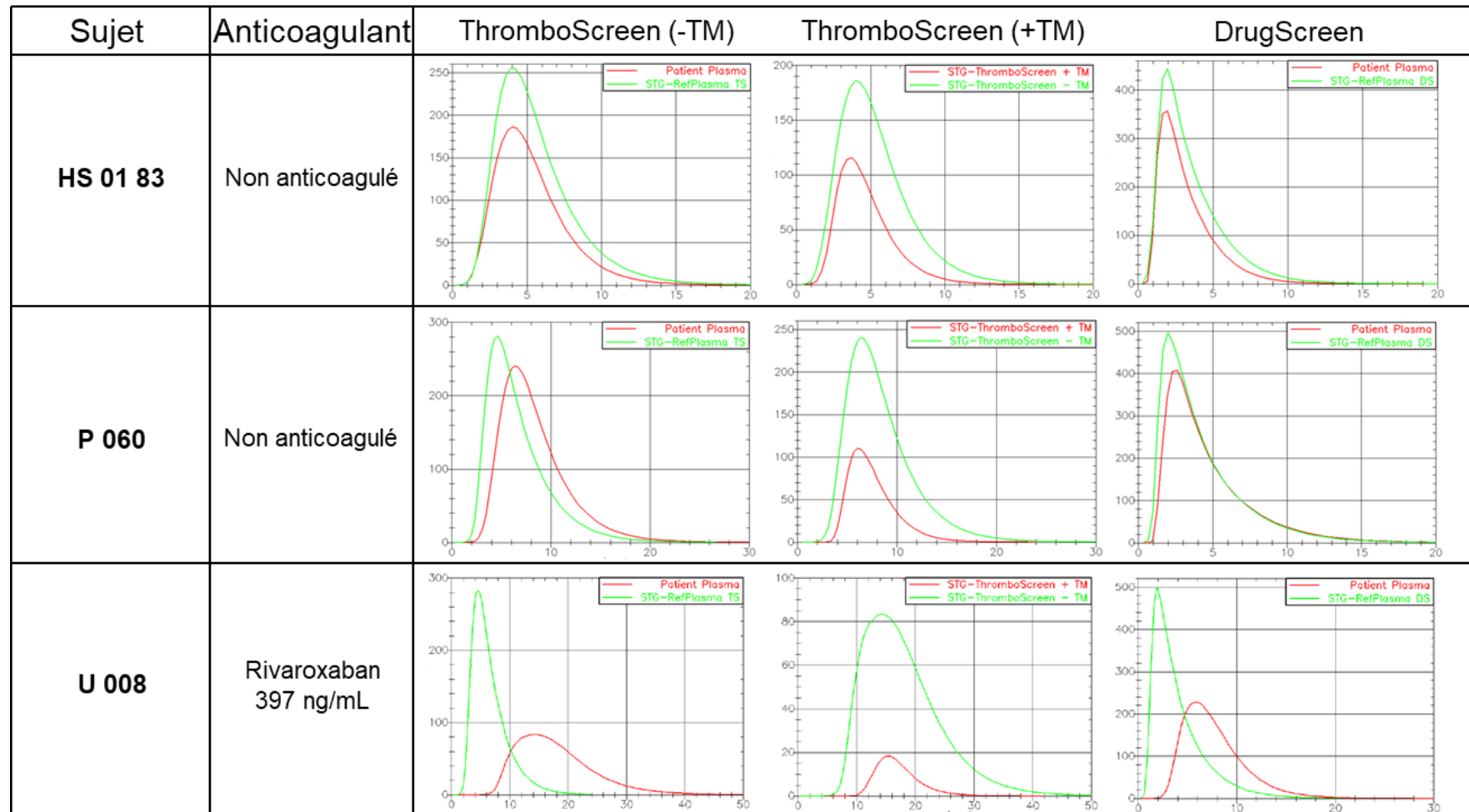


Figure 25 : Exemples de résultats de génération de thrombine obtenus avec le ST-Genesisia.

Tests de génération de thrombine réalisés chez un volontaire sain à T0 (HS 01 83), chez un patient âgé non anticoagulé (P 060) et chez un patient ADAGE traité par rivaroxaban (U 008). Les courbes des patients sont en rouge. La courbe verte est celle du plasma de référence (TS-TM et DS) sauf avec le TS+TM, où il s'agit alors de la mesure chez ce même sujet en condition TS-TM. Les échelles sont variables pour chaque graphique. TM : Thrombomoduline.

V.2.1. Répétabilité

La répétabilité est calculée après avoir répété en série plusieurs fois l'examen sur un même échantillon. Elle doit être effectuée par le même opérateur, en utilisant le même étalonnage et le même lot de réactifs. Par ailleurs, le délai entre chaque répétition doit être le plus court possible. Cette étude permet d'apprécier les performances d'un nouveau système et d'en vérifier son bon fonctionnement [228].

J'ai réalisé les essais de répétabilité sur les différents contrôles internes de qualité disponibles avec les réactifs STG-ThromboScreen (lot 202640) et STG-DrugScreen (lot 202641). Pour chaque niveau de contrôle avec chaque réactif, la mesure a été répétée dix fois, le même jour. Cet essai de répétabilité montre des résultats très satisfaisants, avec notamment des coefficients de variation inférieurs à 3,8 % pour l'ensemble des paramètres mesurés avec chacun des réactifs. Ces résultats sont détaillés dans le Tableau 15. La normalisation des résultats n'influence pas significativement les coefficients de variation.

V.2.2. Reproductibilité

La mesure de reproductibilité consiste à mesurer un même échantillon dans des conditions différentes : les mesures sont réalisées par des opérateurs différents, à des jours différents, avec des lots et des calibrations différents [228].

Un premier essai de reproductibilité a été conduit avec les mêmes lots de réactifs et CIQ que ceux de l'essai de répétabilité (*vide supra*) avec des mesures reproduites 27 fois sur 27 jours différents. Deux opérateurs, Guillaume Paris et moi-même ont participé à la réalisation de ces mesures. Les résultats de cet essai étaient très satisfaisants avec des CV inférieurs à 10 % pour chaque paramètre avec chacun des réactifs (Tableau 16). Remarquablement, les CV obtenus avec les paramètres temporels (LT et TTP) étaient inférieurs à 5 % pour chaque réactif lorsqu'ils étaient exprimés en valeur absolue. Concernant le réactif STG-ThromboScreen, les CV obtenus pour le PH et l'ETP étaient un peu plus élevés en présence de thrombomoduline qu'en son absence.

Un second essai de reproductibilité a été conduit sur un second lot de CIQ (lot 202947), chaque mesure a été réalisée dix fois sur dix jours différents. Pour des raisons logistiques, ces échantillons ont été analysés uniquement avec le réactif STG-ThromboScreen (avec et sans thrombomoduline).

Tableau 15 : Essai de répétabilité du système ST-Genesis®.

	CIQ bas (n=10)		CIQ normal (n=10)		CIQ haut (n=10)	
	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)
STG-ThromboScreen (-TM) Lot 202640						
Temps de latence (min)	2,5 ± 0,1	1,42	1,8 ± 0,1	1,96	1,4 ± 0,1	2,44
<i>Temps de latence (ratio)</i>	<i>1,2 ± 0,1</i>	<i>1,58</i>	<i>0,8 ± 0,1</i>	<i>2,64</i>	<i>0,6 ± 0,1</i>	<i>2,29</i>
Temps au pic (min)	6,1 ± 0,1	1,03	4,0 ± 0,1	1,62	2,4 ± 0,1	1,04
<i>Temps au pic (ratio)</i>	<i>1,4 ± 0,1</i>	<i>1,04</i>	<i>1,0 ± 0,1</i>	<i>1,65</i>	<i>0,5 ± 0,1</i>	<i>1,26</i>
Hauteur de pic (nM)	92,4 ± 1,0	1,04	245 ± 5	1,87	477 ± 7	1,54
<i>Hauteur de pic (%)</i>	<i>34,2 ± 0,4</i>	<i>1,04</i>	<i>91,0 ± 1,7</i>	<i>1,87</i>	<i>190 ± 2,8</i>	<i>1,49</i>
ETP (nM·min)	662 ± 11	1,74	1347 ± 11	0,84	1634 ± 19	1,16
<i>ETP (%)</i>	<i>44,6 ± 0,8</i>	<i>1,74</i>	<i>91,0 ± 0,8</i>	<i>0,83</i>	<i>113 ± 1,3</i>	<i>1,18</i>
STG-ThromboScreen (+TM) Lot 202640						
Temps de latence (min)	2,8 ± 0,1	1,52	1,9 ± 0,1	1,95	1,4 ± 0,1	2,93
Temps au pic (min)	5,0 ± 0,1	1,15	3,7 ± 0,1	1,27	2,4 ± 0,1	1,55
Hauteur de pic (nM)	70 ± 2	3,08	220 ± 3	1,59	473 ± 6	1,34
ETP (nM·min)	393 ± 15	3,79	1036 ± 20	1,95	1560 ± 41	2,61
STG-DrugScreen Lot 202641						
Temps de latence (min)	1,4 ± 0,1	1,52	1,0 ± 0,1	1,16	N.D.	N.D.
<i>Temps de latence (ratio)</i>	<i>1,1 ± 0,1</i>	<i>1,45</i>	<i>0,8 ± 0,1</i>	<i>1,09</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Temps au pic (min)	2,6 ± 0,1	2,87	2,1 ± 0,1	1,02	N.D.	N.D.
<i>Temps au pic (ratio)</i>	<i>1,1 ± 0,1</i>	<i>1,05</i>	<i>0,9 ± 0,1</i>	<i>2,12</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Hauteur de pic (nM)	232 ± 4	1,85	441 ± 5	1,25	N.D.	N.D.
<i>Hauteur de pic (%)</i>	<i>49,5 ± 0,9</i>	<i>1,84</i>	<i>93,6 ± 1,2</i>	<i>1,27</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
ETP (nM·min)	677 ± 14	2,02	1487 ± 35	2,36	N.D.	N.D.
<i>ETP (%)</i>	<i>36,9 ± 0,7</i>	<i>2,02</i>	<i>81,3 ± 1,7</i>	<i>2,14</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>

Les données en italique correspondent aux valeurs normalisées sur le plasma de référence. CIQ : contrôle interne de qualité. Moy. : moyenne, e.t. : écart-type, CV : coefficient de variation, N.D. : non disponible

En complément, des essais de reproductibilité ont été réalisés sur les échantillons de *pools* commerciaux de plasma normaux provenant de deux fabricants différents, ainsi que sur les plasmas de référence du ST-Genesisia fourni avec les lots de réactifs :

- mélange de plasma normaux, lyophilisé (Pool Norm, Stago), lots 253797 et 254596 ;
- mélange de plasma normaux, congelé (Cryocheck, Cryopep), lot A1236 ;
- plasma de référence lyophilisé (STG-RefPlasma), lot 202640 ;
- plasma de référence lyophilisé (STG-RefPlasma), lot 202947.

Pour mieux comprendre les profils de génération de thrombine obtenus avec ces plasmas normaux, l'activité coagulante des facteurs (I, II, V, FVII+X) et l'activité des inhibiteurs physiologiques de la coagulation (antithrombine, protéine C, protéine S) ont été mesurées (Figure 26). Les taux étaient similaires pour le Pool Norm et le STG-Refplasma, tandis que le Cryocheck présentait des taux plus importants d'inhibiteurs physiologiques. Pour les différents types de plasmas commerciaux, des résultats satisfaisants ont été obtenus. De manière arbitraire, un CV inférieur à 10% avait été prédéfini comme acceptable. En l'absence de thrombomoduline, tous les CV étaient inférieurs à 10 %, avec la majorité d'entre eux inférieurs à 5 %. Des CV satisfaisants ont également été obtenus en présence de thrombomoduline, hormis pour la hauteur de pic mesurée sur plasma congelé (11,23 %). Enfin, avec les plasmas de référence, les CV étaient tous inférieurs à 5 % pour le lot 202640. Des résultats légèrement moins bons ont été obtenus avec le lot 202947, mais la reproductibilité n'a été mesurée que sur 10 échantillons pour ce lot (Tableau 17), conduisant à une estimation des CV moins fiable.

V.2.3. Justesse

La justesse permet d'apprécier l'écart existant entre la valeur mesurée par la méthode et la valeur « vraie » de cette mesure. La justesse peut également s'appréhender par la mesure du biais absolu, correspondant à l'écart entre la valeur moyenne mesurée d'un échantillon et la valeur cible. Cette notion de biais est plus pertinente en biologie médicale [227,228]. La justesse du système a donc été ici estimée par le calcul du biais relatif, calculé à l'aide de la formule

$$\text{Biais relatif (\%)} = \frac{100 \times (\text{mesure} - \text{cible})}{\text{cible}}$$

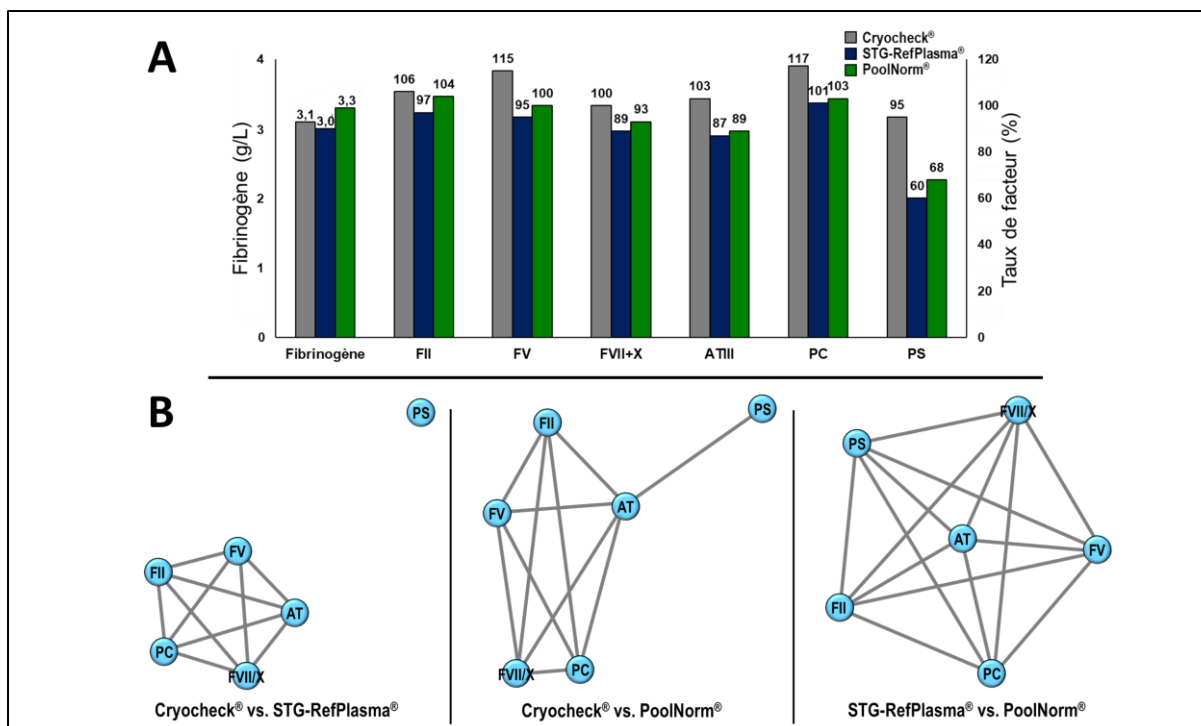


Figure 26 :Caractérisation des plasmas commerciaux utilisés

(A) Concentration en fibrinogène et les taux de différents facteurs de la coagulation mesurés dans les trois plasmas normaux commerciaux testés. (B) Chaque nœud (disque bleu) est l'un des facteurs dosés. Deux facteurs sont reliés s'ils varient de façon similaire d'un plasma à l'autre. Si les plasmas étaient identiques, on attendrait que tous les nœuds soient reliés entre eux par au moins une arête. Seuil de coupure : 0,15. Méthode d'après Curis et collègues, *Bioinformatics* 2018 [229].

Dans cette formule, la cible a été définie comme le centre de l'intervalle de référence proposé par le fabricant pour chaque paramètre. Les calculs ont été réalisés avec les données de reproductibilité des CIQ présentées ci-avant (STG-ThromboScreen, lot 202640 et STG-DrugScreen lot 202641, $n = 27$ mesures).

Le calcul du biais relatif, exprimé en pourcentage, rapporte des valeurs inférieures à 6 % pour les paramètres temporels avec les deux réactifs. Des biais plus importants ont été obtenus pour PH et ETP avec le CIQ normal, respectivement 15 % et 11 %, alors qu'ils étaient de -0,3 % et 4,3 % pour PH et 3,9 % et 6,8 % pour ETP avec les CIQ bas et haut, respectivement. Les résultats normalisés pour PH (2,7 %) et ETP (3,6 %) montraient un biais plus satisfaisant, suggérant que la valeur cible des CIQ pour ces deux paramètres pourrait être sous-estimée. Des résultats similaires ont été obtenus en présence de thrombomoduline, avec de faibles biais pour LT, PH et TTP. Enfin, de faibles biais ont été calculés pour LT PH et TTP avec le réactif STG-DrugScreen, tandis qu'ils étaient de 9,5 % et 11,7 % pour l'ETP (CIQ bas et normal, respectivement). Malgré l'important biais calculé pour l'ETP avec le CIQ normal en valeur absolue, les valeurs normalisées donnaient un biais à 1,7 % (Tableau 18).

Tableau 16 : Résultats des essais de reproductibilité du système ST-Genesis® obtenus à partir des contrôles de qualité interne

	CIQ Bas (n = 27)		CIQ Normal (n = 27)		CIQ Haut (n = 27)	
	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)
STG-ThromboScreen (-TM) Lot 202640						
Temps de latence (min)	2,7 ± 0,1	2,56	1,9 ± 0,1	2,00	1,5 ± 0,1	2,65
<i>Temps de latence (ratio)</i>	<i>1,2 ± 0,1</i>	<i>1,69</i>	<i>0,8 ± 0,1</i>	<i>2,35</i>	<i>0,6 ± 0,1</i>	<i>1,89</i>
Temps au pic (min)	6,0 ± 0,2	4,21	4,3 ± 0,1	2,12	2,4 ± 0,1	1,94
<i>Temps au pic (ratio)</i>	<i>1,3 ± 0,1</i>	<i>4,46</i>	<i>0,9 ± 0,1</i>	<i>6,34</i>	<i>0,5 ± 0,1</i>	<i>3,31</i>
Hauteur de pic (nM)	106 ± 5	4,33	237 ± 7	2,97	507 ± 21	4,09
<i>Hauteur de pic (%)</i>	<i>35,8 ± 2,2</i>	<i>6,06</i>	<i>80,1 ± 3,4</i>	<i>4,28</i>	<i>171 ± 10,4</i>	<i>6,08</i>
ETP (nM·min)	707 ± 31	4,43	1351 ± 59	4,34	1753 ± 100	5,74
<i>ETP (%)</i>	<i>43,9 ± 1,3</i>	<i>3,08</i>	<i>83,9 ± 2,1</i>	<i>2,50</i>	<i>108 ± 3,3</i>	<i>3,07</i>
STG-ThromboScreen (+TM) Lot 202640						
Temps de latence (min)	2,9 ± 0,1	3,22	2,0 ± 0,1	2,09	1,5 ± 0,1	1,59
Temps au pic (min)	5,1 ± 0,1	2,88	3,9 ± 0,1	1,89	2,4 ± 0,1	1,57
Hauteur de pic (nM)	62 ± 4,3	6,94	197 ± 8	3,94	509 ± 19	3,75
ETP (nM·min)	342 ± 21	6,10	913 ± 46	5,04	1679 ± 82	4,91
STG-DrugScreen Lot 202641						
Temps de latence (min)	0,9 ± 0,1	3,86	0,7 ± 0,1	5,67	N.D.	N.D.
<i>Temps de latence (ratio)</i>	<i>1,0 ± 0,1</i>	<i>5,15</i>	<i>0,8 ± 0,1</i>	<i>6,14</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Temps au pic (min)	2,0 ± 0,1	3,17	1,8 ± 0,1	4,02	N.D.	N.D.
<i>Temps au pic (ratio)</i>	<i>1,0 ± 0,1</i>	<i>2,27</i>	<i>0,9 ± 0,1</i>	<i>3,85</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Hauteur de pic (nM)	282 ± 8	2,99	497 ± 21	4,32	N.D.	N.D.
<i>Hauteur de pic (%)</i>	<i>53,9 ± 1,7</i>	<i>3,21</i>	<i>95,1 ± 2,5</i>	<i>2,58</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
ETP (nM·min)	716 ± 25	3,51	1597 ± 86	5,37	N.D.	N.D.
<i>ETP (%)</i>	<i>35,3 ± 1,6</i>	<i>4,69</i>	<i>78,6 ± 3,1</i>	<i>4,00</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>

La reproductibilité a été mesurée sur les contrôles de qualité et plasmas de référence associés. Les données en italique correspondent aux valeurs normalisées à l'aide du plasma de référence. CIQ = contrôle interne de qualité. CV : coefficient de variation ; TM : thrombomoduline ; N.D. = donnée non disponible.

Tableau 17: Résultats des essais de reproductibilité du système ST-Genesia® obtenus à partir des pools de plasmas normaux commerciaux.

	POOLNORM		POOLNORM		CRYOCHECK		REFPLASMA		REFPLASMA	
	Lyophilisé, lot 253797		Lyophilisé, lot 254596		Congelé, lot A1236		Lyophilisé, lot 202640		Lyophilisé, lot 202947	
	n = 12		n = 12		n = 12		n = 27		n = 10	
	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)	Moy. ± e.t.	CV (%)
STG-ThromboScreen (-TM)*										
Temps de latence (min)	2,1 ± 0,1	1,94	2,1 ± 0,1	2,24	2,9 ± 0,1	3,67	2,2 ± 0,1	1,78	2,1 ± 2,5	2,61
<i>Temps de latence (ratio)</i>	<i>1,1 ± 0,1</i>	3,38	<i>1,1 ± 0,1</i>	2,55	<i>1,3 ± 0,1</i>	3,35	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Temps au pic (min)	4,6 ± 0,1	2,34	4,7 ± 0,1	2,50	5,8 ± 0,1	2,62	4,5 ± 0,1	2,33	4,1 ± 3,3	2,97
<i>Temps au pic (ratio)</i>	<i>1,1 ± 0,1</i>	2,88	<i>1,2 ± 0,1</i>	3,77	<i>1,3 ± 0,1</i>	4,30	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Hauteur de pic (nM)	221 ± 10	4,39	225 ± 16	6,95	129 ± 10	8,05	294 ± 11	3,88	284 ± 145	4,88
<i>Hauteur de pic (%)</i>	<i>79,0 ± 2,1</i>	2,63	<i>76,8 ± 5,9</i>	7,68	<i>43,8 ± 3,4</i>	7,67	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
ETP (nM · min)	1328 ± 86	6,50	1392 ± 39	3,09	946 ± 76	8,06	1615 ± 73	4,54	1532 ± 404	6,12
<i>ETP (%)</i>	<i>90,4 ± 3,6</i>	3,96	<i>90,3 ± 3,9</i>	4,35	<i>60,2 ± 1,6</i>	2,74	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
STG-ThromboScreen (+TM)*										
Temps de latence (min)	2,4 ± 0,1	1,71	2,3 ± 0,1	2,27	3,7 ± 0,2	6,69	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Temps au pic (min)	4,4 ± 0,1	1,41	4,4 ± 0,1	2,32	5,7 ± 0,4	6,59	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
Hauteur de pic (nM)	182 ± 10	5,72	181 ± 13	7,09	88,7 ± 10	11,23	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
ETP (nM · min)	854 ± 88	9,58	873 ± 49	5,67	415 ± 37	9,00	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>

Les données en italique correspondent aux valeurs normalisées avec celles du plasma de référence.* Lot 202640. CV : coefficient de variation ; TM : thrombomoduline N.D. = non disponible.

Tableau 18 : Essai de justesse du système ST-Genesis®.

	CIQ Bas <i>n</i> = 27		CIQ Normal <i>n</i> = 27		CIQ Haut <i>n</i> = 27	
	<i>Biais relatif</i>	<i>Intervalle de référence</i>	<i>Biais relatif</i>	<i>Intervalle de référence</i>	<i>Biais relatif</i>	<i>Intervalle de référence</i>
STG-ThromboScreen (-TM) – Lot 202640						
Temps de latence (min)	-0,94	[1,93 ; 3,45]	1,09	[1,57 ; 2,11]	-3,75	[1,30 ; 1,74]
<i>Temps de latence (ratio)</i>	-1,11	[0,96 ; 1,44]	0,99	[0,73 ; 0,91]	-2,76	[0,58 ; 0,76]
Temps au pic (min)	1,43	[4,98 ; 6,86]	-2,56	[3,92 ; 4,86]	-1,40	[2,20 ; 2,68]
<i>Temps au pic (ratio)</i>	5,34	[1,09 ; 1,45]	0,83	[0,86 ; 1,2]	3,36	[0,46 ; 0,58]
Hauteur de pic (nM)	-0,29	[82 ; 130]	15,00	[125 ; 288]	4,25	[313 ; 660]
<i>Hauteur de pic (%)</i>	-10,44	[31,0 ; 49,0]	2,69	[63,0 ; 93,0]	-6,51	[153 ; 213]
ETP (nM·min)	3,85	[468 ; 894]	10,99	[770 ; 1664]	6,78	[1099 ; 2185]
<i>ETP (%)</i>	-2,36	[34,0 ; 56,0]	3,59	[68,0 ; 94,0]	-0,12	[92 ; 126]
STG-ThromboScreen (+TM) – Lot 202640						
Temps de latence (min)	-1,67	[2,43 ; 3,43]	-0,36	[1,76 ; 2,26]	-4,24	[1,39 ; 1,81]
Temps au pic (min)	-1,21	[4,55 ; 5,71]	-0,91	[3,56 ; 4,29]	-2,72	[2,29 ; 2,75]
Hauteur de pic (nM)	-21,72	[58,9 ; 98,5]	9,29	[103 ; 261]	3,58	[312 ; 656]
ETP (nM·min)	-19,72	[325 ; 515]	9,22	[484 ; 1198]	5,38	[1071 ; 2101]
STG-DrugScreen – Lot 202641						
Temps de latence (min)	-0,85	[0,68 ; 1,16]	-2,68	[0,54 ; 0,98]	N.D.	N.D.
<i>Temps de latence (ratio)</i>	-3,30	[0,87 ; 1,13]	-5,09	[0,70 ; 0,96]	N.D.	N.D.
Temps au pic (min)	1,61	[1,65 ; 2,21]	2,23	[1,51 ; 1,95]	N.D.	N.D.
<i>Temps au pic (ratio)</i>	-1,10	[0,89 ; 1,07]	0,51	[0,78 ; 0,96]	N.D.	N.D.
Hauteur de pic (nM)	3,11	[205 ; 341]	3,13	[302 ; 662]	N.D.	N.D.
<i>Hauteur de pic (%)</i>	-3,67	[49,0 ; 63,0]	-2,89	[88 ; 108]	N.D.	N.D.
ETP (nM·min)	9,48	[490 ; 818]	11,67	[881 ; 1979]	N.D.	N.D.
<i>ETP (%)</i>	-4,59	[34,0 ; 40,0]	-1,72	[66,0 ; 94,0]	N.D.	N.D.

La justesse est estimée par le biais relatif (valeurs indiquées, en %), par rapport à la valeur au centre de l'intervalle de référence proposé par le fabricant. CIQ : contrôle interne de qualité. N.D. : non disponible.

V.3. TGT et xabans : étude *in vitro*

Lors des essais menés sur le ST-Genesis, il n'existait dans la littérature aucune donnée spécifique de ce système. Cette étude préliminaire avait donc pour objectif d'analyser l'effet des AOD sur les différents paramètres de génération de thrombine *in vitro*, afin d'explorer les possibilités du ST-Genesis dans l'étude de la pharmacodynamie des AOD.

V.3.1. Influence de la concentration en facteur tissulaire sur la génération de thrombine *in vitro*

Comme décrit précédemment, les réactifs du ST-Genesis ont des taux de facteur tissulaire différents les uns des autres. Les tests réalisés sur des plasmas normaux mélangés congelés (Cryocheck®, Cryopep, Montpellier, France) confirment que, mesurée sur un même échantillon de plasma, la génération de thrombine est plus importante avec le réactif DS qu'avec le réactif TS-TM. À l'inverse, la présence de thrombomoduline l'atténue. Ainsi, les paramètres temporels (LT, TTP) sont plus courts et les paramètres quantitatifs (PH, ETP) sont plus élevés avec le réactif DS qu'avec le réactif TS. La Figure 27 montre un exemple de profils obtenus sur six jours différents.

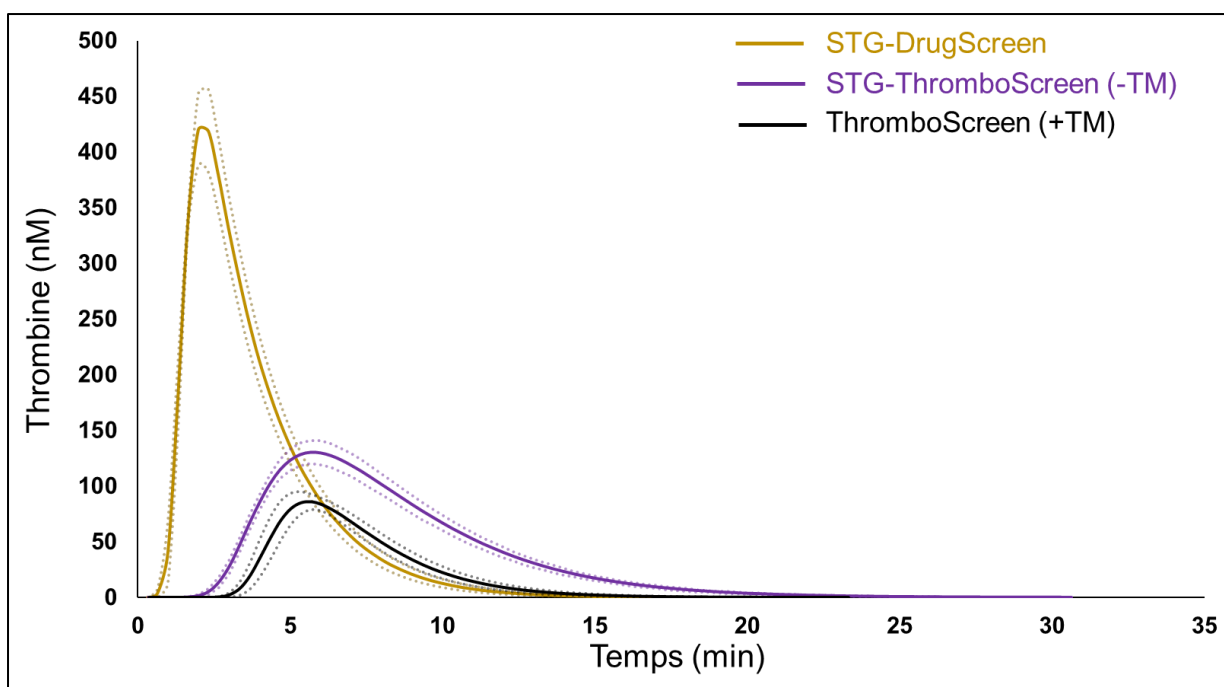


Figure 27 : Influence de la quantité de facteur tissulaire sur la génération de thrombine. Ces courbes représentent la moyenne (trait plein) \pm l'écart-type (pointillés) de six mesures de génération de thrombine sur plasma normal lyophilisé (Pool Norm) ; réalisées sur ST-Genesis à l'aide des réactifs STG-DrugScreen (jaune), STG-ThromboScreen sans thrombomoduline (violet) et STG-ThromboScreen avec thrombomoduline (noir). Le facteur tissulaire (à forte concentration dans le STG-DrugScreen) amplifie la génération de thrombine, la thrombomoduline l'atténue. Chacune des six mesures a été réalisée à des jours différents.

V.3.2. Réalisation de la gamme

Pour chacun des trois AOD étudiés, six points de gamme ont été réalisés en surchargeant du plasma normal (Cryocheck®) avec des solutions de rivaroxaban, d'apixaban et de dabigatran pour des concentrations finales allant de 0 à 450 ng/mL (non prédéfinies), comme décrit ailleurs dans la littérature [223]. La concentration finale en diméthylsulfoxyde était d'au plus 0,05% (v/v), concentration connue comme n'influençant pas les tests d'hémostase [230]. Chaque point de gamme a été analysé six fois (six jours différents).

Pour des raisons d'indisponibilités des réactifs, l'effet du dabigatran sur les paramètres du ST-Genesisia *in vitro* n'a pu être étudié que sur deux séries de six points et ne sera pas présenté ici.

V.3.3. Effet des AOD sur la génération de thrombine *in vitro*

Pour cette étude *in vitro* sur le ST-Genesisia, les échantillons précédemment décrits (partie III, V.3.2) ont été analysés. Il s'agissait au total de 72 échantillons comprenant 30 échantillons surchargés en rivaroxaban (0 – 445 ng/mL ou 0 – 1021 nM), 30 surchargés en apixaban (0 – 425 ng/mL ou 0 – 925 nM) et deux séries de 6 plasmas non surchargés. Avec ce système, la génération de thrombine a été mesurable :

- dans tous les échantillons avec le réactif STG-DrugScreen ;
- dans tous les échantillons surchargés en apixaban et dans tous ceux surchargés en rivaroxaban sauf un (325 ng/mL) avec le réactif STG-ThromboScreen en l'absence de thrombomoduline ;
- Pour des concentrations allant jusque 395 ng/mL (apixaban) ou 194 ng/mL (rivaroxaban) avec le réactif STG-ThromboScreen en présence de thrombomoduline.

Pour les trois réactifs (TS-TM, TS+TM et DS), un effet similaire sur les paramètres de génération de thrombine a été retrouvé pour les deux xabans (Figure 28) : des concentrations plus élevées de rivaroxaban et d'apixaban allongent les paramètres temporels (LT et TTP) et diminuent la valeur des paramètres quantitatifs (PH et ETP). Ces corrélations sont bien dans le sens attendu avec une action anticoagulante. Ces résultats sont représentés en Figure 29. A noter, à concentration molaire équivalente, l'allongement des paramètres temporels plus important avec le rivaroxaban qu'avec l'apixaban : ceci s'explique par le fait que le rivaroxaban inhibe *in vitro* 4 fois plus rapidement le facteur Xa que l'apixaban [219].

Une importante variabilité inter-échantillons a été retrouvée pour l'ETP en conditions TS en l'absence de thrombomoduline, pour des concentrations en AOD comprises entre 65 et 230 ng/mL environ.

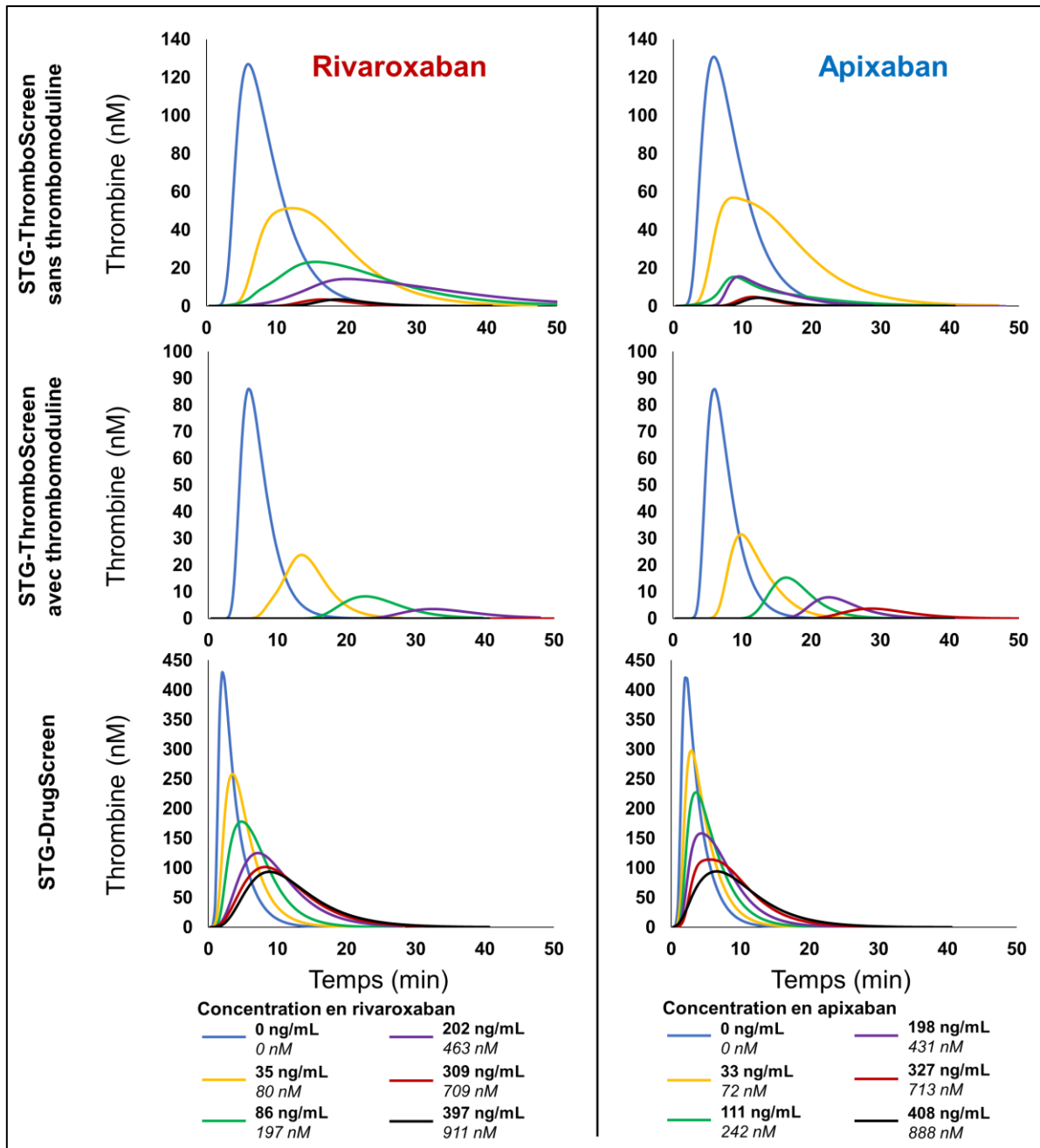


Figure 28 : Effet des xabans sur la génération de thrombine *in vitro*.

Chaque courbe représente la moyenne de 6 courbes de génération de thrombine mesurées pour une concentration similaire en xaban.

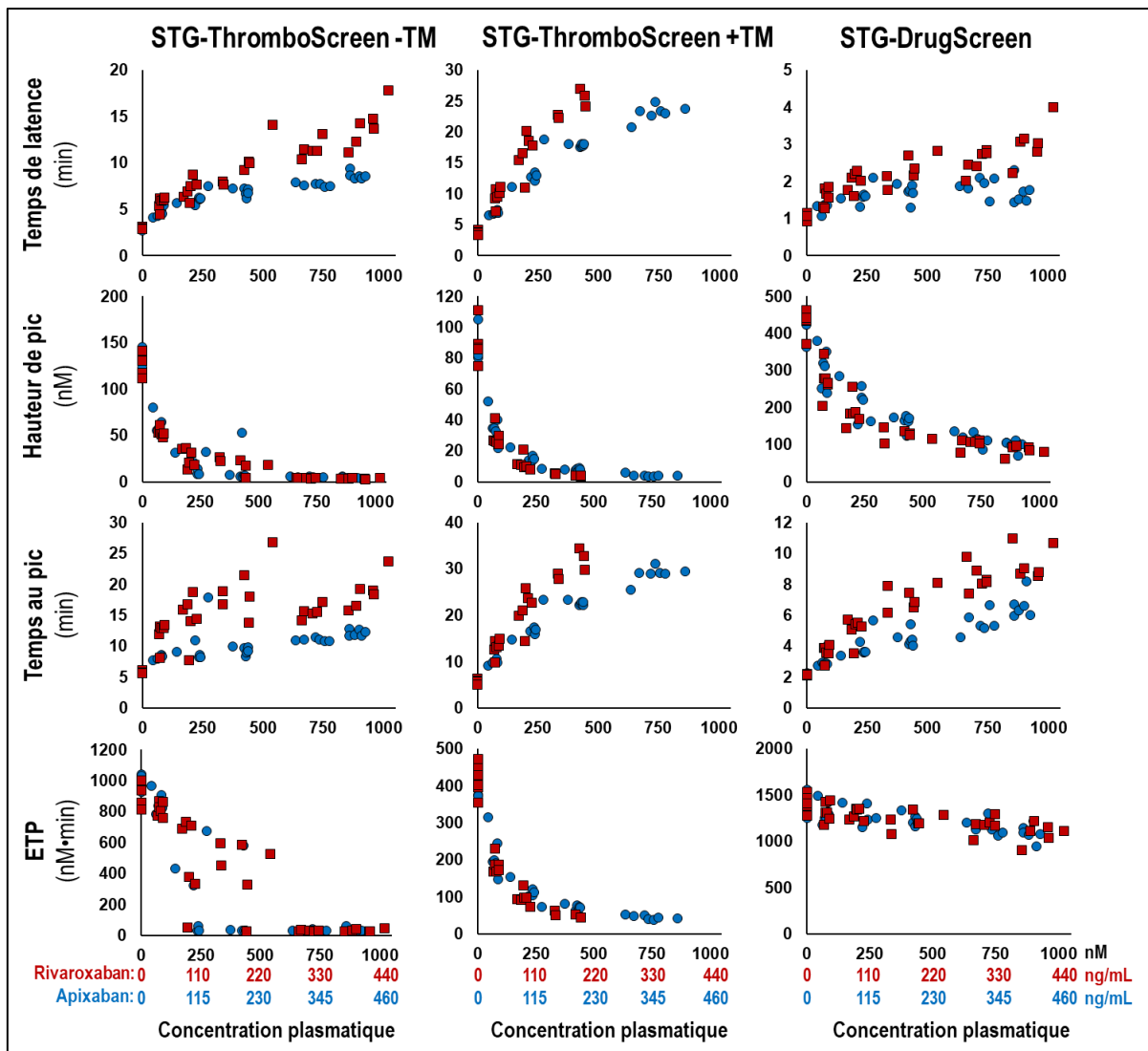


Figure 29 : Effet des xabans sur les paramètres de génération de thrombine *in vitro* (ST-Genesis).

Pour chaque paramètre, les échelles varient suivant le réactif utilisé. Les carrés rouges proviennent des échantillons surchargés en rivaroxaban, les points bleus de ceux surchargés en apixaban. Les concentrations en xabans sont données en nM avec leur conversion en concentration massique. L'importante variabilité sur l'ETP mesuré en STG-ThromboScreen -TM pour des concentrations en xabans allant de 100 à 250 ng/mL témoigne du manque de pertinence de ce paramètre lorsque la courbe de génération de thrombine est quasiment plate.

V.4. Comparaison au système CAT

V.4.1. Plasmas de volontaires sains étudiés

Pour cette comparaison de méthodes, des plasmas issus de volontaires sains inclus dans l'essai DRIVING (*New oral anticoagulant drugs Dabigatran etexilate and RIVaroxaban: INfluence of Genetic factors in healthy volunteers*) [231] conduit par notre équipe (Dr Isabelle Gouin-Thibault). DRIVING est un essai clinique s'intéressant à la variabilité de la réponse au dabigatran et au rivaroxaban chez le volontaire sain (NCT 01627665). Brièvement, il s'agit d'un essai clinique académique randomisé, en ouvert, en *cross-over*. Les volontaires sains recevaient une dose unique de 40 mg de rivaroxaban ou

une dose unique de 300 mg de dabigatran, puis l'autre traitement après un *wash-out* de six à dix jours (Annexe 2). Dans cet essai, le choix d'une dose unique de 40 mg de rivaroxaban ou de 300 mg de dabigatran a permis d'obtenir des concentrations plasmatiques en rivaroxaban proches de celles obtenues chez des patients à l'équilibre recevant des doses répétées de 20 mg de rivaroxaban ou de 110 mg de dabigatran [232]. Les conditions de prélèvement et de conservation étaient les mêmes que celles de l'étude ADAGE.

V.4.2. Comparaison des deux méthodes

Pour comparer le système ST-Genesisia à la méthode CAT (Thrombinoscope® BV, software 5.0.0.742, Maastricht, Netherlands), considérée comme méthode de référence historique, la génération de thrombine a été mesurée avec les deux systèmes sur les échantillons de plasma de 23 volontaires sains issus de l'essai DRIVING mené par notre groupe [231]. Il s'agissait de prélèvements réalisés à T0 ($n = 23$) et à différents moments après une prise unique de rivaroxaban (40 mg) pour couvrir une large plage de concentrations plasmatiques [231] : 14 prélèvements entre 0,5 et 4 h d'une part, 11 prélèvements entre 8 et 24 h d'autre part. La génération de thrombine a été mesurée sur ces prélèvements à la fois avec le ST-Genesisia (STG-ThromboScreen en l'absence de thrombomoduline) et le système CAT en utilisant le réactif *PPP reagent* (5 pM de facteur tissulaire, « PPP » pour plasma pauvre en plaquettes).

La comparaison a porté sur 48 échantillons de plasma. Dans l'ensemble, les représentations de Bland-Altman montrent une certaine concordance entre la méthode CAT *PPP reagent* et la méthode ST-Genesisia avec le réactif STG-ThromboScreen en l'absence de thrombomoduline. Certains biais relatifs pouvaient toutefois être observés : $20,8 \pm 9,3$ % pour le temps de latence, $16,4 \pm 13,2$ % pour la hauteur de pic et $17,8 \pm 11,9$ % pour l'ETP (Figure 30). Ces biais peuvent être expliqués par les conditions de mesure non directement superposables (meilleur contrôle de la température dans ST-Genesisia, méthode automatisée...) et les concentrations de facteur tissulaire utilisées non équivalentes.

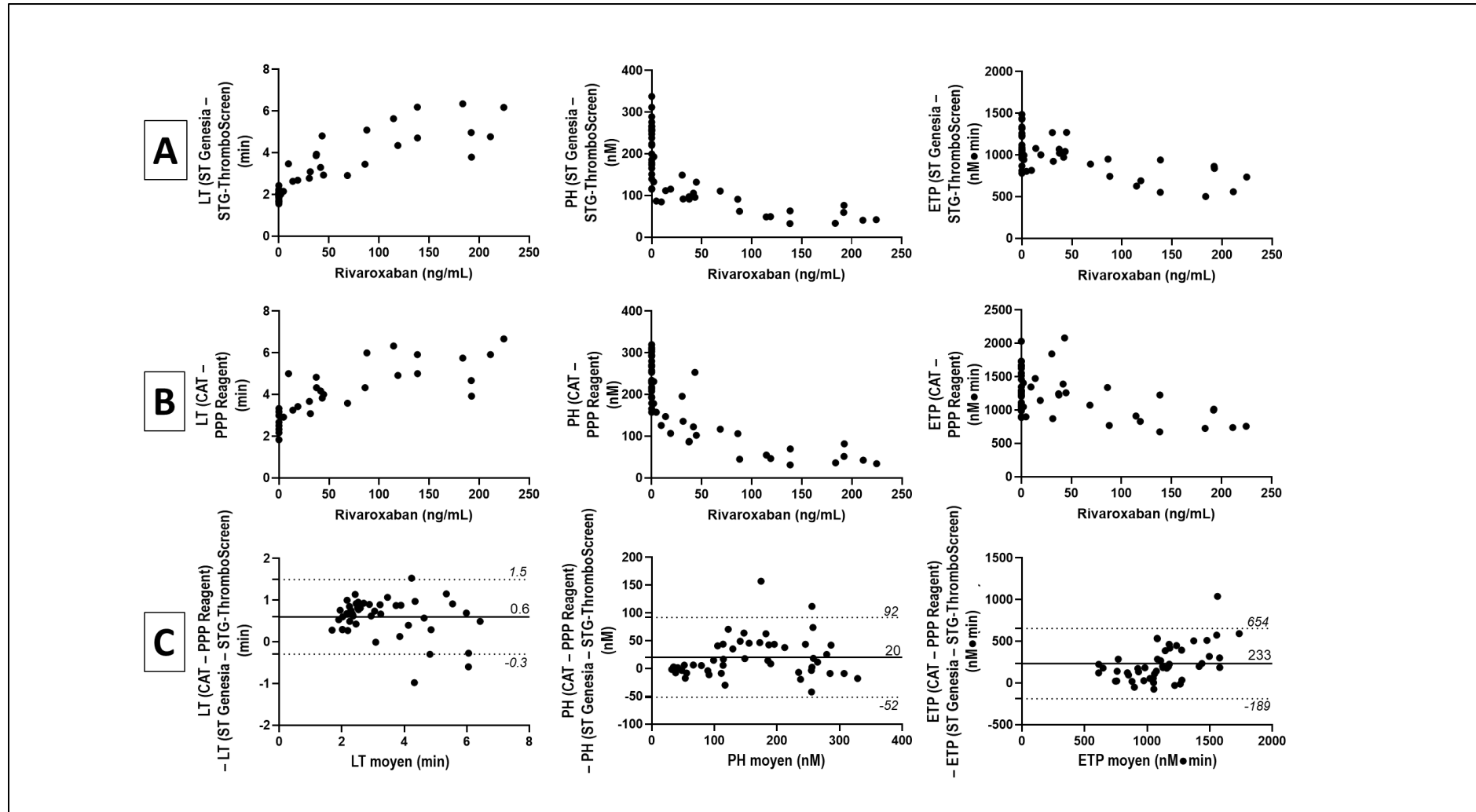


Figure 30 : Effet comparé du rivaroxaban sur les paramètres de génération de thrombine mesurés avec les systèmes CAT et ST-Genesis. Les paramètres de génération de thrombine, mesurés avec (A) le système ST-Genesis (STG-ThromboScreen en l'absence de thrombomoduline) et avec (B) le système CAT (PPP reagent), sont représentés en fonction des concentrations plasmatiques en rivaroxaban. (C) Les représentations graphiques de Bland-Altman montrent la valeur moyenne du paramètre en abscisse et la différence entre les deux méthodes en ordonnée. Le trait plein représente le biais absolu, les pointillés représentent l'intervalle de prédiction à 95 % du biais.

V.5. Le ST-GENESIA : conclusions

Le ST-Genesis est un nouveau système de génération de thrombine très prometteur permettant une évaluation qualitative et standardisée de la génération de thrombine sur un même échantillon avec différents réactifs : STG-ThromboScreen, STG-DrugScreen et STG-BleedScreen. Ces trois réactifs sont caractérisés par une concentration respectivement intermédiaire, élevée et faible en facteur tissulaire. Le fabricant préconise l'usage du premier pour explorer les phénomènes thrombotiques, le second pour évaluer l'effet des anticoagulants sur la coagulation et le dernier pour l'étude des événements hémorragiques (cette thématique étant hors du contexte de cette thèse, ce réactif n'a pas été testé).

Ces travaux préliminaires mettent en avant les bonnes performances analytiques du ST-Genesis, avec notamment en répétabilité et en reproductibilité des CVs respectifs inférieurs à 3 % et 7 % pour la majorité des paramètres pour les différents réactifs employés. Des résultats similaires de reproductibilité ont été obtenus par Calzavarini et collègues sur le même lot de réactif (202640) pour le STG-ThromboScreen [226], avec une variabilité modérément supérieure pour PH et ETP ; cependant les valeurs normalisées ne montraient pas de différences importantes avec nos résultats. Concernant le réactif STG-DrugScreen, Douxfils et collègues ont obtenu des résultats comparables avec deux lots de réactif différents [224]. L'étude de justesse montre de bons résultats néanmoins des biais importants sont retrouvés pour PH et ETP avec le réactif STG-ThromboScreen. Ces données suggèrent que la valeur cible des CIQ bas était sur notre instrument surestimée et que celle du contrôle normal et du contrôle sous-estimée. Un re-ciblage local peut s'avérer nécessaire.

C'est par ailleurs la première fois que les performances du ST-Genesis sont évaluées sur du plasma normal mélangé commercial ; nos données suggèrent qu'aussi bien le plasma lyophilisé (Pool Norm) que congelé (Cryopep) peuvent être utilisés pour mesurer de la génération de thrombine *in vitro*.

Enfin, les excellentes corrélations retrouvées dans l'étude *in vitro* entre la valeur mesurée des quatre paramètres de GT et les concentrations en rivaroxaban et apixaban sont en faveur de l'utilisation du ST-Genesis pour étudier la pharmacodynamie des xabans *ex vivo*.

L'ensemble des résultats est discuté dans l'article de Foulon-Pinto et collègues *Int J Lab Hematol* 2020 [233], reproduit en Annexe 3.

VI. GÉNÉRATION DE THROMBINE AVEC LE SYSTÈME THROMBODYNAMICS®

VI.1. Présentation du système

Le Thrombodynamics-4D Analyser (HemaCore LLC, Moscou, Russie) est un système de capture vidéo permettant de réaliser en simultané sur un même échantillon de plasma pauvre en plaquettes contenu dans une cupule (Figure 31) :

- l'étude de la génération de thrombine au démarrage de la coagulation permettant d'obtenir un thrombogramme : l'activation de la coagulation est déclenchée par la mise en contact avec le plasma d'un insert dont l'extrémité est recouverte de facteur tissulaire humain recombinant (à 90 pmol/m²) ;
- l'étude de la propagation spatio-temporelle de la formation de thrombine ;
- l'étude de la formation de la fibrine permettant d'obtenir un fibrinogramme.

Dans la plupart des méthodes d'analyse en hémostase, la coagulation est enclenchée par l'ajout dans une cupule d'un réactif déclenchant, principalement du facteur tissulaire ou du calcium dans le cas de plasmas citratés. La particularité du système Thrombodynamics-4D réside dans le fait que la réaction est déclenchée non pas par l'ajout de facteur tissulaire soluble mais par la mise en contact de facteur tissulaire immobilisé sur un insert avec le plasma à tester [234].

VI.1.1. Appareillage

Le système est composé d'une enceinte hermétique thermostatée à 37 °C en surpression dans laquelle se déroule l'analyse du plasma (Figure 31). En dehors de l'enceinte, se trouve un espace thermostaté permettant de pré-incuber les microtubes contenant les réactifs. Un système de diodes électroluminescentes éclaire alternativement l'échantillon à 356 nm (ultra-violet) et à 652 nm (lumière rouge) pour permettre les analyses de thrombinographie et de fibrinographie. Une caméra permet le suivi et l'enregistrement en temps réel de l'analyse.

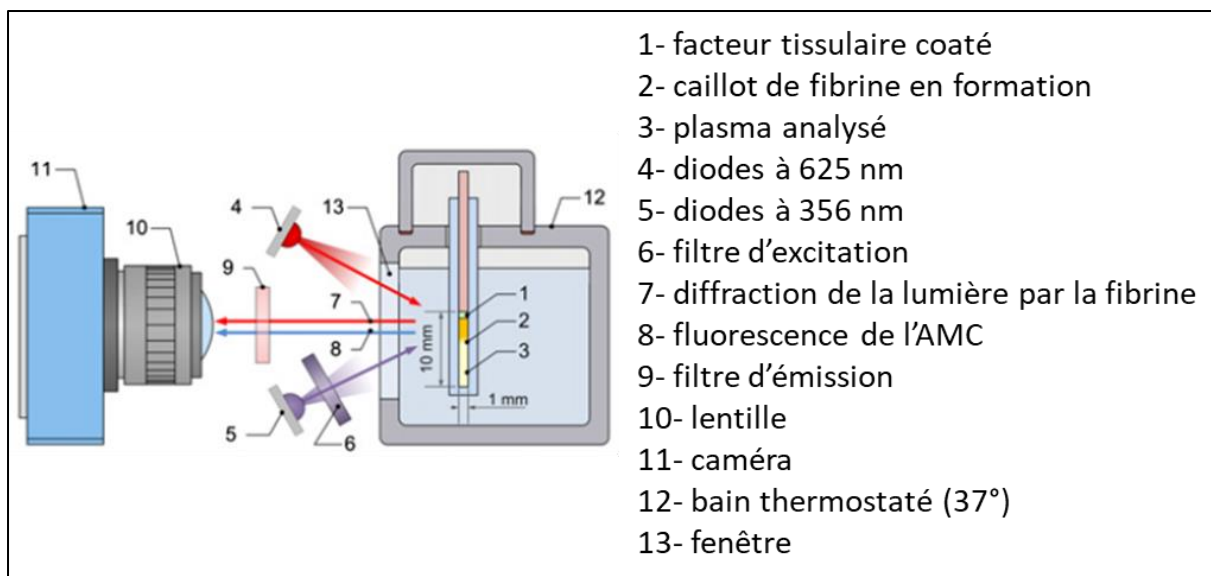


Figure 31 : Schéma de l'appareillage du Thrombodynamics-4D.

