



Développement de tests de laboratoire pour le suivi de patients sous traitement anticoagulant

Cédric Amiral

► To cite this version:

Cédric Amiral. Développement de tests de laboratoire pour le suivi de patients sous traitement anticoagulant. Biotechnologies. 2020. hal-03150803

HAL Id: hal-03150803

<https://ephe.hal.science/hal-03150803>

Submitted on 24 Feb 2021

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 Pratique
des Hautes Études



**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE**

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

AMIRAL Cédric

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

**DEVELOPPEMENT DE TESTS DE LABORATOIRE POUR LE
SUIVI DE PATIENTS SOUS TRAITEMENT ANTICOAGULANT**

Soutenu le 28/09/2020

Devant le jury suivant :

Dr. NEILDEZ Thi-My Anh – Président

Dr. DUNOIS Claire - Tuteur scientifique

Dr. THENET Sophie - Tuteur pédagogique

Dr. MARTIN TOUTAIN Isabelle - Rapporteur

Dr. FAILLE Dorothée - Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. DUNOIS Claire (tutrice scientifique)

A HYPHEN-BioMed service Validation:

155, rue d'Eragny- 95000 NEUVILLE SUR OISE

Directrice : *Dr DUNOIS Claire*



et de

Dr THENET Sophie (tutrice pédagogique)

GRET Les cellules et leur environnement : dynamique des interactions (CEDi)

Centre de Recherche Saint-Antoine - Equipe Microbiote Intestin Inflammation

27, rue de Chaligny - 75012 PARIS

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu le laboratoire HYPHEN BioMed, dont la présidente est Mme Anne Marie Vissac, de m'avoir permis de reprendre ce cursus d'étude de l'EPHE tout en exerçant ma profession. Je remercie les membres du Jury le président Dr Neildez Thi-My Han, ma tutrice scientifique Dr Claire Dunois, ma tutrice pédagogique Dr Sophie Thenet, mon rapporteur Dr Martin Toutin Isabelle et mon examinatrice Dr Dorothée Faille.

Je remercie particulièrement le Dr Claire Dunois qui, par son enthousiasme et sa volonté de voir évoluer son personnel, m'a soutenu dans la reprise des études à l'EPHE. Le Dr Claire Dunois est aussi ma tutrice scientifique, je la remercie, en premier lieu de m'avoir accueilli dans son équipe Validation, mais aussi pour son aide et ses conseils dans tout mon cursus d'étude, ainsi que pour l'aide apportée dans la structure de mon mémoire. Merci aussi pour le temps qu'elle m'a accordé, après les horaires de travail habituelles.

Je remercie Dr Sophie Thenet, ma tutrice pédagogique, pour ses conseils avisés dans l'élaboration de mon mémoire. Je sais que la nature de mon travail de recherche appliquée dans l'industrie pharmaceutique est très différente de la recherche universitaire. Je remercie le Dr Sophie Thenet de m'avoir aidé à l'adapter au mieux au contexte de l'EPHE.

J'ai le plaisir de travailler avec des personnes consciencieuses et ayant une haute idée de l'esprit d'équipe et de l'esprit de camaraderie. Ces personnes savent aussi bien être dans la plaisanterie que dans la solidarité et le sérieux, et cela rend le travail plus léger et agréable. Je remercie pour cet état d'esprit mes collègues proches : Sophie, Jeyachelvi, Laure, Jean-Baptiste, Valérie, Anthony ainsi que nos encadrants Marie et Claire. Je remercie tout particulièrement Sophie pour sa gentillesse, son aide, ses encouragements et sa participation active dans certaines études que je présente. Je lui souhaite aussi toute la réussite possible dans la poursuite de ses propres études. J'ai pu bénéficier dans le cadre de mon travail, mais aussi des études qui ont mené à ce rapport, de l'aide de chacun des collègues cités, Jeyachelvi en relecture de résultats, Valérie, Simon en fabrication, Laure, Jean Baptiste, Anthony et Arnaud pour le contrôle des produits finalisés, Marie dans l'organisation ou la relecture de certains rapports. Merci à tous de votre contact sympathique, rendant le travail à HYPHEN BioMed très agréable.