Le déclenchement des processus de coagulation par la mise en contact d'un insert couvert de facteur tissulaire avec le plasma permet d'étudier l'évolution spatiotemporelle de la génération de thrombine et de la formation du caillot de fibrine. D'après Dashkevitch et coll, Biophys. J. 2012 [235].

VI.1.2. Principe de mesure

La mesure fluorométrique est fondée sur la capacité de la thrombine à cliver spécifiquement le Z-GGR-AMC, substrat fluorogène, décrit précédemment (Figure 23). Selon les données du fabricant. L'enregistrement vidéo permet de suivre le déplacement du pic de thrombine générée dans la cupule ainsi que la mesure de l'intensité de fluorescence à un moment et un endroit précis. Différents paramètres cinétiques et de concentration en thrombine sont mesurés.

Le fibrinogramme consiste en la mesure dynamique de la propagation du caillot de fibrine insoluble et opaque par diffraction d'un faisceau de lumière rouge. Différents paramètres cinétiques et de densité sont mesurés.

L'échantillon de plasma est analysé tour à tour sous lumière rouge et sous UV : la diffraction de la lumière par la fibrine et la mesure des signaux de fluorescence générés par l'action de la thrombine sur le Z-GGR-AMC sont enregistrés.

VI.1.3. Protocole d'utilisation

Après décongélation, un volume de 120 μ L de plasma est pré-incubé pendant 15 minutes avec 5 μ L d'une solution de phospholipides (*Reagent PLS*[®], concentration finale 4 μ M) dans un microtube, à usage unique, contenant un inhibiteur de la phase contact (« *corn trypsin inhibitor* » ou CTI) ainsi que le substrat fluorogène.

L'intégralité du mélange est transférée manuellement vers un second microtube à usage unique contenant des sels calciques lyophilisés permettant la recalcification du

plasma citraté. Le mélange est immédiatement transféré dans la cuvette d'analyse. L'insert (à l'extrémité duquel se trouve le facteur tissulaire le couvrant) est introduit dans la cuvette d'analyse, permettant le contact du facteur tissulaire avec le plasma [236] (Figure 32) et l'enclenchement de la coagulation via la voie exclusive du facteur tissulaire du fait de la présence du CTI.

L'analyse de la formation de fibrine et de la génération de thrombine est réalisée durant 1 h en temps réel via un enregistrement vidéo visible sur le logiciel Thrombodynamics-4D. Ce même logiciel permet l'enregistrement de toutes les données mesurées ainsi que l'édition des rapports d'analyse.

La calibration de l'automate a été vérifiée par le fournisseur (5-Diagnostics, Bâle, Confédération Helvétique) lors de son installation. Des échantillons de plasmas normaux congelés (Cryocheck) ont été passés hebdomadairement comme contrôles.

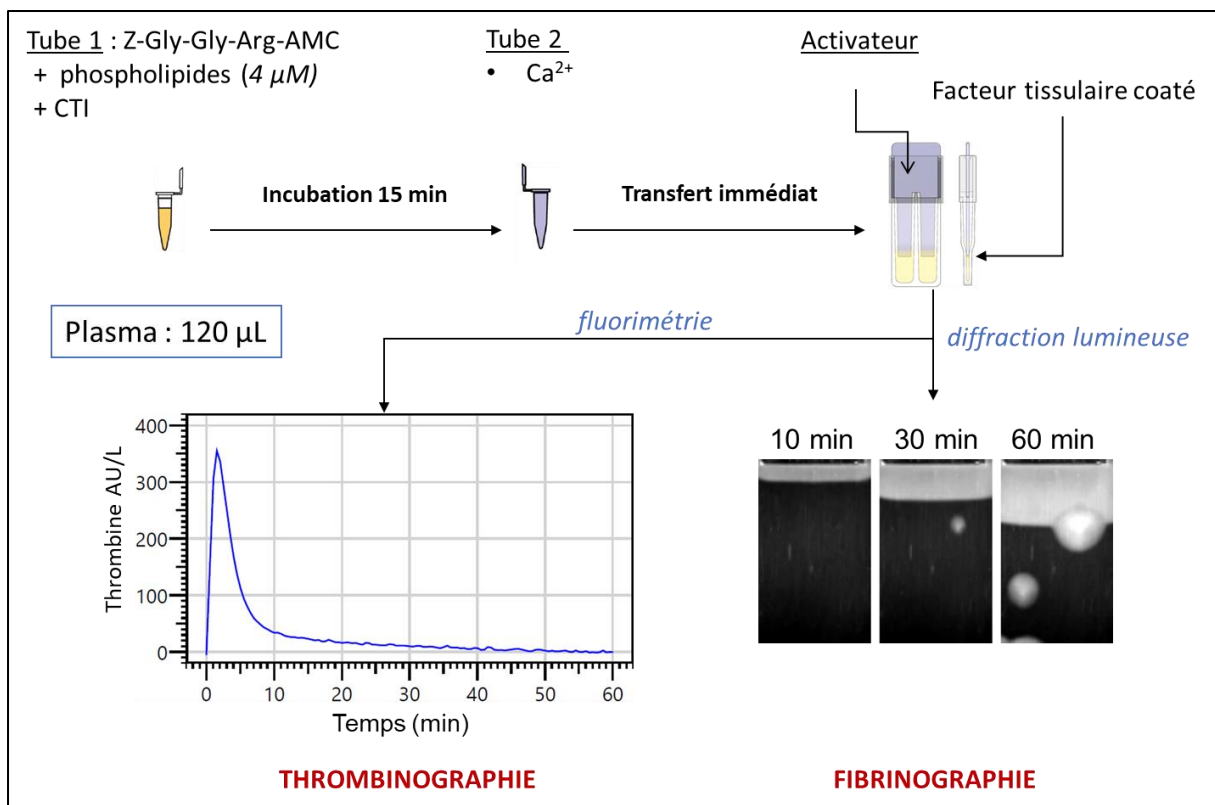


Figure 32 : Protocole schématisé d'utilisation du Thrombodynamics-4D.

À partir de 120 µL de plasma pauvre en plaquettes, il est possible d'obtenir un thrombogramme, un fibrinogramme et des images de fibrinographie obtenues par enregistrement vidéo.

VI.1.4. Paramètres de génération de thrombine

Le système Thrombodynamics-4D permet de mesurer les quatre principaux paramètres du thrombogramme (LT, PH, TTP et ETP), avec cependant une nomenclature proposée par le fabricant, légèrement différente. Par souci de clarté, cette nomenclature

sera utilisée pour distinguer les mesures réalisées avec le système Thrombodynamics-4D de celles réalisées avec le système ST-Genesisia :

- **temps de latence** (Lag_ATG), exprimé en minutes, qui correspond au temps au bout duquel la concentration en thrombine générée atteint 20 AU/L (comparable au LT) ;
- **concentration maximale en thrombine** ($Cmax_ATG$), exprimée en unités arbitraires par litre (UA/L), qui correspondant à la concentration maximale en thrombine à l'interface entre le facteur tissulaire et le plasma (comparable au PH) ;
- **temps au pic** ($Tmax_ATG$), exprimé en minute, représente le temps nécessaire à l'obtention de $Cmax_ATG$ (comparable au TTP, avec une mesure tous les 30 secondes) ;
- **potentiel d'activation de la thrombine** (ETP_ATG), qui représente l'aire sous la courbe des concentrations en thrombine en fonction du temps, en UA min/L (analogue à l'ETP).

VI.1.5. Propagation de la thrombine

La dynamique spatio-temporelle de la thrombine générée est analysée grâce à deux paramètres (Figure 33) :

- l'**amplitude stationnaire du pic de thrombine** (Ast), exprimée en UA/L, qui représente la concentration moyenne en thrombine au front de propagation ;
- la **vitesse de propagation du pic de thrombine** (Vt), exprimée en $\mu\text{m}/\text{min}$, calculée suivant la position du front de thrombine entre 45 et 55 minutes.

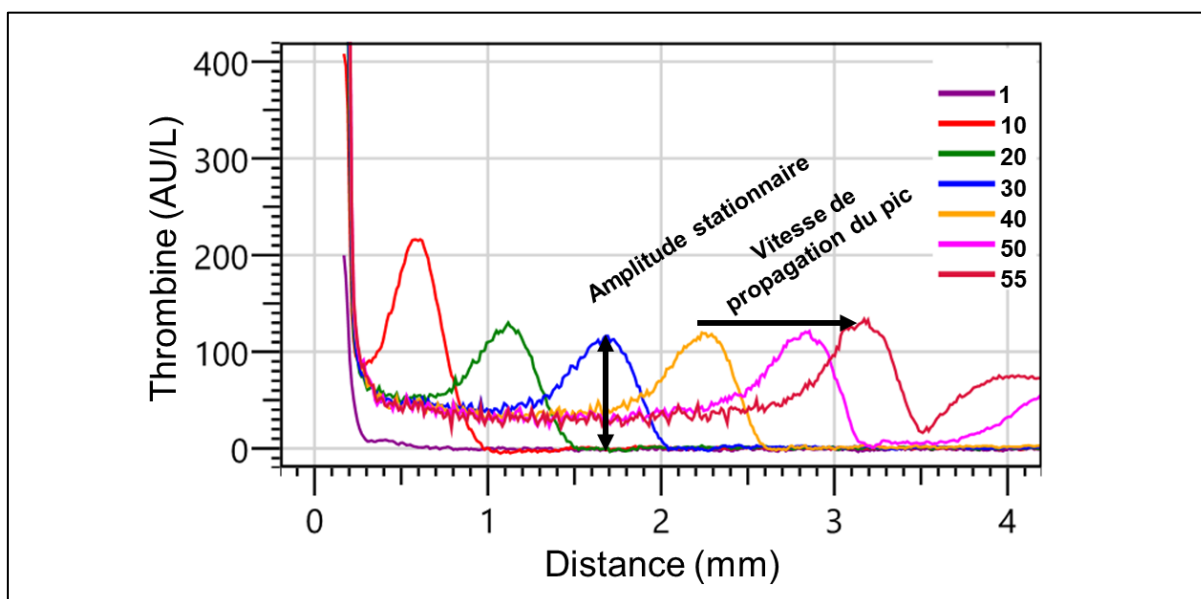


Figure 33 : Paramètres de propagation de la thrombine.

Ces paramètres sont définis d'après le fait que le pic de thrombine généré se propage suivant un mode ondulatoire [235].

VI.1.6. Paramètres de fibrinographie

Les différents paramètres de fibrinographie sont les suivants (Figure 34) :

- **la vitesse de croissance du caillot**, $\mu\text{m}/\text{min}$ (V) : elle représente la vitesse moyenne de croissance du caillot, c'est-à-dire l'évolution de la taille du caillot en fonction du temps (paramètre calculé entre 15 et 25 min) ;
- **le temps de latence**, min (LTf) : temps entre l'activation de la coagulation et le moment à partir duquel la fibrine est significativement détectable, c'est-à-dire quand la valeur de diffraction de la lumière atteint la moitié de la valeur maximale mesurée à la fin de l'analyse ;
- **la vitesse initiale de croissance du caillot**, $\mu\text{m}/\text{min}$ (Vi) : vitesse mesurée lors du début de la formation du caillot de fibrine, entre 2 et 6 minutes après activation ;
- **la vitesse stationnaire de croissance du caillot**, $\mu\text{m}/\text{min}$ (Vst) : vitesse également mesurée entre 15 min et 25 min, ne différant de la vitesse de croissance du caillot qu'en cas de caillots spontanés (définis ci-après) ;
- **la taille du caillot**, μm : mesurée à 30 minutes après le début de l'analyse (CS) ;
- **la densité du caillot**, unités arbitraires notées u.a. (D) : mesurée par diffraction de la lumière ;
- **temps d'apparition de caillots spontanés**, min (Tsp) : temps au bout duquel apparaissent des caillots spontanés dans la partie inférieure de la cuvette (non en contact avec le facteur tissulaire), de telle sorte qu'ils occupent au moins 5 % de l'espace de mesure.

Pour les paramètres mesurant ou étant calculés à l'aide de la taille du caillot, celle-ci correspond en pratique à la distance entre l'interface facteur tissulaire – échantillon de plasma (soit l'extrémité de l'insert où se trouve le facteur tissulaire immobilisé) et le front du caillot de fibrine.

VI.2. Performances du système Thrombodynamics-4D

VI.2.1. Essai de reproductibilité

Il n'a pas été possible durant ce travail de réaliser une étude complète des performances du système Thrombodynamics-4D. Le principal frein est que cet appareil n'est pas fourni avec ses propres contrôles internes de qualité, ne disposant que du marquage RUO (*Research Use Only*) au début de ces travaux. Pour vérifier la fiabilité du système, des échantillons de *pools* commerciaux de plasmas normaux congelés (Cryocheck) ont été passés régulièrement comme contrôles internes de qualité. Les données de

reproductibilité obtenues (Tableau 19) montrent des CV très satisfaisants avec une majorité d'entre eux inférieurs à 4 % en thrombinographie et fibrinographie.

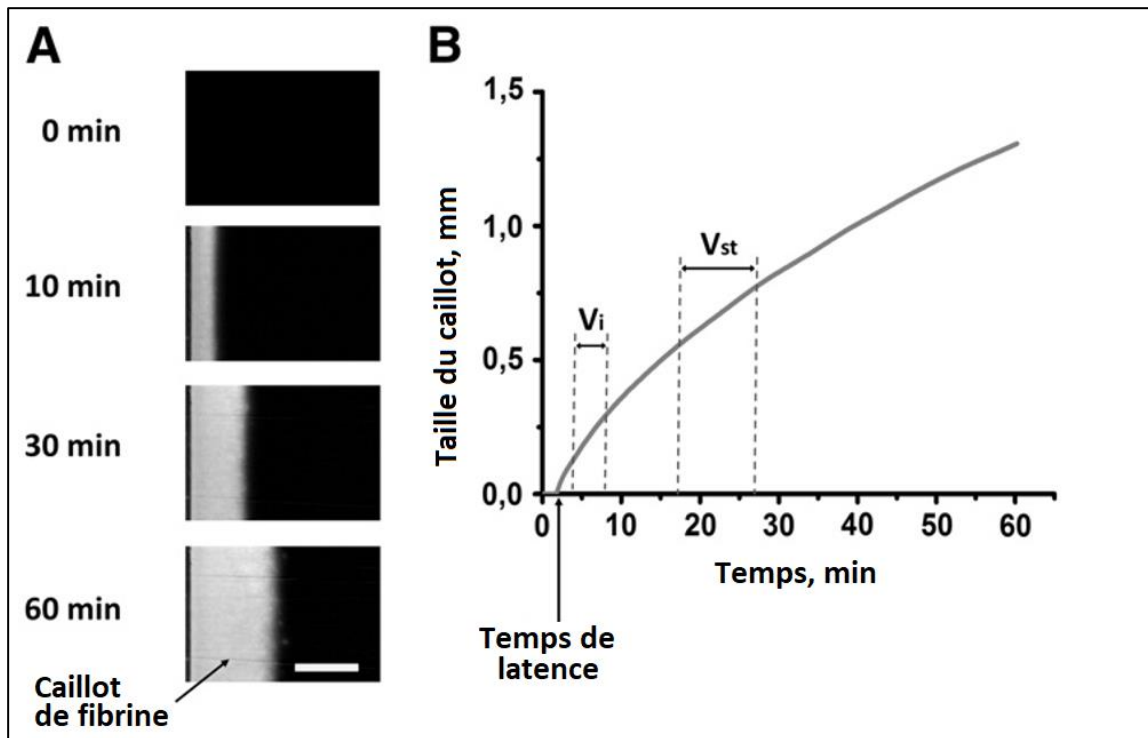


Figure 34 : Diffraction de la lumière et fibrinogramme.

La diffraction de la lumière est modifiée par la croissance du caillot (A), permettant de calculer différents paramètres du fibrinogramme (B). D'après Dashkevitch et coll, *Biophys. J.* 2012 [235].

VI.2.2. Détermination des intervalles de référence

Du fait du caractère innovant de cet appareil et du manque de données en vie réelle concernant son utilisation, les intervalles de référence pour les paramètres de thrombinographie et de fibrinographie communiqués par le fabricant ne concernent que le plasma frais. Nous avons établi localement des valeurs de référence à partir de 30 échantillons de plasma congelés des volontaires sains issus de l'essai DRIVING. Ces intervalles de référence ont été calculés à partir de la valeur moyenne plus ou moins deux écarts-types [237] et sont présentés dans le Tableau 20.

VI.2.3. Étude *in vitro* : effet des AOD sur les paramètres de thrombinographie

Les échantillons surchargés en AOD décrits précédemment (*cf Partie II, V.3.2*) ont également été analysés avec le système Thrombodynamics-4D. De plus, 36 échantillons de plasma dont 30 surchargés en dabigatran et six non surchargés ont été analysés avec ce système. Les concentrations en dabigatran allaient de 0 à 410 ng/mL, soit 0 à 653 nM. La génération de thrombine a été mesurable dans chacun des 108 échantillons analysés et les résultats sont présentés en Figure 35.

Tableau 19 : Essai de reproductibilité du système Thrombodynamics-4D.

	CRYOCHECK		Valeurs normales
	Congelé, lot A1236		(plasma frais)
	<i>n</i> = 12		
	Moy. ± e.t.	CV (%)	
Thrombinographie			
Temps de latence (min)	0,1 ± 0,0	0	[0,1 ; 0,2]
Concentration maximale (AU/L)	385 ± 21	5,4	[230 ; 410]
Temps au pic (min)	1,6 ± 0,0	0	[1,5 ; 2,0]
ETP (AU*min/L)	1636 ± 65	3,9	[1220 ; 2170]
Propagation de la thrombine			
Amplitude stationnaire (AU/L)	42,9 ± 8,1	18,9	[33 ; 100]
Vitesse de propagation (µm/min)	22,5 ± 1,9	8,5	[24 ; 44]
Fibrinographie			
Vitesse de croissance (µm/min)	35,4 ± 1,2	3,4	[34 ; 44]
Temps de latence (min)	0,8 ± 0,1	7,1	[0,6 ; 1,5]
Vitesse initiale (µm/min)	68 ± 1,4	2,1	[59 ; 69]
Taille du caillot à 30 min (µm)	1485 ± 29	1,2	[1380 ; 1640]
Densité du caillot (u.a.)	16843 ± 496	2,9	[19500 ; 34200]

Essai réalisé sur les paramètres de thrombinographie, propagation de la thrombine et fibrinographie avec le lot de réactif 00586. Les CV aberrants obtenus pour les paramètres temporels de thrombinographie s'expliquent par la résolution du système de lecture (1 mesure toutes les 30 secondes). Ces mesures ont été réalisées sur une période de 20 jours et par deux opérateurs différents (Candice Cavalié et moi-même). Les valeurs normales sont celles proposées par le fabricant, pour du plasma frais. CV : coefficient de variation.

Tableau 20 : Intervalles de référence des paramètres du Thrombodynamics-4D.

	moyenne ± écart-type	intervalle
Génération de thrombine		
Temps de latence (min)	0,1 ± 0,1	[0,1 ; 0,2]
Concentration maximale en thrombine (UA/L)	304 ± 73	[159 ; 450]
Temps au pic (min)	1,8 ± 0,2	[1,3 ; 2,2]
Potentiel d'activation de la thrombine (UA min/L)	1601 ± 385	[832 ; 2370]
Fibrinographie		
Vitesse de croissance du caillot (µm/min)	63,4 ± 17,6	[28,3 ; 98,6]
Temps de latence (min)	0,9 ± 0,2	[0,6 ; 1,2]
Vitesse initiale (µm/min)	74,1 ± 6,5	[61,0 ; 87,2]
Vitesse stationnaire (µm/min)	48,6 ± 8,0	[32,6 ; 64,6]
Taille du caillot à 30min (µm)	1734 ± 173	[1388 ; 2080]
Densité du caillot (u.a.)	17156 ± 2857	[11443 ; 22869]
Caillots spontanés (min)	21,1 ± 14,0	[0,1 ; 49,2]

Détermination réalisée chez des volontaires sains. La valeur minimale des bornes inférieures des paramètres temporels a été fixée arbitrairement à 0,1 seconde.

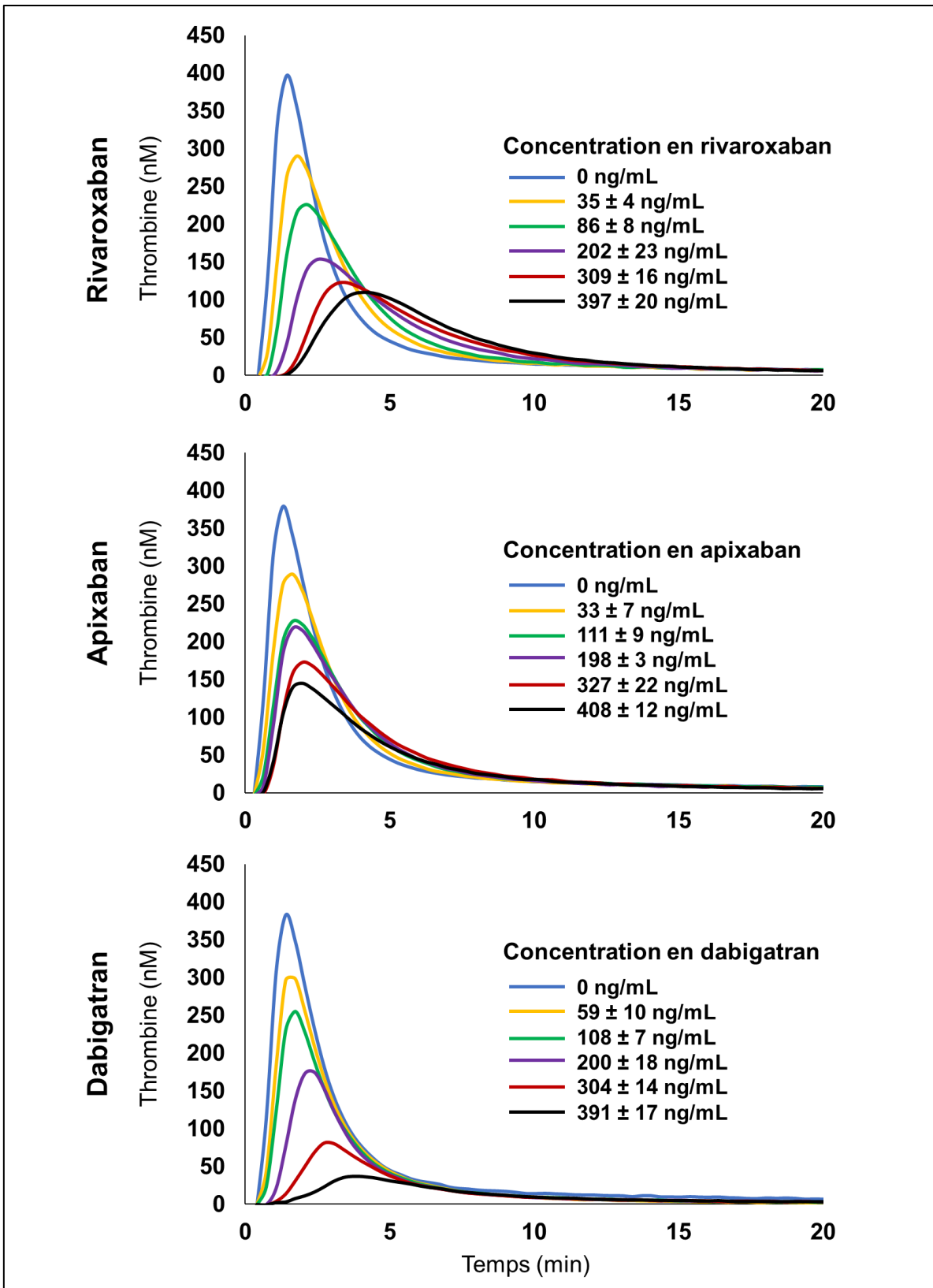


Figure 35 : Effet des AOD sur la génération de thrombine mesurée *in vitro* sur Thrombodynamics-4D.

Chaque courbe représente la moyenne de 6 courbes de GT mesurées pour une concentration similaire en AOD. La thrombine générée apparaît concentration en AOD dépendante.

L'étude *in vitro* permet d'observer, pour chacun des trois AOD, d'excellentes corrélations entre les concentrations plasmatiques et chacun des quatre paramètres de thrombinographie mesurés. Cette étude montre que les concentrations croissantes d'AOD allongent les paramètres temporels (LT, TTP) et diminuent les valeurs de PH et d'ETP (Figure 36). Les deux paramètres de propagation de la thrombine (Ast et Vt) présentent corrélations avec la concentration en AOD variable d'un AOD à l'autre. Les valeurs mesurées pour Ast et pour Vt diminuent lorsque les concentrations d'AOD augmentent (sauf Ast en présence de rivaroxaban).

VI.2.4. Étude *in vitro* : effet des AOD sur les paramètres de fibrinographie

Il existe également d'excellentes corrélations entre les concentrations de chaque AOD et plusieurs paramètres de fibrinographie (Figure 37), en particulier ceux de cinétique de formation du caillot avec une diminution des différentes vitesses de croissance du caillot et un allongement du temps de latence. Ces corrélations sont bien dans le sens attendu avec une action anticoagulante. Par ailleurs, la taille du caillot à 30 minutes diminue avec les concentrations croissantes d'AOD. Aucune relation n'a été retrouvée concernant la densité du caillot ou encore le temps d'apparition des caillots spontanés.

VI.3. Le système Thrombodynamics-4D : conclusions

Initialement développé comme un système permettant d'étudier la formation de la fibrine à partir de facteur tissulaire immobilisé [234], le Thrombodynamics-4D permet également d'étudier la génération de thrombine sur le même échantillon de plasma [235]. L'absence de contrôles internes de qualité dédiés ne permet pas une évaluation rigoureuse des performances du système ; néanmoins l'essai de reproductibilité dans les limites de son interprétation apporte des résultats rassurants. Dans son ensemble, le système Thrombodynamics-4D est un système simple d'utilisation avec une prise en main rapide, particulièrement intéressant pour des analyses très complètes sur un petit nombre d'échantillons ; de plus, le système ne nécessite qu'une faible prise d'essai de 120 μ L contre environ 350 μ L pour une condition expérimentale avec le ST-Genesisia.

Les paramètres de fibrinographie ont été étudiés chez des patients traités par héparines [236,238–240] ainsi que dans la recherche d'états pro-thrombotiques [237,240–242]. Toutefois, l'intérêt du Thrombodynamics-4D dans l'étude de la pharmacodynamie des AOD n'était pas décrit dans la littérature au début de nos travaux, aussi était-il nécessaire de mener une étude *in vitro* pour évaluer la sensibilité de ce système. Avec de très bonnes corrélations entre valeur des paramètres et concentration en AOD, en

génération de thrombine mais aussi avec plusieurs paramètres de fibrinographie, le système Thrombodynamics-4D apparaît comme un outil innovant et pertinent dans l'étude de la pharmacodynamie des AOD.

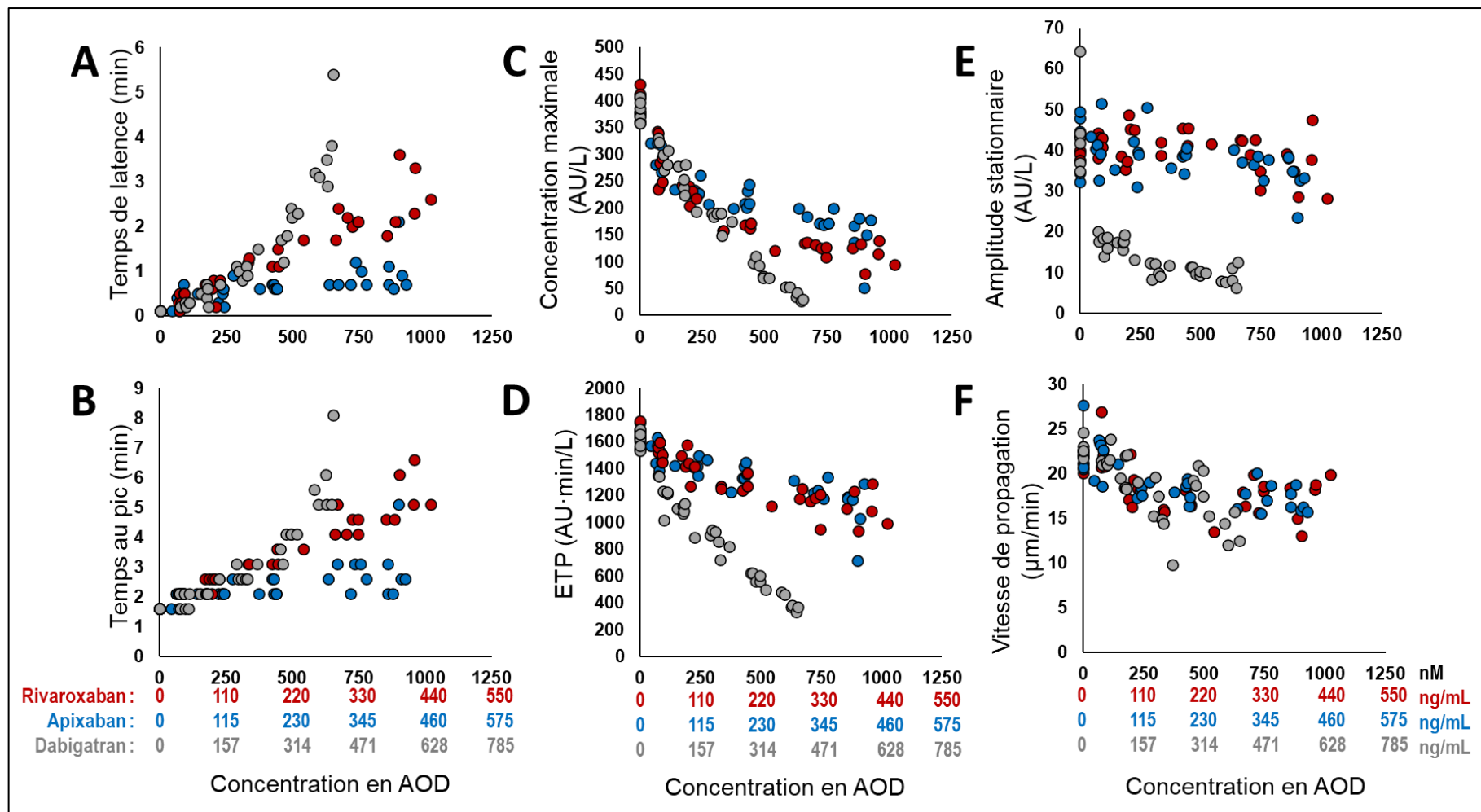


Figure 36 : Effet des AOD sur les paramètres de thrombinographie *in vitro* (Thrombodynamics-4D).

Des concentrations croissantes d'AOD allongent le temps de latence (A) et le temps au pic (B) et diminuent la concentration maximale en thrombine (C) et la valeur de l'ETP (D). L'amplitude stationnaire (E) est réduite en présence de concentrations croissantes d'apixaban et de dabigatran mais pas de rivaroxaban. Les trois AOD réduisent la vitesse de propagation de la thrombine (F). Les concentrations sont données en nM, avec leur équivalence en ng/mL. Une concentration de 250 nM correspond respectivement à 110, 115 et 157 ng/mL de rivaroxaban, d'apixaban et de dabigatran. Les mesures provenant d'échantillons surchargés en rivaroxaban, apixaban et dabigatran sont distinguées par leur couleur, rouge, bleue et grise respectivement.

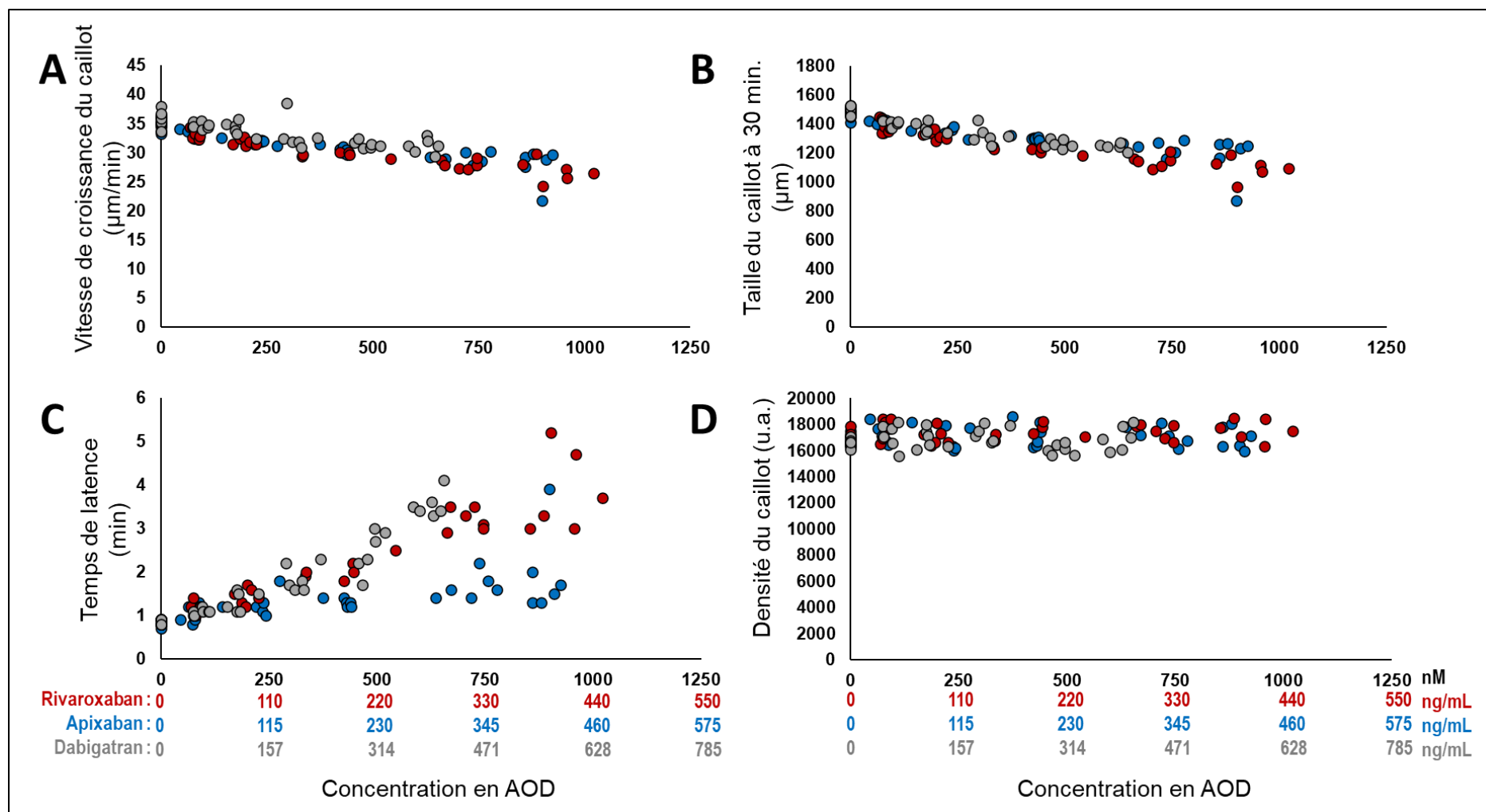


Figure 37 : Effet des AOD sur les paramètres de fibrinographie *in vitro*.

Des concentrations croissantes d'AOD diminuent la vitesse de croissance du caillot (A) et sa taille mesurée à 30 min (B) ; et allongent le temps de latence (C). Aucun effet de la concentration en AOD sur la densité du caillot (D) n'a été mise en évidence. Les concentrations sont données en nM avec leur équivalence en ng/mL. Une concentration de 250 nM correspond respectivement à 110, 115 et 157 ng/mL de rivaroxaban, d'apixaban et de dabigatran. Les mesures provenant d'échantillons surchargés en rivaroxaban, apixaban et dabigatran sont signifiés en rouge, bleu et gris respectivement.

VII. ÉTUDE DE LA PHARMACODYNAMIE DES AOD PAR THROMBINOGRAPHIE ET FIBRINOGRAPHIE

Les résultats obtenus avec l'étude *in vitro* justifient l'intérêt des systèmes ST-Genesis et Thrombodynamics-4D pour étudier la pharmacodynamie des AOD à l'aide du TGT. L'étude des profils pharmacodynamiques des AOD a été menée chez les 185 premiers patients ADAGE, à savoir ceux ayant été inclus entre novembre 2015 et décembre 2017.

VII.1. Description du sous-groupe étudié

VII.1.1. Caractéristiques des patients

Les caractéristiques des patients inclus sont résumées dans le Tableau 21 : 67 patients (36,2 %) sont traités par rivaroxaban, 70 (37,8 %) par apixaban et 48 par dabigatran (25,9 %). L'âge moyen est de $86,1 \pm 4,1$ ans (min. 80 ans, max. 97 ans). La cohorte est composée de 69,2 % de femmes. Le score CIRS-G moyen est de 10,5. La clairance de la créatinine moyenne, estimée par la formule de Cockcroft & Gault, est de 51,2 mL/min. Enfin, les patients sont polymédiqués car ils prennent en moyenne, en plus de leur AOD, entre 6 et 7 médicaments différents, dont au moins un médicament inhibiteur de la P-gp pour 40,1 % d'entre eux.

VII.1.2. Prélèvements analysés

Au total, 342 prélèvements ont été analysés pour cette partie de l'étude, avec respectivement 146, 129 et 67 prélèvements réalisés parmi les patients traités par rivaroxaban, apixaban et dabigatran : le nombre moyen de prélèvements par patient est proche de deux. Compte tenu des mauvaises performances du ST-Genesis pour évaluer l'effet du dabigatran, l'étude des profils pharmacodynamiques du dabigatran chez les patients ADAGE s'est limitée au système Thrombodynamics-4D.

VII.1.3. Données pharmacocinétiques dans le sous-groupe

Parmi les 55 patients recevant 15 mg par jour de rivaroxaban, la concentration à T_{\max} médiane était de 244 ng/mL (IQR 180 – 387 ng/mL), avec une valeur maximale à 676 ng/mL. À T_{\min} médiane était de 38 ng/mL (IQR 23 – 64 ng/mL).

Concernant les 54 patients traités par apixaban 2,5 mg \times 2/jour, la concentration médiane à T_{\max} était de 166 ng/mL (IQR 126 – 209), avec une valeur maximale de 442 ng/mL et une concentration à T_{\min} médiane de 74 ng/mL (IQR 49 – 116).

Enfin, chez les 41 patients du groupe dabigatran recevant la posologie de 110 mg \times 2/jour, la concentration médiane à T_{\max} était de 145 ng/mL (IQR 104 – 280) avec une valeur maximale de 665 ng/mL. La concentration médiane à T_{\min} était de 44 ng/mL (IQR 23 – 73 ng/mL).

VII.2. Effet des xabans sur la thrombinographie en fonction des concentrations plasmatiques chez les patients ADAGE

Pour chaque paramètre de génération de thrombine mesuré chez les patients de l'étude ADAGE, des corrélations entre la valeur du paramètre et la concentration en xaban ont été recherchées. Les résultats de cette étude sont synthétisés dans le Tableau 22.

Les valeurs des quatre paramètres principaux mesurées à T_{\max} et à T_{\min} sont détaillées dans le Tableau 23 pour le rivaroxaban et dans le Tableau 24 pour l'apixaban.

VII.2.1. Temps de latence (LT et Lag_ATG)

Avec les quatre conditions étudiées (DS, TS-TM, TS+TM et Thrombodynamics-4D), les xabans allongent le temps au bout duquel apparaissent les premières traces de thrombine (Figure 38). Cet allongement est d'autant plus marqué que les concentrations en xaban sont importantes. À concentration similaire, l'allongement est plus marqué avec le rivaroxaban que l'apixaban en présence d'une forte concentration de facteur tissulaire (STG-DrugScreen et Thrombodynamics-4D).

VII.2.2. Temps au pic (TTP et Tmax_ATG)

Similairement au temps de latence, des concentrations croissantes en xabans induisent un allongement croissant du temps nécessaire pour atteindre le pic de thrombine, aussi bien quand mesuré sur ST-Genesisia que sur Thrombodynamics-4D (Figure 39).

VII.2.3. Hauteur de pic (PH et Cmax_ATG)

De fortes corrélations ont été retrouvées entre la hauteur du pic de thrombine et les concentrations en xabans chez les patients ADAGE : rivaroxaban et apixaban diminuent la quantité maximale de thrombine générée, d'autant plus que leur concentration augmente (Figure 40).

Tableau 21 : Caractéristiques des patients ADAGE inclus dans l'étude de pharmacodynamie.

	rivaroxaban	apixaban	dabigatran	total
Nombre de patients (n)	67	70	48	185
Caractéristiques démographiques				
Âge, années – (m ± e.t.)	85,9 ± 4,0	86,4 ± 4,2	85,7 ± 4,3	86,1 ± 4,1
Femmes (%)	70,1	72,9	62,5	69,2
Poids (kg)	65,5 ± 12,9	67,4 ± 16,1	67,3 ± 16,0	66,6 ± 14,8
Caractéristiques cliniques				
FA persistante (%)	11,9	11,9	8,7	11,5
FA paroxysmale (%)	35,8	29,9	34,8	33,1
FA permanente (%)	52,2	58,2	56,5	55,4
Score CHA ₂ DS ₂ VASc – (m ± e.t.)	4,9 ± 1,4	5,1 ± 1,3	4,2 ± 1,5	4,9 ± 1,4
Score HEMORR ₂ HAGES – (m ± e.t.)*	2,0 ± 0,9	2,6 ± 1,1	2,0 ± 0,8	2,3 ± 1,0
Antécédent d'AVC / AIT (%)	26,9	30,4	35,7	29,7
Diabète (%)*	10,8	27,5	14,3	18,5
Hypertension (%)	73,1	81,2	67,9	75,6
Insuffisance cardiaque (%)	53,7	53,6	32,1	50,0
Dyslipidémie (%)	23,9	32,4	32,0	28,8
Score CIRS-G - (m ± e.t.)*	9,5 ± 3,9	11,7 ± 5,2	9,1 ± 3,4	10,5 ± 4,6
Caractéristiques biologiques				
Clairance de la créatinine, mL/min – (m	51,2 ± 17,8	49,2 ± 15,5	54,7 ± 22,1	51,2 ± 18,0
Albuminémie, g/L – (m ± e.t.)	33,0 ± 3,8	32,9 ± 6,1	32,1 ± 6,0	32,8 ± 5,2
Protéine C réactive, mg/L – médiane (IQR)	27,2 ± 39,9	33,2 ± 43,1	25,1 ± 37,4	29,1 ± 40,6
Hémoglobine, g/dL – (m ± e.t.)	12,5 ± 1,4	11,7 ± 1,8	12,3 ± 1,5	12,2 ± 1,6
Données thérapeutiques				
Nombre de médicaments associés – (m ± e.t.)	6,1 ± 2,7	6,6 ± 2,9	5,8 ± 2,3	6,2 ± 3,0
≥ 1 inhibiteur de P-gp (%)	36,4	47,8	20,0	40,1
≥ 1 inhibiteur du CYP3A4/5 (%)	15,2	27,5	13,2	19,8
Anti-arythmiques (%)	16,4	28,6	16,7	21,1
Amiodarone (%)	15,2	27,5	15,9	20,1
Antiplaquettaires (%)*	10,8	24,6	2,3	14,0

*Existence d'une différence significative (tests utilisés : analyse de variance à un facteur classique ; test de Kruskal-Wallis ou test du khi-deux d'indépendance). Seuil de significativité : $p > 0,05$. m ± e.t. = moyenne ± écart-type. AVC = accident vasculaire cérébral. AIT = accident ischémique transitoire.

Tableau 22 : Corrélations statistiques entre paramètres de GT et concentrations en AOD chez les patients ADAGE

	STG-DrugScreen	STG-ThromboScreen	Thrombodynamics-4D	
rivaroxaban		-TM	+TM	
Temps de latence	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	0,0002	$p < 10^{-4}$
Temps au pic	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
Hauteur de pic	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
ETP	<i>0,1028</i>	<i>0,1846</i>	$p < 10^{-4}$	0,0013
	STG-DrugScreen	STG-ThromboScreen	Thrombodynamics-4D	
apixaban		-TM	+TM	
Temps de latence	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
Temps au pic	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
Hauteur de pic	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$
ETP	0,0102	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	0,0001

Mesures réalisées *ex vivo* chez les patients ADAGE avec les systèmes ST-Genesis et Thrombodynamics-4D. Corrélations obtenues à l'aide du test de Spearman. Un résultat en italique est non significatif (seuil de significativité $p < 0,05$).

VII.2.4. Potentiel endogène de thrombine (ETP et ETP_ATG)

Chez les patients ADAGE, les corrélations entre ETP et concentrations en xabans étaient moins uniformes d'une condition à l'autre que pour les autres paramètres (Figure 41). Contrairement à ce qu'avait montré l'étude *in vitro*, les concentrations croissantes en rivaroxaban ne semblent pas influencer l'ETP quand celui-ci est mesuré avec les réactifs STG-DrugScreen et STG-ThromboScreen (sans thrombomoduline). Des corrélations, respectivement forte et modérée existent lorsque la mesure est réalisée en conditions STG-ThromboScreen en présence de thrombomoduline et Thrombodynamics-4D. En revanche des corrélations existent pour les quatre conditions entre la valeur de l'ETP et les concentrations en apixaban chez les sujets âgés, avec néanmoins une corrélation faible en condition STG-DrugScreen.

VII.2.5. Variabilité pharmacodynamique

Pour chaque paramètre mesuré dans les quatre conditions de génération de thrombine, les CV ont été calculés ; leurs valeurs des concentrations à T_{\max} et T_{\min} sont détaillées dans le Tableau 23 pour le rivaroxaban et dans le Tableau 24 pour l'apixaban.

La variabilité pharmacodynamique mesurée dans ces quatre conditions de génération de thrombine suggère des profils similaires entre le rivaroxaban et l'apixaban. Que ce soit pour les concentrations à T_{\max} ou à T_{\min} , les paramètres temporels montrent une faible variabilité interindividuelle, avec des CVs inférieurs à 30 % pour la majorité

des cas, exception faite pour le temps de latence mesuré avec le Thrombodynamics-4D : les CVs élevés, allant respectivement jusqu'à 78,1 et 70,4 % pour le rivaroxaban et l'apixaban à T_{\min} , s'expliquent par le déclenchement manuel de la réaction, ajoutant un facteur de variabilité lié à l'utilisateur. Les CVs les plus importants sont obtenus avec la hauteur de pic et l'ETP quand ceux-ci sont mesurés avec le STG-ThromboScreen, en l'absence et surtout en présence de thrombomoduline.

Dans l'ensemble, les mesures réalisées avec le STG-DrugScreen montrent une variabilité moindre pour les deux xabans, à T_{\max} comme à T_{\min} avec la grande majorité des paramètres montrant moins de 30 % de variabilité. Ceci s'explique par la forte concentration en facteur tissulaire dans ce réactif. Cette variabilité reste toutefois bien plus importante que celle observée *in vitro* (Figure 42), mettant en évidence l'état d'hypercoagulabilité du sujet âgé. Des résultats similaires sont obtenus avec le Thrombodynamics-4D, avec des CVs toutefois plus élevés.

Tableau 23 : Valeurs des paramètres mesurées à la T_{max} et T_{min} chez les patients traités par rivaroxaban 15 mg et variabilité (CV).

	Temps de latence (min)		Hauteur de pic (nM)		Temps au pic (min)		ETP (nM·min)	
	T _{max}	T _{min}	T _{max}	T _{min}	T _{max}	T _{min}	T _{max}	T _{min}
ST-Genesis TS-TM	5,7	4,4	77,9	177	14,0	8,7	1214	1392
<i>IQR</i>	(5,1 – 7,4)	(3,4 – 5,2)	(45,3 – 88,1)	(92,7 – 239)	(12,2 – 16,5)	(6,9 – 10,6)	(742 – 1508)	(1202 – 1646)
<i>CV (%)</i>	35,5	28,6	42,7	53,4	19,1	30,1	44,8	30,9
ST-Genesis TS+TM	8,7	5,4	18,4	69,7	12,7	8,8	148	377
<i>IQR</i>	(6,6 – 9,7)	(3,9 – 7,2)	(12,4 – 27,9)	(35,9 – 152)	(10,1 – 15,1)	(6,4 – 10,0)	(84,0 – 180)	(221 – 867)
<i>CV (%)</i>	46,0	47,8	46,6	75,5	40,4	35,1	47,0	80,8
ST-Genesis DS	2,3	1,4	226	379	5,4	2,9	1431	1520
<i>IQR</i>	(2,0 – 2,6)	(1,2 – 1,7)	(162 – 267)	(326 – 426)	(4,5 – 5,9)	(2,3 – 3,6)	(1209 – 1687)	(1342 – 1754)
<i>CV (%)</i>	29,3	26,0	34,6	24,5	28,9	29,9	27,7	21,9
Thrombodynamics-4D *	1,1	0,2	203	289	3,1	2,1	1391	1832
<i>IQR</i>	(0,8 – 1,6)	(0,1 – 0,4)	(140 – 268)	(254 – 422)	(2,6 – 3,9)	(1,6 – 2,1)	(1176 – 1774)	(1322 – 2480)
<i>CV (%)</i>	58,2	80,5	41,6	33,4	36,6	18,6	31,2	38,7

Les valeurs sont données sous forme de médiane. CV = coefficient de variation. *Pour le Thrombodynamics-4D, la hauteur de pic est donnée en UA/L et l'ETP en UA·min/L.

Tableau 24 : Valeurs des paramètres mesurées à T_{max} et T_{min} chez les patients traités par apixaban 2,5 mg et variabilité (CV).

	Temps de latence (min)		Hauteur de pic (nM)		Temps au pic (min)		ETP (nM·min)	
	T _{max}	T _{min}	T _{max}	T _{min}	T _{max}	T _{min}	T _{max}	T _{min}
ST-Genesis TS-TM	4,9	4,5	61,4	125	8,5	8,3	958	1190
<i>IQR</i>	(3,7 – 6,3)	(3,5 – 5,7)	(38,9 – 155)	(62,9 – 214)	(7,2 – 11,8)	(6,3 – 9,3)	(568 – 1268)	(860 – 1341)
<i>CV (%)</i>	32,4	31,0	91,2	61,0	29,3	25,2	54,2	35,5
ST-Genesis TS+TM	7,2	6,4	29,7	65,2	10,7	8,7	194	306
<i>IQR</i>	(3,7 – 6,3)	(4,1 – 8,4)	(9,2 – 87,5)	(22,5 – 127)	(6,7 – 13,6)	(6,4 – 12,2)	(74,6 – 446)	(159 – 567)
<i>CV (%)</i>	48,4	43,2	122,6	75,3	40,8	36,0	105,0	69,1
ST-Genesis DS	1,6	1,4	295	360	3,7	3,0	1384	1529
<i>IQR</i>	(1,3 – 1,9)	(1,2 – 1,7)	(208 – 387)	(282 – 395)	(2,6 – 4,7)	(2,4 – 3,7)	(1203 – 1684)	(1316 – 1699)
<i>CV (%)</i>	26,5	27,7	38,6	26,1	31,6	27,7	28,4	16,5
Thrombodynamics-4D *	0,4	0,2	296	325	2,1	2,1	1635	1711
<i>IQR</i>	(0,2 – 0,6)	(0,2 – 0,6)	(236 – 388)	(292 – 379)	(2,1 – 2,6)	(2,1 – 2,1)	(1252 – 1943)	(1436 – 1978)
<i>CV (%)</i>	72,5	71,5	29,8	23,1	27,5	18,7	34,8	25,8

Les valeurs sont données sous forme de médiane. CV = coefficient de variation. *Pour le Thrombodynamics-4D, la hauteur de pic est donnée en UA/L et l'ETP en UA·min/L.

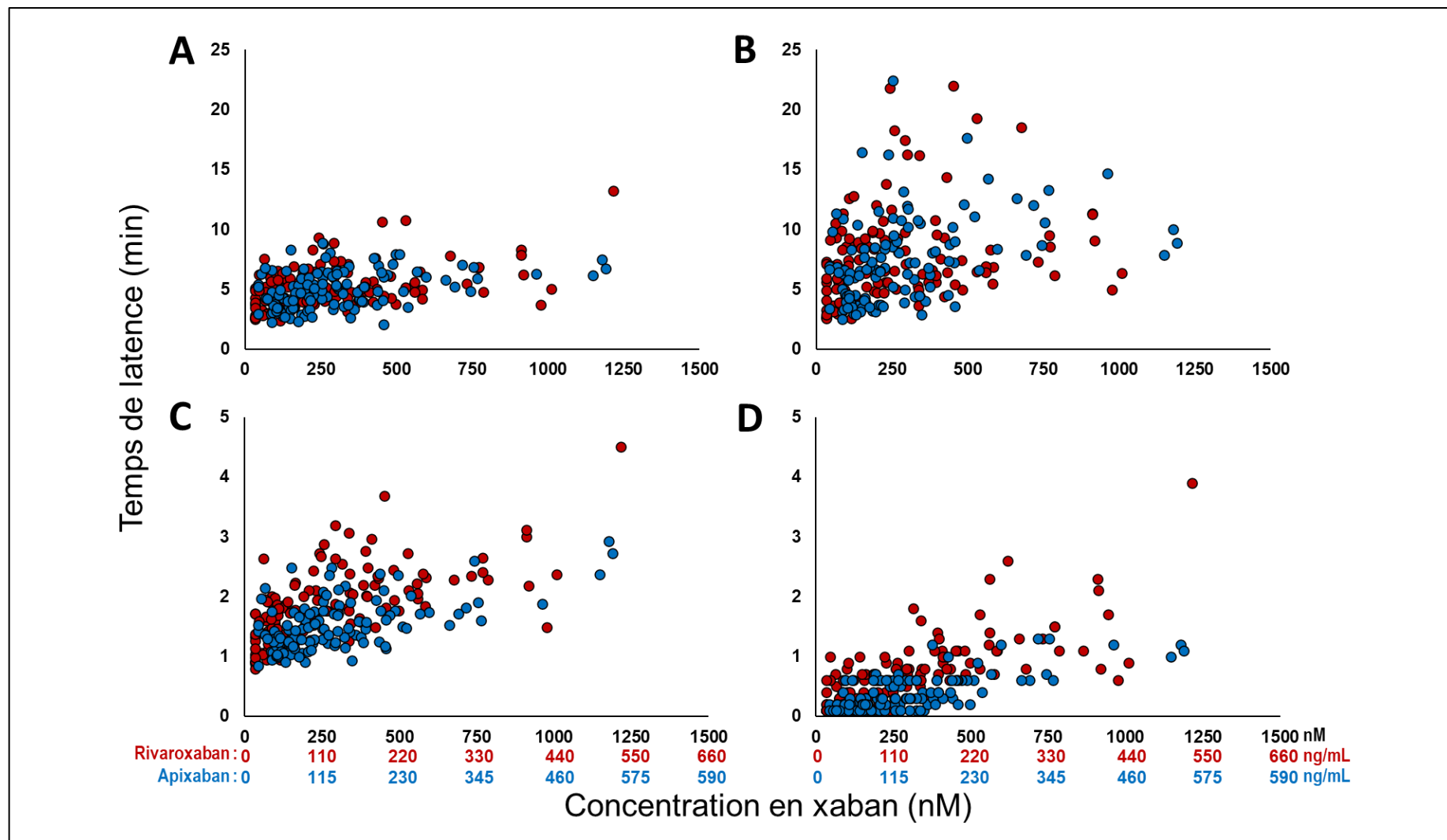


Figure 38 : Temps de latence en fonction de la concentration en xaban chez les patients ADAGE

Les mesures ont été réalisées avec les systèmes ST-Genesis STG-ThromboScreen sans TM (A), avec TM (B), STG-DrugScreen (C) et le système Thrombodynamics-4D (D). Concentrations en xaban données en nM avec leur équivalence en ng/mL de rivaroxaban et d'apixaban. Les axes des ordonnées ont été ajustés deux à deux pour A et B ainsi que C et D. Les données issues des patients traités par rivaroxaban et apixaban sont représentées en rouge et en bleu, respectivement.