Plus généralement, je remercie tout le personnel d'HYPHEN BioMed : Responsables, Techniciens, et Conditionneurs, qui m'ont aidé ou soutenu, et participé de près ou de loin à l'élaboration de mes projets.

Je remercie ma famille proche, ma femme Jonah et mes deux enfants Justin et Anaëlle, qui me soutiennent malgré mon manque de disponibilité dû à la rédaction du mémoire. Ma famille m'a donné la force d'aller jusqu'au bout de mes études. Je remercie mes parents, et particulièrement mon père, qui s'est montré très encourageant dans la poursuite de ces études et qui a aussi pu me donner ses conseils précieux, étant lui-même Docteur en sciences.

Reprendre des études tardivement n'est pas aisé et demande le contrôle de soi face à des situations quelquefois tendues, rendant parfois difficile la gestion du quotidien. Je pratique depuis près de 14 ans une méthode méditative de Qi-Qong basée sur 3 principes universels, Authenticité, Bonté, Patience, et venant de Chine. Je remercie les deux personnes qui m'ont introduit à la pratique du Falun Dafa au parc du Luxembourg : Giovanny et Elie qui sont devenus des amis, ainsi, que le Docteur en neurosciences : Alexis Génin, dont l'approche scientifique des méthodes méditatives m'a aidé à découvrir un nouveau champ de connaissance, à travers notamment des échanges sur les effets de la méditation et l'amélioration de la qualité et de la durée de la vie. Je termine par un petit mot pour quatre collègues avec qui j'ai l'habitude de courir et avec lesquels je participe à une course solidaire pour la recherche sur le cancer de la prostate, « les Bacchantes ». Merci pour ces moments agréables passés à s'entraîner Jeyachelvi, Sophie et plus occasionnellement Jean-Baptiste et Anthony.

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION.....	11
II	ETAT DE L'ART	12
1	Définition	12
2	L'Hémostase	14
2.1	Hémostase primaire	14
2.2	Hémostase secondaire (activation en cascade)	14
2.2.1	Coagulation <i>in vitro</i>	16
2.2.2	Coagulation <i>in vivo</i>	18
2.3	La régulation de la cascade de la coagulation	21
2.4	La Fibrinolyse.....	22
2.5	Les pathologies liées à l'hémostase.	23
2.6	Exploration de l'hémostase.....	24
2.6.1	Exploration Biologique : Tests de Laboratoires globaux	24
2.6.2	Exploration Biologique : Tests spécifiques.....	25
2.7	Les traitements disponibles	25
3	Les anticoagulants	26
3.1	Historique des Anticoagulants : Hirudine, Héparines et AVK.....	26
3.2	Les Héparines	28
3.2.1	Présentation des Héparines.....	28
3.2.2	Utilisation clinique des Héparines	28
3.3	Hirudine et analogues	29
3.4	La Bivalirudine	30
3.4.1	Présentation de la Bivalirudine	30
3.4.2	Utilisation clinique de la Bivalirudine.....	30
3.5	Anticoagulants oraux directs (AODs)	31
3.5.1	Présentation des AODs	31
3.5.2	Utilisation clinique des AODs.....	31
3.5.3	Intérêt du dosage des AODs	32
3.6	L'Edoxaban	33
3.6.1	Utilisation hospitalière et études cliniques.....	33
3.6.2	Impact des métabolites de l'Edoxaban sur l'activité anti Xa	33
3.7	Le Dabigatran	34
4	Dosage des anticoagulants	35
4.1	Historique du suivi des traitements anticoagulants.....	35
4.2	Suivi des patients sous AVKs	38
4.3	Evaluation du traitement avec test globaux : exemple du suivi des patients héparinés (ou hirudinés).....	38
4.4	Dosage LC:MS/MS	38
4.5	Dosages chromogènes/coagulants	39
4.5.1	Dosage des anti-Xa.....	39
4.5.2	Dosage des anti-IIa.....	40
4.6	Tests à usage unique	41
4.7	Les tests commerciaux utilisés pour le suivi des traitements	42
4.7.1	Les Tests fonctionnels d'HYPHEN BioMed	42
4.7.2	Les Tests fonctionnels des principaux concurrents	42
4.7.3	Les automates.....	43
5.	Objectifs du travail.....	48
III	MATERIELS ET METHODES	50
1	Mise au point et études des tests de dosages de l'Edoxaban et la Bivalirudine.....	50
1.1	Automates STAR et CS-5100 utilisés pour les mesures coagulantes et chromogènes dans les dosages.....	50
1.2	Dosage de l'Edoxaban	50
1.2.1	Les outils de dosage.....	50
1.2.2	Principe du test B. DiXal.....	50

1.2.3	Principe du test B. HLRT	51
1.2.4	Intérêt des deux coffrets.....	52
1.2.5	Préparation des étalons et contrôles Edoxaban et des plasmas enrichis en métabolites	53
1.3	Dosage de la Bivalirudine	55
1.3.1	Les outils de dosage.....	55
1.3.2	Test chromogène B. DTI.....	56
1.3.3	Test coagulant HTI	57
1.3.4	Préparation des étalons Bivalirudine et des plasmas de contrôle	58
1.4	Lyophilisation des étalons et contrôles Edoxaban et Bivalirudine, voir annexe 1.	59
1.5	Vérification des performances des méthodes de dosage de l'Edoxaban et de la Bivalirudine.....	60
1.5.1	Protocole de vérification des performances des méthodes	60
1.5.2	Test de la calibration	60
1.5.3	Test de la contamination inter-échantillon.....	60
1.5.4	Test de répétabilité	61
1.5.5	Test de linéarité	61
1.5.6	Interférences.....	62
1.5.6.1	Principe	62
1.5.6.2	Protocole	62
1.5.7	Reproductibilité de jour à jour	67
1.5.8	Limite de blanc (LdB), Limites de détection (LdD)	67
1.5.9	Comparaison de méthodes et d'automates	68
1.6	Etude spécifiques des métabolites de l'Edoxaban M4, M6 et M8	68
2	Amélioration des tests de dosage existants pour réduire les interférences liées aux anticoagulants.....	69
2.1	Amélioration du coffret B. DiXal pour supprimer l'interférence de l'Héparine dans le dosage des AODs. .	69
2.2	Neutralisation des AODs dans les plasmas de patients.	71
	Préparation des plasmas à traiter	72
2.3	Test des plasmas neutralisés.....	72
3	Test rapide de dosage du Dabigatran	72
3.1	Principe du test Dabigatran sur Bandelette	72
3.2	Interprétation du résultat du dispositif.....	76
4	Analyses statistiques.....	76
4.1	Validation des tests à l'aide des calculs de probabilité sur Excel	77
4.2	Logiciel Analyse It	77
4.3	Test statistique spécifique:	78
IV	RESULTATS.....	79
1	Dosage de l'Edoxaban avec deux méthodes chromogènes Anti-Xa (2-Temps et cinétique)	79
1.1	Le dosage in vitro de l'Edoxaban.....	79
1.2	Résultats des dosages	79
1.3	Comparaison des méthodes développées et la méthode référence LC:MS/MS pour le dosage de l'Edoxaban sur des échantillons cliniques	82
1.4	Etude de l'activité des métabolites de l'Edoxaban	84
1.4.1	Comparaison des kits B. DiXal et B. HLRT dans le dosage de l'activité de chaque métabolite de l'Edoxaban.....	84
1.4.2	Hypothèse sur les différences observées dans les dosages des métabolites	86
1.4.3	Rôle de l'origine humaine ou bovine du Facteur Xa dans les différences des dosages	86
1.4.4	Impact des métabolites sur les dosages B. HLRT et B. DiXal.....	87
2	Dosage de la Bivalirudine par méthodes chromogène et coagulante	87
2.1	Le dosage in vitro de la Bivalirudine.....	87
2.2	Résultats des dosages	88
2.3	Etude des interférences dans les dosages de Bivalirudine Résultats des dosages	89