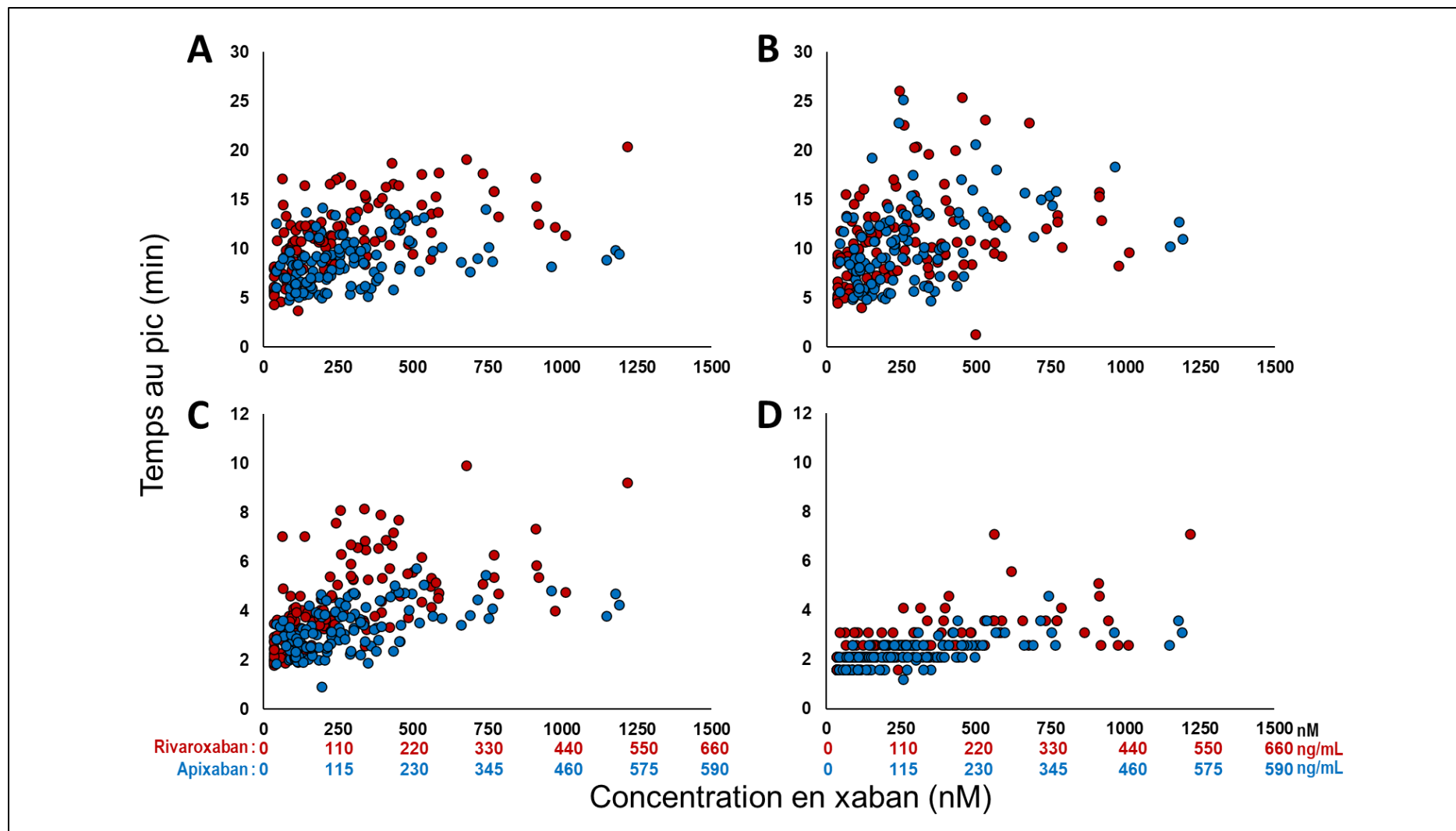


Figure 39 : Temps au pic en fonction de la concentration en xaban chez les sujets âgés.

Les mesures ont été réalisées avec les systèmes ST-Genesis STG-ThromboScreen sans TM (A), avec TM (B), STG-DrugScreen (C) et le système Thrombodynamics-4D (D). Concentrations en xaban données en nM avec leur équivalence en ng/mL de rivaroxaban et d'apixaban. Les axes des ordonnées ont été ajustés deux à deux pour A et B ainsi que C et D. Les données issues des patients traités par rivaroxaban et apixaban sont représentées en rouge et en bleu, respectivement.

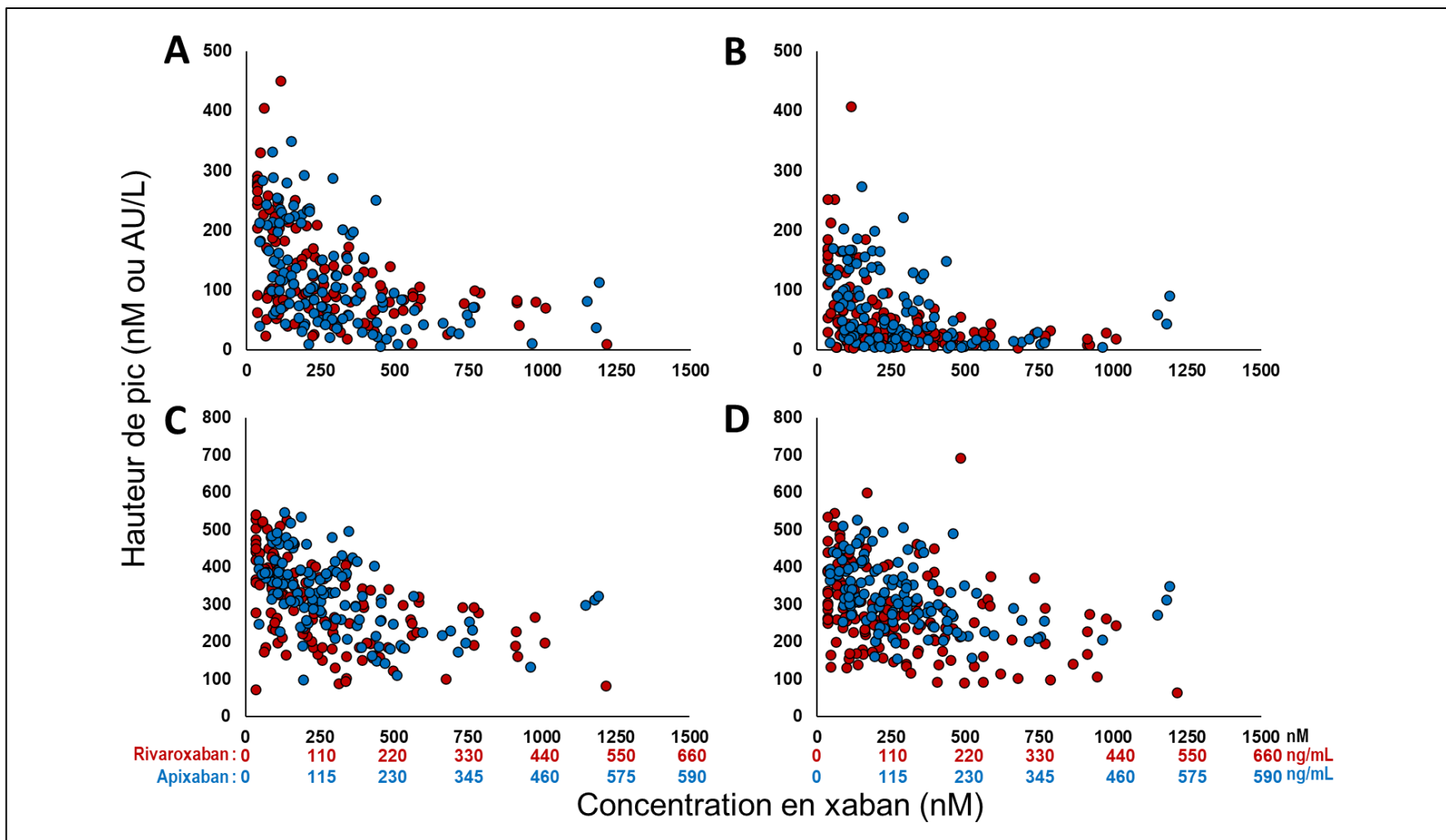


Figure 40 : Hauteur de pic en fonction de la concentration en xaban chez les patients ADAGE.

Les mesures ont été réalisées avec les systèmes ST-Genesia STG-ThromboScreen sans TM (A), avec TM (B), STG-DrugScreen (C) et le système Thrombodynamics-4D (D). Concentrations en xaban données en nM avec leur équivalence en ng/mL de rivaroxaban et d'apixaban. Les axes des ordonnées ont été ajustés deux à deux pour A et B ainsi que C et D. Les concentrations en thrombine sont données en nM (ST-Genesia) ou AU/L (Thrombodynamics-4D). Les données issues des patients traités par rivaroxaban et apixaban sont représentées en rouge et en bleu, respectivement.

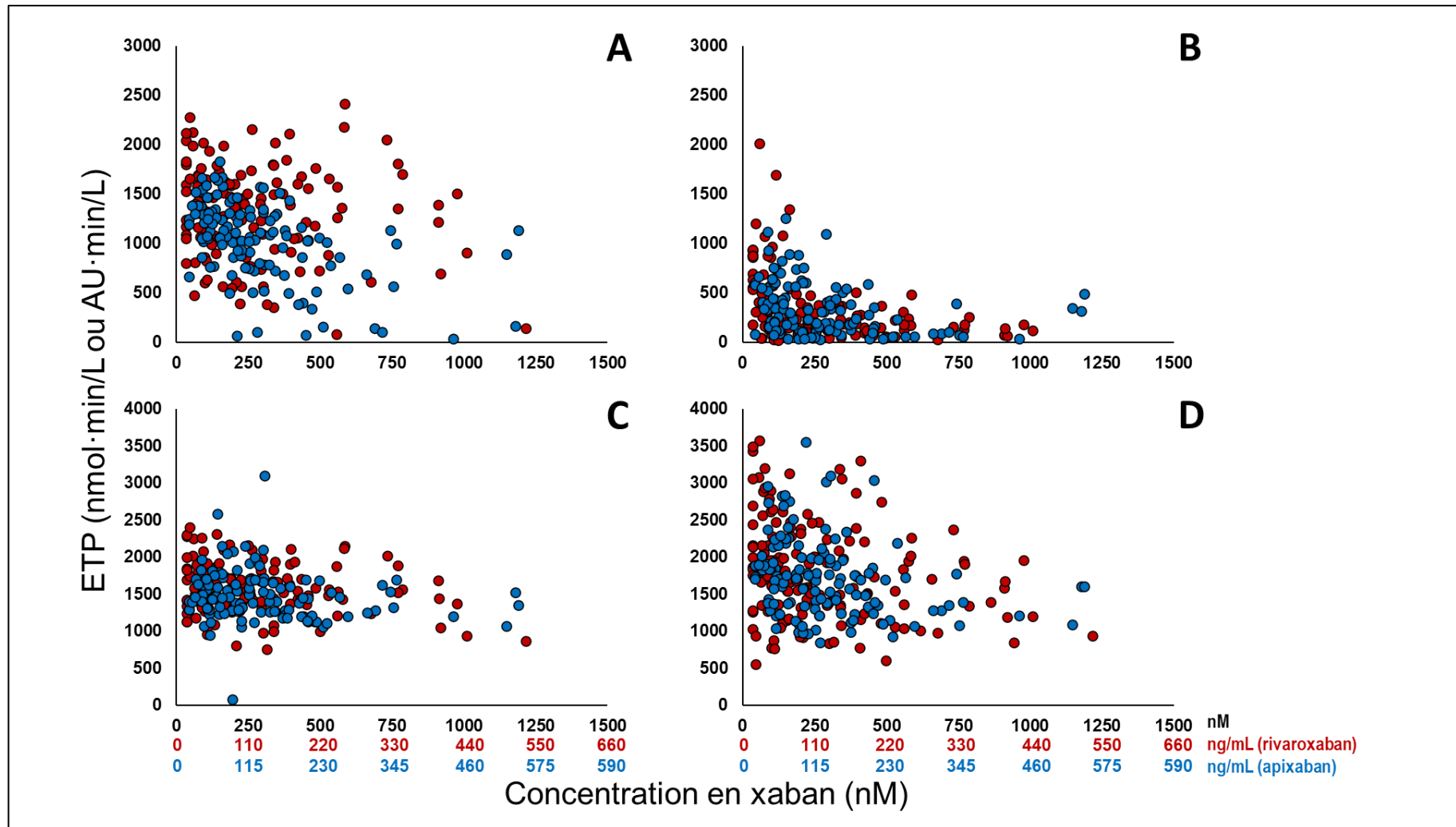


Figure 41 : ETP en fonction de la concentration en xaban chez les patients ADAGE.

Les mesures ont été réalisées avec les systèmes ST-Genesis STG-ThromboScreen sans TM (A), avec TM (B), STG-DrugScreen (C) et le système Thrombodynamics-4D (D). Concentrations en xaban données en nM avec leur équivalence en ng/mL de rivaroxaban et d'apixaban. Les axes des ordonnées ont été ajustés deux à deux pour A et B ainsi que C et D. Les concentrations en thrombine sont données en nM (ST-Genesis) ou AU/L (Thrombodynamics-4D). Les données issues des patients traités par rivaroxaban et apixaban sont représentées en rouge et en bleu, respectivement.

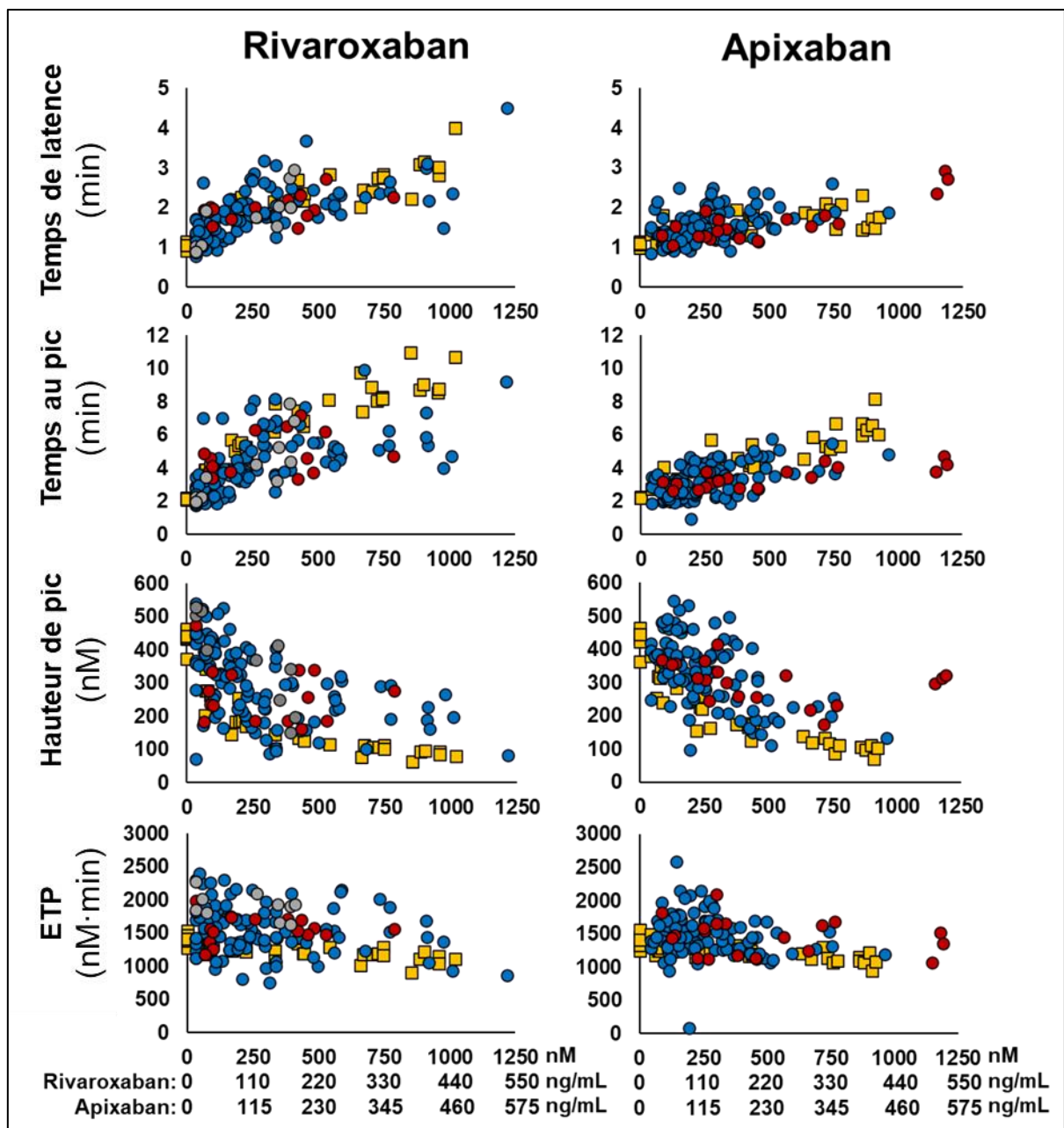


Figure 42 : Mise en évidence de l'état d'hypercoagulabilité du sujet âgé

Les points représentent des mesures réalisées chez les patients ADAGE à l'aide du ST-Genesis (réactif STG-DrugScreen). La couleur est fonction de la dose – rouge (20 mg ou 5 mg ×2), bleu (15 mg ou 2,5 mg ×2) en rivaroxaban ou en apixaban respectivement ou gris (10 mg de rivaroxaban). Les carrés jaunes proviennent des mesures réalisées in vitro.

VII.3. Effet des xabans sur la fibrinographie en fonction des concentrations plasmatiques chez les sujets âgés

Dans cette population de patients âgés, les xabans ont un effet très modéré (apixaban) voire inexistant (rivaroxaban) sur la vitesse de croissance du caillot tandis qu'ils diminuent tous deux la vitesse initiale de croissance du caillot. Le délai d'apparition du caillot est également prolongé en présence de concentrations croissantes de xabans. Par ailleurs, le caillot est d'autant plus petit que les concentrations en xabans sont

importantes (Figure 43). Enfin, similairement à ce que rapportait l'étude *in vitro*, les xabans n'influencent ni la densité du caillot, ni le temps d'apparition des caillots spontanés. Le degré de signification des différentes associations est détaillé dans le Tableau 25. La densité du caillot est en revanche influencée par la fibrinogénémie, avec des caillots plus denses chez les patients ayant un taux élevé de fibrinogène (Figure 44).

Tableau 25 : Corrélations entre paramètres de fibrinographie et concentrations en AOD.

	rivaroxaban	apixaban
Vitesse de croissance du caillot	<i>0,0573</i>	0,0132
Temps de latence	<i>$p < 10^{-4}$</i>	<i>$p < 10^{-4}$</i>
Vitesse initiale de croissance	<i>$p < 10^{-4}$</i>	<i>$p < 10^{-4}$</i>
Taille du caillot	<i>$p < 10^{-4}$</i>	0,0043
Densité du caillot	<i>0,0671</i>	<i>0,4869</i>
Apparition des caillots spontanés	<i>0,2516</i>	<i>0,2014</i>

Mesures réalisées *ex vivo* chez les patients de l'étude ADAGE à l'aide du système Thrombodynamics-4D. Un résultat en italique est non significatif (seuil de significativité $p < 0,05$).

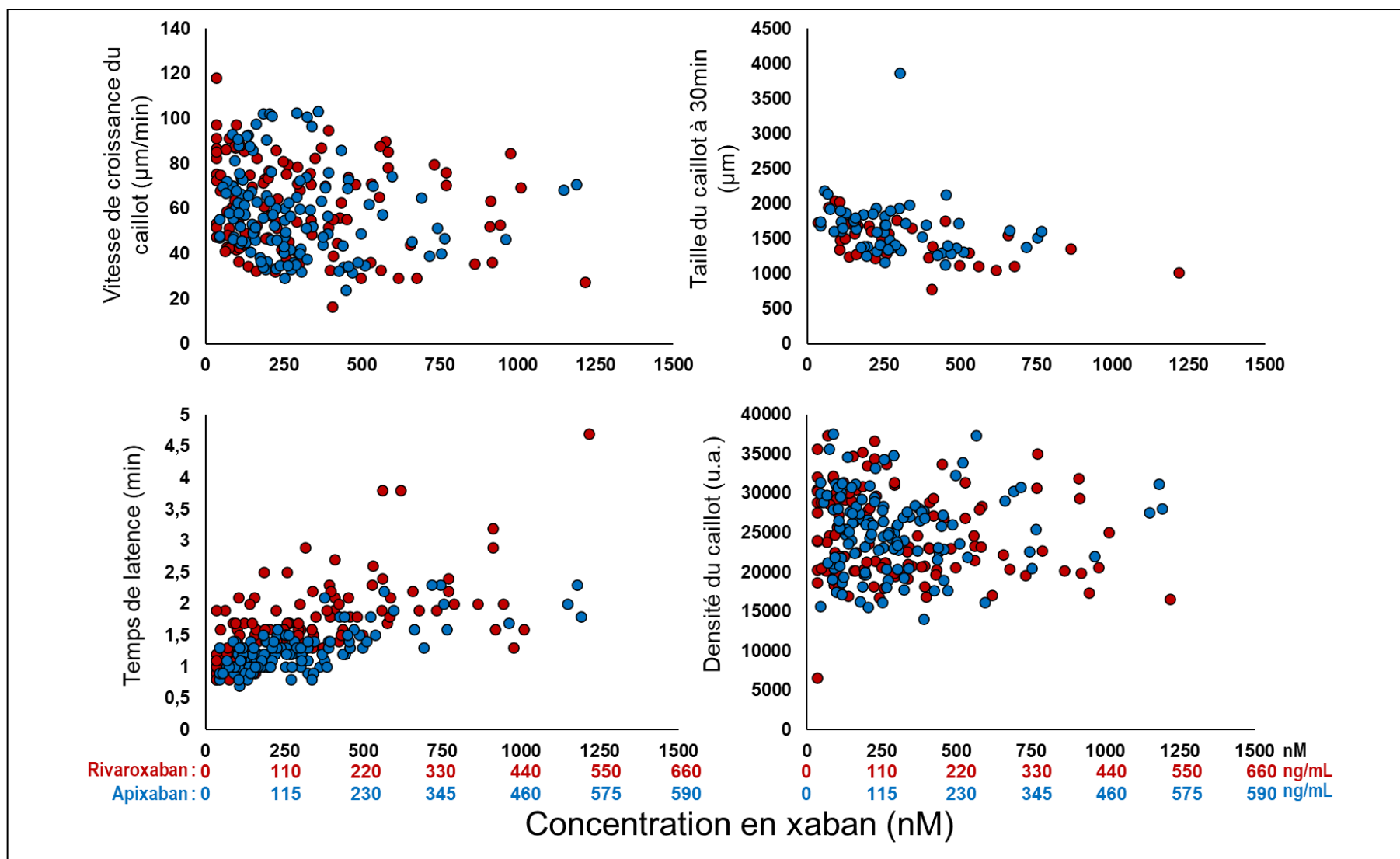


Figure 43 : Effet des xabans sur les paramètres de fibrinographie chez les patients ADAGE.

Mesures réalisées avec le système Thrombodynamics-4D chez les sujets âgés de l'étude ADAGE. Les données issues des patients traités par rivaroxaban et apixaban sont représentées en rouge et en bleu, respectivement.

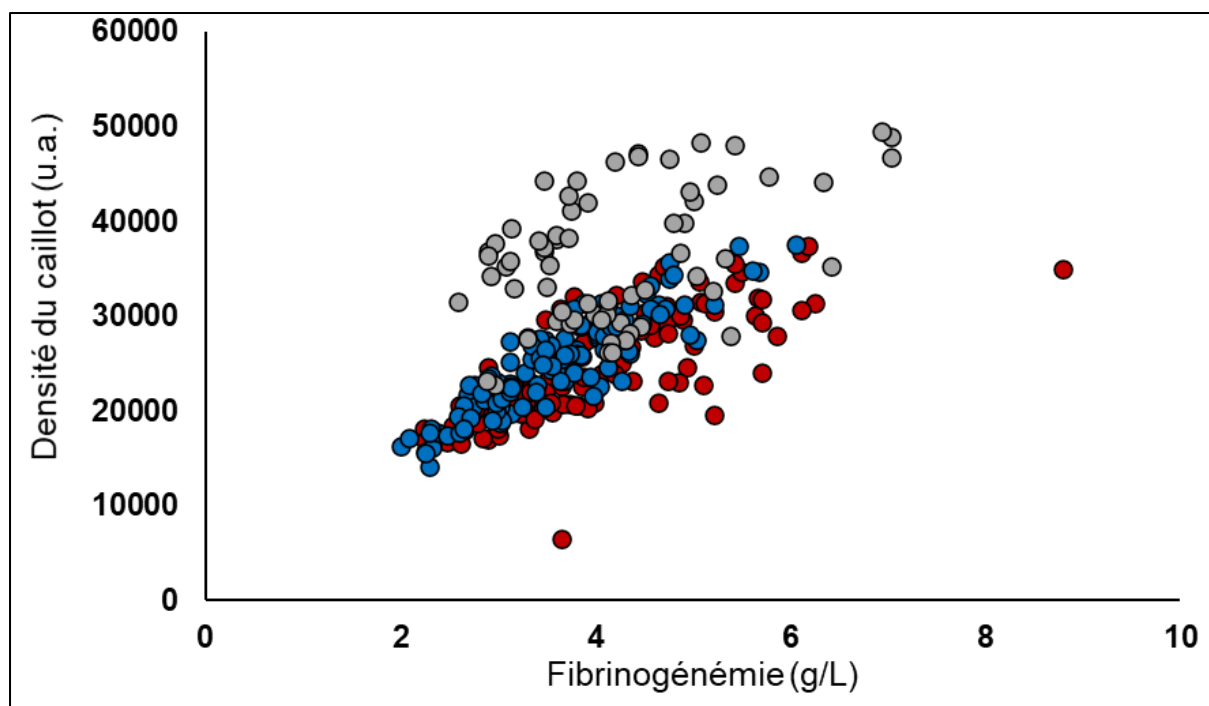


Figure 44 : Densité du caillot en fonction du fibrinogène chez les patients ADAGE.
Échantillons provenant des patients ADAGE traités par rivaroxaban (rouge), apixaban (bleu) et dabigatran (gris). Dans les trois groupes de patients étudiés, le caillot de fibrine était d'autant plus dense que la fibrinogénémie était élevée ($p < 10^{-4}$). Mesures réalisées avec le système Thrombodynamics-4D.

VII.4. Effet du dabigatran sur la thrombinographie et la fibrinographie en fonction des concentrations plasmatiques chez les patients ADAGE

VII.4.1. Paramètres de thrombinographie

À l'instar des résultats obtenus *in vitro*, d'excellentes corrélations ont été obtenues entre la valeur des paramètres de thrombinographie et les concentrations en dabigatran ($p < 10^{-4}$). Pour des concentrations croissantes, le dabigatran provoque un allongement des paramètres temporels (Lag_ATG et Tmax_ATG) et une diminution de la valeur des paramètres quantitatifs (Cmax_ATG et ETP_ATG). Ces résultats sont montrés en Figure 45.

VII.4.2. Paramètres de fibrinographie

Les résultats de fibrinographie montrent l'existence de corrélations de significativité statistique variable entre les concentrations en dabigatran et la vitesse de croissance du caillot, le temps de latence, la vitesse initiale et la taille du caillot à 30 minutes (Figure 46). Comme attendu au vu des résultats chez les patients traités par rivaroxaban et apixaban, le dabigatran n'influence ni la densité du caillot, ni le temps d'apparition des caillots spontanés.

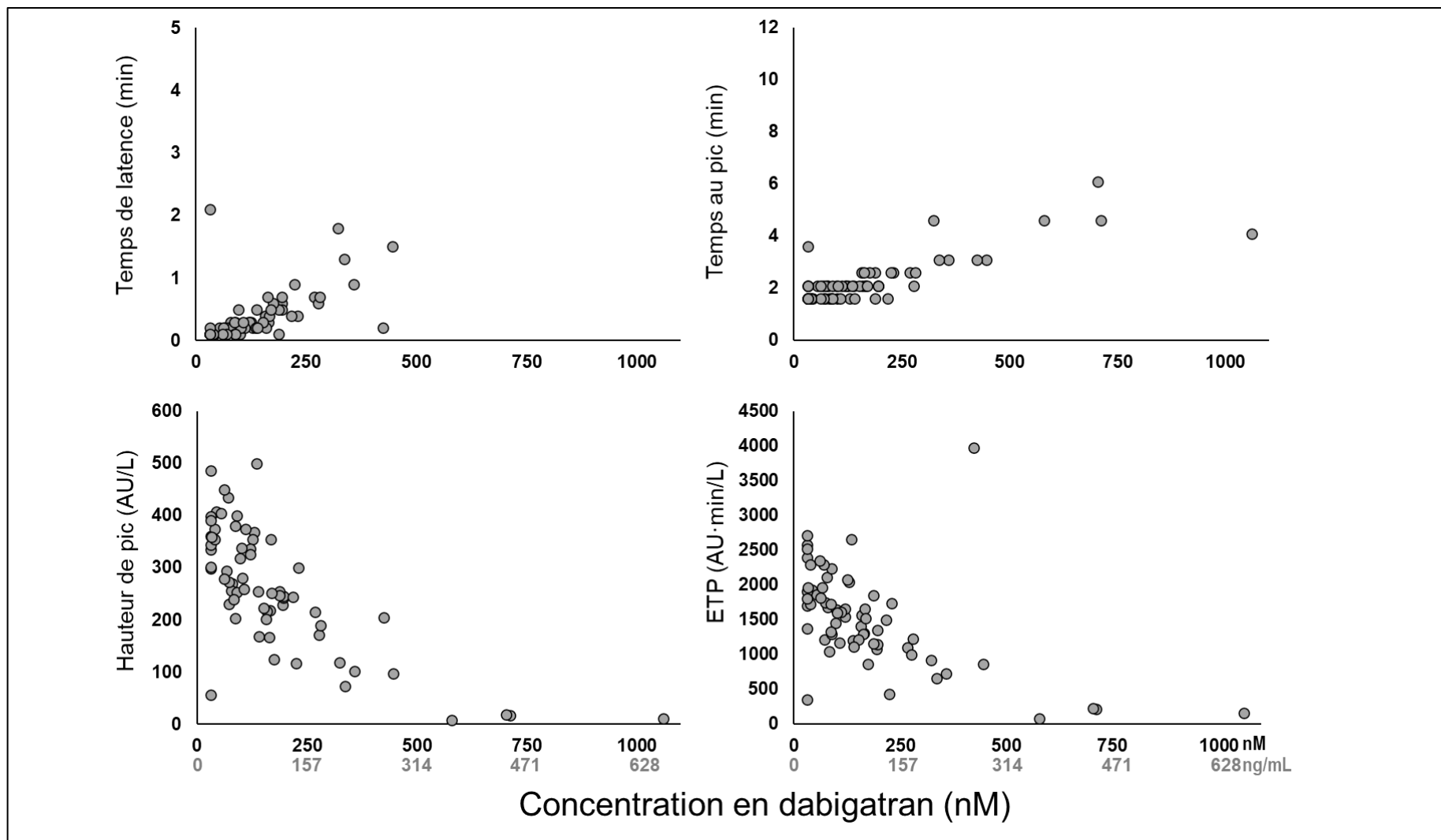


Figure 45 : Effet du dabigatran sur les paramètres de thrombinographie chez les patients ADAGE.

Mesures réalisées à l'aide du système *Thrombodynamics-4D*.

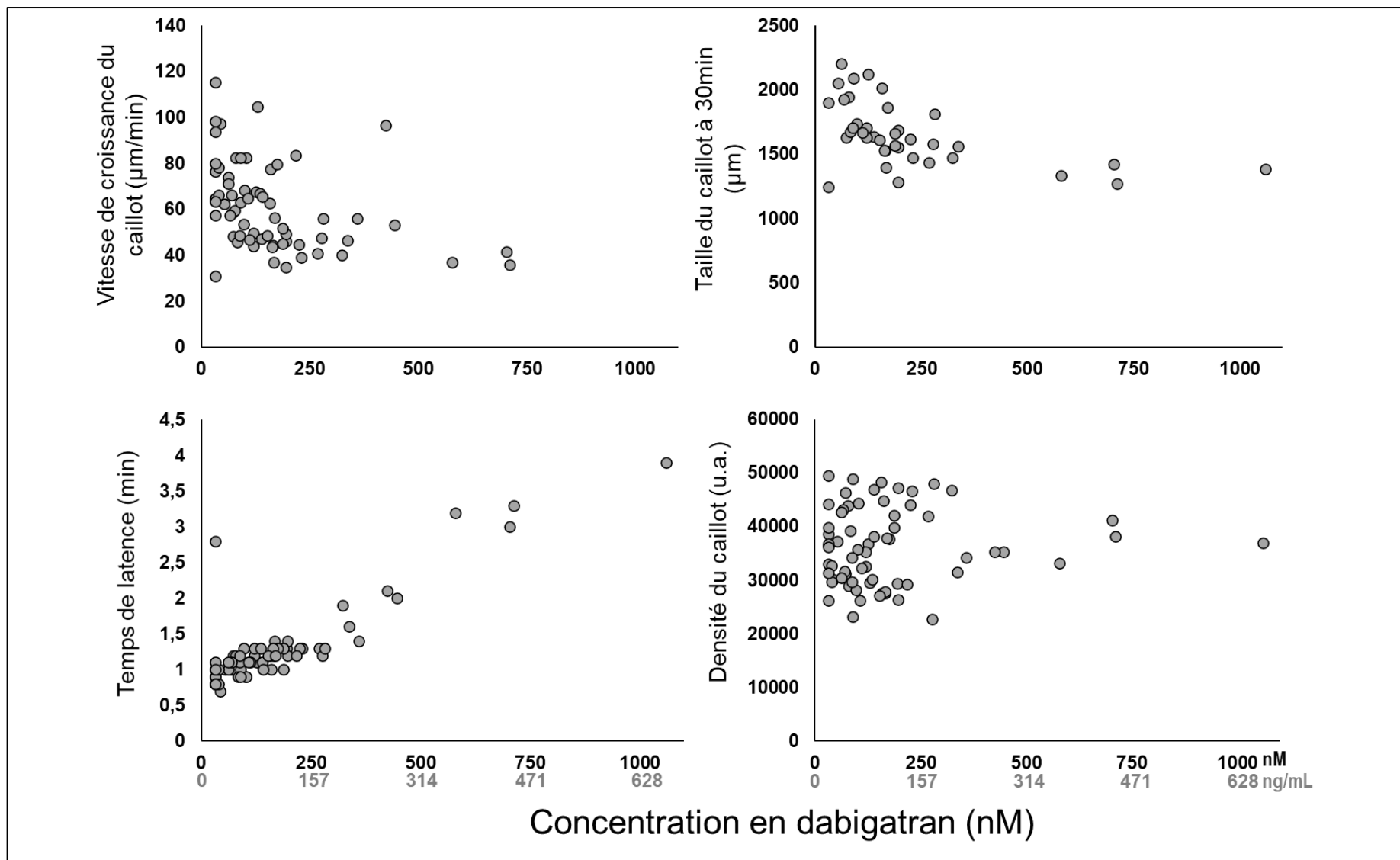


Figure 46 : Effet du dabigatran sur les paramètres de fibrinogénèse chez les patients ADAGE

Mesures réalisées à l'aide du système *Thrombodynamics-4D*.

VIII. CONCLUSION

Avec ses différents paramètres, le TGT apparaît comme un excellent candidat pour explorer les états d'hypocoagulabilité, par rapport aux examens usuels TP et TCA. Ces derniers n'explorent que la phase initiale de la coagulation : puisqu'un plasma coagule dès qu'environ 5 % de la thrombine totale est générée, correspondant à une concentration de 10 à 30 nM de thrombine [243], il reste 95 % de la thrombine générée non explorée par ces tests. De plus, ces examens ne fournissent aucune information sur les inhibiteurs naturels de la coagulation (antithrombine, système de la protéine C activée) ou sur l'activité élevée des facteurs pro-coagulants [77].

Les deux systèmes de génération de thrombine utilisés pour cette partie de l'étude, le ST-Genesis conçu par Stago et le Thrombodynamics-4D conçu par Hemacore LLC, apparaissent comme deux systèmes fiables et prometteurs pour explorer la pharmacodynamie des AOD. Tous deux mesurent la thrombine générée suivant le principe de fluorescence d'Hemker, avec déclenchement par apport de facteur tissulaire mais dans des conditions très différentes. Le ST-Genesis permet un déclenchement avec une concentration forte (DS) ou intermédiaire (TS) de facteur tissulaire, cette dernière en présence et en l'absence de thrombomoduline tandis que le Thrombodynamics-4D apporte le facteur tissulaire fixé sur un insert, mis en contact avec le plasma à tester. L'étude *in vitro* montre que les AOD provoquent un allongement des temps de latence et temps au pic et diminution des concentrations maximales de thrombine et de l'ETP, de façon liée à la concentration. Des résultats similaires sont obtenus chez les patients ADAGE traités par AOD pour fibrillation atriale. Néanmoins, la mesure de l'ETP apparaît comme étant moins fiable, en accord avec des données issues de la littérature [191,210].

Les paramètres de fibrinographie semblent plus délicats d'interprétation : seul, le temps de latence est fortement corrélé aux concentrations d'AOD. La densité du caillot est fortement corrélée au taux de fibrinogène (Figure 44). Néanmoins l'état d'hypercoagulabilité du sujet âgé pourrait fausser les autres paramètres, tandis que les paramètres cinétiques semblent être influencés à la fois par le taux de fibrinogène et par les concentrations en AOD.

Ces deux systèmes diffèrent dans leur protocole d'utilisation, mais leur utilisation reste simple et accessible avec une simple formation adaptée. Avec plus de 500 échantillons analysés pour cette partie de l'étude, il apparaît que chacun des deux systèmes possède ses avantages et inconvénients. Le ST-Genesis, avec sa calibration

quotidienne et ses nombreux niveaux de CIQ, présente des performances analytiques à la hauteur des attentes qualité d'un laboratoire de biologie. Il permet une analyse de la génération de thrombine en grandes séries et ferait donc un candidat idéal pour une utilisation hospitalière. Les différents réactifs proposés par le fabricant permettent d'adapter ses indications. Le STG-ThromboScreen semble notamment être un bon candidat pour étudier la variabilité interindividuelle de la réponse aux xabans, l'ajout de thrombomoduline apportant des informations supplémentaires sur l'effet des inhibiteurs de la coagulation.

Le Thrombodynamics-4D quant à lui est très simple à manier et permet une analyse en très petites à petites séries. Les informations complémentaires apportées par la fibrinographie en font un système de premier choix pour une étude poussée de l'hémostase chez des patients isolés (Annexe 4).

Pour conclure, cette étude de la pharmacodynamie des AOD avec ces deux systèmes innovants de génération de thrombine confirme donc leur intérêt chez le sujet âgé. Si un suivi pharmacodynamique régulier n'est pas pertinent en routine, certains patients à haut risque hémorragique ou thrombotique pourrait en tirer individuellement un bénéfice, permettant ainsi une meilleure gestion de leur anticoagulation [187–190].

PARTIE IV — FACTEURS DE VARIABILITÉ DE LA RÉPONSE AUX XABANS

I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le travail mené pour cette thèse nous a permis jusqu'ici de caractériser l'évolution des concentrations en AOD en fonction du temps écoulé après la prise et l'effet de ces médicaments sur l'hémostase des patients à l'aide de la génération de thrombine. Nous nous sommes ensuite intéressés aux causes potentielles de variabilité inter-individuelle de la réponse aux xabans chez les patients ADAGE. Au vu du nombre limité de patients traités par dabigatran dans l'étude ADAGE, la variabilité de la réponse n'a été explorée que chez les patients traités par rivaroxaban ou par apixaban.

Pour mémoire, dans la cohorte ADAGE, la variabilité pharmacocinétique observée chez les patients traités par rivaroxaban était tout à fait comparable à celle observée chez les patients traités par apixaban. Chez les patients traités par rivaroxaban 15 mg, la variabilité pharmacocinétique, estimée par le coefficient de variation des concentrations ici donné avec son intervalle de confiance à 95 %, était de 49 % [41 ; 57] au pic apparent et de 64 % [58 ; 70] en résiduel, alors que chez ceux recevant de l'apixaban 2,5 mg ×2, elle était respectivement de 47 % [39 ; 54] et 60 % [55 ; 62] au pic apparent et en résiduel. La variabilité pharmacodynamique, au sens de l'effet sur la génération de thrombine, quant à elle, est particulièrement marquée pour les paramètres PH et ETP obtenus avec une concentration intermédiaire en facteur tissulaire (STG-ThromboScreen ; Figure 47). Dans ces conditions, concernant les patients recevant du rivaroxaban à la posologie de 15 mg/j, les coefficients de variation à T_{max} et à T_{min} étaient respectivement de 42,7 % [32,2 ; 53,3] et 53,4 % [45,4 ; 61,4] pour la hauteur de pic, 44,8 % [34,2 ; 55,4] et 30,9 % [23,5 ; 38,3] pour l'ETP. Concernant l'apixaban à la posologie de 2,5 mg ×2/j, les coefficients de variation à T_{max} et à T_{min} étaient respectivement de 91,2 % [85,7 ; 96,8] et 61,0 % [54,0 ; 67,9] pour la hauteur de pic, et de 54,2 % [44,5 ; 63,9] et 34,5 % [28,7 ; 42,3] pour l'ETP.

Comme évoqué précédemment, les études de pharmacocinétique nécessaires à la mise sur le marché de ces deux xabans ont montré des similitudes dans leurs profils pharmacocinétiques respectifs, telles qu'un taux de liaison aux protéines plasmatiques élevé, des voies de métabolisme et de transports communes (CYP3A4/5, P-gp...) ou encore

une élimination par voie rénale dont une part non négligeable (27 à 33 %) sous forme inchangée [123–125,129,130]. Pour ces deux médicaments, l'âge a également été identifié comme un facteur de variabilité de la réponse [127,131], avec cependant très peu d'octogénaires et de nonagénaires inclus dans les études cliniques.

Cette partie de thèse est consacrée aux différents facteurs démographiques, clinico-biologiques, thérapeutiques et pharmacogénétiques contribuant à expliquer la variabilité pharmacocinétique et la variabilité pharmacodynamique aux xabans chez les patients ADAGE, permettant ainsi d'identifier des déterminants de la réponse pharmacodynamique qui pourraient être distincts de la réponse pharmacocinétique.

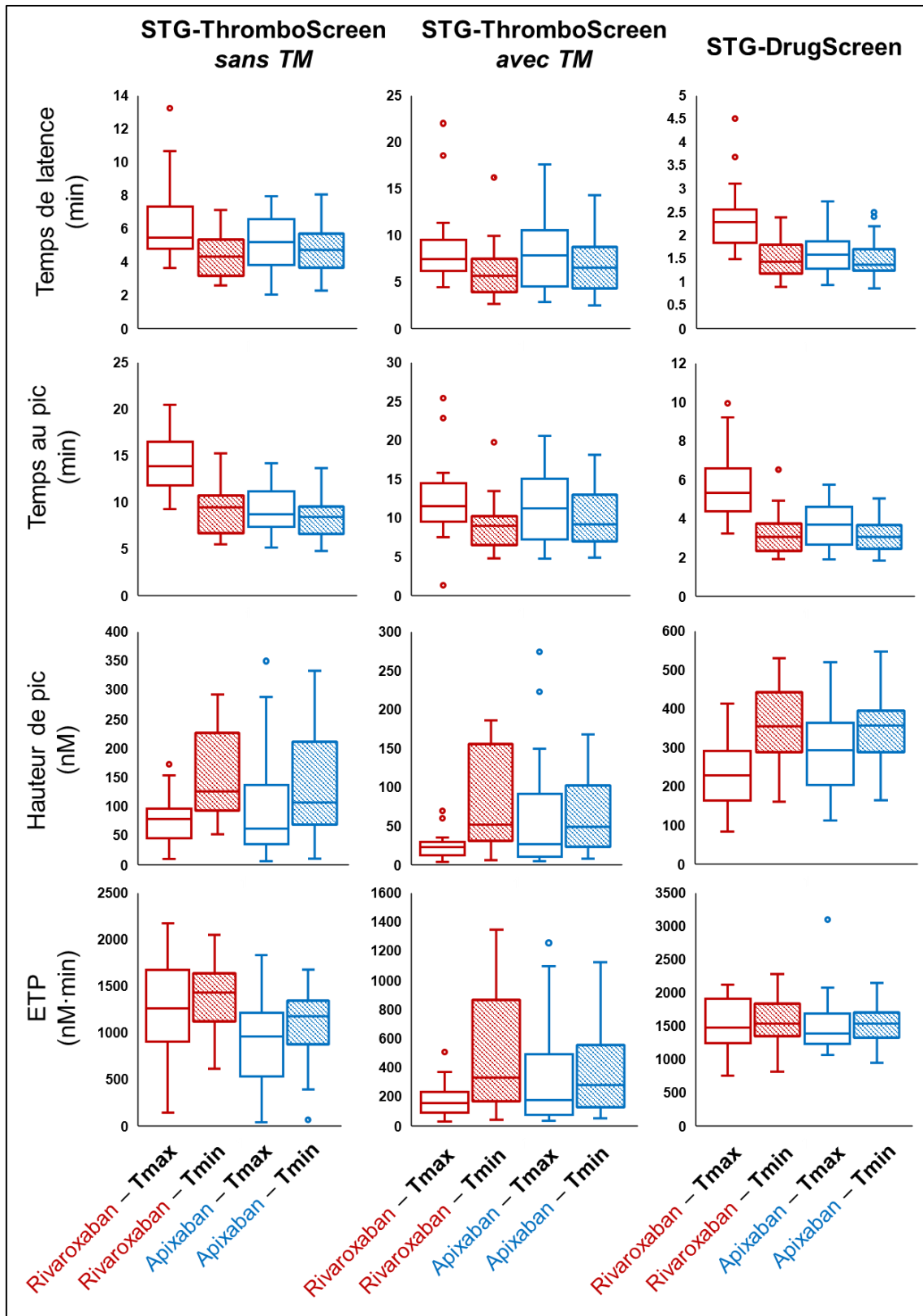


Figure 47 : Variabilité pharmacodynamique de la réponse au xabans, étudiée en génération de thrombine.

Les boîtes à moustaches rouges et bleues représentent la distribution des valeurs des paramètres de génération de thrombine mesurées chez les patients recevant du rivaroxaban et de l'apixaban respectivement, toutes posologies confondues. L'amplitude des boîtes permet de visualiser l'importante variabilité inter-individuelle de ces paramètres. Les boîtes vides représentent les résultats pour les prélèvements à T_{max} , les boîtes hachurées ceux des prélèvements à T_{min} . Mesures réalisées avec le système ST-Genesis

II. FACTEURS DÉMOGRAPHIQUES, CLINICO-BIOLOGIQUES, THÉRAPEUTIQUES ET PHARMACOGÉNÉTIQUES : DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

II.1. Effet de l'âge, du poids et de la fonction rénale sur la pharmacocinétique du rivaroxaban

Une étude de phase II d'escalade de doses a été menée spécifiquement chez le sujet sain d'âge supérieur à 60 ans : 48 sujets d'âge moyen 66 ans (extrêmes 60–76 ans) ont été randomisés pour recevoir une dose unique de 30, 40 ou 50 mg de rivaroxaban ou un placebo. La demi-vie d'élimination variait de 11,7 à 13,3 h selon les groupes [244]. Une autre étude PK/PD de population réalisée à partir des données de deux études randomisées de phase II et de phase III (ODIXa-DVT et EINSTEIN-DVT) menées chez des patients avec thrombose veineuse profonde ayant reçu des doses allant de 10 mg × 1/j à 30 mg × 2/j selon les groupes [166] visait à réaliser, à partir du modèle obtenu, une simulation du profil pharmacocinétique du rivaroxaban chez les patients en fibrillation atriale en fonction de variables individuelles. Les résultats obtenus à partir de 870 patients d'âge moyen 61 ans (dont 10 % de plus de 75 ans), avec une clairance de la créatinine moyenne de 87 mL/min, montrent que la clairance du rivaroxaban est, selon les auteurs, modérément influencée par l'âge et la fonction rénale. Pour un patient âgé de 90 ans, le modèle prédit néanmoins une augmentation de 35 % de l'exposition au rivaroxaban liée à l'âge ; l'exposition est par ailleurs augmentée, selon la modélisation, de 40 % en cas d'insuffisance rénale modérée. Il a pu être simulé qu'une dose de 15 mg × 1/j administrée à des patients avec clairance comprise entre 30 et 49 mL/min (dose non testée dans l'essai de phase II mais testée dans l'essai ROCKET-AF de phase III) permettait d'obtenir une exposition au rivaroxaban (estimée par l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques ou la concentration plasmatique maximale) similaire à celle de patients recevant 20 mg avec une fonction rénale normale. Ce modèle PK/PD réalisé à partir de patients sélectionnés d'études de phase II et III dans la thrombose veineuse profonde n'a pas fait l'objet de validation prospective dans une population de patients de plus de 80 ans en fibrillation atriale combinant âge avancé, fonction rénale altérée et polymédication. De plus, les inhibiteurs, inducteurs ou substrats de la P-gp n'ont fait l'objet d'aucune mention dans cette étude.

II.2. Effet de l'âge, du poids et de la fonction rénale sur la pharmacocinétique de l'apixaban

Plusieurs facteurs de variabilité de la réponse à l'apixaban ont été mis en évidence jusqu'à présent : l'exposition aux concentrations plasmatiques d'apixaban est majorée de 16 %, 29 % et 44 %, respectivement, en cas d'insuffisance rénale légère (clairance de la créatinine de 51 à 80 mL/min), modérée (de 30 à 50 mL/min) ou sévère (de 15 à 29 mL/min), comparée à des patients non insuffisants rénaux [102]. La pharmacocinétique de l'apixaban en cas d'insuffisance rénale très sévère (clairance de la créatinine inférieure à 15 mL/min) n'a pas été étudiée et l'utilisation du médicament est contre-indiquée actuellement dans ces cas. Il a cependant été établi que la fonction rénale avait un effet plus marqué sur la pharmacocinétique du rivaroxaban que sur celle de l'apixaban [232].

Il a aussi été montré une influence de l'âge et du poids corporel. Chez les sujets de moins de 50 kg, la concentration maximale et l'aire sous la courbe sont majorées de 30 % et 20 % respectivement, comparées à des personnes de 60 à 85 kg, la gamme de poids de référence employée [245]. Dans une autre étude, la concentration maximale n'était pas modifiée dans des proportions cliniquement pertinentes (+7 %) mais l'exposition totale augmentée de 32 % chez des sujets âgés en bonne santé, comparés à des patients plus jeunes [131]. Cependant, les personnes incluses dans cette étude n'étaient pas très âgées (âge moyen 75 ± 5 ans chez les hommes et 69 ± 3 ans chez les femmes) et étaient en bonne santé. Aucune étude n'a encore étudié la pharmacocinétique de l'apixaban chez des patients très âgés ni chez des patients âgés atteints de comorbidités multiples, pourtant des patients très habituels dans la pratique clinique gériatrique.

III. FACTEURS THÉRAPEUTIQUES ET PHARMACOGÉNÉTIQUES

III.1. La glycoprotéine P

La glycoprotéine P (P-gp) est une protéine transmembranaire codée par le gène *ABCB1*. Également appelée MDR1, pour « *MultiDrug Resistance* », elle fait partie de la famille des transporteurs possédant un site de fixation de l'adénosine triphosphate (ATP), site dit « *ATP-binding cassette* » et dépendant de l'ATP pour fonctionner [246]. Elle favorise l'élimination des xénobiotiques, notamment du rivaroxaban et de l'apixaban pour ce qui nous intéresse ici. Elle est localisée au niveau de différentes barrières : barrière intestinale, où elle limite l'absorption en rejetant les xénobiotiques dans la lumière

intestinale ; dans le rein, au niveau des tubules proximaux rénaux, où elle favorise l'élimination hors de l'organisme du médicament. Pour s'affranchir des gradients de concentration, l'énergie est fournie par l'hydrolyse de l'ATP : l'efflux est donc actif, quelle que soit la concentration en xénobiotique considérée dans les différents compartiments. Conséquemment, l'inhibition de cette voie d'élimination (par un autre médicament par exemple) provoquera une hausse des concentrations plasmatiques en AOD [126,160]. L'une des causes de variabilité de réponse au médicament réside donc dans la modulation de l'activité de la P-gp, sous l'influence de facteurs environnementaux ou génétiques.

Si certaines molécules comme le rivaroxaban et l'apixaban sont de simples substrats de la P-gp, d'autres comme l'amiodarone ou la fluoxétine en sont des inhibiteurs, et d'autres encore sont à la fois inhibiteur et substrat [247]. Ainsi, en présence à la fois d'un substrat et d'un inhibiteur, l'activité de pompe d'efflux des xénobiotiques P-gp est diminuée de façon variable suivant la puissance de l'inhibiteur. Il peut en résulter une réduction de l'élimination du principe actif et donc une exposition au médicament plus importante pour le patient. Selon le contexte, les conséquences sont diverses : majoration du risque d'effet indésirable, voire apparition d'une toxicité.

Par ailleurs, des polymorphismes (ou variants) du gène *ABCB1*, pertes de fonction, ont été identifiés : en diminuant l'activité de la P-gp, ils sont potentiellement à l'origine de l'augmentation de l'exposition à certains principes actifs substrats de P-gp [245,247]. C'est le cas de la carbamazépine indiquée dans l'épilepsie, des inhibiteurs de protéases comme l'atazanavir utilisé dans le traitement de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, de la paroxétine (antidépresseur) ou de la fluindione (AVK) [248].

Ces variants génétiques sont soit des mutations faux-sens, soit des mutations silencieuses ; certains de ces variants sont en déséquilibre de liaison, avec une distribution des génotypes variable selon les ethnies :

- rs1128503 c.1236C>T (*Gly412Gly*) situé dans l'exon 12 ;
- rs2032582 c.2677G>A/T (Ala893Ser/Thr) situé dans l'exon 21 (variant tri-allélique) ;
- rs1045642 c.3435C>T (Ile1145Ile) situé dans l'exon 26, en fort déséquilibre de liaison avec le variant de l'exon 21.

Leur potentiel effet concernant les xabans n'a donné lieu qu'à très peu d'études dans la littérature [249–251].

Pour étudier l'influence potentielle de ces polymorphismes sur la réponse pharmacocinétique au rivaroxaban, l'essai DRIVING (*New oral anticoagulant drug*

Dabigatran etexilate and RIVaroxaban: INfluence of Genetic factors in healthy volunteers) a été mené par notre groupe [231]. C'est une étude randomisée, ouverte, en *cross-over* et bi-centrique, dont l'objectif principal était d'évaluer l'impact des polymorphismes de la P-gp sur la variabilité de la réponse au rivaroxaban après une prise unique orale de 40 mg (ainsi que celle au dabigatran étexilate) chez des volontaires sains masculins âgés de moins de 45 ans. Ces volontaires ont été sélectionnés en fonction de leur génotype d'*ABCB1* (exon 26) : 20 volontaires étaient homozygotes sauvages, 20 hétérozygotes et 20 homozygotes mutés (quelle que soit ici la nature de la mutation pour le variant 2677). Dans cet essai, le coefficient de variation de la réponse pharmacocinétique au rivaroxaban, estimée par l'aire sous la courbe obtenue à l'aide de 10 points de mesure dans les 24 h suivant la prise, est de 51 % pour l'ensemble des volontaires. La différence d'exposition entre les trois groupes est inférieure à 20 % [231]. Une étude russe menée chez des patients en chirurgie orthopédique a montré des résultats similaires pour le rs1045642 d'*ABCB1* [250]. Aucune donnée n'est actuellement disponible chez les sujets très âgés.