2.4	Comparaison des méthodes développées pour le dosage de la Bivalirudine sur des échantillons cliniques	91
3	Amélioration des performances des tests existants pour les AODs	92
3.1	Neutralisation des AODs dans les plasmas de patients.	92
3.2	Elimination de l'interférence de l'Héparine dans le dosage des AODs anti-Xa avec le test B. DiXal.	93
3.2.1	Optimum de polybrène dans le tampon R3 du B. DiXal	94
3.2.2	Test du tampon R3 avec 50 µg/mL de polybrène dans le dosage des autres AODs anti-Xa.....	95
4	Dosage du Dabigatran en Test compétitif de filtration tangentielle sur bandelettes ..	97
4.1	Test de diffusion latérale sur bandelette	98
4.2	Test d'augmentation du temps de remise à température des bandelettes, avant utilisation	99
4.3	Evaluation du temps de migration dans le dosage d'une gamme plasmatique de Dabigatran	99
V	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	101
1	Les dosages de l'Edoxaban	102
1.1	Etude des tests mis au point	102
1.2	Test des métabolites de l'Edoxaban.....	103
1.2.1	Etude de la réactivité des métabolites en B. HLRT et B. DiXal.....	103
1.2.2	Impact des métabolites dans le dosage sur plasma des patients.....	104
1.3	Comparaison avec la méthode de référence LC:MS/MS.....	105
2	Les dosages de la Bivalirudine.....	106
2.1	Etude des tests mis au point HTI/STAR et B. DTI/CS	106
2.2	Etude des interférences avec les tests HTI/STAR et B. DTI/CS	107
2.3	Applications des dosages développés	107
3	Amélioration des tests de dosage des anticoagulants.....	108
3.1	Amélioration du test B. DiXal dans la neutralisation des inhibiteurs indirect du FXa.....	108
3.2	Pastilles de charbon actif adsorbant les AODs	108
4	Le dosage du Dabigatran en test rapide	109
VI	CONCLUSION	111

LISTE DES ABBREVIATIONS

AT:	Antithrombine (régulateur de la coagulation)
Adaptation :	Terme utilisé pour qualifier un protocole réactionnel adapté à un automate particulier.
AVK :	Antivitamine K (médicament diminuant l'activité des Facteurs de la coagulation vitamine K dépendants : II, VII, IX, X, PC, PS, PZ)
AVC :	Accident Vasculaire Cérébral
AOD :	Anticoagulant Oral Direct
B. DTI :	BIOPHEN™ DTI. Test chromogène dosant les inhibiteurs directs de la Thrombine
B. DIXal :	BIOPHEN™ DiXal. Test chromogène dosant les inhibiteurs directs du FXa
B. HLRT:	BIOPHEN™ Heparin LRT. Test chromogène (sous forme liquide) dosant les activités anti Xa par méthode cinétique : indirectes (Héparines : HNF, HBPM) et directes (Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban, Betrixaban)
BSA :	Albumine sérique d'origine bovine
CIVD:	Coagulation Intravasculaire Disséminée
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut des standards cliniques et laboratoires).
CV :	Coefficient de Variation
DO/min :	Densité Optique par minute
DTI :	Direct Thrombin Inhibitors (Inhibiteur direct de la Thrombine : Hirudine, Bivalirudine, Dabigatran).
DiXal :	Direct FXa Inhibitors (Inhibiteurs directs du Facteur Xa : Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban, Betrixaban)
DO :	Densité Optique
EP :	Embolie pulmonaire
ET :	Ecart Type
Four :	Fournisseur d'un produit biologique chimique ou d'un consommable.
FANV :	Fibrillation Auriculaire Non-Valvulaire.
FI à FXIII :	Facteurs (F) de la coagulation I à XIII : Facteurs intervenant dans la coagulation
FIIa à FXIIIa :	Facteurs précédents avec le préfixe a signifiant les formes activées.
FII :	Facteur II ou prothrombine.
FIIa :	Facteur IIa aussi appelé Thrombine (prothrombine activée)
FXa :	Facteur Xa de la coagulation (forme activée du Facteur X)
FT :	Facteur Tissulaire
HBPM :	Héparine de Bas Poids Moléculaire
HNF :	Héparine Non Fractionnée.
HTI :	HEMOCLLOT™ Thrombin Inhibitors. Test coagulant dosant les antithrombines Directs.
INR :	International Normalised Ratio (anglais) : Ratio normalisé calculé pour exprimer les résultats du test TP