Très peu de données sont disponibles pour l'apixaban, sinon une étude menée chez des patients japonais avec fibrillation atriale, suggérant que les concentrations résiduelles n'étaient pas influencées par les polymorphismes d'*ABCB1* [251].

III.2. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) sont des sources potentielles de variabilité de la réponse aux médicaments. En effet, ils interviennent dans la métabolisation des xénobiotiques en métabolites actifs ou inactifs, en rendant les xénobiotiques plus hydrosolubles, favorisant ainsi leur élimination rénale. Il existe de nombreuses familles de cytochromes P450 et nombre d'entre eux présente des variants, qui, en thérapeutique, à l'instar de la P-gp, impactent différents médicaments. Ces polymorphismes peuvent se traduire par une activité enzymatique amplifiée ou diminuée, donc une demi-vie modifiée des xénobiotiques. Ainsi, selon les variants génétiques considérés dans une population, il est possible de distinguer des métaboliseurs lents ou rapides. Dans le cas d'un médicament inactivé par les cytochromes, un sujet dit « métaboliseur lent » sera plus longtemps exposé au médicament avec un risque d'effets indésirables majoré alors qu'un métaboliseur rapide l'éliminera plus vite, au risque au risque d'obtenir un effet moindre du médicament.

Les polymorphismes de deux cytochromes P450 sont potentiellement impliqués dans l'effet du rivaroxaban et de l'apixaban :

- *CYP3A4/5* rs776746 (c.6986A>G) aussi appelé *CYP3A5*3* (variant intronique)
- *CYP2J2* rs890293 (c.-76G>T) aussi appelé *CYP2J2*7*

Les travaux de Mueck et collègues ont montré que le rivaroxaban est un substrat du *CYP2J2*, et que ce dernier est responsable de 14 % de l'élimination du rivaroxaban. Néanmoins, si les inhibiteurs du *CYP2J2* testés dans cette étude ont un impact significatif sur la réponse au rivaroxaban [252], ils sont également inhibiteurs du *CYP3A4/5* et de la P-gp. Aussi, il est peu aisé de prédire la part de responsabilité de ce cytochrome P450 dans la variabilité de la réponse au rivaroxaban, au vu des données actuelles de la littérature [252]. Par ailleurs, les données en vie réelle concernant l'impact de ces variants sur la pharmacocinétique du rivaroxaban [250] et de l'apixaban [253] sont très limitées.

III.3. Principaux médicaments modulateurs de P-gp ou CYP

En plus de cette variabilité potentielle pharmacogénétique, de nombreux médicaments peuvent moduler l'activité de la P-gp ou des CYP et être source d'interactions médicamenteuses (Tableau 26). C'est par exemple le cas des antiarythmiques tels que l'amiodarone ou le vérapamil qui sont tous deux inhibiteurs à la fois de la P-gp et du *CYP3A4/5*. En outre, l'amiodarone est connue pour entraîner une augmentation mineure de l'aire sous la courbe des concentrations en rivaroxaban mais son effet sur l'apixaban n'est pas connu [160]. Les anti-hypertenseurs sont également concernés, comme le bisoprolol, le losartan et l'irbésartan qui peuvent interagir avec la P-gp, ou l'amlodipine qui est un substrat du *CYP3A4/5*. Les médicaments du système nerveux central sont aussi fortement représentés : certains inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine comme le citalopram sont substrats de la P-gp et du *CYP3A4/5* tandis que la sertraline et la paroxétine sont des inhibiteurs de la P-gp. D'autres antidépresseurs (venlafaxine, mirtazapine) et certains neuroleptiques atypiques (quétiapine, rispéridone) sont également concernés par ce risque d'interactions [254]. Il existe par ailleurs des inducteurs puissants de CYP tels la rifampicine, le phénobarbital, la carbamazépine, le millepertuis, diminuant l'effet des médicaments et, pour cette raison, pouvant contre-indiquer leur association comme c'est le cas pour les xabans.

Tableau 26 : Exemples de molécules pouvant interagir avec la P-gp.

Molécule	P-gp		CYP3A4/5	
	substrat	inhibiteur	substrat	inhibiteur
Antiarythmiques				
amiodarone	Non	Oui	Oui	Oui
diltiazem	Oui	Oui	Oui	Oui
vérapamil	Oui	Oui	Oui	Oui
Anticoagulants et antiagrégants				
apixaban	Oui	Non	Oui	Non
clopidogrel	Oui	Non	Oui	Non
dabigatran	Oui	Non	Non	Non
rivaroxaban	Oui	Non	Oui	Non
Anti-hypertenseurs				
amlodipine	Non	Non	Oui	Non
bisoprolol	Oui	Non	Non	Non
irbésartan	Non	Oui	Non	Non
losartan	Oui	Non	Non	Non
Hypolipémiants				
atorvastatine	Oui	Non	Oui	Non
fluvastatine	Oui	Non	Non	Non
simvastatine	Non	Oui	Oui	Non
Médicaments du SNC*				
alprazolam	Non	Non	Oui	Non
citalopram	Oui	Non	Oui	Non
mirtazapine	Non	Non	Oui	Non
paroxétine	Non	Oui	Non	Non
quétiapine	Non	Oui	Oui	Non
rispéridone	Oui	Non	Non	Non
sertraline	Non	Oui	Non	Non
venlafaxine	Oui	Non	Non	Non

Liste non exhaustive des principales molécules thérapeutiques employées en gériatrie pouvant être impliquées dans des interactions médicamenteuses médiées par la P-gp ou le CYP3A4/5. Données provenant du service de Pharmacologie et Toxicologie cliniques des Hôpitaux universitaires de Genève [254].*SNC : Système nerveux central.

III.4. Génotypage des variants moléculaires des patients ADAGE

III.4.1. Extraction d'ADN.

Les extractions d'ADN. ont été réalisées manuellement à l'aide des kits E.Z.N.A.®SQ Blood DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, Géorgie, États-Unis) selon les recommandations du fournisseur. Pour l'extraction, la prise d'essai était de 300 µL de culot globulaire (conservé à -80°C). Ce kit se compose de quatre tampons : un tampon de lyse des érythrocytes (ERL Buffer), un tampon de lyse des leucocytes (WTL Buffer), un tampon de précipitation des protéines (PCP Buffer) et un tampon d'élution (EB Buffer).

III.4.2. Génotypage par discrimination allélique

Protocole

Le génotypage de l'ADN des patients a été réalisé par discrimination allélique par sondes fluorescentes (*Drug Metabolism Genotyping Assay*, Applied Biosystems®) sur un appareil QuantStudio 6-Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific®) assisté par le logiciel QuantStudio® (Thermo Fisher Scientific®). Des témoins aux génotypes connus (mutés et non mutés) ont été analysés en parallèle dans chaque série. Le génotypage a été réalisé par Candice Cavalié et moi-même. Différentes étapes de préparation sont nécessaires :

- réalisation du « PCR-mix » : mélange du Mastermix (Taqman® universal PCR mastermix, Applied Biosystem) contenant tampon, Taq-polymérase et dNTP et les sondes correspondantes au polymorphisme étudié ;
- préparation de la plaque 96 puits : dans chaque puits, ajout de 5,25 µL de « PCR-mix » et 4,75 µL de la solution contenant l'A. D. N. à analyser (ou l'A. D. N. témoin pour les puits témoins) puis centrifugation de la plaque à 2 300 tours/min pendant 3 minutes.

Principe

La discrimination allélique par sondes est une PCR (réaction en chaîne par polymérase – *polymerase chain reaction*) semi-quantitative mettant en jeu deux sondes spécifiques marquées par deux fluorophores émettant à des longueurs d'ondes différentes ainsi qu'un couple d'amorces sens et antisens spécifiques de la séquence d'intérêt du gène à étudier. Les sondes diffèrent d'un seul nucléotide défini par le variant à étudier et sont couplées au fluorochrome FAM pour l'allèle sauvage et au fluorochrome VIC pour l'allèle variant. Chaque sonde porte un « *quencher* » qui réabsorbe les photons émis par le fluorochrome porté par la sonde lorsque celle-ci est à l'état basal, masquant la fluorescence. La dénaturation de l'A. D. N. à 95 °C libère les simples brins d'ADN. Chaque sonde se fixe spécifiquement sur l'allèle cible encadrée par les amorces sens et antisens (phase d'hybridation). Lors de l'élongation, la Taq polymérase qui possède une activité exonucléasique 5' > 3' va dégrader la sonde hybridée au niveau du polymorphisme. Le *quencher* n'étant plus à proximité immédiate du fluorochrome, il n'inhibera plus son émission de fluorescence et un signal sera émis et quantifié. La fluorescence émise est proportionnelle à la dégradation de la sonde et reflète donc la présence ou l'absence de l'allèle étudié.

III.5. Profils thérapeutiques et génétiques observés chez les patients ADAGE

III.5.1. Interactions médicamenteuses potentielles chez les patients ADAGE

Parmi les médicaments pouvant être impliqués dans des interactions médicamenteuses médiées par la P-gp ou les CYP, le bisoprolol était le plus fréquemment retrouvé dans cette cohorte et concernait 40,5 % des patients. D'autres médicaments du système cardio-vasculaire étaient également fréquemment retrouvés : l'amiodarone chez 21,0 % des patients et l'amlodipine pour 11,3 % d'entre eux. Les autres médicaments fréquemment retrouvés dans la cohorte étaient l'atorvastatine (hypolipémiant) chez 25,3 % des patients, le lansoprazole (inhibiteur de la pompe à protons) chez 17,1 % des patients et les antidépresseurs de la famille des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine chez 10,5 % des patients (notamment citalopram, paroxétine et sertraline).

III.5.2. Profils génétiques dans la cohorte

Les résultats de l'analyse des variants d'*ABCB1* codant la glycoprotéine P ainsi que ceux de *CYP2J2* et *CYP3A5* sont présentés dans le Tableau 27. La fréquence allélique des différents variants analysés ne diffère pas de celle rapportée dans la littérature chez les caucasiens [255]. Aucuns des variants étudiés ne présente de déviation significative de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Au total, 198 patients (92,1 %) ont bénéficié de cette étude génétique, soit 91,3 % et 92,8 % des patients traités par rivaroxaban et par apixaban respectivement. Les autres patients n'ont pas pu être étudiés en raison d'une quantité d'ADN extrait en trop faible quantité.

Concernant les variants d'*ABCB1*, les sujets sont majoritairement hétérozygotes (50,5 % pour le rs1128503 de l'exon 12 ; 51,5 % pour le rs2032582 tri-allélique de l'exon 21 ; 58,1 % pour le rs1128503 de l'exon 26). Pour les variants de *CYP2J2*, les patients de la cohorte sont très majoritairement homozygotes sauvages (84,3 % des patients) et seuls deux patients sont homozygotes mutés. Enfin, 82,2 % des patients sont homozygotes mutés pour *CYP3A5*.

Tableau 27 : Répartition des génotypes d'*ABCB1*, *CYP2J2* et *CYP3A5* dans la cohorte ADAGE.

	rivaroxaban	apixaban	total	répartition attendue
	<i>n</i> = 95	<i>n</i> = 103	<i>n</i> = 198	
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	%
rs1128503 <i>ABCB1</i> exon 12				
CC (<i>homozygote sauvage</i>)	32 (33,7)	27 (26,2)	59 (29,8)	32
CT (<i>hétérozygote</i>)	46 (48,4)	54 (52,4)	100 (50,5)	42
TT (<i>homozygote muté</i>)	17 (17,9)	22 (21,4)	39 (19,7)	26
rs2032582 : <i>ABCB1</i> exon 21				
GG (<i>homozygote sauvage</i>)	29 (30,5)	28 (27,2)	57 (28,8)	33
GA / GT (<i>hétérozygote</i>)	48 (50,5)	54 (52,4)	102 (51,5)	48
AA / AT / TT (<i>homozygote muté</i>)	18 (18,9)	21 (20,4)	39 (19,7)	19
rs1045642 : <i>ABCB1</i> exon 26				
CC (<i>homozygote sauvage</i>)	17 (17,9)	24 (23,3)	41 (20,7)	16
CT (<i>hétérozygote</i>)	60 (63,2)	55 (53,4)	115 (58,1)	61
TT (<i>homozygote muté</i>)	18 (18,9)	24 (23,3)	42 (21,2)	23
rs890293 <i>CYP2J2</i>(*7)				
GG (<i>homozygote sauvage</i>)	81 (85,3)	86 (83,5)	167 (84,3)	83
GT (<i>hétérozygote</i>)	13 (13,7)	16 (15,5)	29 (14,6)	13
TT (<i>homozygote muté</i>)	1 (1,0)	1 (1,0)	2 (1,0)	4
rs776746 <i>CYP3A5</i>(*3)†				
AA (<i>homozygote sauvage</i>)	1 (1,1)	1 (1,0)	2 (1,0)	1
AG (<i>hétérozygote</i>)	13 (13,8)	20 (19,6)	33 (16,8)	17
GG (<i>homozygote muté</i>)	80 (85,1)	81 (79,4)	161 (82,2)	82

† En raison d'une quantité d'ADN insuffisante chez deux patients (un du groupe rivaroxaban et un du groupe apixaban), la PCR n'a été réalisée que pour 196 patients. La répartition attendue des génotypes est celle dans la population générale d'origine caucasienne [255].

IV. ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel R (version 3.3.2), dans le département de biostatistiques de la Faculté de pharmacie de Paris (Dr E. Curis). Les variables retenues pour étudier l'influence potentielle des différentes variables démographiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques et génétiques sur l'activité anti-Xa plasmatique au pic et en résiduel d'une part, sur les paramètres de génération de thrombine (mesurés à la fois au pic et en résiduel) d'autre part, sont indiquées dans le Tableau 28. Cette analyse a été effectuée dans un premier temps variable par variable (analyse dite « univariée ») après transformation en log des variables expliquées : l'influence des variables qualitatives sur les différents critères a été étudiée en utilisant une analyse de la variance à un facteur ou un test de Kruskal-Wallis. Les variables quantitatives ont été analysées à l'aide du test de Spearman.

Une analyse multivariée a par ailleurs été réalisée, en combinant les variables prédictives d'intérêt dont la sélection est un compromis entre les variables d'intérêt, les variables révélées par l'analyse « univariée », les corrélations entre ces variables et les éventuels faibles effectifs ($n < 5$) de certaines catégories.

Toutes les analyses ont été faites au seuil $\alpha = 5 \%$, éventuellement après correction de multiplicité (méthode de Bonferroni).

Tableau 28 : Variables retenues pour l'analyse statistique.

Démographie	Thérapeutique
âge (<i>continue</i>)	amiodarone (<i>binaire</i>)
sexe (<i>binaire</i>)	antifongique azolé (<i>binaire</i>)
poids (<i>continue</i>)	≥ 1 médicament inhibiteur de P-gp* (<i>binaire</i>)
Comorbidités	≥ 1 médicament inhibiteur de CYP3A4/5* (<i>binaire</i>)
insuffisance cardiaque (<i>binaire</i>)	posologie (<i>quantitative discrète</i>)
Biologie	concentration en AOD, à T_{max} (<i>continue</i>)
albuminémie (<i>continue</i>)	concentration en AOD, à T_{min} (<i>continue</i>)
hémoglobulinémie (<i>continue</i>)	Génétique
clairance de la créatinine (<i>continue</i>)	<i>ABCB1</i> exon 12 (<i>nombre de mutations</i>)**
	<i>ABCB1</i> exon 21 (<i>nombre de mutations</i>)**
	<i>ABCB1</i> exon 26 (<i>nombre de mutations</i>)**
	<i>CYP3A5</i> (<i>nombre de mutations</i>)**
	<i>CYP2J2</i> (<i>nombre de mutations</i>)**

*Hors amiodarone. ** Homozygote sauvage (0), hétérozygote (1) ou homozygote muté (2).

V. FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE AU RIVAROXABAN

V.1. Variabilité pharmacocinétique

À T_{max} , nous n'avons pas pu mettre en évidence d'influence des différentes variables étudiées sur la concentration du rivaroxaban. Bien que les données suggèrent une augmentation des concentrations plasmatiques avec la posologie reçue de 12,7 % pour une augmentation de la dose de 2,5 mg (IC95 [-2,23 ; 30,0]) ce résultat n'est significatif ni en analyse univariée ($p = 0,0736$), ni en analyse multivariée ($p = 0,2138$). Cela pourrait toutefois refléter un manque de puissance.

À T_{min} , en analyse univariée, plusieurs facteurs sont associés à la concentration résiduelle en rivaroxaban : les patients traités par amiodarone ont des concentrations plus élevées comparativement à ceux qui n'en prennent pas (66,9 ng/mL contre 49,6 ng/mL ;

soit une augmentation de 47,7 % ; IC95 [0,1 ; 118,2] – $p = 0,0497$). De plus, la présence d'un inhibiteur de CYP3A4/5, hors amiodarone, est également associée à des concentrations plasmatiques 31,2 % plus élevées (IC95 [-0,2 ; 72,5] ; 48,6 ng/mL contre 37,0 ng/mL), toutefois sans atteindre la significativité ($p = 0,0515$). Enfin, les concentrations résiduelles sont plus élevées lorsque la clairance de la créatinine diminue (soit un effet de -7,5 % quand la clairance augmente de 10 mL/min ; IC95 [-15,3 ; 1,0]), mais de manière non significative ($p = 0,0930$). Aucune autre variable démographique, clinico-biologique, thérapeutique ou génétique n'est significativement associée à la concentration maximale ou résiduelle en rivaroxaban (Tableau 29).

En analyse multivariée, les sens d'effet subsistent entre des concentrations résiduelles plus élevées et la prise d'amiodarone ($p = 0,1197$), ou la prise d'un substrat ou inhibiteur du CYP3A4/5 ($p = 0,0732$), mais de manière non significative (Tableau 29).

V.2. Variabilité pharmacodynamique

Nous avons choisi de limiter notre analyse à l'influence des caractéristiques individuelles sur la variabilité de deux paramètres pharmacodynamiques du rivaroxaban, la hauteur de pic et le potentiel endogène de thrombine, tous deux mesurés à l'aide du réactif STG-ThromboScreen en l'absence de thrombomoduline (ST-Genesis), ces deux paramètres présentant une variabilité inter-individuelle importante dans ces conditions expérimentales (Figure 47).

V.2.1. Hauteur de pic

En analyse univariée, les patients avec une insuffisance cardiaque ont une hauteur de pic plus faible à T_{max} (effet de -36,6 % , IC95 [-59,3 ; -1,3]) que les patients sans insuffisance cardiaque (67,2 nM contre 91,9 nM ; $p = 0,0442$) et un effet similaire existe à T_{min} (effet de -30,3 % ; IC95 [-50,8 ; -1,4]) mais non significative (140,3 nM contre 193,4 nM ; $p = 0,0637$). La prise d'amiodarone est également associée à une diminution de la hauteur de pic à T_{min} (90,5 nM contre 178,9 nM, soit un effet de -71,0 % (IC95 [-86,4 ; -38,1] – $p = 0,0138$). Enfin, le degré d'insuffisance rénale évalué par la clairance de la créatinine est significativement associé à une diminution de la hauteur de pic à T_{max} (soit une augmentation de 19,7 % de la hauteur de pic quand la clairance rénale augmente de 10 mL/min, IC95 [4,7 ; 36,8] – $p = 0,0016$) ; à T_{min} , l'association, toujours positive, est non significative (pic augmenté de 8,9 % quand ClCr augmente de 10 mL/min ; IC95 [-1,6 ; 20,5] – $p = 0,0556$). Enfin, si la concentration en rivaroxaban n'est pas significativement associée à la hauteur de pic à T_{max} ($p = 0,3227$), elle l'est très significativement à T_{min}

($p = 0,0005$), expliquant 25,4 % de la variance de la hauteur de pic (effet de $-99,2$ %, IC95 $[-99,9 ; -87,9]$) pour une augmentation de la concentration de 10 ng/mL. Aucune autre variable démographique, clinico-biologique, thérapeutique ou génétique n'est significativement associée à la hauteur du pic de thrombine (Tableau 30).

L'analyse multivariée confirme l'association entre degré d'insuffisance rénale et hauteur de pic à T_{\max} (le pic augmente de 21,5 %, IC95 $[6,6 ; 38,5]$ quand ClCr augmente de 10 mL/min – $p = 0,0059$), mais non à T_{\min} ($p = 0,1568$). Il convient de noter dans la cohorte une association significative entre la présence d'une insuffisance cardiaque et l'altération de la fonction rénale (test de Wilcoxon, $p = 0,03$), de telle sorte qu'en analyse multivariée, l'insuffisance cardiaque n'est plus un déterminant de la variabilité (facteur confondant ; $p = 0,1327$). Par ailleurs, l'effectif de patients traités par amiodarone étant inférieur 5, cette variable n'a pas été incluse dans l'analyse multivariée qui n'a été réalisée que chez les patients ne prenant pas d'amiodarone. Enfin, la clairance rénale étant liée aux concentrations plasmatiques, la corrélation entre les deux rend délicate l'interprétation du rôle de chacune dans l'analyse multivariée.

V.2.2. ETP

De manière remarquable, ce sont les mêmes caractéristiques individuelles qui influencent significativement l'ETP, en analyse univariée, à T_{\max} et à T_{\min} , et en analyse multivariée (Tableau 31).

Tableau 29 : Influence des caractéristiques des patients ADAGE sur la pharmacocinétique du rivaroxaban.

Variables étudiées	Analyse univariée						Analyse multivariée			
	T_{max}			T_{min}			T_{max}		T_{min}	
	Effet	%	<i>p</i>	Effet	%	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>
sexe féminin	6,93 % [-20,80 ; 44,38]	2,22 %	0,6552	-17,79 % [-38,83 ; 10,47]	4,04 %	0,1906	11,79 % [-21,28 ; 58,74]	0,5218	-10,98 % [-35,19 ; 22,26]	0,4659
posologie	12,73 % † [-2,28 ; 30,05]	5,89 %	0,0736	9,24 % † [-7,70 ; 29,28]	0,03 %	0,2644	13,89 % † [-7,59 ; 40,37]	0,2138	-1,59 % † [-19,45 ; 20,23]	0,8734
amiodarone*	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	47,75 % [0,06 ; 118,20]	2,57 %	0,0497	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	99,82 %** [10,28 ; 26,00]	0,1197
≥ 1 médicament inhibiteur de P-gp**	-4,78 % [-30,29 ; 30,05]	0,47 %	0,7530	-7,86 % [-31,62 ; 24,17]	0,68 %	0,5862	-6,31 % [-36,14 ; 37,46]	0,7313	-8,65 % [-34,19 ; 26,82]	0,1616
≥ 1 médicament inhibiteur de CYP3A4/5**	12,86 % [-16,85 ; 53,19]	1,94 %	0,8126	31,22 % [-0,18 ; 72,48]	3,56 %	0,0515	10,61 % [-23,49 ; 59,90]	0,5810	43,05 % [5,30 ; 94,34]	0,0732
clairance de la créatinine (Cockcroft)	-3,35 % ‡ [-11,92 ; 6,05]	0,03 %	0,8126	-7,51 % ‡ [-15,31 ; 1,01]	1,31 %	0,0930	-3,62 % ‡ [-14,35 ; 8,44]	0,5281	-4,80 % ‡ [-13,79 ; 5,13]	0,3252

Seuil de significativité : $p < 0,05$. †pour une augmentation de 2,5 mg. *Valeur valable uniquement chez les patients ne recevant pas en plus un autre inhibiteur de P-gp ou de CYP3A4/5. **Hors amiodarone. ‡pour une augmentation de 10 mL/min. *N.D.* = non disponible.

Tableau 30 : Influence des caractéristiques des patients ADAGE sur la pharmacodynamie du rivaroxaban (hauteur de pic).

Variables étudiées	Analyse univariée						Analyse multivariée			
	T_{max}			T_{min}			T_{max}		T_{min}	
	Effet	%	<i>p</i>	Effet	%	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>
insuffisance cardiaque	-36,61 % [-59,30 ; -1,28]	11,25 %	0,0442	-30,33 % [-50,78 ; -1,40]	9,58 %	0,0637	-22,83 % [-45,38 ; 9,04]	0,1327	-11,35 % [-36,99 ; 24,72]	0,4781
concentration en rivaroxaban	-97,82 % † [-99,98 ; 169,90]	10,94 %	0,3227	-99,23 % † [-99,95 ; -87,88]	25,40 %	0,0005	129,40 % † [-95,72 ; 122,00]	0,6666	-92,47 % † [-99,74 ; 119,3]	0,1283
amiodarone*	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	-52,21 % [-70,42 ; -22,79]	12,48 %	0,0138	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	-45,30 %** [-75,52 ; 22,24]	0,2775
≥ 1 médicament inhibiteur de P-gp**	-1,91 % [-39,37 ; 58,69]	1,52 %	0,1697	24,16 % [-14,15 ; 79,54]	0,31 %	0,2432	-3,49 % [-29,82 ; 32,71]	0,8173	7,68 % [-25,96 ; 56,58]	0,3428
≥ 1 médicament inhibiteur de CYP3A4/5**	-5,40 % [-41,82 ; 53,81]	0,20 %	0,7298	-15,11 % [-40,87 ; 21,86]	2,89 %	0,3851	14,20 % [-16,49 ; 56,17]	0,3846	-12,36 % [-40,33 ; 28,7]	0,6607
clairance de la créatinine (Cockcroft)	19,70 % ‡ [4,70 ; 36,85]	47,50 %	0,0016	8,87 % ‡ [-1,62 ; 20,48]	7,26 %	0,0556	21,49 % ‡ [6,58 ; 38,47]	0,0059	7,27 % ‡ [-2,79 ; 18,38]	0,1568

Réponse pharmacodynamique représentée par la hauteur de pic de thrombine mesurée sur ST-Genesis, à l'aide du réactif ThromboScreen sans thrombomoduline. Seuil de significativité : $p < 0,05$. † pour une augmentation de 2,5 mg. *Valeur valable uniquement chez les patients ne recevant pas en plus un autre inhibiteur de P-gp ou de CYP3A4/5. **Hors amiodarone. ‡ pour une augmentation de 10 mL/min. *N.D.* = non disponible.

Tableau 31 : Influence des caractéristiques des patients ADAGE sur la pharmacodynamie du rivaroxaban (ETP).

Variables étudiées	Analyse univariée						Analyse multivariée			
	T_{max}			T_{min}			T_{max}		T_{min}	
	Effet	%	<i>p</i>	Effet	%	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>
insuffisance cardiaque	-38,71 % [-60,44 ; -5,06]	18,85 %	0,0168	-19,7 % [-34,50 ; -1,56]	9,72 %	0,0435	-23,19 % [-46,08 ; 9,42]	0,1347	-9,86 % [-26,89 ; 11,13]	0,3206
concentration en rivaroxaban	-94,1 % † [-99,96 ; 724,6]	2,79 %	0,6073	-83,55 % † [-97,18 ; -4,15]	9,64 %	0,0483	546,90 % † [-89,02 ; 380,30]	0,3487	1,59 % † [-87,14 ; 702,80]	0,9877
amiodarone*	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	-33,42 % [-49,99 ; -11,34]	15,42 %	0,0069	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	-35,09 %** [-60,36 ; 6,267]	0,1014
≥ 1 médicament inhibiteur de P-gp**	2,81 % [-36,50 ; 66,45]	1,42 %	0,5914	12,63 % [-9,39 ; 39,99]	1,25 %	0,5230	-2,69 % [-29,77 ; 34,82]	0,8622	-0,47 % [-20,89 ; 25,22]	0,1750
≥ 1 médicament inhibiteur de CYP3A4/5**	-12,07 % [-1,19 ; 31,63]	1,07 %	0,6570	-10,82 % [-27,84 ; 10,23]	2,63 %	0,3851	7,67 % [-21,85 ; 48,33]	0,6340	-13,02 % [-1,66 ; 10,96]	0,2696
clairance de la créatinine (Cockcroft)	14,04 % ‡ [4,70 ; 36,85]	27,73 %	0,0013	4,70 % ‡ [-1,39 ; 11,17]	7,49 %	0,0391	17,84 % ‡ [3,07 ; 34,73]	0,0191	4,46 % ‡ [-1,39 ; 11,17]	0,1514

Réponse pharmacodynamique représentée par l'ETP mesuré sur ST-Genesis, à l'aide du réactif ThromboScreen sans thrombomoduline. Seuil de significativité : $p < 0,05$. †pour une augmentation de 2,5mg. *Valeur valable uniquement chez les patients ne recevant pas en plus un autre inhibiteur de P-gp ou de CYP3A4/5. **Hors amiodarone. ‡ pour une augmentation de 10 mL/min. *N.D.* = non disponible.

VI. FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE À L'APIXABAN

VI.1. Variabilité pharmacocinétique

En analyse univariée, la posologie (5mg ×2/jour ou 2,5 mg ×2/jour) est significativement associée aux concentrations d'apixaban à la fois à T_{max} où une augmentation de dose de 2,5 mg correspond à des concentrations 44,9 % plus élevées (IC95 [7,1 ; 96,1] – $p = 0,0226$) et à T_{min} (augmentation de 45,6 %, IC95 [4,6 ; 102,6] – $p = 0,0314$). Deux autres variables contribuent à expliquer une augmentation de la concentration à T_{max} : la prise d'amiodarone (C_{max} 273,1 ng/mL chez les patients traités contre 195,0 ng/mL chez les non traités soit une augmentation de 43,5 %, IC95 [7,9 ; 90,9] – $p = 0,0141$) et le sexe féminin (232,7 ng/mL contre 154,3 ng/mL soit une augmentation de 44,0 %, IC95 [7,3 ; 93,0] chez les femmes – $p = 0,0158$). Aucune autre variable démographique, biologique, thérapeutique ou génétique n'est significativement associée à la concentration maximale ou résiduelle en apixaban. (Tableau 32).

En analyse multivariée, la posologie pleine ou réduite est la seule variable significativement associée aux concentrations d'apixaban à la fois au pic (augmentation de 64,8 %, IC95 [16,6 ; 132,9] pour une dose augmentée de 2,5 mg – $p = 0,0058$) et en résiduel (augmentation de 54,8 % pour une dose augmentée de 2,5 mg – $p = 0,0222$). La prise d'amiodarone contribue aussi à augmenter les concentrations, en particulier au pic, mais l'effet est globalement à la limite de la significativité ($p = 0,0574$), bien qu'en se limitant aux 5 patients qui ne reçoivent aucun autre inhibiteur, il soit significatif (+79,3 % [+5,5 % ; +204,7 %]).

VI.2. Variabilité pharmacodynamique

VI.2.1. Hauteur de pic

Comme pour le rivaroxaban, nous avons choisi de limiter notre analyse à l'influence des variables individuelles sur deux critères pharmacodynamiques de l'apixaban, la hauteur de pic et le potentiel endogène de thrombine, tous deux mesurés à l'aide du réactif STG-ThromboScreen en l'absence de thrombomoduline. Les résultats sont présentés dans le Tableau 33.

L'analyse univariée permet de mettre en évidence une diminution de la hauteur de pic significativement associée à des concentrations croissantes en apixaban, aussi bien à T_{max} (effet de -100,0 %, IC95 [-100,0 ; -74,7] – $p = 0,0224$) qu'à T_{min} (effet de -98,9 %, IC95

$[-99,9 ; -83,0] - p = 0,0005$) ; la concentration en apixaban compte ainsi pour 22,6 % de la variance observée à T_{\max} et pour 20,8 % à T_{\min} . Par ailleurs, les patients recevant de l'amiodarone ont, à T_{\min} , un pic de thrombine moins élevé que ceux ne prenant pas d'amiodarone (93,5 nM contre 138,7 nM pour un effet de -37,2 %, IC95 $[-60,0 ; -1,5] - p = 0,0426$). Aucune autre variable démographique, biologique, thérapeutique ou génétique n'est significativement associée à la hauteur de pic.

L'analyse multivariée confirme la posologie comme seul déterminant de la variabilité de la hauteur de pic aussi bien à T_{\max} (effet de -100,0 % pour une augmentation de 10 ng/mL de la concentration, IC95 $[-100,0 ; -47,1] - p = 0,0371$) qu'à T_{\min} (effet de -98,4 %, IC95 $[-99,9 ; -67,0] - p = 0,0085$).

VI.2.2. Potentiel endogène de thrombine

En analyse univariée, la concentration en apixaban est significativement associée à une diminution de l'ETP à T_{\max} (effet de -100,0 % pour une augmentation de 10 ng/mL d'apixaban, IC95 $[-100,0 ; -91,3] - p = 0,0171$) et à T_{\min} (effet de -89,4 %, IC95 $[-99,0 ; +10,0] - p = 0,0050$). En multivariée, elle reste significativement associée à une diminution de l'ETP à T_{\max} (effet de -100 %, IC95 $[-100,0 ; -96,26] - p = 0,0085$), mais non à T_{\min} ($p = 0,2209$; Tableau 34).

Tableau 32 : Influence des caractéristiques des patients ADAGE sur la pharmacocinétique de l'apixaban.

Variables étudiées	Analyse univariée						Analyse multivariée			
	T_{max}			T_{min}			T_{max}		T_{min}	
	Effet	%	<i>p</i>	Effet	%	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>
sexe féminin	43,97 % [7,37 ; 93,05]	9,80 %	0,0158	15,65 % [-14,86 ; 57,10]	1,12 %	0,3479	28,70 % [-4,46 ; 73,36]	0,0947	14,50 % [-17,33 ; 58,59]	0,4101
posologie	44,94 % † [7,14 ; 96,08]	12,20 %	0,0226	45,61 % † [4,65 ; 102,60]	7,45 %	0,0314	64,77 % † [16,59 ; 132,90]	0,0058	54,78 % † [6,65 ; 124,60]	0,0222
amiodarone*	43,51 % [7,87 ; 90,92]	10,25 %	0,0141	14,38 % [-18,50 ; 60,51]	0,58 %	0,4327	79,26 % [5,46 ; 204,70]	0,0574	44,09 % [-31,31 ; 202,20]	0,4916
≥ 1 médicament inhibiteur de P-gp**	-12,73 % [-37,07 ; 21,03]	2,12 %	0,4076	5,68 % [-26,61 ; 52,14]	0,23 %	0,7644	-3,95 % [-36,28 ; 44,77]	0,1870	-10,72 % [-43,73 ; 41,63]	0,8082
≥ 1 médicament inhibiteur de CYP3A4/5**	4,01 % [-20,41 ; 35,92]	0,23 %	0,7694	20,76 % [-9,83 ; 61,72]	2,42 %	0,2027	12,08 % [-17,29 ; 51,87]	0,2838	23,40 % [-11,10 ; 71,29]	0,3300
clairance de la créatinine (Cockcroft)	-3,29 % ‡ [-10,31 ; 4,28]	0,98 %	0,2894	-4,60 % ‡ [-12,70 ; 4,24]	3,23 %	0,1664	-4,51 % ‡ [-11,44 ; 2,97]	0,2234	-4,50 % ‡ [-13,06 ; 4,91]	0,3322

Seuil de significativité : $p < 0,05$. †pour une augmentation de 2,5 unités. *Valeur valable uniquement chez les patients ne recevant pas en plus un autre inhibiteur de P-gp ou de CYP3A4/5. **Hors amiodarone. ‡pour une augmentation de 10 mL/min.

Tableau 33 : Influence des caractéristiques des patients ADAGE sur la pharmacodynamie de l'apixaban (hauteur de pic).

Variables étudiées	Analyse univariée						Analyse multivariée			
	T_{max}			T_{min}			T_{max}		T_{min}	
	Effet	%	<i>p</i>	Effet	%	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>
insuffisance cardiaque	-26,73 % [-66,74 ; 61,41]	1,80 %	0,4262	3,21 % [-30,50 ; 53,27]	0,01 %	0,9347	0,89 % [-58,84 ; 147,30]	0,9837	1,22 % [-30,96 ; 48,39]	0,9495
concentration en apixaban	-97,82 % † [-99,98 ; 169,90]	22,59 %	0,0224	-98,94 % † [-99,93 ; -82,99]	20,81 %	0,0005	-99,99 % † [-100,00 ; -47,10]	0,0371	-98,40 % † [-99,92 ; -67,05]	0,0085
amiodarone*	3,67 % [-58,67 ; 160,10]	0,49 %	0,9364	-37,23 % [-60,01 ; -1,47]	6,30 %	0,0426	-19,78 % [-90,77 ; 597,20]	0,9282	-56,85 % [-83,37 ; 12,00]	0,1405
≥ 1 médicament inhibiteur de P-gp**	-9,23 % [-67,96 ; 157,20]	1,26 %	0,8502	-6,31 % [-42,12 ; 51,66]	0,75 %	0,8888	-69,89 % [-95,00 ; 81,29]	0,1784	-16,17 % [-52,75 ; 48,7]	0,5782
≥ 1 médicament inhibiteur de CYP3A4/5**	14,42 % [-48,06 ; 152,00]	0,11 %	0,7291	15,21 % [-23,29 ; 73,01]	0,20 %	0,4931	41,20 % [-49,21 ; 292,60]	0,4896	9,48 % [-29,18 ; 69,24]	0,1474
clairance de la créatinine (Cockcroft)	0,42 % ‡ [4,70 ; 36,85]	0,08 %	0,9030	1,73 % ‡ [-10,66 ; 15,84]	0,49 %	0,5664	-0,01 % ‡ [-19,85 ; 24,75]	0,9994	2,05 % ‡ [-10,04 ; 15,77]	0,7473

Réponse pharmacodynamique représentée par la hauteur de pic mesurée sur ST-Genesis, à l'aide du réactif ThromboScreen sans thrombomoduline. Seuil de significativité : $p < 0,05$. †pour une augmentation de 2,5 mg. *Valeur valable uniquement chez les patients ne recevant pas en plus un autre inhibiteur de P-gp ou de CYP3A4/5. **Hors amiodarone. ‡pour une augmentation de 10 mL/min.

Tableau 34 : Influence des caractéristiques des patients ADAGE sur la pharmacodynamie de l'apixaban (ETP).

Variables étudiées	Analyse univariée						Analyse multivariée			
	T_{max}			T_{min}			T_{max}		T_{min}	
	Effet	%	<i>p</i>	Effet	%	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>
insuffisance cardiaque	-19,60 % [-62,98 ; 74,59]	3,79 %	0,3190	0,31 % [-26,67 ; 37,22]	0,11 %	0,4033	11,16 % [-51,19 ; 153,10]	0,7913	-5,55 % [-32,28 ; 31,75]	0,7316
concentration en apixaban	-99,99 % † [-100,00 ; -91,28]	24,08 %	0,0171	-89,37 % † [-98,97 ; 10,04]	9,95 %	0,0050	-100,00 % † [-100,00 ; -96,26]	0,0085	-80,29 % † [-98,58 ; 174,60]	0,2209
amiodarone*	23,05 % [-49,68 ; 200,90]	0,11 %	0,8584	-21,71 % [-45,65 ; 12,78]	8,39 %	0,0276	11,52 % [-84,67 ; 711,50]	0,8505	-34,54 % [-71,44 ; 50,07]	0,4012
≥ 1 médicament inhibiteur de P-gp**	-24,65 % [-72,59 ; 107,10]	2,86 %	0,3556	-6,78 % [-36,34 ; 36,48]	0,01 %	0,9205	-71,69 % [-94,55 ; 47,07]	0,1258	-6,26 % [-43,06 ; 54,35]	0,6258
≥ 1 médicament inhibiteur de CYP3A4/5**	1,73 % [-53,02 ; 120,30]	0,16 %	0,9127	4,84 % [-24,12 ; 44,87]	0,09 %	0,5707	32,87 % [-48,02 ; 239,60]	0,5348	-1,11 % [-32,30 ; 44,44]	0,3899
clairance de la créatinine (Cockcroft)	-0,17 % ‡ [-18,14 ; 21,75]	0,01 %	0,7159	-2,32 % ‡ [-11,86 ; 8,25]	0,14 %	0,4376	-1,76 % ‡ [-19,81 ; 20,36]	0,8573	-3,12 % ‡ [-13,19 ; 8,11]	0,5455

Réponse pharmacodynamique représentée par l'ETP mesuré sur ST-Genesis, à l'aide du réactif ThromboScreen sans thrombomoduline. Seuil de significativité : $p < 0,05$. †pour une augmentation de 2,5 mg. *Valeur valable uniquement chez les patients ne recevant pas en plus un autre inhibiteur de P-gp ou de CYP3A4/5. **Hors amiodarone. ‡ pour une augmentation de 10 mL/min.

VII. CONCLUSION

Les concentrations plasmatiques en apixaban sont plus élevées chez les patients recevant 5 mg ×2 comparativement à ceux recevant 2,5 mg ×2, aussi bien à T_{max} qu'à T_{min} , et cet effet se retrouve sur la pharmacodynamie, où le pic de thrombine est plus inhibé chez les patients ayant de plus fortes concentrations à T_{max} et T_{min} . La posologie n'influence en revanche pas la pharmacocinétique du rivaroxaban, pour qui seule la fonction rénale a une influence sur la pharmacodynamie : à T_{max} , les patients ayant une clairance de la créatinine diminuée ont des pics de thrombine plus faibles, sans qu'un tel effet soit observé sur les concentrations résiduelles. Plusieurs tendances existent avec l'amiodarone, avec des concentrations plasmatiques en xaban plus élevées chez les patients concernés, toutefois ces associations ne sont pas significatives dans l'analyse multivariée. Les autres inhibiteurs du CYP3A4/5 et de P-gp ne semblent pas interagir de façon significative avec la réponse pharmacocinétique ou pharmacodynamique aux xabans. Les autres paramètres démographiques, cliniques, biologiques et thérapeutiques ne semblent pas influencer la réponse au rivaroxaban ou à l'apixaban. Les variant des gènes codant pour les CYP3A5, CYP2J2 et P-gp n'ont pas non plus d'influence significative.

PARTIE V – SUIVI CLINIQUE DES PATIENTS ADAGE

I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Dès 2014 et 2015, deux méta-analyses se sont spécifiquement intéressées aux données des essais pivots randomisés dans le sous-groupe des patients âgés de 75 ans et plus traités par AOD dans la fibrillation atriale [256,257]. Dans cette sous-population, en termes d'efficacité, les AOD sont soit non-inférieurs aux AVK, soit, pour l'apixaban et le dabigatran (à la dose de 150 mg deux fois par jour pour ce dernier), supérieurs aux AVK [256,257]. L'analyse des données de sécurité de l'une des deux études montre qu'il n'existe pas de différence entre les AOD et la warfarine dans cette population [257], tandis que celle de l'autre rapporte moins de saignements majeurs avec l'apixaban, moins de saignements intracrâniens avec l'apixaban, le dabigatran et le rivaroxaban (quoique la diminution ne soit pas statistiquement significative pour ce dernier) et moins de saignements fatals avec le rivaroxaban [256]. Par ailleurs, l'analyse en sous-groupes de la méta-analyse ARISTOPHANES, étude observationnelle publiée en 2018, montre la supériorité de l'apixaban par rapport au rivaroxaban chez les patients âgés de 80 ans et plus avec un RRI de 0,80 (IC95 [0,73 ; 0,89]) pour la survenue d'AVC/ES et de 0,55 ([0,53 ; 0,59]) pour la survenue de saignements majeurs [144].

L'objectif principal de cette partie est de recenser et de décrire les événements cliniques six mois après inclusion dans l'étude, à savoir les événements hémorragiques, les événements thrombotiques et la mortalité toute cause confondue. Les objectifs secondaires sont d'évaluer la relation potentielle entre les caractéristiques des patients, l'exposition aux AOD et la survenue d'événements hémorragiques ou thrombotiques.

II. SUIVI CLINIQUE DES PATIENTS ADAGE TRAITÉS PAR XABANS

II.1. Méthodes

II.1.1. Réalisation du suivi

Six mois après l'inclusion dans ADAGE, un suivi clinique a été réalisé lors d'un entretien téléphonique par un attaché de recherche clinique ou un clinicien. En plus des cliniciens référents de chaque centre d'inclusion, une partie du suivi clinique a été

complétée par le Dr Léa Rivière, interne en gériatrie, sous la supervision de le Dr Flora Ketz, gériatre. L'entretien était conduit directement auprès du patient (ou de la personne de confiance nommée référente à l'inclusion) ou auprès des médecins prenant en charge le patient (le médecin traitant principalement), soit lors des consultations de suivi habituel des patients, soit par prise de contact avec les établissements où le patient était pris en charge (clinique, foyer-logement, maison de retraite...).

II.1.2. Informations issues de l'entretien

Lors de l'entretien, les événements hémorragiques, thrombotiques, les hospitalisations et les décès ont été recueillis ainsi que leur date de survenue à l'aide d'un formulaire standardisé. Les saignements ont été classés en fonction de leur sévérité selon les recommandations de l'ISTH en contexte non-chirurgical [258]. Ainsi, un saignement est considéré comme majeur s'il répond à une ou plusieurs de ces caractéristiques :

- fatal ;
- symptomatique dans un organe critique (intracrânien, intra-oculaire, intra-articulaire...) ;
- responsable d'une baisse du taux d'hémoglobine d'au moins 2 g/dL ou ayant nécessité une transfusion d'au moins 2 concentrés de globules rouges.

Les saignements non majeurs cliniquement pertinents correspondent à des saignements dont les caractéristiques sont insuffisantes pour qu'ils soient classés en saignement majeur, mais qui nécessitent une intervention d'un professionnel de santé (hospitalisation, traitement médical ou chirurgical du saignement). Les autres saignements sont dits mineurs.

Pour la présentation des résultats, chaque événement clinique a été identifié par la lettre « R » pour un saignement sous rivaroxaban, « A » pour un saignement sous apixaban, et « T » pour un événement thrombotique sous rivaroxaban ou apixaban suivi d'un numéro d'identification (sans que ce dernier ne préjuge de la gravité de l'événement concerné).

II.1.3. Analyse statistique

L'étude statistique visait à établir un lien entre l'existence de différents facteurs individuels (*cf Partie IV : IV*) et la survenue d'au moins un événement hémorragique ou thrombotique au cours des six mois de suivi. Cette analyse a également été effectuée en univarié : le lien avec les variables qualitatives a été étudié en utilisant un test du khi-deux d'indépendance ou, lorsque ses conditions d'utilisation n'étaient pas satisfaites

(effectifs théoriques trop faibles), un test de Fisher exact. Les variables quantitatives ont été analysées par régression logistique. Des représentations de Kaplan-Meier ont été établies pour les événements hémorragiques et les décès ; néanmoins aucune analyse du délai de survenue de ces événements n'a été réalisée.

II.2. Patients suivis

L'étude de l'efficacité et de la sécurité des AOD dans la cohorte des patients ADAGE a porté sur les 215 patients inclus dans les groupes rivaroxaban ($n = 104$) et apixaban ($n = 111$). Le suivi clinique a pu être réalisé pour 204 patients, correspondant à 5 % de perdus de vue (5 du groupe rivaroxaban et 6 du groupe apixaban ; Figure 48). Au terme de ce suivi, 20,8 % des patients traités par rivaroxaban et 4,9 % des patients traités par apixaban avaient arrêté leur anticoagulation par AOD (choix de l'arrêt à la discrétion du clinicien).

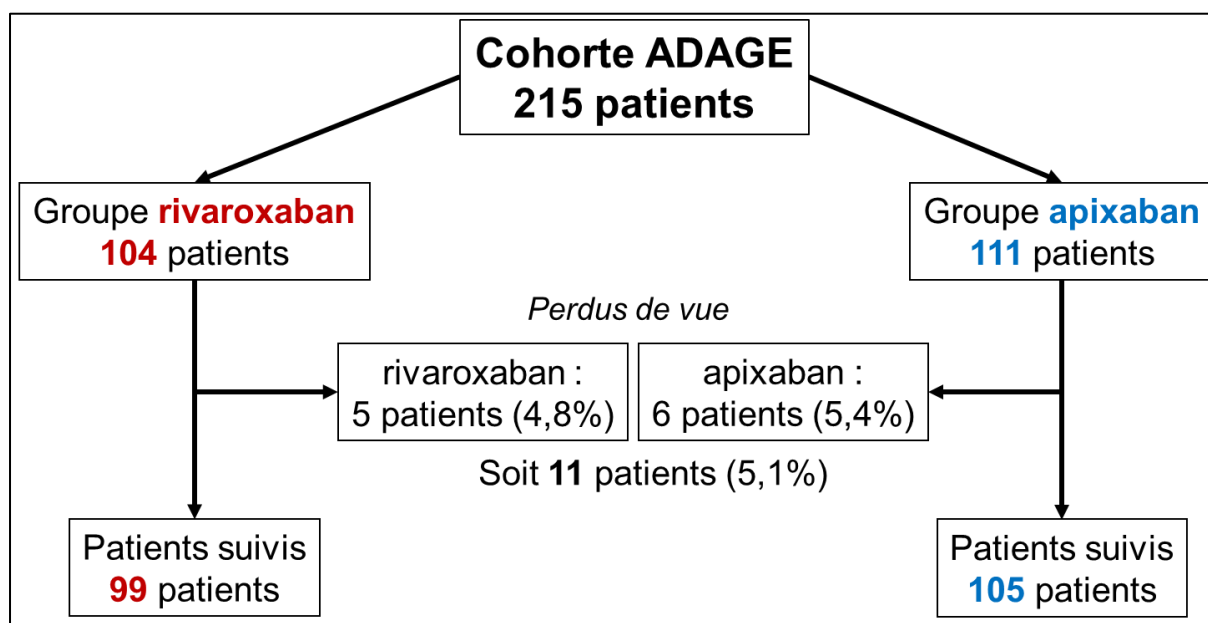


Figure 48: Suivi clinique dans la cohorte ADAGE .

Le recueil des événements thrombotiques et hémorragiques des patients de l'étude ADAGE a été réalisé chez 99 patients traités par rivaroxaban et 105 patients traités par apixaban, avec 5,1 % de patients perdus de vue.

III. ÉVÉNEMENTS HÉMORRAGIQUES

Parmi les 204 patients dont le suivi a été complet, 24 (11,8 %) ont présenté des saignements de localisation et de gravité variables (aucun patient n'a présenté plus d'un événement hémorragique). La survenue des saignements en fonction du temps après l'inclusion est représentée dans la Figure 49. Le délai médian du décès par rapport à la date d'inclusion dans ADAGE était de 3,4 mois (25^e – 75^e 1,8 – 4,6).

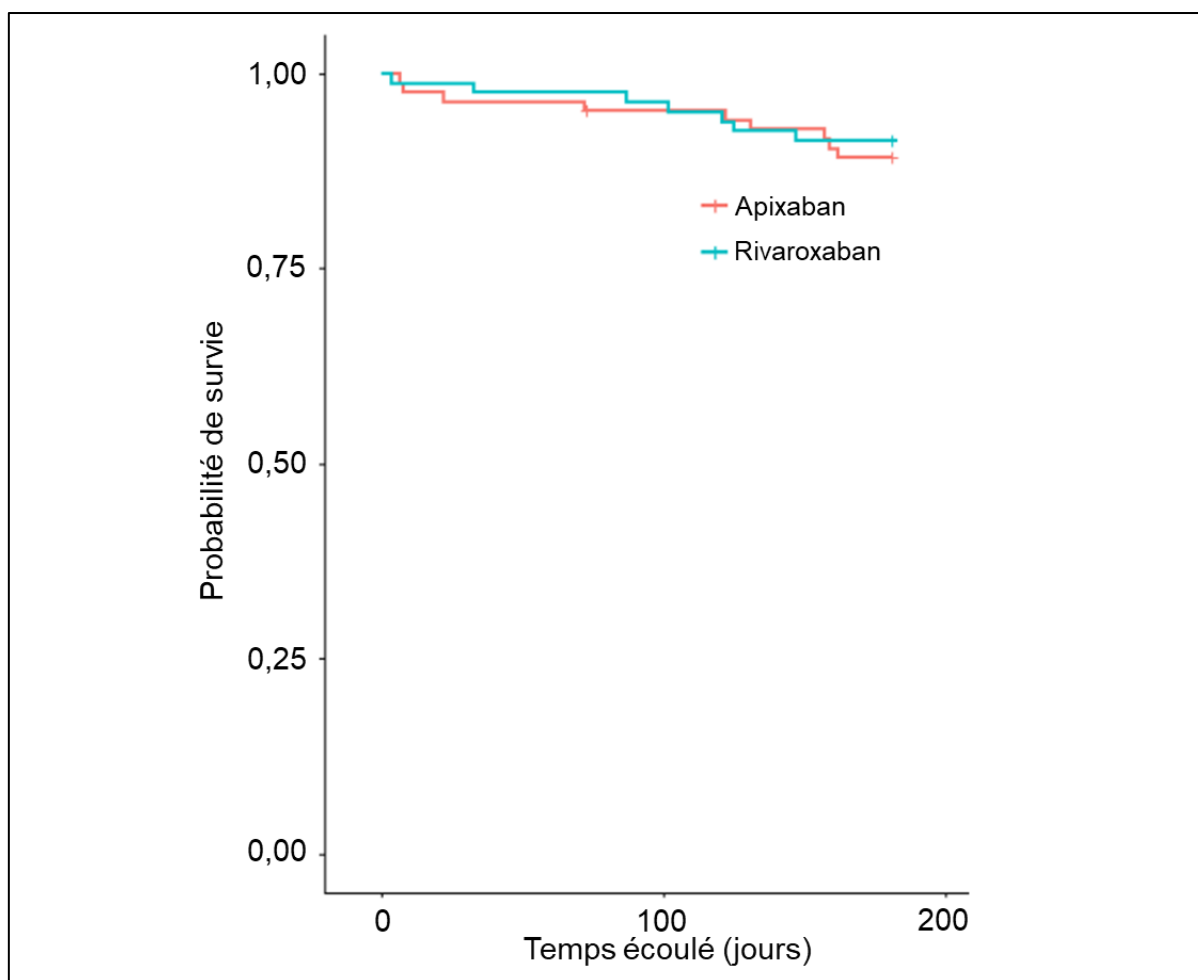


Figure 49 : Représentation de Kaplan-Meier des événements hémorragiques toute gravité confondue dans la cohorte ADAGE chez les patients traités par xabans.

La survenue d'événement hémorragique suit une tendance similaire dans le groupe apixaban et dans le groupe rivaroxaban.

III.1. Événements hémorragiques sous rivaroxaban

Onze événements hémorragiques ont été recensés dans le groupe des patients traités par rivaroxaban, correspondant à 10,6 % des 99 patients avec suivi complet (Tableau 35) : 6 saignements majeurs et 5 non majeurs cliniquement pertinents selon les critères de l'ISTH. Ces saignements étaient le plus fréquemment d'origine digestive ($n = 4$) ; deux patients ont présenté des saignements intracrâniens (hématome sous-dural et hémorragie intra-cérébrale). Les autres saignements concernaient des localisations variées : hématome du psoas ($n = 1$), hémoptysie ($n = 1$), hématurie ($n = 1$).

III.1.1. Saignements majeurs sous rivaroxaban

Parmi les 6 saignements majeurs, deux ont été fatals (événements R4 et R5). Les caractéristiques de ces saignements majeurs et des patients qui les ont présentés sont données dans le Tableau 35 et brièvement commentées ci-après :

- hémorragie digestive (R4) chez une patiente de 93 ans, clairance de la créatinine à l'inclusion de 30 mL/min (formule de Cockcroft-Gault ; ClCr) ;
- hématome du psoas droit (R5) chez un patient de 86 ans, ClCr : 42 mL/min, présentant un syndrome dépressif et une gammopathie monoclonale de signification indéterminée ;
- hématome sous-dural (R1) chez un patient de 89 ans, pesant 54 kg pour 1,80 m (soit un IMC à 16,7 kg/m²), diabétique et hypertendu ;
- hémorragie cérébrale intra-parenchymateuse (R2) chez une patiente de 92 ans insuffisante cardiaque avec antécédent d'œdème aigu du poumon et insuffisante rénale (ClCr : 37 mL/min) ;
- méléna (R3) ayant nécessité une transfusion de concentrés de globules rouges chez une patiente de 87 ans en surpoids (88 kg pour 1,68 m) avec éthyliste chronique ;
- épistaxis à répétition ayant nécessité une transfusion (R6) chez un patient de 86 ans, dénutri (IMC 18 kg/m²), avec, à l'inclusion, une insuffisance rénale sévère (ClCr : 24 mL/min) et recevant 8 traitements dont, notamment, de l'amiodarone.