KHPM :	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
LC:MS /MS :	Chromatographie Liquide- Spectrométrie de Masse
OAT :	Organic Anion Transporter : Terme anglais se traduisant en « Transporteur Biologique d'Anions » (membranaire).
OCT :	Organic Cation Transporter : Terme anglais se traduisant en « Transporteur Biologique d'Anions » (membranaire).
PC/PCa :	Protéine C/ Protéine C activée
PE :	Prise d'essai
pNA :	Para-Nitroaniline
TAC :	Thrombose associée au cancer
TC :	Temps de coagulation dans une réaction coagulante.
TFPI :	Tissue Factor Pathway Inhibitor (inhibiteur de la voie externe du Facteur tissulaire)
TVP :	Thromboses veineuses profondes
TP :	Taux ou Temps de prothrombine. Test de coagulation
TCA :	Temps de Céphaline activé. Test de coagulation
TT :	Temps de Thrombine. Test de coagulation

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation de la balance de l'hémostase.

Figure 2: Brèche vasculaire et différentes étapes de l'hémostase.

Figure 3: Schéma de la cascade de la coagulation *in vitro*

Figures 4, 5, 6: Schéma de la cascade de coagulation actualisé tel qu'intervenant *in vivo* (Hoffman et Monroe, 2001) (Hoffman, 2003).

Figure 4: Phase d'initiation de la cascade de coagulation.

Figure 5: Phase d'amplification de la cascade de coagulation.

Figure 6: Phase de propagation et de stabilisation de la cascade de coagulation.

Figure 7: Rôle clé de la Thrombine dans la coagulation et sa régulation

Figure 8: Schéma de la fibrinolyse

Figure 9: Schéma chronologique montrant la découverte et l'introduction des anticoagulants.

Figure 10: Mécanismes d'action de la Bivalirudine.

Figure 11: Liaison de l'Héparine à l'AT pour l'inhibition du FIIa et du FXa.

Figure 12: Voies métaboliques proposées pour l'Edoxaban

Figure 13: Le Dabigatran doit être métabolisé dans le plasma et le foie par une estérase pour être actif.

Figure 14: Action des anticoagulants sur la cascade de coagulation

Figure 15: Exemple d'automate de la gamme CS

Figure 16: Exemple de la mesure de la mesure cinétique de la DO avec l'automate CS.

Figure 17: Exemple de la mesure de la coagulation à l'aide de l'automate CS.

Figure 18: Coagulation sur automate STAR.

Figure 19: Principe réactionnel avec le coffret B. DiXal.

Figure 20: Principe réactionnel avec le coffret B. HLRT.

Figure 21: Représentation de l'Edoxaban purifié en solution.

Figure 22: Principe réactionnel avec le coffret B. DTI.

Figure 23: Principe réactionnel avec le coffret HTI.

Figure 24: Formule de la Bivalirudine. Moléculaire (A), en séquence d'acides aminés (B).

Figure 25: Interférence des molécules biologiques

Figure 26: Exemple de préparation des échantillons Bilirubine.

Figure 27: Exemple de préparation des échantillons Hémoglobine.

Figure 28: Exemple de préparation des échantillons Intralipides.

Figure 29: Test de migration latérale sur bandelette de nitro-cellulose pour le dosage du Dabigatran.

Figures 30, 31, 32, 33: Principe du test rapide de dosage du Dabigatran.

Figure 34: Représentation graphique des courbes de calibration de l'Edoxaban.

Figure 35: Comparaison du dosage de 125 patients par les deux méthodes B. HLRT (1 temps) et B. DiXal (2 temps) et LC:MS/MS

Figure 36: Activité des métabolites M4, M6 et M8 de l'Edoxaban.

Figure 37: Comparaison des dosages B. HLRT selon la nature du R2 FXa humain ou bovin

Figure 38: Courbes d'étalonnage pour le dosage de la Bivalirudine

Figure 39: Etude des interférences dans les dosages de Bivalirudine (interférents : Bilirubine, Hémoglobine, Lipides).

Figure 40: Etude des interférences dans les dosages (AODs anti-Xa et Héparine) dans les dosages de Bivalirudine.

Figure 41: Dosage de la Bivalirudine sur les plasmas.

Figure 42: Effet de l'absorbant « charbon actif » (inhibiteur des AODs) sur les tests de coagulation des plasmas contenant les AODs.

Figure 43: Neutralisation des Héparines dans le test B. DiXal en gamme basse par ajout progressif de polybrène dans le tampon du réactif .

Figure 44: Dosage des différents AODs avec le B. DiXal (gamme basse) avec ou sans polybrène dans le diluant.

Figure 45: Test de migration avec du sang total ou du plasma avec les bandelettes.

Figure 46: Test d' une gamme plasmatique de Dabigatran avec des bandelettes stockées à 2-8°C et remis 15 minutes à 20-25°C (A) ou stockées une nuit à 20-25°C (B).

Figure 47: Test de migration d'une gamme plasmatique de Dabigatran, après différents temps de migration, puis lecture de la coloration avec le logiciel NG-Biotech.

Figure 48 : Estimation de la contribution de chaque métabolite sur l'activité anti-Xa lors du métabolisme de l'Edoxaban dans le corps humain, après retraitement des résultats.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs de la coagulation activateurs.

Tableau 2 : Inhibiteurs de la coagulation.

Tableau 3 : Pharmacologie comparative des AODs.

Tableau 4 : Méthodes de dosage des Héparine et molécules anti-Xa dépendant de l'AT endogène

Tableau 5 : Méthodes de dosage des Héparines et anti-Xa directs, ne dépendant pas de l'AT.

Tableau 6 : Méthodes de dosage de la Lépirudine et dérivés et autres molécules anti-IIa.

Tableau 7 : Préparation des étalons Edoxaban. Les contrôles Edoxaban sont préparés de la même manière pour la gamme basse et standard à un jour différent et avec un pool de plasma différent.

Tableau 8 : Tableau de réalisation des solutions d'Héparine plasmatiques.

Tableau 9 : Tableau de préparation des solutions AODs dans les plasmas.

Tableau 10 : Tableau de réalisation des solutions de Bilirubine plasmatique.

Tableau 11 : Tableau de réalisation des solutions d'Hémoglobine plasmatique.

Tableau 12 : Tableau de réalisation des solutions d'Intralipides plasmatique.

Tableau 13 : Tableau de préparation du tampon R3 (B. DiXal) à diverses concentrations de polybrène.

Tableau 14 : Tableau de préparation des plasmas avec AOD-anti-Xa et Héparines.

Tableau 15 : Etude des performances des réactifs B. DiXal et B. HLRT dans le dosage de l'Edoxaban.

Tableau 16 : Etude des interférences aux substances biologiques et à l'anticoagulant Dabigatran et Héparines (HNF, HBPM).

Tableau 17 : Etude des performances des réactifs B. DTI sur CS et HTI sur STAR dans le dosage de la Bivalirudine.

Tableau 18 : Spécifications d'entrée pour le développement de migration latérale sur bandelettes.

Tableau 19 : Concentration moyenne en ng/mL à chaque temps de l'Edoxaban et ses métabolites, sur 6 patients, extrait des résultats de Bathala et al (Bathala et al. 2012).

I INTRODUCTION

Ce mémoire concerne le développement et la validation de méthodes de laboratoire pour doser les activités plasmatiques de certains anticoagulants, récemment introduits dans les hôpitaux et cliniques. Ces méthodes permettent d'adapter si nécessaire les thérapies utilisant ces nouvelles molécules, ainsi que de maîtriser le risque hémorragique dans certaines circonstances. Dans un premier temps, je présente l'hémostase et ses fonctions physiologiques, les méthodes de laboratoire courantes pour son exploration et enfin les divers traitements disponibles, en développant plus particulièrement le traitement ou la prévention des thromboses. Je présente ensuite les diverses approches thérapeutiques utilisées au cours du temps pour soigner les états thrombotiques, puis l'introduction contemporaine de nouveaux traitements, mis à la disposition de la médecine.