Aucun de ces patients ne recevait d'antiagrégant plaquettaire ; trois d'entre eux recevaient au moins un inhibiteur de P-gp dans leurs traitements habituels (pour deux d'entre eux, il s'agissait de l'amiodarone, également inhibiteur des CYP3A4/5 et P-gp). Par ailleurs, ils recevaient tous du rivaroxaban à la posologie de 15 mg/jour, conforme aux recommandations à l'exception de la patiente ayant présenté un méléna, qui aurait dû recevoir une posologie de 20 mg/jour. Aucun des patients survivants n'a eu son traitement par rivaroxaban poursuivi après l'événement hémorragique.

III.1.2. Saignements non majeurs sous rivaroxaban

Les saignements non majeurs concernaient cinq patients avec différentes localisations : saignement hémorroïdaire (R7), rectorragies (R8), hématome de la cuisse droite (R9), hémoptysie (R10) et hématurie (R11). Tous ces saignements ont été classés non majeurs cliniquement pertinents puisqu'ayant nécessité l'hospitalisation des patients dans tous les cas.

III.2. Événements hémorragiques sous apixaban

Avec 13 cas recensés, les événements hémorragiques à six mois concernaient 12,4 % des 105 patients traités par apixaban avec suivi complet à 6 mois (Tableau 36). À l'instar des patients du groupe rivaroxaban, les saignements digestifs étaient les plus fréquents ($n = 3$). Un seul cas de saignement intracrânien (AVC hémorragique) a été identifié dans

ce groupe. Toutefois, trois cas de saignements n'ont pu être caractérisés et restent de localisation inconnue. Une importante diversité des localisations a été observée : par exemple, deux cas de mélénas, un hématome de la face, un cas d'hémorragie dentaire, un cas de pétéchies (Tableau 36).

III.2.1. Saignements majeurs sous apixaban

Parmi ces 13 patients ayant observé un événement hémorragique, deux patients ont présenté une hémorragie fatale :

- AVC hémorragique (A1) chez une patiente de 92 ans avec une antériorité d'AVC ischémique deux mois auparavant d'origine cardio-embolique faisant introduire l'apixaban à demi-dose. Cette patiente avait une fonction rénale préservée (61 mL/min), un IMC normal à 24 kg/m² et était peu polymédiqué (3 traitements) ;
- hémorragie fatale (A5) dont le site n'a pas été spécifié, chez une patiente de 92 ans avec troubles neurocognitifs majeurs, un antécédent d'anévrisme de l'aorte abdominale au stade pré-fissuraire, d'AVC ischémique et de diabète. Elle présentait également une dénutrition modérée à sévère avec une albumine à 29 g/L. Sa fonction rénale était de 53 mL/min.

Il est intéressant de noter que ces deux patientes recevaient une posologie non conforme aux strictes recommandations, 2,5mg ×2 /jour au lieu de 5mg ×2 /jour attendu.

Les autres saignements majeurs, mais n'ayant pas directement provoqué le décès du patient, étaient les suivants dans ce groupe :

- méléna ayant nécessité une transfusion (A2) chez un patient de 82 ans insuffisant cardiaque sur une cardiopathie ischémique, pour lequel il recevait de l'aspirine à posologie anti-plaquettaire. Ce patient était polymédiqué (6 traitements), sa fonction rénale était normale ;
- rectorragies (A3) chez une patiente de 91 ans, obèse (IMC à 36,4 kg/m²), dénutrie sévère (albumine 23 g/L), polymédiquée (5 traitements), avec troubles neurocognitifs majeurs, traitée par 5 mg ×2/j d'apixaban (posologie conforme aux recommandations) ;
- méléna ayant nécessité une transfusion (A4) chez une patiente de 81 ans, de faible poids (42 kg) pour 1,45 m (IMC = 20 kg/m²), insuffisante rénale (ClCr : 27 mL/min) avec antécédent de gastrite ;
- hémorragie non caractérisée (A6) chez une patiente de 89 ans ayant nécessité une transfusion. Cette patiente était sévèrement dénutrie (IMC 16,2 kg/m²), insuffisante

rénale (ClCr Cockcroft de 25 mL/min) et polymédiquée (6 traitements). Elle était aussi insuffisante cardiaque et souffrait d'un cancer actif ;

- hémorragie non caractérisée (A7) chez une patiente de 82 ans ayant nécessité une transfusion, insuffisante cardiaque et insuffisante rénale (ClCr : 50 mL/min), polymédiquée (7 traitements), dénutrie (albuminémie : 27 g/L), insuffisante cardiaque sur un rétrécissement aortique, présentant un antécédent néoplasique non spécifié (score CIRS-G calculé à 15).

Contrairement à ce qui a été observé chez les patients avec saignement majeur sous rivaroxaban, tous les patients ayant présenté un saignement majeur sous apixaban et ayant survécu ont poursuivi leur traitement anticoagulant par apixaban.

III.2.2. Saignements non majeurs cliniquement pertinents sous apixaban

Le suivi clinique à six mois rapporte 6 cas de saignements non majeurs sous apixaban. Parmi ces saignements non majeurs, 4 étaient cliniquement pertinents et ont nécessité une hospitalisation : un hématome du poignet (A8), un hématome facial (A9), un cas d'épistaxis (A10) et une hémorragie dentaire (A11).

III.2.3. Saignements mineurs sous apixaban

Les deux autres saignements rapportés étaient mineurs, il s'agissait de pétéchies (A12) et d'hématurie légère (A13).

III.3. Influence potentielle des caractéristiques des patients sur les saignements

Les concentrations plasmatiques en xaban ne semblent pas associées au risque hémorragique, que l'on considère la concentration à T_{\max} ($p = 0,8370$ pour l'apixaban et $p = 0,0740$ pour le rivaroxaban) ou à T_{\min} ($p = 0,6410$ pour l'apixaban et $p = 0,3160$ pour le rivaroxaban). Il convient toutefois de remarquer que les mesures des concentrations étaient réalisées dans les jours suivant l'inclusion et donc à distance des événements hémorragiques. De plus, certains patients ayant eu un événement hémorragique n'avaient été prélevés (à l'inclusion) à T_{\max} ou à T_{\min} , ce qui limite la puissance statistique.

Nous n'avons pas observé d'influence significative de l'âge, de l'insuffisance rénale chronique, de l'existence d'un cancer, d'une démence ou d'une dénutrition sur la survenue d'un saignement. Parmi les patients ayant saigné, une plus grande proportion de patients recevaient des antiplaquettaires (29 % contre 18 %) en comparaison du reste de la cohorte : néanmoins cette différence n'était pas significative ($p = 0,7830$ pour apixaban et $p = 0,8010$ pour rivaroxaban).

Tableau 35 : Récapitulatif des saignements rapportés à 6 mois chez les patients traités par rivaroxaban.

Identification	Sexe	Âge (années)	Poids (kg)	Clairance de la créatinine (Cockcroft, mL/min)	Albuminémie (g/L)	Posologie (mg)	Concentration à T _{max} † (ng/mL)	Concentration à T _{min} † (ng/mL)	Site	Saignement	Gravité	Antiagrégant plaquettaire	Commentaire
R1	Homme	89	54	32	41	15 ×1	287	88	Cérébral	Hématome sous dural	Majeur	non	-
R2	Femme	92	55	37	25	15 ×1	184	46	Cérébral	Hémorragie cérébrale	Majeur	non	-
R3	Femme	87	88	57	35	15 ×1*	81	41	Digestif	Méléna	Majeur	non	-
R4	Femme	93	54	30	30	15 ×1	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	Digestif	Hémorragie digestive	Majeur	non	Hémorragie fatale
R5	Homme	86	68	42	26	15 ×1	<i>N.D.</i>	45	Musculaire	Hématome du psoas	Majeur	non	Hémorragie fatale
R6	Femme	86	56	24	27	15 ×1	173	46	ORL	Epistaxis à répétition	Majeur	non	-
R7	Femme	82	64	71	41	20 ×1	<i>N.D.</i>	67	Digestif	Hémorroïdes	CRB	non	-
R8	Femme	85	69	94	<i>N.D.</i>	20 ×1	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	Digestif	Rectorragies	CRB	non	-
R9	Femme	83	83	44	40	15 ×1	<i>N.D.</i>	72	Musculaire	Hématome de la cuisse	CRB	non	-
R10	Femme	83	63	29	35	15 ×1	<i>N.D.</i>	32	Pulmonaire	Hémoptysie	CRB	oui	-
R11	Homme	84	75	74	40	15 ×1*	171	30	Urinaire	Hématurie	CRB	non	-

CRB = saignement non majeur cliniquement pertinent (Clinically Relevant Bleeding). *N.D.* : non disponible. *Posologie réduite par rapport aux recommandations, ces patients auraient dû recevoir une posologie de 20 mg/j. Les autres posologies étaient conformes. † Mesurée à l'inclusion donc à distance de l'événement clinique.

Tableau 36 : Récapitulatif des saignements rapportés à 6 mois chez les patients traités par apixaban.

Identification	Sexe	Âge (années)	Poids (kg)	Clairance de la créatinine (Cockcroft, mL/min)	Albuminémie (g/L)	Posologie (mg)	Concentration à T _{max} † (ng/mL)	Concentration à T _{min} † (ng/mL)	Site	Saignement	Gravité	Antiagrégant plaquettaire	Commentaire
A1	Homme	92	70	61	41	2,5 × 2*	181	65	Cérébral	AVC hémorragique	Majeur	non	Hémorragie fatale
A2	Homme	82	87	71	<i>N.D.</i>	5 × 2	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	Digestif	Méléna	Majeur	oui	-
A3	Femme	91	99	75	23	5 × 2	329	<i>N.D.</i>	Digestif	Rectorragies	Majeur	non	-
A4	Femme	81	42	27	38	2,5 × 2	228	117	Digestif	Méléna	Majeur	non	Transfusion
A5	Femme	92	69	53	29	2,5 × 2*	89	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	Majeur	non	Hémorragie fatale
A6	Femme	89	39	25	31	2,5 × 2	442	240	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	Majeur	oui	Transfusion
A7	Femme	82	57	50	27	2,5 × 2	166	73	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	Majeur	non	Transfusion
A8	Femme	90	56	38	40	2,5 × 2	<i>N.D.</i>	55	Articulaire	Hématome du poignet	CRB	non	-
A9	Femme	92	81	46	39	2,5 × 2*	145	74	Cutané	Hématome facial	CRB	non	-
A10	Femme	90	60	22	26	2,5 × 2	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	ORL	Epistaxis	CRB	non	CIRS-G total = 24
A11	Femme	87	32	43	31	2,5 × 2	<i>N.D.</i>	85	ORL	Gingivorragies	CRB	non	-
A12	Femme	85	54	59	28	2,5 × 2	<i>N.D.</i>	31	Cutané	Pétéchies	Mineur	oui	-
A13	Femme	91	62	44	32	5 × 2	<i>N.D.</i>	50	Urinaire	Hématurie	Mineur	non	-

CRB = saignement non majeur cliniquement pertinent (Clinically Relevant Bleeding). *N.D.* : non disponible. *Posologie réduite par rapport aux recommandations, ces patients auraient dû recevoir une dose de 5 mg × 2/jour. † Mesurée à l'inclusion donc à distance de l'événement clinique.

IV. COMPLICATIONS THROMBOTIQUES

Sur la période de 6 mois de suivi après inclusion, 5 patients, soit 2,5 % des patients ayant complété le suivi, ont présenté un événement thrombotique (Tableau 37). Ces 5 patients (4 femmes et 1 homme) avaient un âge moyen de $86,2 \pm 4,5$ ans et un score CHA₂DS₂VASc moyen de $5,0 \pm 1,8$. Pour trois de ces patients, un événement hémorragique à 6 mois a également été rapporté. Aucun des événements thrombotiques rapportés n'a été une cause directe de décès.

IV.1. Événement thrombotique sous rivaroxaban

De tous les patients du groupe rivaroxaban ayant un suivi complété à 6 mois (99 patients), un unique cas de thrombose (1,0 %) a été rapporté : un AVC ischémique (T1) chez une patiente de 87 ans en surpoids (88 kg pour 1,68 m soit un IMC à $30,2 \text{ kg/m}^2$) et éthylique chronique, traitée pour fibrillation atriale permanente. Cet AVC est survenu 3 mois après l'inclusion de la patiente.

Cette patiente était traitée par rivaroxaban 15 mg/j tandis que les recommandations préconisaient une dose non réduite de 20 mg/j. Par ailleurs, cette patiente a également présenté un événement hémorragique deux semaines après son AVC (R3). La coexistence de ces deux événements a mené à l'arrêt du traitement par rivaroxaban

IV.2. Événements thrombotiques sous apixaban

Quatre cas de thromboses (3,8%) ont été rapportés lors du suivi, chez des patients recevant tous une dose réduite d'apixaban (posologie de $2,5 \text{ mg} \times 2/\text{j}$) :

- un AVC ischémique (T2) chez une patiente de 90 ans ayant un antécédent d'AVC et d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs avec un score CHA₂DS₂VASc à l'inclusion de 6. Elle était par ailleurs insuffisante rénale, avec une clairance de la créatinine estimée à 38 mL/min (formule de Cockcroft & Gault). Cette patiente a également présenté un hématome du poignet ayant nécessité une hospitalisation (A8), 10 jours avant son AVC ;
- une ischémie critique des membres inférieurs (T3) chez un patient de 91 ans avec antécédent d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. À l'inclusion, ce patient avait des scores CIRS-G de 15 et CHA₂DS₂VASc de 3 ;
- une ischémie mésentérique (T4) chez une patiente de 81 ans, pesant 42 kg pour 1,45 m (IMC : 20 kg/m^2), insuffisante rénale (ClCr selon Cockcroft estimée à 27 mL/min à l'inclusion). Cette patiente a été décrite précédemment pour un méléna (A4) ayant

nécessité une transfusion, ces deux événements étant survenus à la même date. À l'inclusion, son score CHA₂DS₂VASc était de 7 ;

- un événement thrombotique non caractérisé, chez une patiente (T5) de 82 ans insuffisante cardiaque, insuffisante rénale (ClCr selon Cockcroft estimée à 50 mL/min) et sévèrement dénutrie (albuminémie à 27 g/dL). Elle recevait de l'apixaban depuis un mois avant son inclusion dans l'étude, à la dose de 2,5 mg ×2/jour. Son score CHA₂DS₂VASc à l'inclusion était de 4.

Tableau 37 : Récapitulatif des événements thrombotiques rapportés à 6 mois chez les patients de l'étude ADAGE.

Identification	Sexe	Âge (années)	Poids (kg)	Clairance de la créatinine (Cockcroft, mL/min)	CHA ₂ DS ₂ VASc	AOD	Posologie (mg)	Événement thrombotique	Saignement à 6 mois
T1	Femme	87	88	57	<i>N.D.</i>	Rivaroxaban	15 ×1*	AVC ischémique	oui, R3†
T2	Femme	90	56	38	6	Apixaban	2,5 ×2	AIC Frontal droit	oui, A8‡
T3	Homme	91	66	39	3	Apixaban	2,5 ×2	Ischémie critique des membres inférieurs	non
T4	Femme	81	42	27	7	Apixaban	2,5×2	Ischémie mésentérique	oui, A4‡
T5	Femme	82	57	50	4	Apixaban	2,5 ×2*	<i>N.D.</i>	oui, A7‡

N.D. : non disponible *Posologie réduite par rapport aux strictes recommandations. † Voir Tableau 35. ‡ Voir Tableau 36.

V. DÉCÈS TOUTES CAUSES CONFONDUES

Sur la totalité des patients inclus, 39 (18,1 %) sont décédés dans les 6 mois suivant l'inclusion : 18 (17,3 %) dans le groupe rivaroxaban et 21 (18,9 %) dans le groupe apixaban ; cette différence n'était pas significative ($p = 0,7414$). Le délai médian du décès par rapport à la date d'inclusion dans ADAGE était de 2,7 mois (25^e – 75^e percentiles : 1,5 – 4,5). Le suivi indique que 35 des 39 décès, soit 90 % d'entre eux, n'étaient pas liés à un saignement. En plus des quatre patients décédés d'une hémorragie fatale, une patiente a présenté un épisode de rectorragies moins de deux mois avant son décès sans que le lien avec ce dernier ne soit clairement établi. Aucun événement thrombo-embolique n'a pu par ailleurs être directement relié au décès. La courbe de survie des patients après inclusion est présentée dans la Figure 50.

Tableau 38 : Décès à 6 mois

	tous les patients ($n = 215$)	rivaroxaban ($n = 104$)	apixaban ($n = 111$)
Toutes causes confondues – n (%)	39 (18,1 %)	18 (17,3 %)	21 (18,9 %)
Hémorragies fatales – n (%)	4 (1,9 %)	2 (1,9 %)	2 (1,8 %)

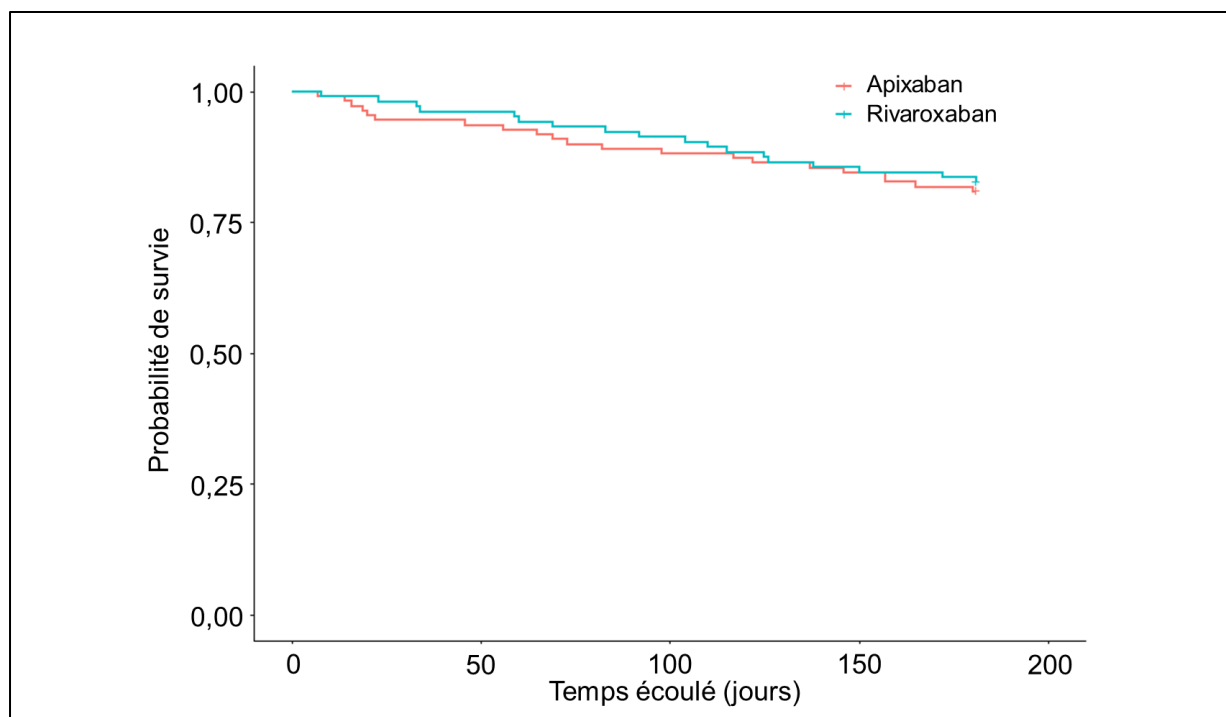


Figure 50 : Décès dans la cohorte ADAGE, représentation de Kaplan-Meier.

La survenue des décès suit une évolution similaire dans le groupe apixaban et dans le groupe rivaroxaban.

VI. CONCLUSION

À 6 mois, 24 patients (soit 11,8 % des patients avec suivi complet, 11 traités par rivaroxaban et 13 par apixaban) ont présenté un événement hémorragique. Treize de ces événements étaient des saignements majeurs, survenus chez 6,3 % des patients dont le suivi a été complet, et 4 fatals (1,96 %). Enfin, 5 patients (4,9 %) ont présenté un événement thrombo-embolique, quatre dans le groupe apixaban et un dans le groupe rivaroxaban.

DISCUSSION

Les patients âgés de plus de 80 ans constituent une population particulièrement fragile. Avec une prévalence de la fibrillation atriale supérieure à 10 %, les octogénaires sont de plus en plus nombreux à bénéficier des AOD. Alors que ces médicaments ont été largement étudiés chez les volontaires sains, les patients inclus dans les essais cliniques et ceux des registres [116–118,148–150,150–152,154–157,159], il n'existe que peu de données spécifiques publiées chez les patients âgés de 80 ans et plus avec fibrillation atriale.

Spécificités de la cohorte ADAGE

L'étude ADAGE, étude académique multicentrique observationnelle, a permis d'inclure prospectivement 265 patients avec fibrillation atriale, d'âge moyen 86 ans et traités par AOD depuis au moins 4 jours, parmi lesquels 104 par rivaroxaban, 111 par apixaban et 50 par dabigatran. Près de trois-quarts d'entre eux sont des femmes ; le score CIRS-G de comorbidités élevé, de 10 en moyenne, et le nombre de médicaments associés, 6 en moyenne, témoignent de la polypathologie et de la polymédication dans cette tranche d'âge. Enfin, la prévalence de l'insuffisance rénale est élevée avec plus de la moitié des patients insuffisants rénaux modérés pour la très grande majorité d'entre eux (clairance de la créatinine ClCr médiane de 47 mL/min, estimée selon la formule de Cockcroft-Gault). Toutes ces caractéristiques soulignent le caractère gériatrique et original de la cohorte ADAGE [259,260]. Dans les essais pivots randomisés ayant permis d'évaluer le rivaroxaban (ROCKET-AF) l'apixaban (ARISTOTLE) et le dabigatran (RE-LY) comparativement aux AVK dans la fibrillation atriale, les patients étaient plus jeunes et avaient moins de comorbidités, il y avait notamment moins d'insuffisants rénaux [256]. L'âge médian des patients inclus dans ROCKET-AF était de 73 ans et 18 % des patients avaient 80 ans et plus ; ClCr médiane de 67 mL/min. Dans ARISTOTLE, l'âge médian des patients était de 70 ans et 31,2 % des patients avaient 75 ans et plus ; 82 % des patients avait une ClCr supérieure à 50 mL/min. Enfin, les patients inclus dans RE-LY avaient un âge médian de 72 ans et 22 % d'entre eux avaient 80 ans et plus ; et moins de 20 % des patients avaient une ClCr < 50 mL/min. De manière intéressante, les patients ADAGE sont comparables entre les trois groupes concernant notamment les variables démographiques ou l'évaluation de la fonction rénale ; néanmoins, les patients traités par l'apixaban ont des scores CIRS-G et HEMORR₂HAGES plus élevés que les patients traités par rivaroxaban

et reçoivent deux fois plus d'antiplaquettaires, témoignant d'un risque hémorragique plus élevé, faisant privilégier le choix du prescripteur pour l'apixaban.

À notre connaissance, ADAGE est la première étude visant à évaluer spécifiquement la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du rivaroxaban, de l'apixaban et du dabigatran dans une cohorte de patients âgés de plus de 80 ans. Devant ce besoin de données en vie réelle chez les sujets très âgés, polyopathologiques et polymédiqués, connus pour être à haut risque à la fois hémorragique et thrombotique, ce travail de thèse avait pour objectif principal de préciser la variabilité inter-individuelle des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du rivaroxaban et de l'apixaban (et dans une moindre mesure du dabigatran) chez les patients de l'étude ADAGE et d'évaluer l'influence des facteurs individuels cliniques, biologiques, thérapeutiques et pharmacogénétiques sur ces profils.

Profils pharmacocinétiques des patients ADAGE

Nous avons fait le choix de mesurer les concentrations plasmatiques des AOD par méthode chromogénique automatisée mesurant l'activité anti-Xa pour l'apixaban et le rivaroxaban et par méthode chromométrique du temps de thrombine dilué pour le dabigatran, méthodes faciles à mettre en œuvre et désormais disponibles dans un grand nombre de laboratoires. Ces méthodes ont l'avantage de générer des résultats exprimés en concentrations massiques (ng/mL) en AOD, résultats qui sont étroitement corrélés à ceux mesurés avec la méthode de référence (CLHP-MS/MS) [142]. En pratique clinique, la mesure des concentrations plasmatiques des AOD chez les patients est réservée à des situations particulières : saignement grave, nécessité de geste invasif urgent, indication à la thrombolyse, dégradation brutale de la fonction rénale, poids extrêmes, interactions médicamenteuses...

Actuellement, dans la littérature, les données pharmacocinétiques dont nous disposons sur le rivaroxaban dans la fibrillation atriale concernent des patients d'âge moyen au plus compris entre 75 et 80 ans, qui sont donc une dizaine d'années plus jeunes que ceux inclus dans ADAGE, qu'ils soient issus d'essais cliniques ou de données de vie réelle [173,176–178,180]. Les données sur les patients recevant une posologie quotidienne de 15 mg de rivaroxaban par jour sont par ailleurs peu nombreuses. Ainsi, dans l'analyse pharmacocinétique menée chez 25 patients d'âge moyen 74 ans issus de l'essai ROCKET-AF recevant 15 mg de rivaroxaban par jour, une C_{max} de 229 ng/mL (moyenne géométrique) (5^e – 95^e percentile : 178 – 313) et une C_{min} de 57 ng/mL (18 – 136) sont rapportées [180] ; à la posologie de 20 mg par jour, les concentrations observées sont de 249 ng/mL

(184 – 343) au pic et de 44 ng/mL (12 – 137) en résiduel [142]. De manière remarquable, ces dernières moyennes concordent parfaitement avec celle des patients d'ADAGE traités par 15mg par jour, dont les concentrations, exprimées ici en moyenne géométrique, sont de 242 ng/mL (5^e – 95^e : 106 – 467) à T_{max} et 44 ng/mL (< 20 – 125) à T_{min}. En revanche, la variabilité que nous observons au pic est beaucoup plus importante chez les patients d'ADAGE comparativement à ceux, sélectionnés, de ROCKET-AF, avec, notamment dans ADAGE, près d'un tiers des patients présentant des valeurs au-delà du 95^e percentile attendu. On note également, dans les profils pharmacocinétiques obtenus, l'existence de patients ayant des concentrations élevées entre 10 et 14 h après la prise, concentrations compatibles avec le cycle entéro-entérique déjà décrit pour le rivaroxaban chez des volontaires sains [192]. À l'inverse, la variabilité observée en résiduel est remarquablement similaire dans ADAGE et dans ROCKET-AF. Les données issues d'autres études observationnelles menées en vie réelle, dont une étude italienne multicentrique menée par Testa et collègues portant sur 71 patients et une étude slovéno-suédoise menée par Miklič et collègues portant sur 30 patients, montrent des résultats similaires, avec une variabilité importante au pic [173,177,178], mais limitée en résiduel. À la posologie de 20 mg par jour, les mêmes observations peuvent être faites dans ADAGE concernant la variabilité au pic et en résiduel.

Concernant les déterminants de la variabilité, il ne ressort pas de facteur ayant une influence significative sur la réponse pharmacocinétique au rivaroxaban en analyse multivariée. La fonction rénale est connue pour influencer la clairance du rivaroxaban [124,261], justifiant l'adaptation posologique chez l'insuffisant rénal modéré, mais cet effet est mieux mis en évidence en prenant en compte l'aire sous la courbe des concentrations en rivaroxaban plutôt que la C_{max} [124], ce qui pourrait expliquer que l'influence de la fonction rénale sur les concentrations en rivaroxaban ne soit pas statistiquement détectable pas dans la cohorte ADAGE, bien que dans tous les cas on observe bien une décroissance des concentrations quand la clairance de la créatinine augmente. Nos résultats suggèrent néanmoins que la réduction posologique proposée chez l'insuffisant rénal modéré est adaptée à la population gériatrique en termes de résultats pharmacocinétiques attendus.

Par ailleurs, nous avons observé un effet de l'amiodarone, connu comme à la fois inhibiteur de CYP3A4 et de P-gp, augmentant significativement la C_{max} du rivaroxaban en analyse univariée. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'EHRA (*European Heart Rythm Association*) selon laquelle l'effet de l'amiodarone est bien décrit comme existant

mais avec un impact clinique mineur [160]. Nos résultats concordent également avec les travaux de Mueck et collègues, qui suggèrent que le rivaroxaban n'interagit pas de façon suffisante avec les substrats et les inhibiteurs du CYP3A4/5 ou de P-gp pour avoir un impact clinique, à l'exception d'inhibiteurs puissants tels que certains azolés antifongiques et les inhibiteurs de protéase du VIH, non co-prescrits chez les patients ADAGE [232,252]. Bien que les patients ADAGE soient polymédiqués avec plusieurs substrats ou inhibiteurs du CYP3A4/5 et/ou de P-gp fréquemment co-prescrits en dehors de l'amiodarone, aucun effet n'a pu être montré sur la réponse pharmacocinétique dans les limites de l'étude (*vide infra*).

Dans le cas de l'apixaban, le résumé des caractéristiques du produit indique, dans la fibrillation atriale, les concentrations médianes (5^e – 95^e percentile) suivantes : pour la posologie 2,5 mg ×2/j une C_{max} de 123 ng/mL (69 – 221) et une C_{min} de 79 ng/mL (34 – 162), et pour la posologie 5mg ×2/j, une C_{max} de 171 ng/mL (91 – 321) et une C_{min} de 103 ng/mL (41 – 230) [102]. Dans la cohorte ADAGE, avec une concentration à T_{max} médiane de 180 ng/mL (89 – 349) et à T_{min} de 74 ng/mL (25 – 199), les patients traités avec une posologie de 2,5 mg ×2/j ont une concentration médiane à T_{max} plus élevée que celle des RCP pour la même posologie, mais proche de celle pour 5mg ×2/j, tandis que la concentration résiduelle chez les patients ADAGE est voisine de celle donnée dans le RCP pour 2,5 mg ×2/j. De plus, nous observons chez les patients ADAGE une variabilité inter-individuelle marquée au pic, comme avec le rivaroxaban, mais également en résiduel, contrairement au rivaroxaban. Des observations similaires sont rapportées en termes de niveaux de concentration et de variabilité, au pic et en résiduel, dans les rares études observationnelles qui présentent des données chez des patients recevant 2,5 mg ×2/j, notamment dans celles de Testa et collègues en 2016 et 2018 chez des patients plus jeunes [176,178].

Excepté la posologie prescrite, aucun facteur individuel n'influence significativement la réponse pharmacocinétique des patients ADAGE à l'apixaban en analyse multivariée, similairement à ce que nous avons observé pour le rivaroxaban. Les travaux de Frost et collègues ont montré que l'âge, 18 – 40 ans d'une part contre 65 ans et plus d'autre part, n'influencait pas la C_{max} de l'apixaban mais que l'aire sous la courbe des concentrations était augmentée de 32 % ; la C_{max} était 18 % plus élevée chez les femmes que chez les hommes, permettant de conclure à un impact « faible à modeste » de l'âge et du sexe sur la pharmacocinétique de l'apixaban [131]. Une tendance similaire a été retrouvée chez les patients ADAGE, avec des concentrations plus élevées chez les femmes à T_{max} ($p = 0,0158$)

en analyse univariée ; toutefois cette association était non significative en analyse multivariée. En revanche, dans une étude en vie réelle, Roşian et collègues ont retrouvé le sexe féminin comme un facteur de variabilité des concentrations maximales et résiduelles chez 53 patients d'âge médian 70 ans traités par apixaban pour fibrillation atriale. L'âge n'a pas d'effet particulier dans la classe d'âge étudiée dans ADAGE comme attendu étant donné l'intervalle réduit (80 à 100 ans). Enfin, la prise d'amiodarone pourrait contribuer à expliquer la variabilité à C_{\max} ($p = 0,0141$), mais non à C_{\min} en analyse univariée ; ce résultat n'est pas décrit dans la littérature. Aucune influence d'autres substrats ou inhibiteurs du CYP3A4/5 ou de P-gp sur la réponse pharmacocinétique à l'apixaban n'a pu être mise en évidence.

Ainsi, chez les patients ADAGE, seule la posologie d'apixaban a un impact significatif sur les concentrations plasmatiques, plus élevées chez les patients traités par 5 mg \times 2 que chez ceux traités par 2,5 mg \times 2. Ces résultats doivent prendre en compte le fait que 29,7 % des patients étaient volontairement sous-dosés par les prescripteurs par crainte du risque hémorragique, contribuant à majorer l'effet de la posologie. Il est intéressant de noter qu'une telle association n'a pas été retrouvée chez les patients traités par rivaroxaban, probablement du fait que la dose réduite dans la fibrillation atriale correspond à 50 % de la dose pleine, contre 75 % de la dose pleine pour le rivaroxaban.

L'une des originalités de notre étude a été d'explorer l'influence potentielle de facteurs pharmacogénétiques sur la réponse aux xabans. Nous montrons que la présence des variants d'*ABCB1* (exons 12, 21 et 26), *CYP3A5*3* et *CYP2J2*7* n'a pas d'impact significatif sur la réponse pharmacocinétique au rivaroxaban ou à l'apixaban. Bien que ces variants « pertes de fonction » puissent être associés à une augmentation théorique des concentrations plasmatiques, les patients ADAGE porteurs de ces variants génétiques n'ont pas de concentrations significativement plus élevées que les patients non mutés, à T_{\max} comme à T_{\min} . Nous confirmons les résultats obtenus chez les volontaires sains de l'essai DRIVING après une prise unique de rivaroxaban concernant l'absence d'impact significatif de l'haplotype *ABCB1* 2677–3435 (exons 21 et 26) [231], en accord avec d'autres résultats résumés dans une revue récente de la littérature sur AOD et variants pharmacogénétiques [249]. Ainsi, aucune influence de la présence des variants d'*ABCB1* identiques à ceux que nous avons étudiés n'a été mise en évidence dans l'étude menée par Roşian et collègues chez 53 patients d'âge médian 70 ans traités par apixaban pour fibrillation atriale. Il en est de même dans l'étude menée par Ueshima et collègues chez des patients japonais

traités par apixaban dans la même indication [175,251]. En revanche, Ueshima observe un impact d'*ABCG2*, ce qui reste à confirmer dans d'autres cohortes dont ADAGE [251].

Enfin, il est difficile de tirer des conclusions dans le groupe dabigatran au vu du nombre limité de patients et donc de prélèvements au pic et en résiduel. On peut noter néanmoins qu'aucun patient ne présentait à 12 h de la prise une concentration résiduelle supérieure à 200 ng/mL, valeur considérée comme le seuil à partir duquel le risque hémorragique est accru [179].

Avec l'ensemble de ces résultats, nous apportons de nouvelles données pharmacocinétiques en vie réelle chez patients gériatriques, permettant de faciliter l'interprétation des résultats quand la mesure des AOD est pratiquée chez ces patients. Il existe toutefois des limites à ces interprétations. Le temps auquel la concentration est maximale est très variable d'un individu à l'autre et sans prélèvements itératifs, il n'est pas possible de déterminer avec certitude la C_{max} , ce qui n'est pas le cas pour la résiduelle, plus fiable. De plus, 10,6 % des patients ayant une concentration résiduelle inférieure au seuil de quantification (20 ng/mL), la variabilité ne peut être explorée de manière optimale. Il est aussi notoire que l'exactitude des résultats n'est pas excellente dans les enquêtes d'évaluation externe de la qualité pour les concentrations d'AOD inférieures à 50 ng/mL [142]. Il reste également à identifier des causes de variabilité importante à T_{max} et à T_{min} chez certains patients particuliers dans une cohorte plus large de patients afin d'augmenter la puissance de l'analyse.

Performances des méthodes pour évaluer la pharmacodynamie des xabans

Face à l'intérêt grandissant de la génération de thrombine pour étudier l'effet des AOD, le ST-Genesia se présentait comme un candidat de choix pour l'étude ADAGE. Nous avons déterminé les performances analytiques du système, en parallèle de l'analyse pharmacodynamique des AOD chez les patients ADAGE. Nous avons analysé dans ce but les données des contrôles de qualité et des plasmas de référence, en utilisant trois réactifs différents : STG-DrugScreen et STG-ThromboScreen, ce dernier à la fois en présence et en l'absence de thrombomoduline. Dans l'ensemble, des résultats satisfaisants ont été obtenus, avec des coefficients de variations (CV) inférieurs à 4 % pour la répétabilité et à 7 % pour la reproductibilité, et ce pour la majorité des paramètres, aussi bien avec le STG-ThromboScreen qu'avec le STG-DrugScreen. Ces performances étaient meilleures que celles obtenues préalablement par notre groupe sur un prototype de ST-Genesia, avec des

réactifs non encore marqués CE [192]. Des résultats similaires aux nôtres ont été obtenus par Calzavarini et collègues avec le réactif STG-DrugScreen (avec ou sans TM) [226], rapportant des valeurs de CV pour PH et ETP légèrement supérieures quand elles étaient exprimées en valeurs absolues. En revanche, les CV des mesures normalisées étaient comparables aux nôtres, soulignant l'intérêt d'utiliser un plasma de référence dédié pour améliorer les comparaisons inter-laboratoires, particulièrement pour l'ETP [226,262–264]. Concernant le réactif STG-DrugScreen, Douxfils et collègues ont montré des résultats comparables [224]. Ce travail de thèse apporte également de nouvelles données sur la justesse, exprimée par le biais entre la valeur mesurée des contrôles internes de qualité et la valeur cible proposée par le fabricant. Les biais étaient dans l'ensemble tous acceptables à l'exception d'un contrôle interne de qualité pour lequel nous avons dû redéfinir la cible pour PH et ETP exprimés en valeurs absolues. Ceci nous invite à souligner l'intérêt de tester les nouveaux lots de contrôles internes de qualité avant leur utilisation en routine pour redéfinir localement la cible si nécessaire. Pour pouvoir réaliser des comparaisons inter-laboratoires, il est devenu indispensable d'inclure le test de génération de thrombine réalisé sur ST-Genesia dans les programmes d'évaluation externe de la qualité. Les performances analytiques évaluées dans le service d'Hématologie biologique de l'hôpital Lariboisière ainsi que les bons résultats de l'évaluation des compétences des techniciens nous ont permis d'ajouter le TGT dans notre ensemble d'analyses accréditées COFRAC.

L'un des points forts de cette partie de l'étude réside dans l'analyse de différents plasmas commerciaux, en plus du plasma de référence (STG-RefPlasma) utilisé pour la normalisation des résultats. Étudiés avec le réactif STG-ThromboScreen (concentration intermédiaire en facteur tissulaire), les plasmas lyophilisés (PoolNorm et STG-RefPlasma) montrent des valeurs de PH et d'ETP plus élevées que le plasma congelé (Cryocheck). En particulier, les valeurs médianes pour PH et ETP mesurées chez les volontaires sains de l'essai DRIVING (âge médian 28 ans) ou chez les adultes en bonne santé de l'étude de Calzavarini (âge médian 48 ans) se situaient entre les valeurs mesurées sur le plasma lyophilisé et celles mesurées sur le plasma congelé [192,226]. Plusieurs raisons pourraient expliquer cela : d'une part le procédé de lyophilisation pourrait augmenter significativement la quantité de thrombine générée ; d'autre part, tandis que les taux de facteurs procoagulants sont similaires au sein des différents plasmas commerciaux étudiés, les inhibiteurs naturels de la coagulation étaient à des taux 15 à 30 % supérieurs dans le plasma congelé par rapport aux deux plasmas lyophilisés. Étant donné que le STG-RefPlasma, avec ses valeurs de PH et ETP relativement élevées est utilisé pour la

normalisation, il n'est pas surprenant que les valeurs normalisées médianes de PH varient de 55 à 75 % et celles d'ETP de 68 à 78 % chez les volontaires sains [192,226], plutôt qu'autour de 100 % comme attendu. En conséquence, il convient d'interpréter les valeurs normalisées en fonction d'intervalles de références préalablement établis : en pratique clinique, des valeurs de PH et ETP de 55 % et 68 % respectivement correspondent à de la normo-coagulation et non pas à de l'hypo-coagulation. Une tendance similaire, quoique moins prononcée, a été observée avec les paramètres temporels (ratios variant de 1,1 à 1,3). L'influence des taux individuels de facteurs pro- et anticoagulants sur les paramètres de génération de thrombine reste à être établie avec le système ST-Genesisia. Pour ces raisons, nous avons opté dans le traitement ultérieur de nos données pour l'utilisation des valeurs absolues des paramètres, et non normalisées à l'aide des valeurs du plasma de référence, puisque l'étude biologique était centralisée. Il en serait différemment dans une étude multicentrique.

Pour comparer l'effet du rivaroxaban et de l'apixaban sur la génération de thrombine *in vitro*, nous avons choisi d'utiliser du plasma normal congelé surchargé avec des concentrations croissantes en chacun des xabans. Nous avons confirmé le fait que l'allongement des paramètres temporels ainsi que la diminution de la concentration maximale de thrombine et du potentiel endogène de thrombine dépendent de la concentration, comme déjà retrouvé aussi bien *in vitro* qu'*ex vivo* [191,192,198,199,210,224,265]. Ces données confirment que la mesure des paramètres de génération de thrombine sur ST-Genesisia permet une évaluation fiable de la réponse pharmacodynamique au rivaroxaban et à l'apixaban, avec une fiabilité accrue du PH par rapport à ETP notamment *ex vivo* [191,192,210]. Par ailleurs, ce travail montre de manière intéressante que des concentrations moléculaires comparables (exprimées en nM) en apixaban et en rivaroxaban entraînaient des PH et ETP comparables. Concernant les conditions expérimentales, le STG-DrugScreen offre des résultats fiables pour des concentrations en xaban jusqu'à 1000 nM. Néanmoins, le STG-ThromboScreen est plus sensible aux faibles concentrations, en particulier en dessous de 250 nM. Ce réactif permet en outre de mettre en évidence l'effet inhibiteur de la protéine C activée lorsqu'il est utilisé en présence de thrombomoduline, titrée de manière à diminuer de 50 % l'ETP à l'état basal comme nous l'avons effectivement vérifié. Par ailleurs, il a été mis en évidence un allongement plus important des paramètres temporels en présence de rivaroxaban qu'en présence d'apixaban, en accord avec les travaux publiés par Georges Jourdi et collègues dans notre groupe [223]. En effet, à affinité équivalente pour le facteur X activé, le rivaroxaban neutralise quatre fois plus rapidement le facteur X activé que l'apixaban,

expliquant les différences de réponse pharmacodynamique entre ces deux xabans. L'effet du dabigatran sur les paramètres de la génération de thrombine mesuré en ST-Genesia sera discuté plus loin.

Enfin, les résultats obtenus *ex vivo* avec ST-Genesia (STG-ThromboScreen) et CAT (*PPP reagent*) montrent une concordance entre les deux systèmes, mais avec certains biais. Les biais observés sur la PH et l'ETP, qui ne sont pas constants en fonction des niveaux de PH et d'ETP, peuvent s'expliquer, d'une part par la différence de concentration en facteur tissulaire qui n'est pas strictement identique [266], d'autre part, par les différences de calibration des deux systèmes et de contrôle de la température. L'utilisation croisée de ces deux systèmes par Talon et collègues suggère en outre que le réactif utilisé aurait un impact plus important que le système d'analyse lui-même [266].

Une originalité de mon travail de thèse a été d'étudier la pharmacodynamie des AOD à l'aide d'un second système d'analyse, le *Thrombodynamics-4D Analyser System*, chez des patients recevant des AOD (article en préparation). Pour mémoire, ce système initialement conçu pour la fibrinographie mesure aussi la génération de thrombine suivant une méthode très proche de celle de référence développée par Hemker et son équipe [222]. La principale différence, assurant le caractère novateur du Thrombodynamics-4D, est que l'activation se fait par mise en contact d'un insert revêtu de facteur tissulaire avec le plasma à tester (le facteur tissulaire ne diffusant pas dans le plasma) [236,237,267]. Dans une étude *in vitro*, à l'aide de plasmas surchargés en apixaban, rivaroxaban ou dabigatran, nous avons pu observer d'excellentes corrélations entre les concentrations de xabans et de dabigatran et les valeurs des paramètres de la génération de thrombine mais aussi avec plusieurs paramètres de fibrinographie, permettant de valider le système Thrombodynamics-4D pour l'étude pharmacodynamique chez les patients.

Paramètres de la génération de thrombine chez les patients ADAGE traités par xabans

Nous avons pu mettre en évidence des relations statistiquement très significatives entre les paramètres de génération de thrombine et les concentrations plasmatiques des xabans dans la cohorte de patients ADAGE traités par rivaroxaban ou apixaban, que les paramètres soient mesurés avec ST-Genesia dans les trois conditions ou avec le Thrombodynamics-4D : allongement des temps de latence et des temps au pic ($p < 10^{-4}$), témoignant du retard de la formation de thrombine que provoque l'inhibition du facteur

Xa par le rivaroxaban ou l'apixaban, diminution de la concentration maximale de thrombine ($p < 10^{-4}$) ; les résultats concernant le potentiel endogène de thrombine sont plus hétérogènes, notamment avec le DrugScreen, la hauteur de pic apparaissant comme un paramètre plus robuste sur le ST-Genesisia.

Dans la littérature, c'est le système CAT qui est le plus souvent utilisé pour mesurer la génération de thrombine dans des petites séries de volontaires sains (âge moyen autour de 40 ans) pour chacun des trois AOD [197,199,205], ou chez des patients en contexte de chirurgie orthopédique [201,202,204,206], ou bariatrique [196], mais avec des âges moyens ou médians allant de 64 à 69 ans. Concernant les autres études chez les patients traités par AOD pour fibrillation atriale, des résultats similaires ont été retrouvés pour le temps de latence et l'ETP, mais avec en revanche un lien non significatif entre les concentrations en AOD et la concentration maximale en thrombine [204] ou bien le temps au pic [193,200]. Cependant, ces études ne concernaient qu'un faible nombre de patients ($n = 17, 20$ et 20 , respectivement). Les résultats d'une étude récente menée par Pfrepper et collègues (2020) chez 40 patients traités par apixaban (5 mg $\times 2$) et 32 traités par rivaroxaban (20 mg), toutes indications confondues, avec la génération de thrombine mesurée sur ST-Genesisia en présence de STG-DrugScreen sont en accord avec les nôtres concernant la meilleure robustesse du pic de thrombine comparée à celle de l'ETP [191].

Paramètres de la génération de thrombine chez les patients ADAGE traités par dabigatran

Deux études rapportent des résultats paradoxaux obtenus avec le CAT chez des patients traités par dabigatran pour fibrillation atriale et en contexte de chirurgie orthopédique [194,201] : si un allongement des paramètres temporels est bien retrouvé, il s'accompagne d'une augmentation de la concentration maximale de thrombine et de l'ETP pour de faibles concentrations de dabigatran. Il faut savoir que la méthode CAT utilise un algorithme pour soustraire la part du signal de fluorescence due à l'hydrolyse du substrat fluorogène par la thrombine liée à l' α -2-macroglobuline. Le dabigatran (contrairement aux xabans) se lie aussi bien à la thrombine libre qu'à la thrombine liée à l' α -2-macroglobuline (avec une affinité moindre) : la totalité du dabigatran n'exerce donc pas son activité inhibitrice vis-à-vis de la thrombine libre [268–270]. Même si la calibration unique par série avec le ST-Genesisia est devenue indépendante des échantillons contrairement à celle sur le CAT effectuée sur chaque échantillon de plasma, éliminant ainsi le problème d'une calibration faussée par la présence du dabigatran, nos expériences préliminaires avec le ST-Genesisia montrent que l'effet paradoxal observé sur la hauteur de pic et l'ETP persiste

quand le ThromboScreen est utilisé ; il serait lié à l'interaction entre dabigatran et la thrombine générée. C'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi l'analyse des patients ADAGE avec le ST-Genesis. Pfrepper et collègues (2020) observent le même phénomène sur la hauteur de pic et l'ETP chez 20 patients traités par dabigatran en utilisant le STG-Drugscreen [191]. Concernant les rares données de génération de thrombine en vie réelle chez des patients traités par AOD pour fibrillation atriale, une étude menée avec le système Innovance ETP® chez 20 patients d'âge moyen 70 ans traités par dabigatran montre une diminution de la hauteur du pic et de l'ETP 3 h après la prise sans qu'un effet paradoxal soit signalé [200]. En revanche, l'effet paradoxal est *a priori* corrigé avec le Thrombodynamics-4D, utilisant un algorithme de calcul différent [271], ce qui explique les bonnes corrélations obtenues chez les patients ADAGE traités par dabigatran. L'intervalle de concentrations plasmatiques couvert dans ce groupe de patients reste néanmoins limité : il convient de vérifier ces résultats sur un plus grand nombre de sujets.

Variabilité de la réponse pharmacodynamique chez les patients ADAGE et hypercoagulabilité

Nos résultats de thrombinographie permettent en outre de mettre en évidence un état d'hypercoagulabilité sous-jacent chez une fraction des patients très âgés. De façon tout à fait intéressante, cet état est objectivé par les résultats de la hauteur de pic et l'ETP, pour lesquels, pour des plages de concentrations similaires, les valeurs obtenues sont beaucoup plus élevées chez les sujets âgés ADAGE comparativement aux résultats *in vitro* ou aux volontaires sains DRIVING pour le rivaroxaban [192,233]. Une étude menée par Haidl et collègues avait déjà permis de mettre en évidence une relation entre l'âge et les paramètres de génération de thrombine à l'état basal, mais malheureusement les sujets inclus dans cette étude ont au plus 60 ans [272]. Il est bien connu que le déséquilibre de la balance entre facteurs pro- et anticoagulants s'accroît avec l'âge dans le sens d'une hypercoagulabilité. L'étude fibrinographique réalisée sur Thrombodynamics-4D chez les patients ADAGE confirme cette hypothèse avec une augmentation de la densité du caillot étroitement liée à la fibrinogénémie, supérieure à 4 g/L chez de nombreux patients. De plus, les représentations graphiques de PH et de l'ETP chez les patients ADAGE permettent également de mettre en évidence une très importante dispersion des données, témoignant d'une grande variabilité inter-individuelle de la réponse pharmacodynamique aux xabans, notamment comparativement aux volontaires sains DRIVING. Ainsi, nos données suggèrent que l'inhibition de la génération de thrombine est d'intensité très variable d'un sujet âgé à un autre pour de mêmes niveaux de concentration d'AOD. Le lien potentiel

entre cette variabilité et les données d'efficacité et de sécurité du traitement reste à être exploré sur un grand nombre de patients. Par ailleurs, en cas de réversion nécessaire de l'anticoagulation du patient, l'état d'hypocoagulabilité estimé par la génération de thrombine associé à la concentration d'AOD pourrait permettre de mieux guider le prescripteur pour le choix de l'agent hémostatique et de sa posologie, comparativement à la seule concentration d'AOD [195,203–205].

Influence des facteurs individuels sur les paramètres de génération de thrombine

La variabilité inter-individuelle pharmacodynamique n'a été que très peu explorée et jamais dans une cohorte spécifiquement gériatrique. Elle est complémentaire de l'étude de la variabilité pharmacocinétique. En particulier, l'existence d'une insuffisance cardiaque explique environ 10 % de la variabilité de la hauteur de pic à T_{\max} et à T_{\min} chez les patients traités par rivaroxaban en analyse univariée. Un retentissement de l'insuffisance cardiaque sur le flux sanguin hépatique et donc à un déséquilibre de la synthèse par l'hépatocyte entre facteurs procoagulants (V, VII...) et anticoagulants ainsi que d'autres modifications hémodynamiques peuvent conduire à un état d'hypocoagulabilité relatif auquel s'ajoute l'effet du rivaroxaban. La prise d'amiodarone est également significativement associée à la hauteur de pic et à l'ETP à T_{\max} et à T_{\min} . En analyse multivariée, seul le degré d'insuffisance rénale influence significativement la hauteur de pic avec un probable effet confondant, les insuffisants cardiaques étant fréquemment insuffisants rénaux. Il est intéressant de remarquer que la concentration en rivaroxaban n'est pas retrouvée comme prédicatrice de l'effet.

Pour les patients ADAGE traités par l'apixaban, la concentration en apixaban est au contraire le seul facteur influençant l'effet de l'apixaban sur la concentration maximale de thrombine indépendamment d'autres facteurs de variabilité individuels, confirmant le rôle déterminant de la posologie comme évoqué supra.

Notons que, comme pour l'étude pharmacocinétique, la variabilité inter-individuelle du T_{\max} peut avoir un retentissement direct sur l'effet mesuré si des prélèvements itératifs ne sont pas pratiqués ; de plus, les thrombogrammes générés étant assez plats au T_{\max} , la précision de la hauteur de pic est moins grande qu'au T_{\min} . Telles sont les limites de l'interprétation de la variabilité pharmacodynamique.

Suivi clinique des patients ADAGE traités par xaban

L'étude ADAGE comprenait un suivi clinique des patients à six mois, avec recueil des événements hémorragiques majeurs et non majeurs cliniquement pertinents, les événements thrombotiques et les décès toutes causes. Malgré les difficultés de suivi dans cette tranche d'âge, le nombre de perdus de vue a été faible, ne concernant que 11 patients soit 5 % des patients de la cohorte. Sur les 6 mois ayant suivi leur inclusion, 24 patients (soit 11,1 % des patients inclus, 11 traités par rivaroxaban et 13 par apixaban) ont présenté un événement hémorragique. Treize de ces événements étaient des saignements majeurs, soit 6,3 % des patients suivis, dont quatre cas de saignements fatals. Enfin, 5 patients ont présenté un événement thrombo-embolique, quatre dans le groupe apixaban et un dans le groupe rivaroxaban. Dans le groupe de patients traités par rivaroxaban inclus dans ADAGE, onze événements hémorragiques ont été rapportés, dont quatre d'origine digestive ; dans le groupe des patients traités par apixaban, treize événements hémorragiques ont été rapportés, dont trois d'origine digestive. La prédominance de saignement au niveau digestif, comme chez les patients des essais cliniques ou des registres, pourrait s'expliquer par le fait qu'une partie de la molécule active traverse le tube digestif pour être éliminée dans les selles, ce qui pourrait démasquer des lésions préexistantes, malignes, inflammatoires ou érosives, ou des angiodysplasies plus fréquentes dans cette tranche d'âge [273]. Par ailleurs, la mortalité toute cause confondue à six mois était de 18,1 % avec une proportion équivalente dans les deux groupes. Dans le registre italien de Giustozzi et collègues, qui incluait 245 patients traités par AOD, âgés de 90 ans ou plus, la mortalité toute cause était de 19,4 patients-années [274] ; toutefois, aucune caractéristique sur les comorbidités des patients inclus n'est précisée dans cette étude.