Enfin, les anticoagulants historiques ainsi que ces nouveaux traitements nécessitant un suivi particulier dans certains cas, diverses méthodes de dosage de leur activité dans le plasma des patients sont ensuite détaillées dans ce rapport. Je présente le rôle de l'entreprise HYPHEN BioMed, ainsi que celui de ses concurrents, dans leur contribution au suivi de patients traités, en présentant une partie des outils de diagnostic existant pour doser les anticoagulants.

A travers cette introduction, je présente l'objectif de mon travail, qui consiste en la mise au point de dosages particuliers pour l'Edoxaban et la Bivalirudine, leur validation et certaines applications pratiques. Je développe également l'amélioration de certains tests de dosage déjà commercialisés par HYPHEN BioMed, et permettant un meilleur suivi des patients.

Ensuite, et toujours en lien avec l'amélioration du suivi des patients, je présente un test rapide innovant pour le Dabigatran, activité que nous initions, avec mon équipe. Cette méthode concerne un nouveau procédé de dosage sur bandelette pour tester le Dabigatran, et pourrait être généralisée à d'autres anticoagulants directs.

II ETAT DE L'ART

1 Définition

L'hémostase concerne l'ensemble des mécanismes biochimiques et cellulaires qui assurent d'un côté la prévention des hémorragies, comme en cas de lésion vasculaire, et d'un autre côté préviennent et régulent la formation d'un caillot et sa dissolution.

L'hémostase est un processus localisé et rapide. Elle est souvent représentée comme une balance en état d'équilibre (**figure 1**). Toute rupture de l'équilibre fait pencher la balance soit vers un état thrombotique soit vers un état hémorragique.

Virchow en 1856 est le premier à avoir théorisé son mécanisme. Selon ce médecin pathologiste allemand, l'hémostase est un processus qui nécessite une étroite coopération entre la paroi des vaisseaux sanguins, les protéines plasmatiques, les Facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse et les cellules sanguines, en particulier les plaquettes (triade de VIRCHOW).

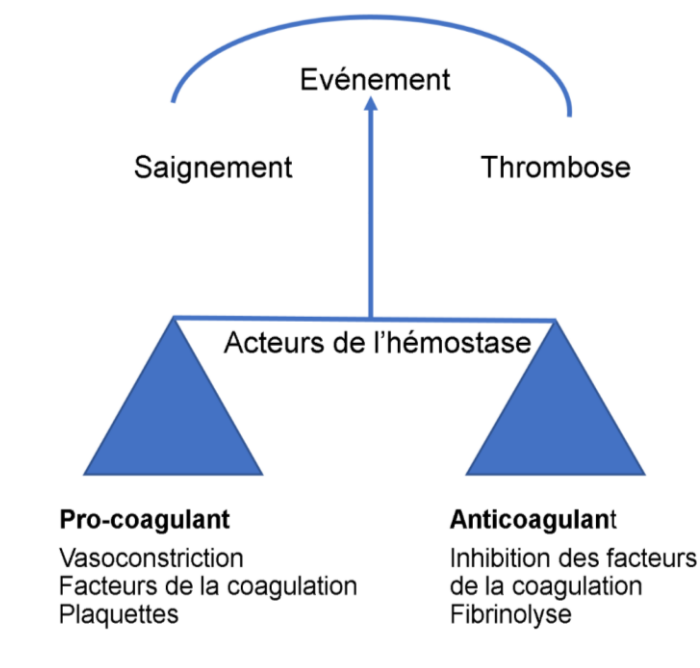


Figure 1 : Représentation de la balance de l'hémostase. La survenue d'un évènement, comme une brèche dans un vaisseau sanguin, va déclencher l'activation de l'hémostase (voies procoagulantes). La présence du caillot thrombotique intravasculaire déclenche en revanche la mise en œuvre des Facteurs anticoagulants.

Au fil des découvertes, la compréhension des mécanismes de l'hémostase a évolué et s'est enrichie. A l'heure actuelle elle est souvent décrite en trois étapes majeures (**figure 2**) :

- **L'hémostase primaire** concerne la réaction de vasoconstriction consécutive à la lésion vasculaire ou endothéliale, ainsi que l'activation et l'agrégation des plaquettes

- **L'hémostase secondaire, ou coagulation**, concerne une activation en cascade des Facteurs de la coagulation activés en enzymes, ce qui aboutit à la formation d'un réseau de Fibrine qui emprisonne les globules blancs et les globules rouges.
- **La fibrinolyse** permet au sang, après cicatrisation, de retrouver son état fluide au niveau du caillot formé pour colmater la brèche vasculaire, par dégradation de ce caillot sanguin de façon retardée.