L'étude ADAGE n'étant pas dimensionnée pour évaluer l'efficacité et la tolérance des AOD chez les patients âgés, les résultats ne nous permettent pas de comparer le nombre d'événement aux résultats des essais pivots ou des registres publiés. Il reste cependant intéressant de noter que l'étude de Patti *et al*, rassemblant les données des patients de 75 ans et plus de deux registres européens, PREFER in AF et PREFER in AF PROLONGATION, et incluant 1156 patients traités par AOD pour fibrillation atriale (772 patients par rivaroxaban, 356 par apixaban et 428 par dabigatran) a montré, à un an de suivi, 40 saignements majeurs, soit 2,7 % de la population, et 37 événements thrombo-emboliques, soit 2,5 % de la population [275]. En France, des données récentes chez 995 patients d'âge moyen 86 ans traités par rivaroxaban rapportent un taux de saignement

majeur de 6,3 % à un an de suivi [260], dans le même ordre de grandeur que celui de la cohorte ADAGE à 6 mois. Toujours pour le rivaroxaban, les 60 patients, d'âge moyen 73 ans avec fibrillation atriale inclus dans l'étude de Miklič et collègues avaient quant à eux un taux de saignement majeurs de 5,0 % ; les auteurs rapportent des concentrations résiduelles en rivaroxaban significativement plus importantes chez les 28 patients ayant présenté un saignement (soit 46,7% des patients), toute gravité confondue y compris mineure, avec une durée de suivi variable allant jusque 20 mois [173]. Nous n'avons pas retrouvé de relation entre les concentrations plasmatiques et les saignements ($p = 0,7218$) chez les patients ADAGE, qui ne bénéficiaient pas tous de prélèvement au pic et en résiduel, d'où un manque de puissance potentiel dans notre étude. Enfin, il n'apparaissait pas de différence dans la survenue d'événement hémorragique entre les patients du groupe rivaroxaban et ceux du groupe apixaban ($p = 0,7518$), malgré, pour mémoire, des patients avec un score CIRS-G et HEMORR₂HAGES significativement plus élevé dans ce dernier groupe. La méta-analyse (sur des données en vie réelle) de Proietti et collègues suggère un meilleur profil de sécurité de l'apixaban par rapport au rivaroxaban, avec une réduction du risque relatif pour les saignements majeurs de 46 % ($p < 0,00001$) [276]. Comme déjà évoqué plus haut, nos résultats peuvent refléter une préférence des gériatres à prescrire l'apixaban aux patients les plus fragiles.

Ce travail de thèse a également permis une évaluation de la conformité des prescriptions d'AOD chez un échantillon de patients en gériatrie. Parmi les patients ADAGE, des régimes posologiques non strictement conformes aux critères (créatinine sérique, âge et poids) ont été retrouvés pour 35 patients (31,5 %) traités par apixaban. Concernant le rivaroxaban, la posologie n'était pas conforme au critère qu'est la fonction rénale pour 32 patients (31 %). Une très grande majorité d'entre eux était sous-dosés. Deux patients sous-dosés ont présenté un événement thrombo-embolique. En revanche, aucun patient surdosé n'a eu d'événement hémorragique. Les inadéquations de posologie s'expliquent souvent par l'appréhension du praticien à traiter les patients par anticoagulant, et en particulier par AOD, notamment lorsque le risque hémorragique est très élevé. Or, il est connu que les scores de risque hémorragique actuellement validés ne le sont pas spécifiquement dans une population gériatrique. En comparaison, parmi les patients de l'essai XANTUS (âge moyen 71 ans), 21 % recevaient la dose de 15mg de rivaroxaban par jour tandis qu'ils étaient moins de 10 % à avoir une clairance de la créatinine comprise entre 15 et 49 mL/min [145]. Dans l'étude SAFIR, ils étaient 63 % à recevoir la posologie de 15 mg et 84,5 % des patients avec une clairance comprise entre 30 et 49 mL/min recevaient cette posologie [260].

La comparaison des caractéristiques des patients pour chacun des deux xabans ne montre pas de différence significative entre les patients ayant saigné et ceux n'ayant pas saigné. Une analyse des données de l'étude ROCKET-AF montrait un risque de saignements majeurs et non majeurs cliniquement pertinents plus important chez les patients les plus polymédiqués [277], ce qui n'apparaît pas dans l'étude ADAGE ($p = 0,6047$) ; toutefois, la polymédication touche une grande majorité des patients ADAGE avec, de fait, peu de variabilité au sein de cette cohorte.

D'autre part, bien que l'association ne soit pas statistiquement significative, il est intéressant de noter que 12,9 % des patients recevant des anti-agrégants plaquettaire ont présenté un saignement, d'autant plus que pour certains patients, il n'y avait pas d'indication formelle à une anti-agrégation plaquettaire en plus de l'anticoagulation par AOD. Ceci rappelle l'importance de réévaluer les indications des traitements antithrombotiques, en particulier chez les patients âgés ; ainsi, l'essai RELAXED mené chez 1309 patients japonais d'âge moyen 77 ans a montré une association entre le risque de saignement majeur et la prise d'anti-agrégants plaquettaire avant la mise en place du traitement par rivaroxaban [157].

Enfin, la comparaison des paramètres de génération de thrombine entre les groupes de patients ayant saigné et n'ayant pas saigné n'a pas pu être réalisée : en effet, les patients ayant eu un événement hémorragique n'ont pas tous pu être testés en génération de thrombine, réduisant le nombre de patients analysables au point de ne plus permettre d'analyse pertinente.

Limites de l'étude

Ce travail comporte certaines limites dont certaines ont déjà été évoquées. Le protocole prévoyait un à cinq prélèvements par patient sur une période de 20 jours après inclusion ; aussi était-il attendu d'avoir en moyenne trois prélèvements par patient. En réalité, comme les prélèvements étaient réalisés dans le cadre des soins prévus durant l'hospitalisation, les patients ont été prélevés en moyenne deux fois, impliquant que le nombre de malades initialement prévu ($n = 75$) a dû être revu à la hausse pour le rivaroxaban et l'apixaban. Ce plan de prélèvements prévu par le protocole, respectueux des contraintes gériatriques, a cependant limité la puissance de l'étude statistique.

En regard du protocole établi, le travail d'étude de la réponse pharmacocinétique et pharmacodynamique concernait aussi bien des patients traités par rivaroxaban et apixaban que par dabigatran. Du fait de la rareté des prescriptions du dabigatran chez les

patients gériatriques, il n'a été possible de recruter que 50 patients traités par dabigatran. Si cette base de patients nous permet d'apporter des données en vie réelle sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du dabigatran, il n'a toutefois pas été possible de mesurer la variabilité de réponse et d'étudier les facteurs influençant cette réponse.

Enfin, l'étude de l'influence de la réponse pharmacocinétique et pharmacodynamique sur le risque de saignement ou de thrombose est limitée, comme évoqué *supra*, par le nombre de prélèvements, dans le sens où plusieurs patients ayant connu un événement clinique n'ont pas eu systématiquement de prélèvement à T_{\max} et à T_{\min} .

CONCLUSION

Ces travaux de thèse mettent en évidence l'intérêt majeur de ces deux systèmes innovants de génération de thrombine (et de fibrinographie pour le Thrombodynamics-4D) dans l'analyse de la pharmacodynamie des AOD chez le patient âgé. Au regard de l'ensemble des travaux réalisés avec le ST-Genesis, ce dernier nous paraît être un outil fiable et performant pour l'exploration de la pharmacodynamie du rivaroxaban et de l'apixaban, notamment chez les patients âgés. Les différents réactifs disponibles permettent cette exploration sous différents aspects : avec sa concentration intermédiaire en facteur tissulaire, le STG-ThromboScreen, avec ou sans thrombomoduline, permet d'analyser l'effet des xabans avec plus de sensibilité et permet de calculer le pourcentage d'inhibition en présence de thrombomoduline. Le STG-DrugScreen quant à lui, avec sa forte concentration en facteur tissulaire, permet de réaliser un TGT même pour des hautes concentrations en xabans jusqu'à 400 ng/mL, tandis que le STG-ThromboScreen fournit un thrombogramme plat à partir de 300 ng/mL. Son principe d'utilisation lui permet également de réaliser un grand nombre de TGT par jour pour un seul automate, pouvant aller jusqu'à une trentaine d'échantillons (pour 3 TGT réalisés par échantillon avec les différents réactifs), avec l'intérêt de ne demander qu'un temps d'utilisateur limité. Le Thrombodynamics-4D quant à lui permet une étude de la pharmacodynamie du dabigatran en plus des xabans et une étude de fibrinographie du plasma que le ST-Genesis ne permet pas. Sa prise en main est beaucoup plus simple que le ST-Genesis, ne nécessitant qu'un temps de formation court, toutefois il n'est à ce jour pas fourni avec ses propres contrôles de qualité. Avec deux échantillons analysables par heure (pour TGT + fibrinographie, hors préincubation des réactifs), le temps utilisateur total par échantillon limite son intérêt pour l'analyse de grandes séries, mais en fait un outil de choix pour des petites séries d'échantillons. Notons tout de même que le thrombogramme et le fibrinogramme sont réalisés parallèlement à partir d'un même volume très réduit de plasma (120 µL), ce qui est particulièrement adapté aux prélèvements gériatriques. Bien que l'intérêt du TGT en routine hospitalière ne porte aujourd'hui que sur un nombre limité d'applications [187], ces travaux nous confortent dans son rôle clé pour l'étude pharmacodynamique des AOD, aussi bien à grande échelle en recherche clinique qu'isolément chez des malades spécifiques.

Les résultats obtenus dans la cohorte des patients ADAGE traités par rivaroxaban et apixaban mettent en évidence une importante variabilité pharmacocinétique à T_{max} , et

également à T_{\min} pour l'apixaban. La variabilité pharmacodynamique reste plus délicate à quantifier, toutefois nos résultats montrent que le test de génération de thrombine, réalisé avec les systèmes ST-Genesia et Thrombodynamics-4D, permet une étude fiable et performante de la pharmacodynamie des AOD, notamment chez le patient très âgé, la fibrinographie permettant d'apporter des données complémentaires sur l'état d'hypercoagulabilité. La survenue d'événements hémorragiques et thrombotiques graves reste limitée dans la cohorte ADAGE, à six mois après inclusion ; ces données sont rassurantes quant à l'usage des xabans en prévention du risque thrombotique lié à la fibrillation atriale chez les patients très âgés et fragiles.

L'objectif final de l'étude ADAGE est de modéliser par approche de population les profils pharmacocinétiques du rivaroxaban et de l'apixaban et d'évaluer l'influence des facteurs individuels clinico-biologiques, thérapeutiques et génétiques sur ces profils. Cette modélisation devrait permettre de mieux appréhender la réponse au rivaroxaban et à l'apixaban chez les patients âgés traités pour fibrillation atriale, en prenant en compte leurs caractéristiques individuelles (telles que le sexe, la fonction rénale, les traitements reçus comme l'amiodarone, etc.). En pratique, ces modèles pourraient permettre, par exemple, de mieux anticiper la décroissance des concentrations en xaban chez des malades devant recevoir un geste invasif urgent.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Extrait du livret de recueil des données patients.	198
Annexe 2 : Design de l'étude DRIVING, d'après Gouin-Thibault et al.	203
Annexe 3 : Foulon-Pinto et collègues, <i>Int J Lab Hematol</i> 2020.....	204
Annexe 4 : Lefrère et collègues, <i>Thromb. Res.</i> 2019.	214

Annexe 1 : Extrait du livret de recueil des données patients.

J0		CARACTERISTIQUES CLINIQUES	
DATE =		Nom patient :	
<u>Co-morbidités chroniques stables</u> : (liste exhaustive, ne pas faire le « tri ») Préciser notamment : insuffisance cardiaque O/N, insuffisance rénale O/N, insuffisance hépatique O/N			
<u>Co-morbidités chroniques en progression</u> :			
<u>Pathologies aiguës</u> : (y compris l'indication du traitement anticoagulant)			
<u>Quel anticoagulant ?</u> Dabigatran O Rivaroxaban O Apixaban O			
<u>Posologie:</u>			
<u>Date de début du traitement :</u>			
<u>Spécialité et lieu d'exercice du médecin à l'origine de la prescription :</u>			
<u>Liste exhaustive des médicaments et posologie:</u>			
- Nombre de spécialités :			
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
Préciser notamment :			
Amiodarone O, Ketoconazole O, itraconazole O, Verapamil O, Quinidine O, Clarithromy cine O			
⇒ avec ces réponses remplir la grille de co-morbidité CIRS-G			

Annexe 1 (suite).

Score de co-morbidité : CIRS-G					
Nom Patient :					
Instructions de cotation du CIRS : pour chaque système, indiquer le degré de sévérité :					
⚠ <i>Attention : on a tendance à oublier des co-morbidités quand elles ne posent pas de problème aigu</i>					
0 = aucun	pas de trouble de l'organe ou du système				
1 = léger	<table style="border: none;"> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>trouble n'affectant pas l'activité normale</td></tr> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>un traitement peut être ou ne pas être requis ; pronostic excellent</td></tr> </table>	{	trouble n'affectant pas l'activité normale	{	un traitement peut être ou ne pas être requis ; pronostic excellent
{	trouble n'affectant pas l'activité normale				
{	un traitement peut être ou ne pas être requis ; pronostic excellent				
2 = modéré	<table style="border: none;"> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>trouble affectant l'activité normale</td></tr> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>un traitement est nécessaire ; pronostic bon</td></tr> </table>	{	trouble affectant l'activité normale	{	un traitement est nécessaire ; pronostic bon
{	trouble affectant l'activité normale				
{	un traitement est nécessaire ; pronostic bon				
3 = sévère	<table style="border: none;"> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>trouble invalidant ou handicapant</td></tr> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>un traitement est urgent ; pronostic réservé</td></tr> </table>	{	trouble invalidant ou handicapant	{	un traitement est urgent ; pronostic réservé
{	trouble invalidant ou handicapant				
{	un traitement est urgent ; pronostic réservé				
4 = très sévère	<table style="border: none;"> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>trouble menaçant la vie</td></tr> <tr><td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">{</td><td>traitement urgent ou inefficace ou n'existant pas ; pronostic grave</td></tr> </table>	{	trouble menaçant la vie	{	traitement urgent ou inefficace ou n'existant pas ; pronostic grave
{	trouble menaçant la vie				
{	traitement urgent ou inefficace ou n'existant pas ; pronostic grave				
Items du CIRS-G (si plusieurs maladies dans même système, coter la plus grave)	SCORE (0 à 4)				
CARDIAQUE cœur seulement					
HEMATOLOGIE sang, moelle osseuse, rate, vaisseaux sanguins, ganglions					
HTA cotation fondée sur sévérité (organes touchés cotés séparément)					
RESPIRATOIRE poumons, bronches, trachée sous larynx					
ORL et OPH oreilles, nez, larynx, yeux					
DIGESTIF SUP œsophage, estomac, duodénum, voies biliaires, pancréas					
DIGESTIF INF reste des intestins, dont hernies					
HEPATIQUE foie seulement					
RENAL reins seulement					
GENITO-URINAIRE uretères, urètre, prostate, vessie, gonades					
MUSCULO-SQUELETTIQUE et TEGUMENTS muscles, os, peau					
NEUROLOGIQUE cerveau, (<u>démences exclues</u>), moelle épinière, nerfs					
ENDOCRINO-METABOLIQUE diabète, infection diffuse, intoxication					
PSYCHIATRIE inclut <u>démences</u> , agitation, dépression, anxiété, psychoses					
<u>CIRS-G total</u>					
<u>CIRS composite</u> = nombre de systèmes cotés ≥ 2					

Annexe 1 (suite).

Données cardiovasculaires				
<u>Caractéristiques de la Fibrillation auriculaire :</u>				
Persistante	O	Paroxystique	O	Permanente
				O
<u>Facteurs de risque cardiovasculaires :</u>				
HTA	O	Diabète	O	Dyslipidémie
				O
				Tabac
				O
				Surpoids
				O
<u>Constantes à J0 :</u>				
		Tension artérielle :	/	mmHg,
		Fréquence cardiaque :	/	min
<u>Score de CHA₂ DS₂ VASc :</u>				
Age > 75 ans :				+ 2
Sexe féminin :				+ 1
Insuffisance cardiaque :				+ 1
HTA :				+ 1
Vasculopathie (IDM, Athérome aortique, AOMI) :				+ 1
Diabète :				+ 1
AVC ou AIT :				+ 2
				TOTAL :
<u>Score HAS- BLED :</u>				
TA Systolique > 160 mmHg				+ 1
Dialyse/transplantation rénale/Créatinine > 200µmol/l				+ 1
Cirrhose/bilirubine > 2 N/ ASAT, ALAT, PAL > 3 N				+ 1
AIT/AVC				+ 1
Saignement				+ 1
INR labiles				+ 1
Age > 65 ans				+ 1
AINS/antiagrégants				+ 1
Alcoolisme				+ 1
				TOTAL :
<u>Score HEMORR₂HAGES :</u>				
Age > 75 ans :				+ 1
Saignement majeur :				+ 2
Hépatopathie/néphropathie:				+ 1
Alco olisme :				+ 1
Cancer :				+ 1
HTA non traitée :				+ 1
Anémie :				+ 1
Risque de chute :				+ 1
AVC/AIT :				+ 1
Thrombopénie :				+ 1
				TOTAL :

Annexe 1 (suite).

J0		CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES			
DATE =		Nom patient :			
 = résultats biologiques datant d'une semaine au maximum par rapport à J0 (de J-7 à J+7) (ne pas faire de prélèvement exprès, donnée ND si pas disponible)					
<u>Poids</u> =	kgs	<u>Age</u> :	ans	Taille :	cm
<u>Créatininémie</u> =			µmol/l		
Clairance (CG) :			mL/min		
Clairance (MDRD) :			mL/min		
Clairance(CKD-EPI) :			mL/min		
- <u>CRP</u> =	mg/L	<u>Fibrinogène</u> :	g/L		
- <u>Albumine</u> =	g/L				
- <u>Hémoglobine</u> :	g/dL	<u>Plaquettes</u> :	G/L	<u>Globules blancs</u> :	G/L
- <u>ASAT</u> (N si normal ou xN en multiple de la limite supérieure) =					
- <u>ALAT</u> (N si normal ou xN en multiple de la limite supérieure) =					
- <u>GGT</u> (N si normal ou xN en multiple de la limite supérieure) =					
- <u>PAL</u> (N si normal ou xN en multiple de la limite supérieure) =					
- <u>Bilirubine totale</u> (N si normal ou xN en multiple de la limite supérieure) =					

Prélèvements

Nom patient :

Rappel : de 1 à 5 prélèvements par patient, sur une durée maximale de 20 jours, avec si possible au moins un prélèvement en résiduel (avant une prise)

1^{er} prélèvement : J0 **date :**

H administration : H prélèvement :

Delta administration -prélèvement :

2^{ème} prélèvement : J **date :**

H administration : H prélèvement :

Delta administration -prélèvement :

3^{ème} prélèvement : J **date :**

H administration : H prélèvement :

Delta administration -prélèvement :

4^{ème} prélèvement : J **date :**

H administration : H prélèvement :

Delta administration -prélèvement :

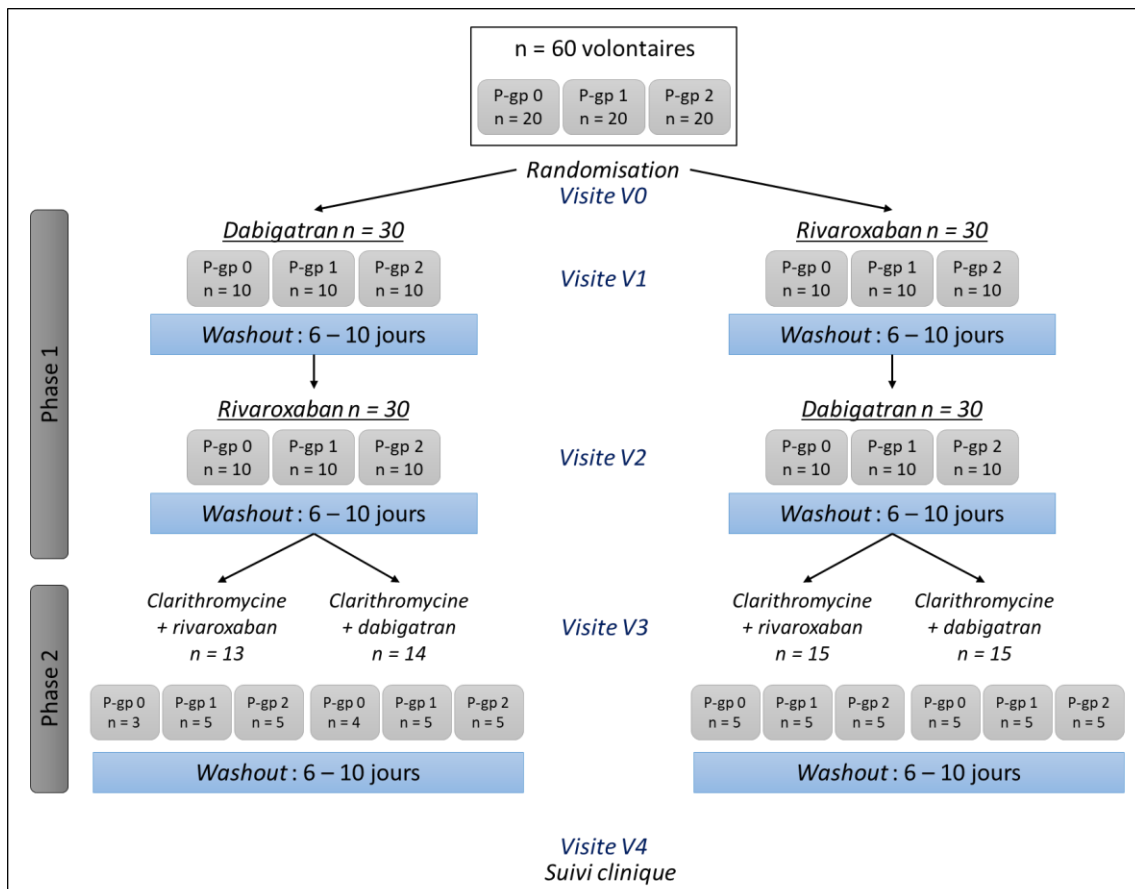
5^{ème} prélèvement : J **date :**

H administration : H prélèvement :

Delta administration -prélèvement :

Attention : dernier tube à prélever avant J 20

Annexe 2 : Design de l'étude DRIVING, d'après Gouin-Thibault et al.[231]



Received: 8 November 2020 | Revised: 5 December 2020 | Accepted: 7 December 2020

DOI: 10.1111/ijlh.13443



ORIGINAL ARTICLE

ISLH International Journal of Laboratory Hematology

WILEY

Study of thrombin generation with St Genesis to evaluate xaban pharmacodynamics: Analytical performances over 18 months

Geoffrey Foulon-Pinto^{1,2} | Georges Jourdi^{1,3} | Julien Perrin^{4,5} |
Johan Abdoul^{1,2} | Guillaume Paris^{1,2} | Isabelle Gouin-Thibault^{6,7} |
Emmanuel Curis^{8,9} | Thomas Lecompte¹⁰ | Virginie Siguret^{1,2}

¹Innovations Thérapeutiques en Hémostase, Université de Paris, INSERM, Paris, France

²Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

³Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

⁴Université de Lorraine, INSERM, DCAC, Nancy, France

⁵Service d'Hématologie Biologique, Pôle Laboratoires, CHRU Nancy, Nancy, France

⁶INSERM, CIC 1414 (Centre d'Investigation Clinique de Rennes), Université de Rennes, CHU de Rennes, Rennes, France

⁷Service d'Hématologie Biologique, CHU de Rennes, Rennes, France

⁸UR 7537 BioSTM, Faculté de Pharmacie, Université de Paris, Paris, France

⁹Service de Biostatistique et Information Médicale, AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

¹⁰Département de Médecine, Faculté de Médecine - GpG, Hôpitaux Universitaires de Genève, Unité d'hémostase, Université de Genève, Geneva, Switzerland

Correspondence

Virginie Siguret, INSERM UMR_S1140, Université de Paris, 4 avenue de l'Observatoire, 75 270 Paris cedex 06, France.
Email: virginie.siguret@parisdescartes.fr

Funding information

The Conny-Maeva Charitable Foundation

Abstract

Introduction: ST Genesis is a new automated system enabling quantitative standardized evaluation of thrombin generation (TG), for example, in patients receiving anti-Xa direct inhibitors (xabans). Data on its analytical performances are scarce.

Methods: Over an 18-month period, repeatability, reproducibility, and accuracy were assessed using STG-ThromboScreen (without or with thrombomodulin) or STG-DrugScreen reagents (corresponding to intermediate/high tissue-factor concentration, respectively), and controls. Furthermore, reproducibility was assessed using commercialized lyophilized and frozen normal pooled plasmas. Rivaroxaban and apixaban impacts on TG parameters were assessed using spiking experiments. Finally, a comparison with the Calibrated Automated Thrombogram method (CAT) (PPP reagent) was performed using plasma from healthy volunteers enrolled in the DRIVING-studyNCT 01627665) before and after rivaroxaban intake.

Results: For all dedicated quality control (QC) levels, inter-series coefficients of variations (CV) were <7% for temporal TG parameters, peak height (PH), and endogenous thrombin potential (ETP), whether results were normalized with a dedicated reference plasma STG-RefPlasma or not. Noteworthy, STG-RefPlasma used for normalization displayed substantially high PH and ETP. Mean biases between the observed and manufacturer's assigned QC values were mostly <7%. Both rivaroxaban/apixaban plasma concentrations were significantly associated with TG parameters. Finally, Bland-Altman plots showed a good agreement between ST Genesis-STG-ThromboScreen and CAT method within the explored range of values, although biases could be observed (PH: $16.4 \pm 13.2\%$, ETP: $17.8 \pm 11.9\%$).

Conclusion: ST Genesis® enables the reliable measurement of TG parameters in both in vitro and ex vivo xaban plasma samples using either STG-ThromboScreen or STG-DrugScreen according to xaban concentrations. The use of reference plasma, despite not completely reflecting a normal pooled plasma behavior, likely improves standardization and inter-laboratory comparisons.

KEYWORDS

anticoagulants, coagulation, quality controls, thrombin generation, xaban

1 | INTRODUCTION

Thrombin is a key enzyme of the hemostatic system, involved not only in the conversion of fibrinogen to fibrin (clot), but also in various feedbacks located on blood components and vessel wall.^{1,2} The concept of thrombin generation (TG) assays has been developed to evaluate both thrombin generation and its inactivation,^{3,4} whereas conventional tests such as prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) offer limited information, only reflecting the initiation phase of coagulation. Moreover, in patients receiving xabans, that is, direct anti-Xa oral anticoagulant (DOAC), the semi-global tests (PT and aPTT) show a poor sensitivity to assess DOAC pharmacodynamics.⁵ While anti-Xa activity levels reflect xaban concentrations, that is, pharmacokinetics,^{6,7} TG parameters may reflect both xaban concentrations and their effect on global plasma coagulation, that is, pharmacodynamics. Several systems have been proposed to measure ex vivo TG.⁶ The first semi-automated TG method was developed by Hemker et al, known as the "Calibrated Automated Thrombogram" (CAT).⁷ The CAT method has been widely used in the assessment of TG in many situations⁸⁻¹¹ but suffers from a lack of standardization and automation.^{12,13}

Among different systems,¹⁴ ST Genesis (Stago) is a fully automated one, enabling quantitative standardized evaluation of TG in platelet-poor plasma, using dedicated reagents, calibrator, and quality controls (QC). The system enables the measurement of TG at different concentrations of tissue-factor (TF), that is, by decreasing order, STG-DrugScreen[®], STG-ThromboScreen[®], or STG-BleedScreen[®]. Besides TG parameter absolute values, the system provides normalized results using a dedicated reference plasma, which is proposed to limit inter-laboratory variations.^{12,15,16} Only few studies have focused on the analytical performances of this system using STG-DrugScreen,¹⁷ STG-ThromboScreen¹⁸ and/or STG-BleedScreen,¹⁸ and data regarding its potential interest in assessing DOACs pharmacodynamics remain limited.^{17,19-21} In the present study, we report the analytical performances of ST Genesis including accuracy over an 18-month period of use in our clinical laboratory using internal QC data. During this period, we assessed in addition TG parameters from different commercial normal pooled plasmas and focused on the effect of rivaroxaban and apixaban on TG parameters. We used different experimental conditions, that is, high and intermediate TF picomolar concentration, the latter in the absence or presence of thrombomodulin (TM), thus enabling the involvement of protein C system. Finally, we sought to compare TG parameters measured with ST Genesis and with CAT from healthy volunteers before and after rivaroxaban intake.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Thrombin generation measurement with ST Genesis[®]

TG was performed with ST Genesis[®] system as previously described.²¹ The method is fluorescence-based, and thrombin

generation is initiated by the addition of TF and phospholipid vesicles. This system differs from the semi-automated CAT system (Stago) with respect to improved 37°C temperature control and a unique calibration performed for each series, using STG-ThrombiCal, a buffered solution containing a known fixed amount of human thrombin. A solution containing the Z-Gly-Gly-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (AMC) fluorogenic substrate together with calcium chloride (STG-FluoStart) is finally added. In parallel, STG-ThrombiCal is incubated in a second cuvette with a solution containing a fixed concentration of AMC (STG-FluoSet): The calibration curve is thus adjusted for the optical characteristics of the plasma sample correcting for the inner filter effect. Once the calibration has been validated for each series, platelet-poor plasma samples are run in duplicate under different experimental conditions in parallel to STG-FluoSet.

In the present study, we used three conditions according to manufacturer's recommendations: STG-ThromboScreen in the absence (-) or presence (+) of TM and STG-DrugScreen. Both reagents contain recombinant human TF, at an intermediate or relatively high picomolar concentration for STG-ThromboScreen and STG-DrugScreen, respectively. TM concentration is adjusted by the manufacturer in order to inhibit 50% of the endogenous thrombin potential (ETP) obtained with normal pooled plasma in absence of TM. Each STG-ThromboScreen or STG-DrugScreen reagent is supplied with a dedicated reference plasma (STG-RefPlasma) allowing result normalization.^{12,15} The following TG parameters were analyzed: lag time (LT, min), time to peak (TTP, min), peak height (PH, nM), and ETP (nM•min). Results are displayed as mean of duplicates; for each run, normalized results are provided by dividing absolute values by the dedicated reference plasma values for STG-ThromboScreen without TM and STG-DrugScreen condition, but not for STG-ThromboScreen with TM (the analysis of STG-RefPlasma for STG-ThromboScreen in the presence of TM is not an option offered by the manufacturer). All TG measurements were performed by two experienced operators (GFP and GP), who followed several training sessions delivered by the manufacturer.

2.2 | Repeatability, reproducibility, and accuracy

In order to assess repeatability and reproducibility, three dedicated QC levels (low, normal and high) were tested using STG-ThromboScreen without and with TM, and two dedicated QC levels (low and normal) using STG-DrugScreen (only two with the latter to evaluate drug-induced hypo-coagulability). Two batches were studied for each reagent over the study period: batches 202640 and 202947 (STG-ThromboScreen); batches 202641 and 202682 (STG-DrugScreen). For each run, QC and dedicated reference plasmas (STG-RefPlasma[®]) were tested. Repeatability was assessed in a single experiment (10 runs per QC level), and reproducibility was determined by two operators over the 18-month period. Biases, that is, differences between results and the assigned values provided by the manufacturer, were calculated for each QC TG parameter. We arbitrarily considered biases as acceptable if they were < 10%. In addition, we assessed TG parameter

reproducibility with two commercial normal plasmas during our study period: (a) frozen normal pooled plasma (Cryocheck[®], CryoPep) (batch A1236); (b) lyophilized normal pooled plasma (Poolnorm[®], Stago) (batches 254596 and 253797), using STG-ThromboScreen (with and without TM) in both cases. We previously characterized these plasmas by measuring clotting factors activity levels and natural coagulation inhibitor activity levels in Poolnorm (253797), Cryocheck, and STG-RefPlasma: Results were of 104, 106, and 97 IU/dL for Factor (F) II, 100, 115, and 95 IU/dL for FV, 93, 100, and 89 IU/dL for FVII + X, 89, 103, and 87 IU/dL for antithrombin, 103, 117, and 101 IU/dL for protein C, 68, 95, and 60 IU/dL for protein S, respectively.

2.3 | TG in plasma samples spiked with xaban

Samples of pooled normal plasma (Cryocheck[®]) were spiked with either rivaroxaban or apixaban as previously described,²² in order to obtain final varying (not predefined) xaban plasma concentrations ranging from 0 to 450 ng/mL.²² The DMSO concentration in plasma was 0.05% (v/v), thus not influencing coagulation.²³ Xaban concentrations were systematically measured in spiked samples using specific chromogenic anti-Xa activity (STA[®]Liquid anti-Xa-Stago) with dedicated calibrators (STA[®] Rivaroxaban Calibrator and STA[®] Apixaban Calibrator, Stago) and controls on STA-R analyzer.

2.4 | Comparison of TG parameters obtained with ST Genesia and CAT method

We selected plasma samples from 23 healthy male volunteers enrolled in the DRIVING study (NCT 01627665) prepared from blood collected at baseline ($n = 23$) and at several time points after the intake of a rivaroxaban single dose (40 mg), in order to cover a wide range of rivaroxaban plasma concentrations²⁴: between 0.5 and 4 hours ($n = 14$), between 8 and 24 hours ($n = 11$). The study was approved by the regional Ethics Committee (#P100507-DRIVING, CPP Île de France 10). All participants gave their written informed consent. Plasma aliquots from healthy volunteers enrolled in DRIVING study were run on both ST Genesia (using STG-ThromboScreen without TM) and CAT system (Thrombinoscope[®] BV, software, 5.0.0.742, Maastricht, Netherlands) using PPP reagent (5 pM TF). Moreover, three samples from External quality Control of diagnostic Assays and Tests (ECAT) were analyzed as external QC with both ST Genesia (using STG-ThromboScreen without TM) and CAT system (using PPP reagent).

2.5 | Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as means (standard deviation (SD)), or median (25th-75th percentiles) (interquartile range: IQR). For repeatability and reproducibility assays, coefficients of variation

(CV) were calculated. In order to compare ST Genesia and CAT methods, Passing-Bablok regressions, and Bland-Altman plots were used to evaluate the agreement (including 95% confidence intervals; GraphPad Prism version 8.0.0-GraphPad Software). The relationship between TG parameters and xaban concentration was analyzed using R version 3.6.0²⁵ (R Foundation for Statistical Computing). Beside graphical representation, existence of a monotonic relationship was tested using Spearman's rank correlation test.

3 | RESULTS

3.1 | Repeatability and reproducibility

Intra-series CVs of TG parameters obtained with the different dedicated QC levels were all below 3.8% whatever the condition used and whether results were normalized using the dedicated reference plasma (STG-RefPlasma[®]) or not (Table 1). Over the 18-month period, inter-series CVs were below 7% for all QC levels using the different conditions (Table 1). CVs of PH and ETP were higher using STG-ThromboScreen in the presence of TM than without, as expected given the low domain of measures. Regarding dedicated reference plasmas, all CVs were below 5.5%. Performances obtained with a second QC batch were in the same order of magnitude (not shown). Finally, we assessed the reproducibility of TG parameters on two characterized commercial (one lyophilized, one frozen) normal pooled plasmas using STG-ThromboScreen with and without TM (Table 2): in the absence of TM, all CVs were below 8.2% and most of them were below 5.0%. In the presence of TM, higher CVs were obtained, the greatest being 11.2% for PH in frozen plasma and 9.6% for ETP measured in lyophilized plasma (Poolnorm[®]). Finally, we observed that commercialized lyophilized normal pooled plasma plasmas, that is, STG-Refplasma and PoolNorm plasmas, displayed rather high ETP and PH values, around 1600 and 1300 nM•min for ETP, 290 and 225 nM for PH, respectively, compared with Cryocheck frozen plasma, around 950 nM•min for ETP and 130 nM for PH (Table 2).

3.2 | Accuracy

Mean biases of both temporal parameter (LT, TTP) between observed and manufacturer assigned absolute and normalized TG values showed results below 6% under all experimental conditions (Figure 1). Regarding PH and ETP results using STG-ThromboScreen without TM, biases were <5% for PH and <7% for ETP with low and high QC levels, respectively, whereas unacceptable biases were obtained with normal QC, +15% and +11% respectively, suggesting underestimated assigned values (Figure 1). Interestingly, normalized results with dedicated reference plasma showed a trend to lower biases, especially for normal QC PH and ETP (< 5%). Using STG-ThromboScreen with TM, biases were around -20% for PH and ETP with low QC, around -9% with

TABLE 1 Repeatability and reproducibility assays performed on STG-Qualitest QC using STG-ThromboScreen and STG-DrugScreen reagent

	STG-Qualitest low		STG-Qualitest norm		STG-Qualitest high	
	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV
Repeatability (n = 10)						
STG-ThromboScreen (without TM) ^a						
Lag time (min)	2.5 ± 0.1	1.42	1.8 ± 0.1	1.96	1.4 ± 0.1	2.44
Normalized Lag time (ratio)	1.2 ± 0.1	1.58	0.8 ± 0.1	2.64	0.6 ± 0.1	2.29
Time to peak (min)	6.1 ± 0.1	1.03	4.0 ± 0.1	1.62	2.4 ± 0.1	1.04
Normalized Time to peak (ratio)	1.4 ± 0.1	1.04	1.0 ± 0.1	1.65	0.5 ± 0.1	1.26
Peak height (nM)	92 ± 1	1.04	245 ± 5	1.87	477 ± 7	1.54
Normalized Peak height (%)	34.2 ± 0.4	1.04	91.0 ± 1.7	1.87	190 ± 2.8	1.49
ETP (nM•min)	662 ± 11	1.74	1347 ± 11	0.84	1634 ± 19	1.16
Normalized ETP (%)	44.6 ± 0.8	1.74	91.0 ± 0.8	0.83	113 ± 1.3	1.18
STG-ThromboScreen (with TM) ^a						
Lag time (min)	2.8 ± 0.1	1.52	1.9 ± 0.1	1.95	1.4 ± 0.1	2.93
Time to peak (min)	5.0 ± 0.1	1.15	3.7 ± 0.1	1.27	2.4 ± 0.1	1.55
Peak height (nM)	70 ± 2	3.08	220 ± 3	1.59	473 ± 6	1.34
ETP (nM•min)	393 ± 15	3.79	1036 ± 20	1.95	1560 ± 41	2.61
STG-DrugScreen ^b						
Lag time (min)	1.4 ± 0.1	1.52	1.0 ± 0.1	1.16	-	-
Normalized Lag time (ratio)	1.1 ± 0.1	1.45	0.8 ± 0.1	1.09	-	-
Time to peak (min)	2.6 ± 0.1	2.87	2.1 ± 0.1	1.02	-	-
Normalized Time to peak (ratio)	1.1 ± 0.1	1.05	0.9 ± 0.1	2.12	-	-
Peak height (nM)	232 ± 4	1.85	441 ± 5	1.25	-	-
Normalized Peak height (%)	49.5 ± 0.9	1.84	93.6 ± 1.2	1.27	-	-
ETP (nM•min)	677 ± 14	2.02	1487 ± 35	2.36	-	-
Normalized ETP (%)	36.9 ± 0.7	2.02	81.3 ± 1.7	2.14	-	-
Reproducibility (n = 27)						
STG-ThromboScreen (without TM) ^a						
Lag time (min)	2.7 ± 0.1	2.56	1.9 ± 0.1	2.00	1.5 ± 0.1	2.65
Normalized Lag time (ratio)	1.2 ± 0.1	1.69	0.8 ± 0.1	2.35	0.6 ± 0.1	1.89
Time to peak (min)	6.0 ± 0.2	4.21	4.3 ± 0.1	2.12	2.4 ± 0.1	1.94
Normalized Time to peak (ratio)	1.3 ± 0.1	4.46	0.9 ± 0.1	6.34	0.5 ± 0.1	3.31
Peak height (nM)	106 ± 5	4.33	237 ± 7	2.97	507 ± 21	4.09
Normalized Peak height (%)	35.8 ± 2.2	6.06	80.1 ± 3.4	4.28	171 ± 10.4	6.08
ETP (nM•min)	707 ± 31	4.43	1351 ± 59	4.34	1753 ± 100	5.74
Normalized ETP (%)	43.9 ± 1.3	3.08	83.9 ± 2.1	2.50	108 ± 3.3	3.07
STG-ThromboScreen (with TM) ^a						
Lag time (min)	2.9 ± 0.1	3.22	2.0 ± 0.1	2.09	1.5 ± 0.1	1.59
Time to peak (min)	5.1 ± 0.1	2.88	3.9 ± 0.1	1.89	2.4 ± 0.1	1.57
Peak height (nM)	62 ± 4.3	6.94	197 ± 8	3.94	509 ± 19	3.75
ETP (nM•min)	342 ± 20.9	6.10	913 ± 46.0	5.04	1679 ± 82.4	4.91
STG-DrugScreen ^b						
Lag time (min)	0.9 ± 0.1	3.86	0.7 ± 0.1	5.67	-	-
Normalized Lag time (ratio)	1.0 ± 0.1	5.15	0.8 ± 0.1	6.14	-	-
Time to peak (min)	2.0 ± 0.1	3.17	1.8 ± 0.1	4.02	-	-

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

	STG-Qualitest low		STG-Qualitest norm		STG-Qualitest high	
	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV
Normalized Time to peak (ratio)	1.0 ± 0.1	2.27	0.9 ± 0.1	3.85	—	—
Peak height (nM)	282 ± 8	2.99	497 ± 21	4.32	—	—
Normalized Peak height (%)	53.9 ± 1.7	3.21	95.1 ± 2.5	2.58	—	—
ETP (nM•min)	716 ± 25	3.51	1597 ± 86	5.37	—	—
Normalized ETP (%)	35.3 ± 1.6	4.69	78.6 ± 3.1	4.00	—	—

Results obtained with ST-ThromboScreen in the absence of thrombomodulin (TM) and with ST-DrugScreen are displayed in both absolute and normalized values with dedicated STG-Refplasma.

Abbreviations: CV, coefficient of variation; SD, standard deviation.

^aBatch 202640.

^bBatch 202641.

normal QC and -5% with high QC, suggesting that assigned values for PH and ETP might have been slightly overestimated by the manufacturer (Figure 1). Using STG-DrugScreen, all biases were below 4% when TG parameters were expressed in absolute values with both low and normal QC, except for ETP (around +10%) (Figure 1); normalization with reference plasma led to ETP biases <5%. Finally, external quality (ECAT) results that we obtained on the CAT system were consistent with those of the peer group. However, no inter-laboratory comparison was available regarding results obtained on ST Genesia.

3.3 | TG parameters in apixaban / rivaroxaban spiked plasma samples

Both rivaroxaban and apixaban plasma concentrations were found to be significantly associated with TG parameters assessed by ST Genesia® ($P < 10^{-4}$ for each parameter) using the three experimental conditions (Figure 2). When expressing xaban concentrations in nM, at the same concentration both LT and TTP were longer with rivaroxaban than with apixaban, reflecting a greater impact

TABLE 2 Inter-assay variability assessed with two different commercial pooled normal plasmas: Poolnorm® (lyophilized) and Cryocheck® (frozen), and the dedicated reference plasma (STG-RefPlasma) provided with STG-ThromboScreen reagent

	POOLNORM ^a		POOLNORM		CRYOCHECK ^a		STG-REFPLASMA ^a	
	Batch 253797		Batch 254596		Batch A1236		Batch 202 640	
	n = 12		n = 12		n = 12		n = 27	
	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV
STG-ThromboScreen (without TM) ^a								
Lag time (min)	2.1 ± 0.1	1.94	2.1 ± 0.1	2.24	2.9 ± 0.1	3.67	2.2 ± 0.1	1.78
Normalized Lag time (ratio)	1.1 ± 0.1	3.38	1.1 ± 0.1	2.55	1.3 ± 0.1	3.35	—	—
Time to peak (min)	4.6 ± 0.1	2.34	4.7 ± 0.1	2.50	5.8 ± 0.1	2.62	4.5 ± 0.1	2.33
Normalized Time to peak (ratio)	1.1 ± 0.1	2.88	1.2 ± 0.1	3.77	1.3 ± 0.1	4.30	—	—
Peak height (nM)	221 ± 10	4.39	225 ± 16	6.95	129 ± 10	8.05	294 ± 11	3.88
Normalized Peak height (%)	79.0 ± 2.1	2.63	76.8 ± 5.9	7.68	43.8 ± 3.4	7.67	—	—
ETP (nM•min)	1328 ± 86	6.50	1392 ± 39	3.09	946 ± 76	8.06	1615 ± 73	4.54
Normalized ETP (%)	90.4 ± 3.6	3.96	90.3 ± 3.9	4.35	60.2 ± 1.6	2.74	—	—
STG-ThromboScreen (with TM) ^a								
Lag time (min)	2.4 ± 0.1	1.71	2.3 ± 0.1	2.27	3.7 ± 0.2	6.69	—	—
Time to peak (min)	4.4 ± 0.1	1.41	4.4 ± 0.1	2.32	5.7 ± 0.4	6.59	—	—
Peak height (nM)	182 ± 10	5.72	181 ± 13	7.09	88.7 ± 10	11.23	—	—
ETP (nM•min)	854 ± 88	9.58	873 ± 49	5.67	415 ± 37	9.00	—	—
ETP inhibition (%)	34.6 ± 1.5	4.44	37.3 ± 2.6	6.99	56.1 ± 2.3	4.16	—	—

Abbreviations: CV, coefficient of variation; SD, standard deviation; TM, thrombomodulin.

^aBatch 202640.

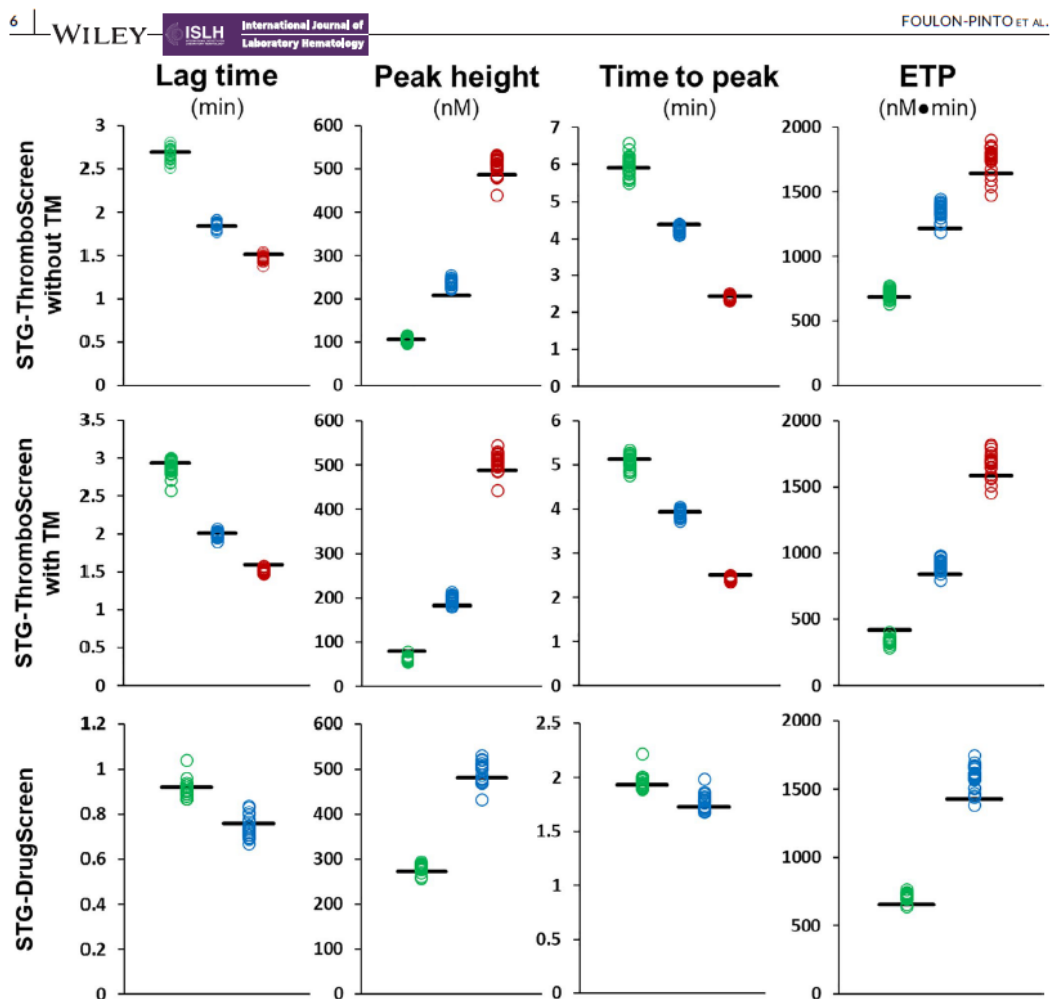


FIGURE 1 Quality controls accuracy based on the manufacturer's assigned values on ST Genesia[®]. Quality control (QC) results using STG-ThromboScreen reagent (without and with thrombomodulin) (STG-Qualitest, three levels) and STG-DrugScreen (STG-Qualitest, two levels) over an 18-month period (27 runs). Low, normal, and high QC are displayed from the left to the right, in green, blue and red, respectively. Horizontal bars represent the assigned values of QC provided by the manufacturer [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

of rivaroxaban on temporal parameters than that of apixaban, whereas ETP and PH were comparable. However, for concentrations of xaban between 200 and 550 nM, visual inspection of individual thrombograms showed flat patterns when using STG-ThromboScreen in the absence of TM, likely distorting the calculation of ETP in some samples, while PH values seemed to be more reliable. Besides, STG-DrugScreen generated suitable ETP results (Figure 2). Noteworthy, rivaroxaban and apixaban concentrations above 300 and 400 ng/mL, respectively, generated values above the upper limit of quantification of the assay using STG-ThromboScreen with TM.

3.4 | Comparison of TG parameters obtained with ST Genesia[®] and CAT

Thrombin generation was studied in 48 plasma samples at baseline and after rivaroxaban intake from healthy male volunteers included in DRIVING study.²⁴ Overall, Bland-Altman plots showed the good agreement of TG parameters between the CAT method using 5 pM TF and ST Genesia using STG-ThromboScreen in the absence of TM although relative biases could be observed: $20.8 \pm 9.3\%$ for LT, $16.4 \pm 13.2\%$ for PH, $17.8 \pm 11.9\%$ for ETP (Figure 3). Spearman's rank correlation coefficients were >0.92 for all parameters except for ETP (0.78).

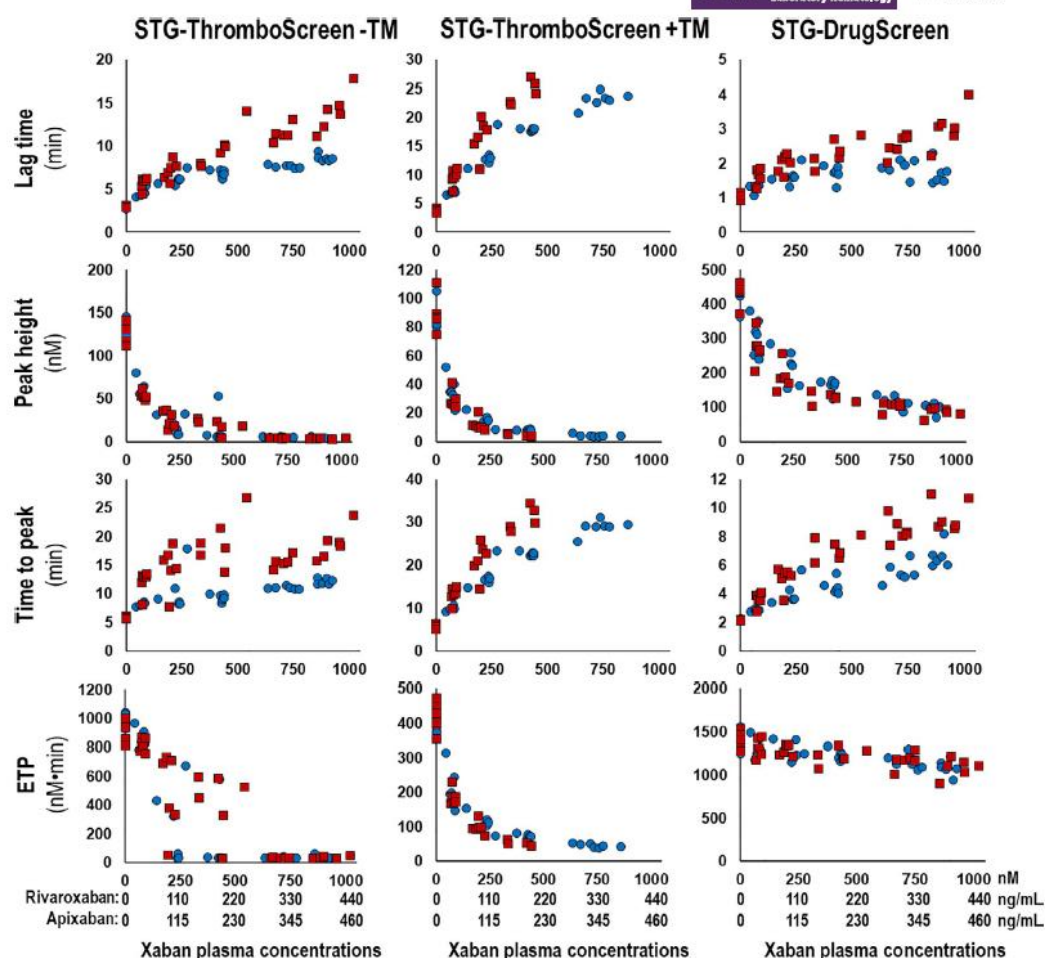


FIGURE 2 Thrombin generation parameters measured as a function of xaban concentration in spiking experiments. Samples of pooled normal plasma (Cryocheck®) were spiked with rivaroxaban or apixaban to obtain final varying concentrations ranged from 0 to 450 ng/mL. Xaban concentrations were systematically measured in final samples. Xaban concentrations are expressed in nM for proper comparison between rivaroxaban (red squares) and apixaban (blue dots). Xaban concentrations in ng/mL are displayed below nM values, bottom panels. For concentrations of xaban comprised between 200 and 550 nM, visual inspection of individual thrombograms showed flat patterns when using STG-ThromboScreen in the absence of TM, likely distorting the calculation of ETP, while PH values seemed to be more reliable (not observed with STG-DrugScreen). For the highest xaban concentrations (namely, ≥ 300 ng for rivaroxaban, ≥ 400 ng/mL for apixaban), results were above the upper limits of quantification when using STG-Thromboscreen with TM (not shown) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

4 | DISCUSSION

ST Genesia is weekly used in our clinical laboratory for assessing DOAC pharmacodynamics in patients enrolled in various RCTs. We used the QC data generated over an 18-month period to comprehensively study the ST Genesia analytical performances, under three experimental conditions (STG-ThromboScreen without/with TM and STG-DrugScreen), using several batches of reagents, QC

and reference plasmas. Satisfactory results were obtained, with intra-assay CV results below 4% and inter-assay CV results below 7% for the majority of parameters with both STG-ThromboScreen and STG-DrugScreen reagents. Of note, performances were slightly improved compared with those previously obtained on a ST Genesia prototype when using non-CE marked reagents.²¹ Similar inter-assay CV results were found by Calvazarini et al using STG-ThromboScreen \pm TM,¹⁸ who showed a moderately higher

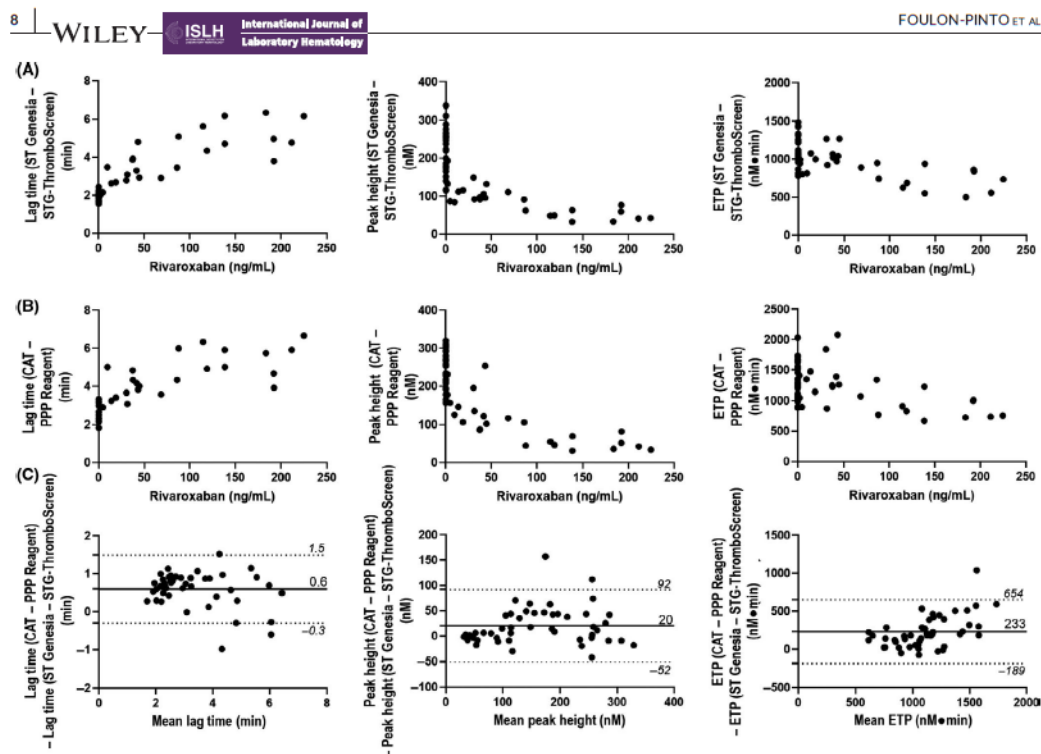


FIGURE 3 Comparison of rivaroxaban effects (ex vivo) on thrombin generation (TG) parameters assessed with STGenesis and the CAT method. TG parameters as a function of rivaroxaban plasma concentration (A) assessed with STGenesis using STG-ThromboScreen without thrombomodulin (TM); (B) assessed with CAT method triggered with PPP reagent; (C) Bland and Altman plots: The x-axis shows the average of TG parameters (LT, PH and ETP) obtained with both systems; the y-axis shows the difference between CAT and STGenesis results. Solid represent the bias, and dotted lines the lower and upper limits of agreement with a 95% CI

PH and ETP variability when expressed in absolute values; however, normalized values were comparable with ours, highlighting the interest of the use of dedicated reference plasma to improve inter-laboratory comparisons, especially for ETP as previously suggested.^{12,15,16,18} Regarding STG-DrugScreen, Douxfils et al obtained comparable results.¹⁷ In addition, we provide data on accuracy, that is, QC biases from the manufacturer's assigned values: all biases were acceptable except for one QC for which we had to redefine the PH and ETP target expressed in absolute values. Therefore, we propose to test new batches of QC before routine use allowing potential local target determination. In order to perform inter-laboratory comparisons, there is now an urgent need for including TG assay performed with ST Genesis in international external quality assessment programmes. Analytical performances demonstrated in our laboratory together with good results of technicians' skill evaluation allowed us to add TG test in our ISO15189 accredited laboratory test set.

A strength of our study resides in the study of several commercial normal pooled plasma besides the reference plasma (STG-RefPlasma) used for normalization under the intermediate

TF concentration condition (STG-ThromboScreen). Lyophilized plasmas (PoolNorm and STG-RefPlasma) displayed substantially higher PH and ETP values than the commercial Cryocheck frozen plasma. Noteworthy, the median PH and ETP values obtained in plasma samples from DRIVING male healthy volunteers (median age 28 years) or from Calzavarini's study healthy adult individuals (median age 48 years) were intermediate between those measured on lyophilized plasmas and those measured on Cryocheck frozen plasma.^{18,21} Several reasons could explain this: (a) the freeze-drying process could substantially increase thrombin generation; (b) while clotting procoagulant factor activity levels were similar in the different commercial tested plasmas, natural coagulation inhibitor activity levels were 15%-30% higher in Cryocheck frozen plasma than in both lyophilized plasmas. Since STG-RefPlasma with substantial high PH and ETP values was used for normalization, it is not surprising that the median normalized PH values varied from 55% to 75%, and those of ETP from 68% to 78% in healthy volunteers,^{18,21} rather than around 100% as we could have expected. Consequently, one should be aware that normalized results have to be interpreted according to normalized reference intervals: in

clinical practice, PH and ETP of 55% and 68% respectively correspond to a normo-coagulability, and not to hypo-coagulability. Noteworthy, the same trend was found with normalized temporal parameters (ratios varying from 1.1 to 1.3), but was much less pronounced. The sensitivity of TG parameters to individual levels of clotting procoagulant and anticoagulant factors remains to be established using this new system.

In order to compare in vitro the effect of rivaroxaban and apixaban on TG parameters, we chose to use frozen normal plasma (Cryocheck) spiked with increasing concentrations of xabans. Increasing xabans concentrations prolonged TG temporal parameters and decreased values of PH and ETP in a concentration-dependant manner as previously shown in vitro as well as ex vivo.^{17,19-21,26-28} These data confirm that measurement of TG parameters with ST Genesia enabled a reliable assessment of the PD response to rivaroxaban and apixaban, PH being more reliable than ETP.¹⁹⁻²¹ Furthermore, we demonstrated that similar apixaban and rivaroxaban concentrations expressed in nM generated comparable PH and ETP. Regarding experimental conditions, STG-DrugScreen provides reliable results for rivaroxaban and apixaban concentrations up to 1000 nM. However, STG-Thromboscreen is more sensitive to low xaban concentrations, particularly below 250 nM. Moreover, it enables the involvement of protein C system whenever performed in the presence of TM. Noteworthy, we evidenced that rivaroxaban had a stronger impact on temporal parameters than apixaban in agreement with our previous findings.²² Indeed, while having a slightly higher affinity to FXa, rivaroxaban neutralizes the latter four-fold more rapidly than apixaban, which rationalizes the observed pharmacodynamics discrepancy between these two drugs.

Finally, ex vivo results obtained with ST Genesia[®] using STG-ThromboScreen and CAT showed good agreements within the tested range of TG parameters; however, observed biases could be partly explained (a) by the difference in TF concentrations which were not strictly identical²⁹; (b) by the difference in calibration and analyzers. Using crossover experiments (CAT with the STG-Thromboscreen reagent), Talon et al suggested that the reagent could play a greater role than the analyzer.²⁹

Our study has some limitations. First, analytical performances of ST Genesia were not assessed using STG-BleedScreen, corresponding to a low TF concentration, proposed for the assessment of inherited bleeding disorders by the manufacturer. However, this was not in our main scope. Secondly, unlike rivaroxaban ex vivo samples, no samples were available from healthy volunteers receiving apixaban; therefore, we were unable to test such samples.

In conclusion, ST Genesia[®] analyzer enables the reliable measurement of TG parameters in both in vitro and ex vivo xaban plasma samples using either STG-ThromboScreen or STG-DrugScreen. The use of reference plasma, despite not reflecting a normal pool plasma behavior, likely improves standardization and inter-laboratory comparisons, even though dedicated reference intervals for each parameter remain to be established. ST Genesia[®] can thus be proposed as a useful additional tool for DOAC pharmacodynamics assessment using either

STG-ThromboScreen or STG-DrugScreen according to the xaban concentration range.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Stago for kindly providing the ST Genesia instrument. Reagents were purchased thanks to a CONNY-MAEVA Charitable Foundation grant. The funding sources had no role in the design and conduct of the study, collection, management, analysis, and interpretation of the data.

CONFLICT OF INTEREST


The authors have no conflict of interest.

ORCID

Georges Jourdi  <https://orcid.org/0000-0001-8738-5975>

Julien Perrin  <https://orcid.org/0000-0001-6037-6403>

Johan Abdoul  <https://orcid.org/0000-0001-5276-5302>

Isabelle Gouin-Thibault  <https://orcid.org/0000-0003-3740-9005>

Emmanuel Curis  <https://orcid.org/0000-0001-8382-1493>

Thomas Lecompte  <https://orcid.org/0000-0003-3269-6156>

Virginie Siguret  <https://orcid.org/0000-0002-6509-8964>

REFERENCES

- Crawley JTB, Zanardelli S, Chion CKNK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2007;5(Suppl 1):95-101.
- Mann KG. Thrombin formation. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):4S-10S.
- Tripodi A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. *Clin Chem*. 2016;62(5):699-707.
- Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006;96(5):553-561.
- Brinkman HJM. Global assays and the management of oral anticoagulation. *Thromb J*. 2015;13:9.
- Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2008;6(2):219-226.
- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in dotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33(1):4-15.
- Lim HY, O'Malley C, Donnan G, Nandurkar H, Ho P. A review of global coagulation assays - Is there a role in thrombosis risk prediction? *Thromb Res*. 2019;179:45-55.
- Zwaveling S, Bloemen S, de Laat B, Ten Cate H, Ten Cate-Hoek A. Calibrated automated thrombinography (CAT), a tool to identify patients at risk of bleeding during anticoagulant therapy: a systematic review. *TH Open*. 2018;2(3):e291-e302.
- Dargaud Y, Negrier C, Rusen L, et al. Individual thrombin generation and spontaneous bleeding rate during personalized prophylaxis with Nuwiq[®] (human-cl rFVII) in previously treated patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2018;24(4):619-627.
- Shih AW, Crowther MA. Reversal of direct oral anticoagulants: a practical approach. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):612-619.
- Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thromb Res*. 2012;130(6):929-934.

- 10 | WILEY | ISLH International Journal of Laboratory Hematology | FOULON-PINTO ET AL.
13. Loeffen R, Kleinegris M-c f, Loubele S, et al. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost*. 2012;10(12):2544-2554.
 14. Kintigh J, Monagle P, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2(1):42-48.
 15. Perrin J, Depasse F, Lecompte T, et al. French-speaking CAT group and under the aegis of GEHT, French-speaking CAT group (all in France unless otherwise stated); French-speaking CAT group all in France unless otherwise stated. Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thromb Res*. 2015;136(1):125-130.
 16. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, et al. Standardisation of thrombin generation test—which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res*. 2010;125(4):353-356.
 17. Douxfils J, Morimont L, Bouvy C, et al. Assessment of the analytical performances and sample stability on ST Genesia system using the STG-DrugScreen application. *J Thromb Haemost*. 2019;17(8):1273-1287.
 18. Calzavarini S, Brodard J, Quarroz C, et al. Thrombin generation measurement using the ST Genesia Thrombin Generation System in a cohort of healthy adults: normal values and variability. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(4):758-768.
 19. Pfrepper C, Metz M, Siegemund A, Klöter T, Siegemund T, Petros S. Direct oral anticoagulant plasma levels and thrombin generation on ST Genesia system. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4(4):619-627.
 20. Metz M, Pfrepper C, Klöter T, et al. Inhibition of thrombin generation 12 hours after intake of direct oral anticoagulants. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020;4(4):610-618.
 21. Siguret V, Abdoul J, Delavenne X, et al. Rivaroxaban pharmacodynamics in healthy volunteers evaluated with thrombin generation and the active protein C system: modeling and assessing interindividual variability. *J Thromb Haemost*. 2019;17(10):1670-1682.
 22. Jourdi G, Siguret V, Martin AC, et al. Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban. *Thromb Haemost*. 2015;114(1):78-86.
 23. Camici GG, Steffel J, Akhmedov A, et al. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: a potential treatment strategy for drug-eluting stents. *Circulation*. 2006;114(14):1512-1521.
 24. Gouin-Thibault I, Delavenne X, Blanchard A, et al. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. *J Thromb Haemost*. 2017;15(2):273-283.
 25. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. <https://www.R-project.org/>
 26. Rigano J, Ng C, Nandurkar H, Ho P. Thrombin generation estimates the anticoagulation effect of direct oral anticoagulants with significant interindividual variability observed. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2018;29(2):148-154.
 27. Artang R, Anderson M, Riley P, Nielsen JD. Assessment of the effect of direct oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban in healthy male volunteers using a thrombin generation assay. *Res Pract Thromb Haemost*. 2017;1(2):194-201.
 28. Helin TA, Virtanen L, Manninen M, et al. Effects of thromboprophylactic doses of apixaban and rivaroxaban on coagulation and thrombin generation in association with total hip replacement. *J Thromb Thrombolysis*. 2017;43(4):562-569.
 29. Talon L, Sinegre T, Lecompte T, et al. Hypercoagulability (thrombin generation) in patients with cirrhosis is detected with ST-Genesia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(9):2177-2190.

How to cite this article: Foulon-Pinto G, Jourdi G, Perrin J, et al. Study of thrombin generation with St Genesia to evaluate xaban pharmacodynamics: Analytical performances over 18 months. *Int J Lab Hematol*. 2020;00:1-10. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13443>



Letter to the Editors-in-Chief

Multifactorial hypercoagulable state associated with a thrombotic phenotype in phosphomannomutase-2 congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG): Case report and brief review of the literature

ARTICLE INFO

Keywords:

CDG
Deep venous thrombosis
Thrombin generation
Fibrinography
von Willebrand factor

Dear Editor,

Phosphomannomutase-2 congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG) is a rare inherited disorder due to impaired protein *N*-glycosylation. Around 850 individuals have been recently identified in the European Reference Network EURO-CDG [1]. Only a small proportion of PMM2-CDG patients develop venous thrombosis and haemostasis exploration was most often limited to the measurement of coagulation factor and natural inhibitor activities [2–8]. The potential imbalance between prothrombotic and antithrombotic factors, especially using thrombinography, has been poorly investigated in order to explain the prothrombotic clinical phenotype.

We report here on a woman with PMM2-CDG diagnosed during childhood, characterized by compound heterozygosity of the *PMM2* gene (R141H and I153T). At the age of 28 years, she developed a spontaneous acute episode of thrombosis in the calf and popliteal veins of the left leg and received rivaroxaban during 6 months [8]. Comedications were fluticasone 250 µg/salmeterol 25 µg (spray), mometasone furoate (spray), montelukast (10 mg/day), desloratadine (5 mg/day), chlormadinone acetate (10 mg/day), estradiol (transdermal patch, 37.5 µg, twice a week), calcium carbonate (600 mg bid) and colecalciferol (100.000 IU, every three months), the last drugs being given for the treatment of severe osteoporosis. The patient had neither personal nor family history of thrombosis. As a consequence of her PMM2-CDG, she is currently able to walk only a few steps with a walking frame and mostly relies on a wheelchair. However, the chronic patient immobilization cannot be considered as a major clinical risk factor. In addition to routine parameters that we previously determined in this patient [8], we sought to thoroughly characterize coagulation phenotype including thrombinography and fibrinography, as well as other haemostasis parameters, in order to look for a potential prothrombotic phenotype.

One month after the rivaroxaban withdrawal, we confirmed on two different samples, 11-months apart, modifications in the patient's haemostatic balance, including a FXI deficiency (32 IU/dL) (normal range 60–140 IU/dL), a slight FX deficiency (65 IU/dL – N 70–130 IU/dL) and

a slight increase of FVIII level (169 IU/dL - N 50–150 IU/dL) without any inflammation, associated with marked quantitative antithrombin (AT) (heparin cofactor activity 30 IU/dL - N 80–120 IU/dL) and protein C deficiencies (PC-anticoagulant activity 54 IU/dL – N 70–130 IU/dL). Patient's liver function tests were normal as well as parent coagulation parameters.

We then performed thrombinography and fibrinography (Thrombodynamics Analyser System® HemaCore, Russia) on poor platelet plasma (PPP). After triggering coagulation with tissue factor coated on an insert [9], a marked increase in thrombin generation was observed, with peak height and endogenous thrombin potential which were higher than controls, whereas temporal parameters were unchanged (Table 1, Fig. 1). In contrast to semi-global clotting times such as prothrombin time, the thrombin generation assay allows studying the coagulation system beyond clot formation, including the initiation, amplification and propagation phases, resulting in large amounts of generated thrombin over time controlled by physiological inhibitors [9]. Furthermore, fibrinography showed a markedly increased rate of clot growth whereas clot density was normal (Table 1, Fig. 1).

In addition, platelet count, closure time measured with Platelet Function Analyzer®, von Willebrand factor (VWF) ristocetin cofactor activity (VWF:RCo) were in the normal range (Table 1). To our knowledge, this is the first demonstration in PMM2-CDG of an increased proportion of intermediate and high molecular weight VWF multimers (Fig. 1). Light transmission aggregometry performed on plasma-rich platelet (PRP) showed increased platelet reactivity (slope) in the presence of ADP, arachidonic acid and collagen at different concentrations (Fig. 1). In addition, the patient's platelets displayed an increased ADP-induced activation, as shown by increased P-selectin expression measured by flow cytometry (Table 1).

One year after anticoagulant treatment discontinuation, no further thrombotic episodes have occurred. A 6-month rivaroxaban treatment had been prescribed when the thrombotic episode occurred [2]; this direct anti-Xa oral anticoagulant has the advantage of a rapid onset and requires no laboratory monitoring. Moreover, because of the AT deficiency in our patient, heparin use could have been challenging.

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.04.010>

Received 21 December 2018; Received in revised form 28 March 2019; Accepted 8 April 2019

Available online 09 April 2019

0049-3848/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Laboratory parameters in the present patient^a.

	Patient	Reference intervals
Primary haemostasis tests		
Platelet exploration		
Platelet count (Giga/L)	368	150–450
Closure time (Platelet Function Analyser)		
• Collagen-epinephrine (s)	108	80–160
• Collagen-ADP (s)	77	59–120
Platelet aggregation tests:		
Maximal amplitude (%)/slope (%/min)		
• Spontaneous activation	< 5	< 10
• ADP 0.6 µM	72/63	14–25/30–50
• ADP 1.25 µM	78/80	72–86/44–96
• ADP 2.5 µM	84/119	76–88/64–114
• ADP 5.0 µM	80/112	79–89/74–122
• Arachidonic acid 0.8 µM	93/197	85–96/116–160
• Arachidonic acid 1.6 µM	96/191	87–100/120–163
• Collagen 0.4 µg/mL	LT: 32 s	LT: 52–94 s
	89/138	52–94/75–92
• Collagen 0.8 µg/mL	LT: 28 s	LT: 52–71 s
	89/164	75–92/46–124
• Collagen 1.2 µg/mL	LT: 28 s	LT 35–61 s
	88/202	80–115/82–146
Platelet flow cytometry activation test (%)		
• Spontaneous CD62 (P selectin)	6	< 5
• ADP-CD62 (P selectin)	88	60–70
• TRAP-CD62 (P selectin)	96	> 75
Von Willebrand factor (VWF)		
• VWF:RCo (IU/dL)	124	50–150
• VWF:Ag (IU/dL)	119	50–150
• VILC/VWF:Ag	1.40	> 0.60
• ADAMTS13 activity (IU/dL)	108	50–150
Fibrinography/thrombinography (Thrombodymics Analyser System [®] T2-T model)		
Fibrinography		
• Rate of clot growth (µm/min)	72.1	34.0–44.0
• Lag time (min)	0.8	0.6–15.0
• Clot density (a.u.)	23,323	19,500–34,200
Thrombin generation assay		
• Lag time (min)	0.1	0.1–0.2
• Time to peak (min)	2.0	1.5–2.0
• Maximum thrombin concentration (AU/L)	589	230–410
• Endogenous thrombin potential (AU·min/L)	6460	1220–2170

Bold numbers indicate values out of range.

^a Measured in the absence of anticoagulant treatment; LT: lag time; AU: arbitrary units.

The classical phenotype of PMM2-CDG includes neurological presentation, dysmorphic features and coagulopathy, with highly variable patterns [4,7]. The prevalence of venous thrombosis varies upon studies, of 2% and 7% in Schiff's and Linssen's case series, respectively, to 24% in Monin's series [5–7]. The haemostasis abnormalities include FXI, AT, and PC decreases in most patients [2–7]. This decreased AT and PC activity is not due to liver dysfunction but to other factors such as possibly an accelerated clearance of *N*-hypoglycosylated proteins. On the other hand, there is no strong association between haemostasis and clinical outcomes, possibly due to the limited number of observations and the heterogeneity of data in children and in adults [2,5–7].

Results of thrombin generation and fibrinography have not been reported yet in PMM2-CDG patients. Our results demonstrate a global hypercoagulable state in the patient despite the absence of inflammation, reflecting the disequilibrium between procoagulant and anticoagulant factors. This is associated with a markedly increased rate of clot growth on fibrinography. Whether these approaches can identify CDG patients with a high thrombotic risk needs further investigation in a large case series. Surprisingly, the patient's D-dimer levels were low (< 400 ng/mL), possibly due to altered fibrinolysis, thus deserving a comprehensive study of fibrinolysis.

Our findings of a slightly increased platelet reactivity are in agreement with the platelet hyperaggregability found in previous studies [10,11] although Arnoux et al. did not find any significant abnormality of platelet reactivity [2]. More recently, analysis of the platelet *N*-glycoproteome, including GPIIb/IIIa, did not show quantitatively nor qualitatively significantly affected platelet *N*-glycoproteins in PMM2-CDG patients [11]. However, a decrease of (negatively charged) sialic acid on the platelet surface has been shown, potentially explaining platelet hyperreactivity [10,11]. Finally, we evidenced, for the first time in CDG, a high proportion of intermediate and high molecular weight multimers of VWF, without any abnormality of VWF or ADAMTS13 activity levels. Whether these abnormalities may be related to PMM2-CDG or have been found by chance in this patient cannot be stated here. VWF multimers need to be further explored in a large series of PMM2-CDG patients.

In conclusion, we confirm evidence of a hypercoagulable state associated with a high platelet reactivity and show the presence of intermediate and high molecular weight VWF multimers: all these abnormalities may have contributed to the clinical prothrombotic phenotype observed in our patient. The potential interest of the thrombin generation assay performed under our experimental

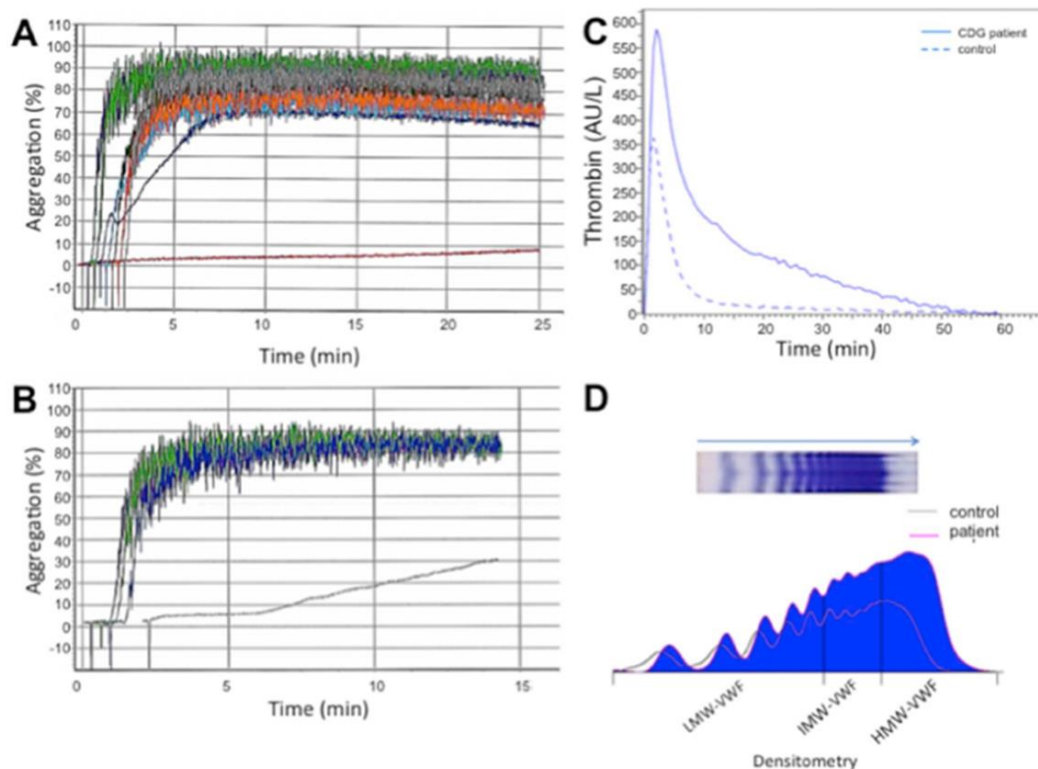


Fig. 1. Patient results of platelet light transmission aggregometry tests, thrombin generation tests and VWF multimer pattern. (A and B) platelet aggregation profiles using different agonists. (A) spontaneous (red); ADP: 0.6 μ M (dark blue), 1.25 μ M (pale blue), 2.5 μ M (black), 5 μ M (orange), 10 μ M (grey); arachidonic acid: 0.25 mg/L (purple), 0.5 mg/mL (green); (B) collagen: 0.4 μ g/mL (pale purple), 0.8 μ g/mL (green), 1.2 μ g/mL (blue); (C) Thrombin generation profile (Thrombodynamics analyser System* T2-T model); (D) VWF multimer pattern after electrophoresis (Hydrasis2*). LMW: Low Molecular Weight multimers, IMW: Intermediate Molecular Weight multimers, HMW: High Molecular Weight multimers. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

conditions and other tests such as fibrinography remain to be confirmed in a series of PMM2-CDG patients, in order to possibly identify patients at particular risk of thrombosis. Finally, in patients in whom the use of anticoagulants is challenging due to frequent AT deficiency, rivaroxaban can be proposed as an attractive therapeutic option in the treatment of venous thromboembolism.

Acknowledgments

The authors sincerely thank Dr. Nathalie Itzhar-Baikian, Dr. Bérangeère Joly, and Prof. Agnès Veyradier for their helpful case discussion.

Author contributions

P.C. and L.D. managed the patient, B.L., A.S., V.S., G.F.P, N.B., and M.A.G. performed laboratory analysis and analyzed data, B.L. and V.S. wrote the manuscript and all authors critically discussed data and gave final approval.

Conflicts of interest

None.

References

- [1] R. Péanne, P. de Lonlay, F. Faulquier, et al., Congenital disorders of glycosylation: quo vadis? *Eur. J. Med. Genet.* 61 (11) (2018) 643–663.
- [2] J.B. Arnoux, N. Boddaert, V. Valayannopoulos, S. Romano, N. Bahi-Buisson, I. Desguerre, Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia, *Mol. Genet. Metab.* 93 (2008) 444–449.
- [3] M.E. De la Morena-Barrio, T.S. Seivas, I. Martínez-Martínez, et al., Congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG) in a patient with antithrombin deficiency and severe thrombophilia, *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 2625–2627.
- [4] M.A. Haeuptle, T. Hennot, Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of diol-linked oligosaccharides, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 1628–1641.
- [5] M. Linsse, M. Mohamed, R.A. Wevers, D.J. Lefeber, E. Morava, Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG, *Mol. Genet. Metab.* 109 (2013) 107–111.
- [6] M.L. Monin, C. Mignot, P. De Lonlay, et al., 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype, *Orphanet J. Rare Dis.* 9 (2014) 207.
- [7] M. Schiff, C. Roda, M.L. Monin, Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 french patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature, *J. Med. Genet.* 54 (2017) 843–851.
- [8] B. Lefrère, A. Stepanian, N. Itzhar-Baikian, et al., Deep venous thrombosis treated by rivaroxaban in a young patient with type Ia carbohydrate-deficient glycoprotein (CDG) syndrome, *Ann. Biol. Clin.* 76 (2018) 217–223.
- [9] N.M. Dashkevich, T.A. Vuino, R.A. Ovsepyan, S.S. Surov, N.P. Soshitova, M.A. Panteleev, F.I. Ataulkhanov, C. Negrier, Effect of pre-analytical conditions on the thrombodynamics assay, *Thromb. Res.* 133 (2014) 472–476 Mar.
- [10] C. Van Geet, J. Jaeken, K. Freson, et al., Congenital disorder of glycosylation type Ia

and IIa are associated with different primary haemostatic complications, *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001) 477–492.

- [11] M.E. de la Morena-Barrio, M. Di Michele, M.L. Lozano, J. Rivera, B. Pérez-Dueñas, C. Altisent, T. Sevivas, V. Vicente, J. Jaeken, K. Freson, J. Corral, Proteomic analysis of platelet N-glycoproteins in PMM2-CDG patients, *Thromb. Res.* 133 (2014) 412–417.

Bertrand Lefrère^{a,b}, Alain Stepanian^{a,c}, Perrine Charles^d,
Geoffrey Foulon-Pinto^{a,b}, Nicolas Béranger^{a,c}, Martine Alhenc-Gelas^e,
Ludovic Drouet^a, Virginie Siguret^{a,b,*}

^a Service d'hématologie biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Paris, France

^b INSERM UMR_S1140, Université Paris Descartes, Paris, France

^c EA3518, Institut Universitaire d'Hématologie-Hôpital Saint Louis, Université Paris Diderot, Paris, France

^d Département de Génétique, Unité Fonctionnelle de Neurogénétique moléculaire et cellulaire et Centre de Référence des Déficiences Intellectuelles de Causes Rares, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Université

Pierre et Marie Curie, Paris, France

^e Service d'hématologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

E-mail address: virginie.siguret@parisdescartes.fr (V. Siguret).

* Corresponding author at INSERM UMR_S1140, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

BIBLIOGRAPHIE

1. Organisation Mondiale de la Santé. World Report on Ageing and Health [Internet]. World Health Organization; 2015 [cité 15 oct 2020]. Disponible à: <https://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/en/>
2. Organisation des Nations Unies, département des affaires économiques et sociales. World population prospects Highlights [Internet]. 2019 [cité 26 juill 2019]. Disponible à: <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html>
3. Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet Lond Engl.* 01 2017;389(10076):1323-35.
4. Steves CJ, Spector TD, Jackson SHD. Ageing, genes, environment and epigenetics: what twin studies tell us now, and in the future. *Age Ageing.* sept 2012;41(5):581-6.
5. Vasto S, Scapagnini G, Bulati M, Candore G, Castiglia L, Colonna-Romano G, Lio D, Nuzzo D, Pellicano M, Rizzo C, Ferrara N, Caruso C. Biomarkes of aging. *Front Biosci Sch Ed.* 1 janv 2010;2:392-402.
6. Engbers MJ, Vlieg AVH, Rosendaal FR. Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups. *J Thromb Haemost.* 2010;8(10):2105-12.
7. Avezum A, Makdisse M, Spencer F, Gore JM, Fox KAA, Montalescot G, Eagle KA, White K, Mehta RH, Knobel E, Collet J-P, GRACE Investigators. Impact of age on management and outcome of acute coronary syndrome: observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am Heart J.* janv 2005;149(1):67-73.
8. Clegg A, Young J, Iliffe S, Rikkert MO, Rockwood K. Frailty in elderly people. *Lancet Lond Engl.* 2 mars 2013;381(9868):752-62.
9. Manfredi G, Midão L, Paúl C, Cena C, Duarte M, Costa E. Prevalence of frailty status among the European elderly population: Findings from the Survey of Health, Aging and Retirement in Europe. *Geriatr Gerontol Int.* août 2019;19(8):723-9.
10. Song X, Mitnitski A, Rockwood K. Prevalence and 10-year outcomes of frailty in older adults in relation to deficit accumulation. *J Am Geriatr Soc.* avr 2010;58(4):681-7.
11. Nicholson K, Terry AL, Fortin M, Williamson T, Bauer M, Thind A. Prevalence, characteristics, and patterns of patients with multimorbidity in primary care: a retrospective cohort analysis in Canada. *Br J Gen Pract J R Coll Gen Pract.* 15 juill 2019;69:647-56.
12. Almirall J, Fortin M. The coexistence of terms to describe the presence of multiple concurrent diseases. *J Comorbidity.* 8 oct 2013;3:4-9.
13. Boyd CM, Fortin M. Future of Multimorbidity Research: How Should Understanding of Multimorbidity Inform Health System Design? *Public Health Rev.* 1 déc 2010;32(2):451-74.
14. Haute Autorité de Santé. Prendre en charge une personne âgée polyopathologique en soins primaires [Internet]. 2015 [cité 27 juill 2019]. Disponible à: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-04/note_methodologique_polyopathologie_de_la_personne_agee.pdf
15. Linn BS, Linn MW, Gurel L. Cumulative illness rating scale. *J Am Geriatr Soc.* mai 1968;16(5):622-6.
16. Miller MD, Paradis CF, Houck PR, Mazumdar S, Stack JA, Rifai AH, Mulsant B, Reynolds CF. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research: application of the Cumulative Illness Rating Scale. *Psychiatry Res.* mars 1992;41(3):237-48.
17. Miller MD, Towers A. Manual of guidelines for scoring the Cumulative Illness Rating Scale for geriatrics (CIRS-G). [Internet]. 1991 [cité 27 juill 2019]. Disponible à: http://www.anq.ch/fileadmin/redaktion/deutsch/20121211_CIRSG_Manual_E.pdf
18. Masnoon N, Shakib S, Kalisch-Ellett L, Caughey GE. What is polypharmacy? A systematic review of definitions. *BMC Geriatr.* 10 2017;17(1):230.

19. Onder G, Marengoni A. Polypharmacy. *JAMA*. 07 2017;318(17):1728.
20. Cadogan CA, Ryan C, Hughes CM. Appropriate Polypharmacy and Medicine Safety: When Many is not Too Many. *Drug Saf*. 2016;39:109-16.
21. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, Castella M, Diener H-C, Heidbuchel H, Hendriks J, Hindricks G, Manolis AS, Oldgren J, Popescu BA, Schotten U, Van Putte B, Vardas P, ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 07 2016;37(38):2893-962.
22. January CT, Wann LS, Alpert JS, Calkins H, Cigarroa JE, Cleveland JC, Conti JB, Ellinor PT, Ezekowitz MD, Field ME, Murray KT, Sacco RL, Stevenson WG, Tchou PJ, Tracy CM, Yancy CW. 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2 déc 2014;64(21):e1-76.
23. Fédération Française de Cardiologie. L'activité électrique du cœur [Internet]. 2016 [cité 27 juill 2019]. Disponible à: <https://www.fedecardio.org/Je-m-informe/Le-coeur/lactivite-electrique-du-coeur>
24. Ko D, Rahman F, Schnabel RB, Yin X, Benjamin EJ, Christophersen IE. Atrial fibrillation in women: epidemiology, pathophysiology, presentation, and prognosis. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(6):321-32.
25. Iwasaki Yu-ki, Nishida Kunihiro, Kato Takeshi, Nattel Stanley. Atrial Fibrillation Pathophysiology. *Circulation*. 15 nov 2011;124(20):2264-74.
26. Hatem S. Électrophysiologie de la fibrillation atriale. *Arch Cardiovasc Dis Suppl*. 1 juin 2013;5(2):119-24.
27. Sellers MB, Newby LK. Atrial fibrillation, anticoagulation, fall risk, and outcomes in elderly patients. *Am Heart J*. févr 2011;161(2):241-6.
28. Organisation Mondiale de la Santé. Accident vasculaire cérébral [Internet]. [cité 28 juill 2019]. Disponible à: https://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/fr/
29. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim Y-H, McAnulty JH, Zheng Z-J, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 25 févr 2014;129(8):837-47.
30. Lindberg T, Wimo A, Elmståhl S, Qiu C, Bohman DM, Sanmartin Berglund J. Prevalence and Incidence of Atrial Fibrillation and Other Arrhythmias in the General Older Population: Findings From the Swedish National Study on Aging and Care. *Gerontol Geriatr Med*. déc 2019;5:2333721419859687.
31. Marinigh R, Lip GYH, Fiotti N, Giansante C, Lane DA. Age as a risk factor for stroke in atrial fibrillation patients: implications for thromboprophylaxis. *J Am Coll Cardiol*. 7 sept 2010;56(11):827-37.
32. Heeringa J, van der Kuip DAM, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BHC, Stijnen T, Lip GYH, Wittteman JCM. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J*. avr 2006;27(8):949-53.
33. Spencer FA, Gore JM, Lessard D, Emery C, Pacifico L, Reed G, Gurwitz JH, Goldberg RJ. Venous thromboembolism in the elderly. A community-based perspective. *Thromb Haemost*. nov 2008;100(5):780-8.
34. Stein PD, Hull RD, Kayali F, Ghali WA, Alshab AK, Olson RE. Venous thromboembolism according to age: the impact of an aging population. *Arch Intern Med*. 8 nov 2004;164(20):2260-5.
35. Emdin CA, Wong CX, Hsiao AJ, Altman DG, Peters SA, Woodward M, Odutayo AA. Atrial fibrillation as risk factor for cardiovascular disease and death in women compared with men: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *BMJ*. 19 janv 2016;532:h7013.

36. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GYH, Franco OH, Hofman A, Wittteman JCM, Stricker BH, Heeringa J. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J.* sept 2013;34(35):2746-51.
37. Mizia-Stec K, Caforio ALP, Charron P, Gimeno JR, Elliott P, Kaski JP, Maggioni AP, Tavazzi L, Rigopoulos AG, Laroche C, Frigy A, Zachara E, Pena-Pena ML, Olusegun-Joseph A, Pinto Y, Sala S, Drago F, Blagova O, Reznik E, Tendera M. Atrial fibrillation, anticoagulation management and risk of stroke in the Cardiomyopathy/Myocarditis registry of the EURObservational Research Programme of the European Society of Cardiology. *ESC Heart Fail.* 17 sept 2020;7(6):3601-9.
38. Piccini JP, Hammill BG, Sinner MF, Jensen PN, Hernandez AF, Heckbert SR, Benjamin EJ, Curtis LH. Incidence and prevalence of atrial fibrillation and associated mortality among Medicare beneficiaries, 1993-2007. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* janv 2012;5(1):85-93.
39. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA.* 16 mars 1994;271(11):840-4.
40. Singer DE, Chang Y, Fang MC, Borowsky LH, Pomernacki NK, Udaltsova N, Go AS. The Net Clinical Benefit of Warfarin Anticoagulation in Atrial Fibrillation. *Ann Intern Med.* 1 sept 2009;151(5):297-305.
41. Parks AL, Fang MC. Scoring Systems for Estimating the Risk of Anticoagulant-Associated Bleeding. *Semin Thromb Hemost.* 30 mars 2017;43(5):514-24.
42. Dictionnaire de français Larousse. Définitions : hémostase - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 27 janv 2019]. Disponible à : <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/h%C3%A9mostase/39554>
43. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost JTH.* déc 2012;10(12):2428-37.
44. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood.* 1 févr 2008;111(3):981-6.
45. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* mars 2012;129(3):220-4.
46. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* juill 2011;25(4):155-67.
47. Wright IS. The nomenclature of blood clotting factors. *Thromb Diath Haemorrh.* 15 mai 1962;7:381-8.
48. History - International Society on Thrombosis and Haemostasis, Inc. [Internet]. [cité 1 oct 2018]. Disponible à : <https://www.isth.org/page/History>
49. Macfarlane RG. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. *Nature.* 2 mai 1964;202:498-9.
50. Esnouf MP, Williams WJ. The isolation and purification of a bovine-plasma protein which is a substrate for the coagulant fraction of Russell's-viper venom. *Biochem J.* juill 1962;84:62-71.
51. Giangrande PLF. Six characters in search of an author: the history of the nomenclature of coagulation factors. *Br J Haematol.* juin 2003;121(5):703-12.
52. Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J.* juin 1935;29(6):1273-85.
53. Ferland G. The discovery of vitamin K and its clinical applications. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(3):213-8.
54. Bell RG, Sadowski JA, Matschiner JT. Mechanism of action of warfarin. Warfarin and metabolism of vitamin K 1. *Biochemistry.* 9 mai 1972;11(10):1959-61.
55. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost JTH.* août 2005;3(8):1894-904.
56. Crawley JTB, Zanardelli S, Chion CKNK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2007;5 Suppl 1:95-101.
57. Hedstrom L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem Rev.* 1 déc 2002;102(12):4501-24.

58. Bode W. The structure of thrombin: a janus-headed proteinase. *Semin Thromb Hemost.* avr 2006;32 Suppl 1:16-31.
59. Josso F, Prou-Wartelle O. Interaction of tissue factor and factor VII at the earliest phase of coagulation. *Thromb Diath Haemorrh Suppl.* 1965;17:35-44.
60. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1977;74(12):5260-4.
61. Ratnoff OD, Rosenblum JM. Role of Hageman factor in the initiation of clotting by glass; evidence that glass frees Hageman factor from inhibition. *Am J Med.* août 1958;25(2):160-8.
62. van der Meijden PEJ, Munnix ICA, Auger JM, Govers-Riemslog JWP, Cosemans JMEM, Kuijpers MJE, Spronk HM, Watson SP, Renné T, Heemskerk JWM. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood.* 23 juill 2009;114(4):881-90.
63. Faxälv L, Boknäs N, Ström JO, Tengvall P, Theodorsson E, Ramström S, Lindahl TL. Putting polyphosphates to the test: evidence against platelet-induced activation of factor XII. *Blood.* 28 nov 2013;122(23):3818-24.
64. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renné T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 11 déc 2009;139(6):1143-56.
65. Hofman Z, de Maat S, Hack CE, Maas C. Bradykinin: Inflammatory Product of the Coagulation System. *Clin Rev Allergy Immunol.* oct 2016;51(2):152-61.
66. Foster PA, Zimmerman TS. Factor VIII structure and function. *Blood Rev.* sept 1989;3(3):180-91.
67. Hemker HC, Kahn MJ. Reaction sequence of blood coagulation. *Nature.* 9 sept 1967;215(5106):1201-2.
68. Hemker HC, Esnouf MP, Hemker PW, Swart AC, Macfarlane RG. Formation of prothrombin converting activity. *Nature.* 15 juill 1967;215(5098):248-51.
69. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem.* 10 janv 1980;255(1):274-83.
70. Astrup T. HEPARIN AND THE INHIBITION OF BLOOD-CLOTTING. *Science.* 14 juill 1939;90(2324):36.
71. Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. HEPARIN AND BLOOD CLOTTING. *Science.* 8 déc 1939;90(2345):539.
72. Huntington JA. Thrombin inhibition by the serpins. *J Thromb Haemost JTH.* juin 2013;11 Suppl 1:254-64.
73. Olson ST, Björk I. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Semin Thromb Hemost.* 1994;20(4):373-409.
74. Griffith MJ. Kinetics of the heparin-enhanced antithrombin III/thrombin reaction. Evidence for a template model for the mechanism of action of heparin. *J Biol Chem.* 10 juill 1982;257(13):7360-5.
75. Jordan RE, Oosta GM, Gardner WT, Rosenberg RD. The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. *J Biol Chem.* 10 nov 1980;255(21):10081-90.
76. van Boven HH, Lane DA. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin Hematol.* juill 1997;34(3):188-204.
77. Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol.* févr 2004;79(2):109-16.
78. Mammen EF, Thomas WR, Seegers WH. Activation of purified prothrombin to autoprothrombin I or autoprothrombin II (platelet cofactor II or autoprothrombin II-A). *Thromb Diath Haemorrh.* 15 déc 1960;5:218-49.
79. Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2003;1(7):1515-24.

80. Gandrille S, Saposnik B, Aiach M. Le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR) : un récepteur à l'interface entre coagulation et système inflammatoire. *Hématologie*. 26 févr 2002;7(6):418-28.
81. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature*. 30 mars 2000;404(6777):518-25.
82. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *N Engl J Med*. 15 mai 1986;314(20):1298-304.
83. Esmon CT. Protein-C: biochemistry, physiology, and clinical implications. *Blood*. déc 1983;62(6):1155-8.
84. Abildgaard U. Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by alpha2-macroglobulin, studied by N-terminal analysis. *Thromb Diath Haemorrh*. 30 avr 1969;21(2):173-80.
85. Fischer AM, Tapon-Bretonnière J, Bros A, Josso F. Respective roles of antithrombin III and alpha 2 macroglobulin in thrombin inactivation. *Thromb Haemost*. 23 févr 1981;45(1):51-4.
86. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost JTH*. juin 2015;13 Suppl 1:S98-105.
87. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. janv 2015;29(1):17-24.
88. Hudson NE. Biophysical Mechanisms Mediating Fibrin Fiber Lysis. *BioMed Res Int*. 2017;2017:2748340.
89. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. mai 2005;129(3):307-21.
90. Sazonova IY, Thomas BM, Gladysheva IP, Houg AK, Reed GL. Fibrinolysis is amplified by converting alpha-antiplasmin from a plasmin inhibitor to a substrate. *J Thromb Haemost JTH*. oct 2007;5(10):2087-94.
91. Edy J, Collen D. The interaction in human plasma of antiplasmin, the fast-reacting plasmin inhibitor, with plasmin, thrombin, trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta BBA - Enzymol*. 13 oct 1977;484(2):423-32.
92. Müllertz S, Clemmensen I. The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochem J*. 1 déc 1976;159(3):545-53.
93. Butte Anjum N., Houg Aiilyan K., Jang Ik-Kyung, Reed Guy L. α 2-Antiplasmin Causes Thrombi to Resist Fibrinolysis Induced by Tissue Plasminogen Activator in Experimental Pulmonary Embolism. *Circulation*. 1 avr 1997;95(7):1886-91.
94. Moroi M, Aoki N. Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J Biol Chem*. 10 oct 1976;251(19):5956-65.
95. Suzuki H, Shima M, Nogami K, Sakurai Y, Nishiya K, Saenko EL, Tanaka I, Yoshioka A. Factor V C2 domain contains a major thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed factor V activation. *J Thromb Haemost JTH*. juin 2006;4(6):1354-60.
96. Fritsch P, Cvirn G, Cimenti C, Baier K, Gallistl S, Koestenberger M, Roschitz B, Leschnik B, Muntean W. Thrombin generation in factor VIII-depleted neonatal plasma: nearly normal because of physiologically low antithrombin and tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost JTH*. mai 2006;4(5):1071-7.
97. von dem Borne PA, Cox LMP, Bouma BN. Factor XI enhances fibrin generation and inhibits fibrinolysis in a coagulation model initiated by surface-coated tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. juin 2006;17(4):251-7.
98. Ponce RA, Visich JE, Heffernan JK, Lewis KB, Pederson S, Lebel E, Andrews-Jones L, Elliott G, Palmer TE, Rogge MC. Preclinical Safety and Pharmacokinetics of Recombinant Human Factor XIII. *Toxicol Pathol*. 1 juin 2005;33(4):495-506.
99. Lundblad RL, White GC. The interaction of thrombin with blood platelets. *Platelets*. nov 2005;16(7):373-85.

100. Siller-Matula JM, Schwameis M, Blann A, Mannhalter C, Jilma B. Thrombin as a multi-functional enzyme. Focus on in vitro and in vivo effects. *Thromb Haemost. déc 2011;106(6):1020-33.*
101. Bayer AG. Xarelto 20 mg film-coated tablets SmPC [Internet]. 2020 [cité 8 oct 2020]. Disponible à: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xarelto-epar-product-information_en.pdf
102. Bristol-Myers Squibb/Pfizer EEIG. Eliquis 5 mg film-coated tablets SmPC [Internet]. 2020 [cité 8 oct 2020]. Disponible à: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/eliquis-epar-product-information_en.pdf
103. Boehringer Ingelheim International GmbH. Pradaxa 150 mg hard capsules SmPC [Internet]. 2020 [cité 8 oct 2020]. Disponible à: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pradaxa-epar-product-information_en.pdf
104. Haute Autorité de Santé. Les anticoagulants oraux [Internet]. 2018 [cité 27 janv 2019]. Disponible à: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2851086/fr/les-anticoagulants-oraux
105. Shameem R, Ansell J. Disadvantages of VKA and requirements for novel anticoagulants. *Best Pract Res Clin Haematol. juin 2013;26(2):103-14.*
106. Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN. Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest. juin 2008;133(6 Suppl):257S-298S.*
107. Hirsh J, O'Donnell M, Eikelboom JW. Beyond unfractionated heparin and warfarin: current and future advances. *Circulation. 31 juill 2007;116(5):552-60.*
108. Ogilvie IM, Newton N, Welner SA, Cowell W, Lip GYH. Underuse of oral anticoagulants in atrial fibrillation: a systematic review. *Am J Med. juill 2010;123(7):638-645.e4.*
109. Tulner LR, Van Campen JPCM, Kuper IMJA, Gijsen GJPT, Koks CHW, Mac Gillavry MR, van Tinteren H, Beijnen JH, Brandjes DPM. Reasons for undertreatment with oral anticoagulants in frail geriatric outpatients with atrial fibrillation: a prospective, descriptive study. *Drugs Aging. 1 janv 2010;27(1):39-50.*
110. Pautas E, Gouin-Thibault I, Debray M, Gaussem P, Siguret V. Haemorrhagic complications of vitamin k antagonists in the elderly: risk factors and management. *Drugs Aging. 2006;23(1):13-25.*
111. Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S. Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation. 29 mai 2007;115(21):2689-96.*
112. Gurwitz JH, Field TS, Radford MJ, Harrold LR, Becker R, Reed G, DeBellis K, Moldoff J, Verzier N. The safety of warfarin therapy in the nursing home setting. *Am J Med. juin 2007;120(6):539-44.*
113. Elg M, Gustafsson D, Carlsson S. Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rat. *Thromb Res. 1 mai 1999;94(3):187-97.*
114. Wolzt M, Sarich TS, Eriksson UG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ximelagatran. *Semin Vasc Med. août 2005;5(3):245-53.*
115. Kindmark A, Jawaid A, Harbron CG, Barratt BJ, Bengtsson OF, Andersson TB, Carlsson S, Cederbrant KE, Gibson NJ, Armstrong M, Lagerström-Fermér ME, Dellsén A, Brown EM, Thornton M, Dukes C, Jenkins SC, Firth MA, Harrod GO, Pinel TH, Billing-Clason SME, Cardon LR, March RE. Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *Pharmacogenomics J. juin 2008;8(3):186-95.*
116. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJV, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, Al-Khalidi HR, Ansell J, Atar D, Avezum A, Bahit MC, Diaz R, Easton JD, Ezekowitz JA, Flaker G, Garcia D, Geraldes M, Gersh BJ, Golitsyn S, Goto S, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Horowitz J, Mohan P, Jansky P, Lewis BS, Lopez-Sendon JL, Pais P, Parkhomenko A, Verheugt FWA, Zhu J, Wallentin L, ARISTOTLE Committees and Investigators. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med. 15 sept 2011;365(11):981-92.*

117. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, Breithardt G, Halperin JL, Hankey GJ, Piccini JP, Becker RC, Nessel CC, Paolini JF, Berkowitz SD, Fox KAA, Califf RM, ROCKET AF Investigators. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 8 sept 2011;365(10):883-91.
118. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, Pogue J, Reilly PA, Themeles E, Varrone J, Wang S, Alings M, Xavier D, Zhu J, Diaz R, Lewis BS, Darius H, Diener H-C, Joyner CD, Wallentin L, RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 17 sept 2009;361(12):1139-51.
119. Pinto DJP, Orwat MJ, Koch S, Rossi KA, Alexander RS, Smallwood A, Wong PC, Rendina AR, Luettgen JM, Knabb RM, He K, Xin B, Wexler RR, Lam PYS. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem.* 1 nov 2007;50(22):5339-56.
120. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitzka D, Misselwitz F. The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Nat Rev Drug Discov.* janv 2011;10(1):61-75.
121. Wong PC, Pinto DJP, Zhang D. Preclinical discovery of apixaban, a direct and orally bioavailable factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombolysis.* mai 2011;31(4):478-92.
122. Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, Lampe T, Pernerstorfer J, Schlemmer K-H, Reinemer P, Perzborn E. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Med Chem.* 22 sept 2005;48(19):5900-8.
123. Kubitzka D, Becka M, Voith B, Zuehlsdorf M, Wensing G. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther.* oct 2005;78(4):412-21.
124. Kubitzka D, Becka M, Mueck W, Halabi A, Maatouk H, Klause N, Lufft V, Wand DD, Philipp T, Bruck H. Effects of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *Br J Clin Pharmacol.* nov 2010;70(5):703-12.
125. Mueck W, Schwerts S, Stampfuss J. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring. *Thromb J.* 28 juin 2013;11(1):10.
126. Gnoth MJ, Buetehorn U, Muenster U, Schwarz T, Sandmann S. In vitro and in vivo P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban. *J Pharmacol Exp Ther.* juill 2011;338(1):372-80.
127. Kubitzka D, Becka M, Roth A, Mueck W. The influence of age and gender on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Clin Pharmacol.* mars 2013;53(3):249-55.
128. Cirincione B, Kowalski K, Nielsen J, Roy A, Thanneer N, Byon W, Boyd R, Wang X, Leil T, LaCreta F, Ueno T, Oishi M, Frost C. Population Pharmacokinetics of Apixaban in Subjects With Nonvalvular Atrial Fibrillation. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol.* 2018;7(11):728-38.
129. Frost C, Wang J, Nepal S, Schuster A, Barrett YC, Mosqueda-Garcia R, Reeves RA, LaCreta F. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* févr 2013;75(2):476-87.
130. Raghavan N, Frost CE, Yu Z, He K, Zhang H, Humphreys WG, Pinto D, Chen S, Bonacorsi S, Wong PC, Zhang D. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* janv 2009;37(1):74-81.
131. Frost CE, Song Y, Shenker A, Wang J, Barrett YC, Schuster A, Harris SI, LaCreta F. Effects of age and sex on the single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban. *Clin Pharmacokinet.* juin 2015;54(6):651-62.

132. Eisert WG, Huel N, Stangier J, Wiene W, Clemens A, van Ryn J. Dabigatran: an oral novel potent reversible nonpeptide inhibitor of thrombin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* oct 2010;30(10):1885-9.
133. Wiene W, Stassen J-M, Priepke H, Ries UJ, Huel N. In-vitro profile and ex-vivo anticoagulant activity of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate. *Thromb Haemost.* juill 2007;98(1):155-62.
134. Huel NH, Nar H, Priepke H, Ries U, Stassen J-M, Wiene W. Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem.* 25 avr 2002;45(9):1757-66.
135. Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(5):285-95.
136. Stangier J, Rathgen K, Stähle H, Gansser D, Roth W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol.* sept 2007;64(3):292-303.
137. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* févr 2008;36(2):386-99.
138. Stangier J, Stähle H, Rathgen K, Fuhr R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the direct oral thrombin inhibitor dabigatran in healthy elderly subjects. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(1):47-59.
139. Ezekowitz MD, Connolly S, Parekh A, Reilly PA, Varrone J, Wang S, Oldgren J, Themeles E, Wallentin L, Yusuf S. Rationale and design of RE-LY: randomized evaluation of long-term anticoagulant therapy, warfarin, compared with dabigatran. *Am Heart J.* mai 2009;157(5):805-10, 810.e1-2.
140. ROCKET AF Study Investigators. Rivaroxaban-once daily, oral, direct factor Xa inhibition compared with vitamin K antagonism for prevention of stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation: rationale and design of the ROCKET AF study. *Am Heart J.* mars 2010;159(3):340-347.e1.
141. Lopes RD, Alexander JH, Al-Khatib SM, Ansell J, Diaz R, Easton JD, Gersh BJ, Granger CB, Hanna M, Horowitz J, Hylek EM, McMurray JJV, Verheugt FWA, Wallentin L, ARISTOTLE Investigators. Apixaban for reduction in stroke and other Thromboembolic events in atrial fibrillation (ARISTOTLE) trial: design and rationale. *Am Heart J.* mars 2010;159(3):331-9.
142. Gosselin RC, Adcock DM, Bates SM, Douxfils J, Favaloro EJ, Guoin-Thibault I, Guillermo C, Kawai Y, Lindhoff-Last E, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost.* mars 2018;118(3):437-50.
143. Wang YP, Kehar R, Iansavitchene A, Lazo-Langner A. Bleeding Risk in Nonvalvular Atrial Fibrillation Patients Receiving Direct Oral Anticoagulants and Warfarin: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *TH Open Companion J Thromb Haemost.* juill 2020;4(3):e145-52.
144. Lip GYH, Keshishian A, Li X, Hamilton M, Masseria C, Gupta K, Luo X, Mardekian J, Friend K, Nadkarni A, Pan X, Baser O, Deitelzweig S. Effectiveness and Safety of Oral Anticoagulants Among Nonvalvular Atrial Fibrillation Patients. *Stroke.* 2018;49(12):2933-44.
145. Camm AJ, Amarenco P, Haas S, Hess S, Kirchhof P, Kuhls S, van Eickels M, Turpie AGG, XANTUS Investigators. XANTUS: a real-world, prospective, observational study of patients treated with rivaroxaban for stroke prevention in atrial fibrillation. *Eur Heart J.* 7 avr 2016;37(14):1145-53.
146. Martínez CAA, Lanás F, Radaideh G, Kharabsheh SM, Lambelet M, Viaud MAL, Ziadeh NS, Turpie AGG, XANTUS Investigators. XANTUS-EL: A real-world, prospective, observational study of patients treated with rivaroxaban for stroke prevention in atrial fibrillation in Eastern Europe, Middle East, Africa and Latin America. *Egypt Heart J EHJ Off Bull Egypt Soc Cardiol.* déc 2018;70(4):307-13.

147. Kim Y-H, Shim J, Tsai C-T, Wang C-C, Vilela G, Muengtaweepongsa S, Kurniawan M, Maskon O, Li Fern H, Nguyen TH, Thanachartwet T, Sim K, Camm AJ, XANAP investigators. XANAP: A real-world, prospective, observational study of patients treated with rivaroxaban for stroke prevention in atrial fibrillation in Asia. *J Arrhythmia*. août 2018;34(4):418-27.
148. Ikeda T, Ogawa S, Kitazono T, Nakagawara J, Minematsu K, Miyamoto S, Murakawa Y, Takeichi M, Ohashi Y, Okayama Y, Sunaya T, Yamanaka S. Real-world outcomes of the Xarelto Post-Authorization Safety & Effectiveness Study in Japanese Patients with Atrial Fibrillation (XAPASS). *J Cardiol*. juill 2019;74(1):60-6.
149. Windecker S, Lopes RD, Massaro T, Jones-Burton C, Granger CB, Aronson R, Heizer G, Goodman SG, Darius H, Jones WS, Aschermann M, Brieger D, Cura F, Engström T, Fridrich V, Halvorsen S, Huber K, Kang H-J, Leiva-Pons JL, Lewis BS, Malaga G, Meneveau N, Merkely B, Milicic D, Morais J, Potpara TS, Raev D, Sabaté M, de Waha-Thiele S, Welsh RC, Xavier D, Mehran R, Alexander JH, AUGUSTUS Investigators. Antithrombotic Therapy in Patients With Atrial Fibrillation and Acute Coronary Syndrome Treated Medically or With Percutaneous Coronary Intervention or Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention: Insights From the AUGUSTUS Trial. *Circulation*. 03 2019;140(23):1921-32.
150. GWT-TUD GmbH. Prospective Register Study to Record Safety and Efficacy of New Oral Anticoagulants [Internet]. clinicaltrials.gov; 2018 nov [cité 5 janv 2021]. Report No.: NCT01588119. Disponible à: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01588119>
151. Thrombosis Research Institute. Prospective, Multi Centre, International Registry of Male and Female Patients Newly Diagnosed With Atrial Fibrillation. [Internet]. clinicaltrials.gov; 2014 déc [cité 4 janv 2021]. Report No.: NCT01090362. Disponible à: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01090362>
152. Japan Cardiovascular Research Foundation. Registry Study on the Effectiveness of Rivaroxaban in Patients With Non-valvular Atrial Fibrillation Managed by General Practitioners(GENERAL Study) [Internet]. clinicaltrials.gov; 2015 déc [cité 5 janv 2021]. Report No.: NCT02633982. Disponible à: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02633982>
153. GWT-TUD GmbH. Factor XA - Inhibition in RENal Patients With Non-valvular Atrial Fibrillation - Observational Registry [Internet]. clinicaltrials.gov; 2019 août [cité 4 janv 2021]. Report No.: study/NCT02663076. Disponible à: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02663076>
154. Lip GYH, Hammerstingl C, Marin F, Cappato R, Meng IL, Kirsch B, van Eickels M, Cohen A, X-TRA study and CLOT-AF registry investigators. Left atrial thrombus resolution in atrial fibrillation or flutter: Results of a prospective study with rivaroxaban (X-TRA) and a retrospective observational registry providing baseline data (CLOT-AF). *Am Heart J*. août 2016;178:126-34.
155. Kirchhof P, Radaideh G, Kim Y-H, Lanas F, Haas S, Amarenco P, Turpie AGG, Bach M, Lambelet M, Hess S, Camm AJ, Global XANTUS program Investigators. Global Prospective Safety Analysis of Rivaroxaban. *J Am Coll Cardiol*. 10 2018;72(2):141-53.
156. Shimokawa H, Yamashita T, Uchiyama S, Kitazono T, Shimizu W, Ikeda T, Kamouchi M, Kaikita K, Fukuda K, Origasa H, Sakuma I, Saku K, Okumura Y, Nakamura Y, Morimoto H, Matsumoto N, Tsuchida A, Ako J, Sugishita N, Shimizu S, Atarashi H, Inoue H. The EXPAND study: Efficacy and safety of rivaroxaban in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 01 2018;258:126-32.
157. Yasaka M, Minematsu K, Toyoda K, Mori E, Hirano T, Hamasaki T, Yamagami H, Nagao T, Yoshimura S, Uchiyama S, RELAXED study group. Rivaroxaban administration after acute ischemic stroke: The RELAXED study. *PloS One*. 2019;14(2):e0212354.
158. Ezekowitz MD, Pollack CV, Halperin JL, England RD, VanPelt Nguyen S, Spahr J, Sudworth M, Cater NB, Breazna A, Oldgren J, Kirchhof P. Apixaban compared to heparin/vitamin K antagonist in patients with atrial fibrillation scheduled for cardioversion: the EMANATE trial. *Eur Heart J*. 21 2018;39(32):2959-71.
159. Yasaka M, Umeyama M, Kataoka H, Inoue H. Secondary stroke prevention with apixaban in nonvalvular atrial fibrillation: A subgroup analysis of the STANDARD study. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. sept 2020;29(9):105034.

160. Steffel J, Verhamme P, Potpara TS, Albaladejo P, Antz M, Desteghe L, Georg Haeusler K, Oldgren J, Reinecke H, Roldan-Schilling V, Rowell N, Sinnaeve P, Collins R, Camm AJ, Heidbüchel H, ESC Scientific Document Group. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 21 avr 2018;39(16):1330-93.
161. Siguret V, Gouin-Thibault I, Gaussem P, Pautas E. Optimizing the use of anticoagulants (heparins and oral anticoagulants) in the elderly. *Drugs Aging*. sept 2013;30(9):687-99.
162. Harper P, Young L, Merriman E. Bleeding risk with dabigatran in the frail elderly. *N Engl J Med*. 1 mars 2012;366(9):864-6.
163. Simon N, Guellec CL, Laporte S. Analyse pharmacocinétique de population. *Médecine Thérapeutique*. 31 mai 2005;11(3):212-8.
164. Loeffen R, Kleinegris M-CF, Loubele STBG, Pluijmen PHM, Fens D, van Oerle R, ten Cate H, Spronk HHM. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost JTH*. déc 2012;10(12):2544-54.
165. Maeda K, Sugiyama Y. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23(4):223-35.
166. Mueck W, Lensing AWA, Agnelli G, Decousus H, Prandoni P, Misselwitz F. Rivaroxaban: population pharmacokinetic analyses in patients treated for acute deep-vein thrombosis and exposure simulations in patients with atrial fibrillation treated for stroke prevention. *Clin Pharmacokinet*. oct 2011;50(10):675-86.
167. Gouin-Thibault I, Pautas E, Mahé I, Descarpentries C, Nivet-Antoine V, Golmard J-L, Siguret V. Is Modification of Diet in Renal Disease formula similar to Cockcroft-Gault formula to assess renal function in elderly hospitalized patients treated with low-molecular-weight heparin? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. nov 2007;62(11):1300-5.
168. Klotz U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab Rev*. 2009;41(2):67-76.
169. Ebert N, Jakob O, Gaedeke J, van der Giet M, Kuhlmann MK, Martus P, Mielke N, Schuchardt M, Tölle M, Wenning V, Schaeffner ES. Prevalence of reduced kidney function and albuminuria in older adults: the Berlin Initiative Study. *Nephrol Dial Transplant*. 1 juin 2017;32(6):997-1005.
170. Glasscock RJ, Warnock DG, Delanaye P. The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls. *Nat Rev Nephrol*. févr 2017;13(2):104-14.
171. Bendayan M, Mardigyan V, Williamson D, Chen-Tournoux A, Eintracht S, Rudski L, MacNamara E, Blostein M, Afilalo M, Afilalo J. Muscle Mass and Direct Oral Anticoagulant Activity in Older Adults With Atrial Fibrillation. *J Am Geriatr Soc*. 11 janv 2021;2021(00):1-7.
172. Šinigoj P, Vene N, Košmelj K, Mavri A. Risk of major bleeding in elderly patients with atrial fibrillation on direct oral anticoagulants: real world experience. *Int J Clin Pharm*. avr 2020;42(2):445-52.
173. Miklič M, Mavri A, Vene N, Söderblom L, Božič-Mijovski M, Pohanka A, Antovic J, Malmström RE. Intra- and inter- individual rivaroxaban concentrations and potential bleeding risk in patients with atrial fibrillation. *Eur J Clin Pharmacol*. août 2019;75(8):1069-75.
174. Suwa M, Morii I, Kino M. Rivaroxaban or Apixaban for Non-Valvular Atrial Fibrillation — Efficacy and Safety of Off-Label Under-Dosing According to Plasma Concentration —. *Circ J*. 25 avr 2019;83(5):991-9.
175. Roşian A-N, Roşian ŞH, Kiss B, Ştefan MG, Trifa AP, Ober CD, Anchin O, Buzoianu AD. Interindividual Variability of Apixaban Plasma Concentrations: Influence of Clinical and Genetic Factors in a Real-Life Cohort of Atrial Fibrillation Patients. *Genes*. 17 2020;11(4).
176. Testa S, Paoletti O, Legnani C, Dellanoce C, Antonucci E, Cosmi B, Pengo V, Poli D, Morandini R, Testa R, Tripodi A, Palareti G. Low drug levels and thrombotic complications in high-risk atrial fibrillation patients treated with direct oral anticoagulants. *J Thromb Haemost JTH*. mai 2018;16(5):842-8.

177. Al-Aieshy F, Malmström RE, Antovic J, Pohanka A, Rönquist-Nii Y, Berndtsson M, Al-Khalili F, Skeppholm M. Clinical evaluation of laboratory methods to monitor exposure of rivaroxaban at trough and peak in patients with atrial fibrillation. *Eur J Clin Pharmacol.* 1 juin 2016;72(6):671-9.
178. Testa S, Tripodi A, Legnani C, Pengo V, Abbate R, Dellanoce C, Carraro P, Salomone L, Paniccia R, Paoletti O, Poli D, Palareti G, START-Laboratory Register. Plasma levels of direct oral anticoagulants in real life patients with atrial fibrillation: Results observed in four anticoagulation clinics. *Thromb Res.* janv 2016;137:178-83.
179. Reilly PA, Lehr T, Haertter S, Connolly SJ, Yusuf S, Eikelboom JW, Ezekowitz MD, Nehmiz G, Wang S, Wallentin L, RE-LY Investigators. 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.
180. Girgis IG, Patel MR, Peters GR, Moore KT, Mahaffey KW, Nessel CC, Halperin JL, Califf RM, Fox K a. A, Becker RC. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with non-valvular atrial fibrillation: results from ROCKET AF. *J Clin Pharmacol.* août 2014;54(8):917-27.
181. Jorgenson JW. Capillary liquid chromatography at ultrahigh pressures. *Annu Rev Anal Chem Palo Alto Calif.* 2010;3:129-50.
182. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* févr 2003;2(2):140-50.
183. Rodriguez-Aller M, Gurny R, Veuthey J-L, Guillarme D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *J Chromatogr A.* 31 mai 2013;1292:2-18.
184. Gouveia F, Bicker J, Gonçalves J, Alves G, Falcão A, Fortuna A. Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review. *Anal Chim Acta.* 17 oct 2019;1076:18-31.
185. Schmitz EMH, Boonen K, van den Heuvel DJA, van Dongen JLJ, Schellings MWM, Emmen JMA, van der Graaf F, Brunsveld L, van de Kerkhof D. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. *J Thromb Haemost JTH.* oct 2014;12(10):1636-46.
186. Cuker A, Siegal DM, Crowther MA, Garcia DA. Laboratory measurement of the anticoagulant activity of the non-vitamin K oral anticoagulants. *J Am Coll Cardiol.* 16 sept 2014;64(11):1128-39.
187. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* mai 2016;62(5):699-707.
188. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* nov 2006;96(5):553-61.
189. Ten Cate H. Thrombin generation in clinical conditions. *Thromb Res.* mars 2012;129(3):367-70.
190. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA.* 26 juill 2006;296(4):397-402.
191. Pfrepper C, Metze M, Siegemund A, Klöter T, Siegemund T, Petros S. Direct oral anticoagulant plasma levels and thrombin generation on ST Genesis system. *Res Pract Thromb Haemost.* mai 2020;4(4):619-27.
192. Siguret V, Abdoul J, Delavenne X, Curis E, Carlo A, Blanchard A, Salem J-E, Gaussem P, Funck-Brentano C, Azizi M, Mismetti P, Lorient M-A, Lecompte T, Gouin-Thibault I. Rivaroxaban pharmacodynamics in healthy volunteers evaluated with thrombin generation and the active protein C system: Modeling and assessing interindividual variability. *J Thromb Haemost JTH.* 2019;17(10):1670-82.
193. Kyriakou E, Katogiannis K, Ikonomidis I, Giallourous G, Nikolopoulos GK, Rapti E, Taichert M, Pantavou K, Gialeraki A, Kousathana F, Poulis A, Tsantes AG, Bonovas S, Kapsimali V,

- Tsivgoulis G, Tsantes AE. Laboratory Assessment of the Anticoagulant Activity of Apixaban in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. 1 oct 2018;24(9S):194S-201S.
194. Zhang C, Zhang P, Li H, Han L, Zhang L, Zhang L, Yang X. The effect of dabigatran on thrombin generation and coagulation assays in rabbit and human plasma. *Thromb Res*. 2018;165:38-43.
 195. Schenk B, Goerke S, Beer R, Helbok R, Fries D, Bachler M. Four-factor prothrombin complex concentrate improves thrombin generation and prothrombin time in patients with bleeding complications related to rivaroxaban: a single-center pilot trial. *Thromb J*. 2018;16:1.
 196. Bertaggia-Calderara D, Kröll D, Gerschheimer C, Nicolas N, Nett P, Stirnimann G, Alberio L. Effect of Rivaroxaban on thrombin generation in vivo. A study in obese patients. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(1):e11-4.
 197. Kreutz R, Persson PB, Kubitzka D, Thelen K, Heitmeier S, Schwerts S, Becka M, Hemmrich M. Dissociation between the pharmacokinetics and pharmacodynamics of once-daily rivaroxaban and twice-daily apixaban: a randomized crossover study. *J Thromb Haemost JTH*. oct 2017;15(10):2017-28.
 198. Helin TA, Virtanen L, Manninen M, Leskinen J, Leppilahti J, Joutsu-Korhonen L, Lassila R. Effects of thromboprophylactic doses of apixaban and rivaroxaban on coagulation and thrombin generation in association with total hip replacement. *J Thromb Thrombolysis*. mai 2017;43(4):562-9.
 199. Artang R, Anderson M, Riley P, Nielsen JD. Assessment of the effect of direct oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban in healthy male volunteers using a thrombin generation assay. *Res Pract Thromb Haemost*. oct 2017;1(2):194-201.
 200. Tsantes AE, Kyriakou E, Ikonomidis I, Katogiannis K, Papadakis I, Douramani P, Kopterides P, Kapsimali V, Lekakis J, Tsangaris I, Bonovas S. Comparative Assessment of the Anticoagulant Activity of Rivaroxaban and Dabigatran in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation: A Noninterventional Study. *Medicine (Baltimore)*. avr 2016;95(14):e3037.
 201. Helin TA, Lemponen M, Hjemdahl P, Rönquist-Nii Y, Lassila R, Joutsu-Korhonen L. From laboratory to clinical practice: Dabigatran effects on thrombin generation and coagulation in patient samples. *Thromb Res*. juill 2015;136(1):154-60.
 202. Freyburger G, Macouillard G, Khennoufa K, Labrousche S, Molimard M, Sztark F. Rivaroxaban and apixaban in orthopaedics: is there a difference in their plasma concentrations and anticoagulant effects? *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. déc 2015;26(8):925-33.
 203. Cheung YW, Barco S, Hutten BA, Meijers JCM, Middeldorp S, Coppens M. In vivo increase in thrombin generation by four-factor prothrombin complex concentrate in apixaban-treated healthy volunteers. *J Thromb Haemost JTH*. oct 2015;13(10):1799-805.
 204. Herrmann R, Thom J, Wood A, Phillips M, Muhammad S, Baker R. Thrombin generation using the calibrated automated thrombinoscope to assess reversibility of dabigatran and rivaroxaban. *Thromb Haemost*. 5 mai 2014;111(5):989-95.
 205. Marlu R, Hodaj E, Paris A, Albaladejo P, Cracowski JL, Crackowski JL, Pernod G. Effect of non-specific reversal agents on anticoagulant activity of dabigatran and rivaroxaban: a randomised crossover ex vivo study in healthy volunteers. *Thromb Haemost*. août 2012;108(2):217-24.
 206. Freyburger G, Macouillard G, Labrousche S, Sztark F. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thromb Res*. mai 2011;127(5):457-65.
 207. Eerenberg ES, Kamphuisen PW, Sijpkens MK, Meijers JC, Buller HR, Levi M. Reversal of rivaroxaban and dabigatran by prothrombin complex concentrate: a randomized, placebo-controlled, crossover study in healthy subjects. *Circulation*. 4 oct 2011;124(14):1573-9.
 208. de Laat-Kremers RMW, Ninivaggi M, Devreese KMJ, de Laat B. Towards standardization of thrombin generation assays: Inventory of thrombin generation methods based on results of an International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost JTH*. août 2020;18(8):1893-9.

209. Kintigh J, Monagle P, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Res Pract Thromb Haemost.* janv 2018;2(1):42-8.
210. Metze M, Pfrepper C, Klöter T, Stöbe S, Siegemund R, Siegemund T, Edel E, Laufs U, Petros S. Inhibition of thrombin generation 12 hours after intake of direct oral anticoagulants. *Res Pract Thromb Haemost.* mai 2020;4(4):610-8.
211. Brinkman HJM. Global assays and the management of oral anticoagulation. *Thromb J.* 2015;13:9.
212. Warner ED, Brinkhous KM, Smith HP. A quantitative study on blood clotting: prothrombin fluctuations under experimental conditions. *Am J Physiol-Leg Content.* 31 janv 1936;114(3):667-75.
213. Herbert FK. The estimation of prothrombin in human plasma. *Biochem J.* déc 1940;34(12):1554-68.
214. Biggs R, MacFARLANE RG. The reaction of haemophilic plasma to thromboplastin. *J Clin Pathol.* nov 1951;4(4):445-59.
215. Pitney WR, Dacie JV. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol.* févr 1953;6(1):9-14.
216. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* févr 1953;6(1):3-8.
217. Hemker HC, Willems GM, Béguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost.* 20 août 1986;56(1):9-17.
218. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost JTH.* févr 2008;6(2):219-26.
219. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost.* 18 oct 1993;70(4):617-24.
220. Ramjee MK. The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation. *Anal Biochem.* 1 janv 2000;277(1):11-8.
221. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* avr 2000;83(4):589-91.
222. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(1):4-15.
223. Jourdi G, Siguret V, Martin AC, Golmard J-L, Godier A, Samama C-M, Gaussem P, Gouin-Thibault I, Le Bonniec B. Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban. *Thromb Haemost.* juill 2015;114(1):78-86.
224. Douxfils J, Morimont L, Bouvy C, de Saint-Hubert M, Devalet B, Devroye C, Dincq A-S, Dogné J-M, Guldenpfennig M, Baudar J, Larock A-S, Lessire S, Mullier F. Assessment of the analytical performances and sample stability on ST Genesia system using the STG-DrugScreen application. *J Thromb Haemost JTH.* août 2019;17(8):1273-87.
225. Ninivaggi M, de Laat-Kremers RMW, Carlo A, de Laat B. ST Genesia reference values of 117 healthy donors measured with STG-BleedScreen, STG-DrugScreen and STG-ThromboScreen reagents. *Res Pract Thromb Haemost.* janv 2021;5(1):187-96.
226. Calzavarini S, Brodard J, Quarroz C, Maire L, Nützi R, Jankovic J, Rotondo LC, Giabbani E, Fiedler GM, Nagler M, Angelillo-Scherrer A. Thrombin generation measurement using the ST Genesia Thrombin Generation System in a cohort of healthy adults: Normal values and variability. *Res Pract Thromb Haemost.* oct 2019;3(4):758-68.
227. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem.* 2019;90:215-81.
228. Comité Français d'Accréditation. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE [Internet]. [cité 2 nov 2020]. Disponible à: <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>

229. Curis E, Courtin C, Geoffroy PA, Laplanche J-L, Saubaméa B, Marie-Claire C. Determination of sets of covariating gene expression using graph analysis on pairwise expression ratios. *Bioinforma Oxf Engl*. 15 janv 2019;35(2):258-65.
230. Camici GG, Steffel J, Akhmedov A, Schafer N, Baldinger J, Schulz U, Shojaati K, Matter CM, Yang Z, Lüscher TF, Tanner FC. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: a potential treatment strategy for drug-eluting stents. *Circulation*. 3 oct 2006;114(14):1512-21.
231. Gouin-Thibault I, Delavenne X, Blanchard A, Siguret V, Salem JE, Narjoz C, Gaussem P, Beaune P, Funck-Brentano C, Azizi M, Mismetti P, Lorient MA. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. *J Thromb Haemost JTH*. 2017;15(2):273-83.
232. Gong IY, Kim RB. Importance of pharmacokinetic profile and variability as determinants of dose and response to dabigatran, rivaroxaban, and apixaban. *Can J Cardiol*. juill 2013;29(7 Suppl):S24-33.
233. Foulon-Pinto G, Jourdi G, Perrin J, Abdoul J, Paris G, Gouin-Thibault I, Curis E, Lecompte T, Siguret V. Study of thrombin generation with St Genesia to evaluate xaban pharmacodynamics: Analytical performances over 18 months. *Int J Lab Hematol*. 28 déc 2020;
234. Fadeeva OA, Pantelev MA, Karamzin SS, Balandina AN, Smirnov IV, Ataullakhanov FI. Thromboplastin immobilized on polystyrene surface exhibits kinetic characteristics close to those for the native protein and activates in vitro blood coagulation similarly to thromboplastin on fibroblasts. *Biochem Biokhimiia*. juin 2010;75(6):734-43.
235. Dashkevich NM, Ovanesov MV, Balandina AN, Karamzin SS, Shestakov PI, Soshitova NP, Tokarev AA, Pantelev MA, Ataullakhanov FI. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys J*. 21 nov 2012;103(10):2233-40.
236. Sinauridze EI, Vuimo TA, Tarandovskiy ID, Ovsepyan RA, Surov SS, Korotina NG, Serebriyskiy II, Lutsenko MM, Sokolov AL, Ataullakhanov FI. Thrombodynamics, a new global coagulation test: Measurement of heparin efficiency. *Talanta*. 1 avr 2018;180:282-91.
237. Gracheva MA, Urnova ES, Sinauridze EI, Tarandovskiy ID, Orel EB, Poletaev AV, Mendeleeva LP, Ataullakhanov FI, Balandina AN. Thromboelastography, thrombin generation test and thrombodynamics reveal hypercoagulability in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(12):3418-25.
238. Balandina AN, Serebriyskiy II, Poletaev AV, Polokhov DM, Gracheva MA, Koltsova EM, Vardanyan DM, Taranenko IA, Krylov AY, Urnova ES, Lobastov KV, Chernyakov AV, Shulutko EM, Momot AP, Shulutko AM, Ataullakhanov FI. Thrombodynamics-A new global hemostasis assay for heparin monitoring in patients under the anticoagulant treatment. *PloS One*. 2018;13(6):e0199900.
239. Koltsova EM, Balandina AN, Grischuk KI, Shpilyuk MA, Seregina EA, Dashkevich NM, Poletaev AV, Pyregov AV, Sukhih GT, Serebriyskiy II, Ataullakhanov FI. The laboratory control of anticoagulant thromboprophylaxis during the early postpartum period after cesarean delivery. *J Perinat Med*. 25 avr 2018;46(3):251-60.
240. Seregina EA, Nikulina OF, Tsvetaeva NV, Rodionova MN, Gribkova IV, Orel EB, Zapariy AP, Erasov AV, Balandina AN, Ananyeva NM, Ataullakhanov FI. Laboratory tests for coagulation system monitoring in a patient with β -thalassemia. *Int J Hematol*. 2014;99(5):588-96.
241. Bertaggia Calderara D, Aliotta A, Zermatten MG, Kröll D, Stirnimann G, Alberio L. Hypercoagulability in obese patients accurately identified by combinations of global coagulation assay parameters. *Thromb Res*. 2020;187:91-102.
242. Soshitova NP, Karamzin SS, Balandina AN, Fadeeva OA, Kretchetova AV, Galstian GM, Pantelev MA, Ataullakhanov FI. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. sept 2012;23(6):498-507.
243. Mann KG. Thrombin formation. *Chest*. sept 2003;124(3 Suppl):4S-10S.

244. Kubitzka D, Becka M, Roth A, Mueck W. Dose-escalation study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in healthy elderly subjects. *Curr Med Res Opin.* oct 2008;24(10):2757-65.
245. Upreti VV, Wang J, Barrett YC, Byon W, Boyd RA, Pursley J, LaCreta FP, Frost CE. Effect of extremes of body weight on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of apixaban in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* déc 2013;76(6):908-16.
246. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* janv 2004;75(1):13-33.
247. Lin JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev.* 21 janv 2003;55(1):53-81.
248. Moreau C, Pautas E, Duverlie C, Berndt C, Andro M, Mahé I, Emmerich J, Lacut K, Le Gal G, Peyron I, Gouin-Thibault I, Golmard J-L, Lorient M-A, Siguret V. A model predicting fluidione dose requirement in elderly inpatients including genotypes, body weight, and amiodarone. *Thromb Haemost.* 1 avr 2014;111(4):705-12.
249. Raymond J, Imbert L, Cousin T, Duflot T, Varin R, Wils J, Lamoureux F. Pharmacogenetics of Direct Oral Anticoagulants: A Systematic Review. *J Pers Med.* 11 janv 2021;11(1).
250. Sychev D, Minnigulov R, Bochkov P, Ryzhikova K, Yudina I, Lychagin A, Morozova T. Effect of CYP3A4, CYP3A5, ABCB1 Gene Polymorphisms on Rivaroxaban Pharmacokinetics in Patients Undergoing Total Hip and Knee Replacement Surgery. *High Blood Press Cardiovasc Prev Off J Ital Soc Hypertens.* oct 2019;26(5):413-20.
251. Ueshima S, Hira D, Fujii R, Kimura Y, Tomitsuka C, Yamane T, Tabuchi Y, Ozawa T, Itoh H, Horie M, Terada T, Katsura T. Impact of ABCB1, ABCG2, and CYP3A5 polymorphisms on plasma trough concentrations of apixaban in Japanese patients with atrial fibrillation. *Pharmacogenet Genomics.* sept 2017;27(9):329-36.
252. Mueck W, Kubitzka D, Becka M. Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* sept 2013;76(3):455-66.
253. Ueshima S, Hira D, Kimura Y, Fujii R, Tomitsuka C, Yamane T, Tabuchi Y, Ozawa T, Itoh H, Ohno S, Horie M, Terada T, Katsura T. Population pharmacokinetics and pharmacogenomics of apixaban in Japanese adult patients with atrial fibrillation. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(6):1301-12.
254. Service de Pharmacologie et Toxicologie cliniques, Hôpitaux Universitaires de Genève. Interactions médicamenteuses, cytochromes P450 et P-glycoprotéine (Pgp). [Internet]. [cité 5 nov 2020]. Disponible à: https://www.hug.ch/sites/interhug/files/structures/pharmacologie_et_toxicologie_cliniques/a5_cytochromes_6_2.pdf
255. PharmGKB [Internet]. PharmGKB. [cité 22 janv 2021]. Disponible à: <https://www.pharmgkb.org/>
256. Sharma M, Cornelius VR, Patel JP, Davies JG, Molokhia M. Efficacy and Harms of Direct Oral Anticoagulants in the Elderly for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation and Secondary Prevention of Venous Thromboembolism: Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation.* 21 juill 2015;132(3):194-204.
257. Sardar P, Chatterjee S, Chaudhari S, Lip GYH. New oral anticoagulants in elderly adults: evidence from a meta-analysis of randomized trials. *J Am Geriatr Soc.* mai 2014;62(5):857-64.
258. Schulman S, Kearon C, Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *J Thromb Haemost JTH.* avr 2005;3(4):692-4.
259. Pautas E, Moreau C, Gouin-Thibault I, Golmard J-L, Mahé I, Legendre C, Taillandier-Hérique E, Durand-Gasselien B, Houllier A-M, Verrier P, Beaune P, Lorient M-A, Siguret V. Genetic factors (VKORC1, CYP2C9, EPHX1, and CYP4F2) are predictor variables for warfarin response in very elderly, frail inpatients. *Clin Pharmacol Ther.* janv 2010;87(1):57-64.

260. Hanon O, Vidal J-S, Pisica-Donose G, Orvoën G, David J-P, Chaussade E, Caillard L, de Jong LW, Bouulloche N, Vinsonneau U, Bouée S, Krolak-Salmon P, Fauchier L, Jouanny P, Sacco G, Bellarbre F, Belmin J, Puisieux F, Lilamand M, Paillaud E, Boureau AS, SAFIR study group. Bleeding risk with rivaroxaban compared with vitamin K antagonists in patients aged 80 years or older with atrial fibrillation. *Heart Br Card Soc.* 1 déc 2020;2020(0):1-7.
261. Mueck W, Eriksson BI, Bauer KA, Borris L, Dahl OE, Fisher WD, Gent M, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, Kålebo P, Kwong LM, Misselwitz F, Turpie AGG. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct factor Xa inhibitor--in patients undergoing major orthopaedic surgery. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(3):203-16.
262. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, Regnault V, Spronk H, Baglin T, Lecompte T, Ten Cate H, Negrier C. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thromb Res.* déc 2012;130(6):929-34.
263. Perrin J, Depasse F, Lecompte T, French-speaking CAT group and under the aegis of GEHT, French-speaking CAT group (all in France unless otherwise stated):, French-speaking CAT group all in France unless otherwise stated. Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thromb Res.* juill 2015;136(1):125-30.
264. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegemund T, Baglin T, Hogwood J, Regnault V, Siegemund A, Negrier C. Standardisation of thrombin generation test--which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res.* avr 2010;125(4):353-6.
265. Rigano J, Ng C, Nandurkar H, Ho P. Thrombin generation estimates the anticoagulation effect of direct oral anticoagulants with significant interindividual variability observed. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* mars 2018;29(2):148-54.
266. Talon L, Sinegre T, Lecompte T, Pereira B, Massoulié S, Abergel A, Lebreton A. Hypercoagulability (thrombin generation) in patients with cirrhosis is detected with ST-Genesia. *J Thromb Haemost JTH.* 17 juin 2020;18(9):2177-90.
267. Dashkevich NM, Vuimo TA, Ovsepyan RA, Surov SS, Soshitova NP, Panteleev MA, Ataulakhanov FI, Negrier C. Effect of pre-analytical conditions on the thrombodynamics assay. *Thromb Res.* mars 2014;133(3):472-6.
268. Wagenvoord RJ, Deinum J, Elg M, Hemker HC. The paradoxical stimulation by a reversible thrombin inhibitor of thrombin generation in plasma measured with thrombinography is caused by alpha-macroglobulin-thrombin. *J Thromb Haemost JTH.* juin 2010;8(6):1281-9.
269. Perzborn E, Heitmeier S, Buetehorn U, Laux V. Direct thrombin inhibitors, but not the direct factor Xa inhibitor rivaroxaban, increase tissue factor-induced hypercoagulability in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2014;12(7):1054-65.
270. Gribkova IV, Lipets EN, Rekhina IG, Bernakevich AI, Ayushev DB, Ovsepyan RA, Ataulakhanov FI, Sinauridze EI. The modification of the thrombin generation test for the clinical assessment of dabigatran etexilate efficiency. *Sci Rep.* 5 juill 2016;6:29242.
271. Gribkova IV, Lipets EN, Rekhina IG, Bernakevich AI, Ayushev DB, Ovsepyan RA, Ataulakhanov FI, Sinauridze EI. The modification of the thrombin generation test for the clinical assessment of dabigatran etexilate efficiency. *Sci Rep.* 5 juill 2016;6:29242.
272. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost.* mai 2006;95(5):772-5.
273. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran, in Humans. *Drug Metab Dispos.* févr 2008;36(2):386-99.
274. Giustozzi M, Agnelli G, Del Toro-Cervera J, Klok FA, Rosovsky RP, Martin A-C, Herold J, Tzoran I, Szmit S, Bertolotti L, Becattini C, Huisman MV. Direct Oral Anticoagulants for the Treatment of Acute Venous Thromboembolism Associated with Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thromb Haemost.* juill 2020;120(7):1128-36.

275. Patti G, Lucerna M, Pecen L, Siller-Matula JM, Cavallari I, Kirchhof P, De Caterina R. Thromboembolic Risk, Bleeding Outcomes and Effect of Different Antithrombotic Strategies in Very Elderly Patients With Atrial Fibrillation: A Sub-Analysis From the PREFER in AF (*P*REvention o *F*Thromboembolic Events– *E*uropean *R*egistry in *A*trial *F*ibrillation). *J Am Heart Assoc* [Internet]. juill 2017 [cité 18 août 2020];6(7). Disponible à: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.117.005657>
276. Proietti M, Romanazzi I, Romiti GF, Farcomeni A, Lip GYH. Real-World Use of Apixaban for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2018;49(1):98-106.
277. Piccini JP, Hellkamp AS, Washam JB, Becker RC, Breithardt G, Berkowitz SD, Halperin JL, Hankey GJ, Hacke W, Mahaffey KW, Nessel CC, Singer DE, Fox KAA, Patel MR. Polypharmacy and the Efficacy and Safety of Rivaroxaban Versus Warfarin in the Prevention of Stroke in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Circulation*. 26 janv 2016;133(4):352-60.
278. Lefrère B, Stepanian A, Charles P, Foulon-Pinto G, Béranger N, Alhenc-Gelas M, Drouet L, Siguret V. Multifactorial hypercoagulable state associated with a thrombotic phenotype in phosphomannomutase-2 congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG): Case report and brief review of the literature. *Thromb Res*. juin 2019;178:75-8.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	9
PARTIE I – FIBRILLATION ATRIALE, ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS ET ÉTUDE ADAGE.....	11
I. LA FIBRILLATION ATRIALE, PATHOLOGIE DU SUJET ÂGÉ.....	11
I.1. <i>Qui sont les sujets âgés ?</i>	11
I.1.1. Espérance de vie.....	11
I.1.2. Vieillesse et fragilité.....	12
I.1.3. Polypathologie du sujet âgé.....	12
Évaluer la polypathologie : le score CIRS-G.....	13
La polymédication.....	13
I.2. <i>La fibrillation atriale</i>	14
I.2.1. Définition.....	14
I.2.2. Physiopathologie.....	15
Contraction cardiaque et rythme sinusal.....	15
Mécanismes de la fibrillation atriale.....	16
I.3. <i>Fibrillation atriale, et accident vasculaire cérébral ischémique</i>	16
I.4. <i>Données épidémiologiques</i>	17
I.4.1. Prévalence de la fibrillation atriale.....	17
I.4.2. Incidence.....	18
I.4.3. Scores cliniques utilisés dans la fibrillation atriale.....	18
Évaluation du risque thrombotique.....	18
Évaluation du risque hémorragique.....	19
I.5. <i>La fibrillation atriale : conclusion</i>	20
II. PHYSIOLOGIE DE L'HÉMOSTASE.....	20
II.1. <i>L'hémostase : définition</i>	20
II.2. <i>L'hémostase primaire</i>	20
II.2.1. La paroi vasculaire.....	21
II.2.2. Le facteur Willebrand.....	21
II.2.3. Les plaquettes.....	21
II.2.4. Formation du clou plaquettaire.....	21
II.3. <i>Les facteurs de la coagulation</i>	22
II.3.1. Nomenclature.....	22
II.3.2. Protéines vitamine K dépendantes impliquées dans la coagulation.....	22
II.3.3. Le fibrinogène.....	23
II.4. <i>La thrombine, enzyme centrale de la coagulation</i>	23
II.4.1. La thrombine, une sérine-protéase de la coagulation.....	23
II.4.2. Générer de la thrombine : la clé de la coagulation.....	23
La voie du facteur tissulaire.....	24
La voie des facteurs contacts.....	24
Le complexe prothrombinase.....	25
II.5. <i>Inhibiteurs physiologiques de la coagulation</i>	26
II.5.1. Antithrombine.....	26
II.5.2. Protéine C, protéine S et thrombomoduline.....	26
II.5.3. L'α-2-macroglobuline.....	27
II.6. <i>La fibrinolyse</i>	27
II.6.1. Formation de la plasmine.....	27
II.6.2. Action de la plasmine.....	27
II.6.3. Mécanismes de régulation.....	28
L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène.....	28
L'α-2-antiplasmine.....	28
II.7. <i>L'hémostase : conclusion</i>	28
III. LES ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS.....	29
III.1. <i>Développement des AOD : un bref historique</i>	30
III.1.1. L'âge d'or des AVK.....	30
Les premiers antithrombotiques dans la fibrillation atriale.....	30
Particularités d'emploi des AVK.....	30

III.1.2. Mélagatran et ximélagatran : débuts difficiles pour les AOD	31
III.2. Rivaroxaban et apixaban	31
III.2.1. Mécanisme d'action commun	31
III.2.2. Relation structure-activité du rivaroxaban.....	31
III.2.3. Profil pharmacocinétique du rivaroxaban.....	34
III.2.4. Relation structure-activité de l'apixaban.....	34
III.2.5. Profil pharmacocinétique de l'apixaban.....	35
III.3. Dabigatran.....	36
III.3.1. Mécanisme d'action	36
III.3.2. Relation structure-activité.....	36
III.3.3. Profil pharmacocinétique du dabigatran	37
III.4. Utilisation des AOD dans la prévention du risque thromboembolique au cours de la fibrillation atriale	38
III.4.1. Anticoagulants oraux directs <i>versus</i> warfarine.....	38
III.4.2. Études de phase IV et registres : données en vie réelle dans la fibrillation atriale.....	41
III.4.3. Recommandations européennes.....	45
Recommandations de la Société européenne de cardiologie.....	45
En France, que recommande la Haute Autorité de santé ?.....	46
III.4.4. Schémas posologiques.....	46
III.5. Les AOD : conclusion	47
IV. ÉTUDE ADAGE ET OBJECTIFS DE MA THÈSE	48
IV.1. Rationnel de l'étude ADAGE	48
IV.2. Objectifs de l'étude ADAGE.....	49
IV.3. Objectifs de ce travail de thèse.....	50
IV.3.1. Pharmacocinétique	50
IV.3.2. Pharmacodynamie	50
IV.3.3. Suivi clinique des patients traités par xaban.....	51
V. DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE ADAGE.....	51
V.1. Centres participants.....	51
V.2. Recrutement de patients dans l'étude	51
V.2.1. Critères d'inclusion	51
V.2.2. Critères d'exclusion	52
V.3. Recueil des données des patients.....	52
V.3.1. Données recueillies à l'inclusion.....	52
V.3.2. Réalisation du suivi clinique	52
V.4. Prélèvements sanguins.....	53
V.4.1. Plan de prélèvements	53
V.4.2. Traitement pré-analytique des échantillons.....	54
V.5. Calcul des effectifs de l'étude ADAGE par groupe	54
V.6. Mon rôle dans l'étude ADAGE.....	55
VI. LA COHORTE ADAGE : UNE COHORTE DE PATIENTS GÉRIATRIQUES	56
VI.1. Description de la cohorte	56
VI.1.1. Caractéristiques démographiques.....	57
VI.1.2. Caractéristiques cliniques.....	57
Présentation clinique de la fibrillation atriale.....	57
Polypathologie dans la cohorte ADAGE	57
VI.1.3. Caractéristiques biologiques	57
Fonction rénale	57
Fonction hépatique.....	58
Marqueurs de l'inflammation	58
Hémogramme.....	58
VI.1.4. Caractéristiques thérapeutiques.....	58
AOD et posologies	58
Patients traités par rivaroxaban.....	59
Patients traités par apixaban.....	59
Polymédication dans la cohorte ADAGE	59
VI.2. Description des échantillons prélevés	60
VII. CONCLUSION	60
PARTIE II – PROFILS PHARMACOCINÉTIQUES DES AOD CHEZ LES PATIENTS D'ADAGE.....	62
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS	62

II. MÉTHODES DE MESURE SPÉCIFIQUE DES CONCENTRATIONS D'AOD.....	69
II.1. CLHP-MS/MS : méthode de référence	69
II.1.1. Principe.....	69
II.1.2. Utilisation pour la mesure des concentrations en AOD.....	69
II.2. Analyse pharmacocinétique des prélèvements ADAGE : mesure des activités anti-Xa et anti-IIa.....	69
II.2.1. L'activité anti-Xa : une méthode chromogénique	70
II.2.2. L'activité anti-IIa : méthode chromométrique.....	70
III. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU RIVAROXABAN.....	71
III.1. Description générale des résultats.....	71
III.2. Concentrations moyennes en rivaroxaban chez les patients ADAGE.....	73
IV. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DE L'APIXABAN	73
IV.1. Description générale des résultats	73
IV.2. Concentrations moyennes en apixaban chez les patients ADAGE.....	74
V. ÉTUDE DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU DABIGATRAN.....	76
V.1. Description générale des résultats.....	76
V.2. Concentrations moyennes en dabigatran chez les patients ADAGE	76
VI. CONCLUSION.....	77
PARTIE III – PHARMACODYNAMIE DES AOD ET GÉNÉRATION DE THROMBINE... 78	
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS	78
II. LIMITES DES EXAMENS SEMI-GLOBAUX DE COAGULATION POUR ÉVALUER L'EFFET DES AOD	79
II.1. Examens semi-globaux en hémostase	79
II.1.1. Le TP et l'INR.....	79
II.1.2. Le TCA.....	83
II.1.3. Le Temps de thrombine (TT).....	83
II.2. Limites des examens semi-globaux chez les patients traités par AOD.....	83
III. MESURE DE LA GÉNÉRATION DE THROMBINE : UN BREF HISTORIQUE	83
III.1. Première moitié du XX ^e siècle : les balbutiements de l'étude de la génération de thrombine.....	83
III.2. Les années 50 : premières applications en pathologie	84
III.3. De Paris à Maastricht : la mise au point du système CAT.....	85
IV. LA GÉNÉRATION DE THROMBINE EN PRATIQUE : LE THROMBOGRAMME	89
IV.1. Paramètres principaux.....	89
IV.2. Autres paramètres mesurés	90
V. GÉNÉRATION DE THROMBINE AVEC LE SYSTÈME ST-GENESIA®.....	91
V.1. Présentation du système.....	91
V.1.1. Appareillage.....	91
V.1.2. Principe analytique	92
V.1.3. La calibration.....	92
V.1.4. Réactifs	93
V.1.5. Contrôles de qualité	93
V.1.6. Paramètres mesurés.....	94
V.2. Performances du système.....	94
V.2.1. Répétabilité.....	96
V.2.2. Reproductibilité.....	96
V.2.3. Justesse.....	98
V.3. TGT et xabans : étude <i>in vitro</i>	103
V.3.1. Influence de la concentration en facteur tissulaire sur la génération de thrombine <i>in vitro</i> ..	103
V.3.2. Réalisation de la gamme	104
V.3.3. Effet des AOD sur la génération de thrombine <i>in vitro</i>	104
V.4. Comparaison au système CAT.....	106
V.4.1. Plasmas de volontaires sains étudiés	106
V.4.2. Comparaison des deux méthodes.....	107
V.5. Le ST-GENESIA : conclusions	109
VI. GÉNÉRATION DE THROMBINE AVEC LE SYSTÈME THROMBODYNAMICS®	110
VI.1. Présentation du système	110
VI.1.1. Appareillage.....	110
VI.1.2. Principe de mesure	111

VI.1.3. Protocole d'utilisation	111
VI.1.4. Paramètres de génération de thrombine.....	112
VI.1.5. Propagation de la thrombine.....	113
VI.1.6. Paramètres de fibrinographie	114
VI.2. Performances du système Thrombodynamics-4D.....	114
VI.2.1. Essai de reproductibilité	114
VI.2.2. Détermination des intervalles de référence	115
VI.2.3. Étude <i>in vitro</i> : effet des AOD sur les paramètres de thrombinographie.....	115
VI.2.4. Étude <i>in vitro</i> : effet des AOD sur les paramètres de fibrinographie	118
VI.3. Le système Thrombodynamics-4D : conclusions.....	118
VII. ÉTUDE DE LA PHARMACODYNAMIE DES AOD PAR THROMBINOGRAPHIE ET FIBRINOGRAPHIE.....	122
VII.1. Description du sous-groupe étudié	122
VII.1.1. Caractéristiques des patients	122
VII.1.2. Prélèvements analysés	122
VII.1.3. Données pharmacocinétiques dans le sous-groupe	122
VII.2. Effet des xabans sur la thrombinographie en fonction des concentrations plasmatiques chez les patients ADAGE.....	123
VII.2.1. Temps de latence (LT et Lag_ATG)	123
VII.2.2. Temps au pic (TTP et Tmax_ATG)	123
VII.2.3. Hauteur de pic (PH et Cmax_ATG)	123
VII.2.4. Potentiel endogène de thrombine (ETP et ETP_ATG)	125
VII.2.5. Variabilité pharmacodynamique	125
VII.3. Effet des xabans sur la fibrinographie en fonction des concentrations plasmatiques chez les sujets âgés	132
VII.4. Effet du dabigatran sur la thrombinographie et la fibrinographie en fonction des concentrations plasmatiques chez les patients ADAGE	135
VII.4.1. Paramètres de thrombinographie.....	135
VII.4.2. Paramètres de fibrinographie.....	135
VIII. CONCLUSION.....	138
PARTIE IV — FACTEURS DE VARIABILITÉ DE LA RÉPONSE AUX XABANS	141
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS	141
II. FACTEURS DÉMOGRAPHIQUES, CLINICO-BIOLOGIQUES, THÉRAPEUTIQUES ET PHARMACOGÉNÉTIQUES : DONNÉES DE LA LITTÉRATURE	144
II.1. Effet de l'âge, du poids et de la fonction rénale sur la pharmacocinétique du rivaroxaban	144
II.2. Effet de l'âge, du poids et de la fonction rénale sur la pharmacocinétique de l'apixaban	145
III. FACTEURS THÉRAPEUTIQUES ET PHARMACOGÉNÉTIQUES	145
III.1. La glycoprotéine P.....	145
III.2. Les cytochromes P450	147
III.3. Principaux médicaments modulateurs de P-gp ou CYP.....	148
III.4. Génotypage des variants moléculaires des patients ADAGE	149
III.4.1. Extraction d'ADN.	149
III.4.2. Génotypage par discrimination allélique	150
Protocole.....	150
Principe.....	150
III.5. Profils thérapeutiques et génétiques observés chez les patients ADAGE	151
III.5.1. Interactions médicamenteuses potentielles chez les patients ADAGE	151
III.5.2. Profils génétiques dans la cohorte	151
IV. ANALYSE STATISTIQUE.....	152
V. FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE AU RIVAROXABAN.....	153
V.1. Variabilité pharmacocinétique	153
V.2. Variabilité pharmacodynamique.....	154
V.2.1. Hauteur de pic.....	154
V.2.2. ETP	155
VI. FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE À L'APIXABAN.....	159
VI.1. Variabilité pharmacocinétique	159
VI.2. Variabilité pharmacodynamique.....	159

VI.2.1. Hauteur de pic	159
VI.2.2. Potentiel endogène de thrombine.....	160
VII. CONCLUSION	164
PARTIE V – SUIVI CLINIQUE DES PATIENTS ADAGE	165
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS	165
II. SUIVI CLINIQUE DES PATIENTS ADAGE TRAITÉS PAR XABANS.....	165
II.1. Méthodes.....	165
II.1.1. Réalisation du suivi	165
II.1.2. Informations issues de l'entretien.....	166
II.1.3. Analyse statistique	166
II.2. Patients suivis	167
III. ÉVÉNEMENTS HÉMORRAGIQUES	167
III.1. Événements hémorragiques sous rivaroxaban	168
III.1.1. Saignements majeurs sous rivaroxaban	168
III.1.2. Saignements non majeurs sous rivaroxaban	169
III.2. Événements hémorragiques sous apixaban.....	169
III.2.1. Saignements majeurs sous apixaban.....	170
III.2.2. Saignements non majeurs cliniquement pertinents sous apixaban	171
III.2.3. Saignements mineurs sous apixaban.....	171
III.3. Influence potentielle des caractéristiques des patients sur les saignements.....	171
IV. COMPLICATIONS THROMBOTIQUES	174
IV.1. Événement thrombotique sous rivaroxaban	174
IV.2. Événements thrombotiques sous apixaban.....	174
V. DÉCÈS TOUTES CAUSES CONFONDUES	177
VI. CONCLUSION.....	178
DISCUSSION.....	179
Spécificités de la cohorte ADAGE.....	179
Profils pharmacocinétiques des patients ADAGE	180
Performances des méthodes pour évaluer la pharmacodynamie des xabans	184
Paramètres de la génération de thrombine chez les patients ADAGE traités par xabans	187
Paramètres de la génération de thrombine chez les patients ADAGE traités par dabigatran	188
Variabilité de la réponse pharmacodynamique chez les patients ADAGE et hypercoagulabilité	189
Influence des facteurs individuels sur les paramètres de génération de thrombine	190
Suivi clinique des patients ADAGE traités par xaban	191
Limites de l'étude.....	193
CONCLUSION.....	195
ANNEXES	197
BIBLIOGRAPHIE.....	219
TABLE DES MATIÈRES.....	237
TABLE DES ILLUSTRATIONS	243

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : INFLUX ELECTRIQUE ET CONTRACTION CARDIAQUE.	16
FIGURE 2 : MECANISMES DE LA FIBRILLATION ATRIALE.	17
FIGURE 3 : SCHEMA SIMPLIFIE DES MECANISMES DE LA COAGULATION.	25
FIGURE 4 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA FIBRINOLYSE.	28
FIGURE 5 : CHRONOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DES AOD.	32
FIGURE 6 : STRUCTURE DU RIVAROXABAN.	33
FIGURE 7 : INTERACTIONS ENTRE LE RIVAROXABAN ET LE FXA.	33
FIGURE 8 : STRUCTURE DE L'APIXABAN.	35
FIGURE 9 : INTERACTIONS ENTRE L'APIXABAN ET LE FACTEUR XA.	36
FIGURE 10 : STRUCTURE DU DABIGATRAN.	37
FIGURE 11 : INTERACTIONS ENTRE LE DABIGATRAN ET LA THROMBINE.	37
FIGURE 12 : RISQUE DE SAIGNEMENT MAJEUR AVEC LES AOD COMPARE A LA WARFARINE.	45
FIGURE 13 : PLAN DE PRELEVEMENT PROPOSE POUR L'ETUDE ADAGE.	54
FIGURE 14 : CONCENTRATIONS EN RIVAROXABAN EN FONCTION DU TEMPS ECOULE APRES LA PRISE.	71
FIGURE 15 : ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN RIVAROXABAN COMPAREE A CELLE DES ESSAIS CLINIQUES.	72
FIGURE 16 : CONCENTRATIONS EN APIXABAN EN FONCTION DU TEMPS ECOULE APRES LA PRISE.	74
FIGURE 17 : ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN APIXABAN COMPAREE AUX DONNEES DU RCP.	75
FIGURE 18 : CONCENTRATIONS EN DABIGATRAN EN FONCTION DU TEMPS ECOULE APRES LA PRISE.	76
FIGURE 19 : PREMICES DE LA GENERATION DE THROMBINE.	85
FIGURE 20 : CAHIER DE PAILLASSE DE S. BEGUIN, 1980.	86
FIGURE 21 : FLUORESCENCE EMISE EN FONCTION DU TEMPS.	87
FIGURE 22 : EXEMPLES DE SUBSTRATS UTILISES POUR LA GENERATION DE THROMBINE.	88
FIGURE 23 : MESURE DE LA GENERATION DE THROMBINE EN FLUORESCENCE.	89
FIGURE 24 : THROMBOGRAMME ET PARAMETRES DE GENERATION DE THROMBINE.	90
FIGURE 25 : EXEMPLES DE RESULTATS DE GENERATION DE THROMBINE OBTENUS AVEC LE ST-GENESIA.	95
FIGURE 26 : CARACTERISATION DES PLASMAS COMMERCIAUX UTILISES.	99
FIGURE 27 : INFLUENCE DE LA QUANTITE DE FACTEUR TISSULAIRE SUR LA GENERATION DE THROMBINE.	103
FIGURE 28 : EFFET DES XABANS SUR LA GENERATION DE THROMBINE <i>IN VITRO</i>	105
FIGURE 29 : EFFET DES XABANS SUR LES PARAMETRES DE GENERATION DE THROMBINE <i>IN VITRO</i> (ST-GENESIA). ...	106
FIGURE 30 : EFFET COMPARE DU RIVAROXABAN SUR LES PARAMETRES DE GENERATION DE THROMBINE MESURES AVEC LES SYSTEMES CAT ET ST-GENESIA.	108
FIGURE 31 : SCHEMA DE L'APPAREILLAGE DU THROMBODYNAMICS-4D.	111
FIGURE 32 : PROTOCOLE SCHEMATISE D'UTILISATION DU THROMBODYNAMICS-4D.	112
FIGURE 33 : PARAMETRES DE PROPAGATION DE LA THROMBINE.	113
FIGURE 34 : DIFFRACTION DE LA LUMIERE ET FIBRINOGRAMME.	115
FIGURE 35 : EFFET DES AOD SUR LA GENERATION DE THROMBINE MESUREE <i>IN VITRO</i> SUR THROMBODYNAMICS-4D.	117
FIGURE 36 : EFFET DES AOD SUR LES PARAMETRES DE THROMBINOGRAPHIE <i>IN VITRO</i> (THROMBODYNAMICS-4D).	120
FIGURE 37 : EFFET DES AOD SUR LES PARAMETRES DE FIBRINOGRAPHIE <i>IN VITRO</i>	121
FIGURE 38 : TEMPS DE LATENCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN XABAN CHEZ LES PATIENTS ADAGE.	128
FIGURE 39 : TEMPS AU PIC EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN XABAN CHEZ LES SUJETS AGES.	129
FIGURE 40 : HAUTEUR DE PIC EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN XABAN CHEZ LES PATIENTS ADAGE.	130
FIGURE 41 : ETP EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN XABAN CHEZ LES PATIENTS ADAGE.	131
FIGURE 42 : MISE EN EVIDENCE DE L'ETAT D'HYPERCOAGULABILITE DU SUJET AGE.	132
FIGURE 43 : EFFET DES XABANS SUR LES PARAMETRES DE FIBRINOGRAPHIE CHEZ LES PATIENTS ADAGE.	134
FIGURE 44 : DENSITE DU CAILLOT EN FONCTION DU FIBRINOGENE CHEZ LES PATIENTS ADAGE.	135
FIGURE 45 : EFFET DU DABIGATRAN SUR LES PARAMETRES DE THROMBINOGRAPHIE CHEZ LES PATIENTS ADAGE. ...	136
FIGURE 46 : EFFET DU DABIGATRAN SUR LES PARAMETRES DE FIBRINOGRAPHIE CHEZ LES PATIENTS ADAGE.	137
FIGURE 47 : VARIABILITE PHARMACODYNAMIQUE DE LA REPONSE AU XABANS, ETUDIEE EN GENERATION DE THROMBINE.	143
FIGURE 48 : SUIVI CLINIQUE DANS LA COHORTE ADAGE.	167
FIGURE 49 : REPRESENTATION DE KAPLAN-MEIER DES EVENEMENTS HEMORRAGIQUES TOUTE GRAVITE CONFONDUE DANS LA COHORTE ADAGE CHEZ LES PATIENTS TRAITES PAR XABANS.	168
FIGURE 50 : DECES DANS LA COHORTE ADAGE, REPRESENTATION DE KAPLAN-MEIER.	177