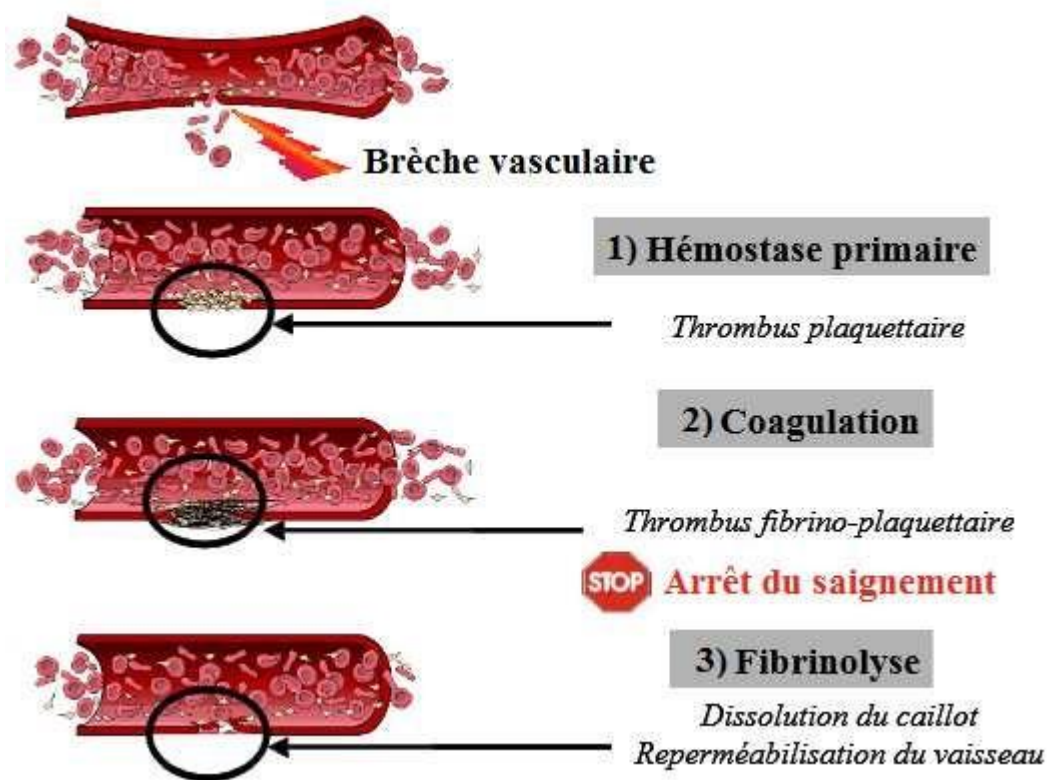


Figure 2 : Brèche vasculaire et différentes étapes de l'hémostase. (Brèche vasculaire http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/hemato05-hemostase_primaire.pdf).

Cette approche en différentes étapes permet de comprendre et d'analyser en profondeur l'hémostase. Dans la réalité physiologique, ces différents phénomènes sont concomitants et dépendent d'un subtil équilibre entre les différents Facteurs pro-coagulants ou anticoagulants.

Ces équilibres, qui assurent le maintien de l'intégrité de la fonction sanguine et sa fluidité dans les vaisseaux sanguins, peuvent être rompus dans certaines conditions. Des activations non physiologiques du sang peuvent alors survenir, aboutissant à la formation de caillots et à l'apparition de thromboses.

Pour prévenir le risque thrombotique, les médecins prescrivent des médicaments qui agissent directement sur la cascade de la coagulation, en réduisant son efficacité. Ces molécules sont des médicaments anticoagulants. Pour comprendre le mode d'action de ces traitements anticoagulants, il est nécessaire d'expliquer plus en détail le phénomène d'activation en cascade de la coagulation, ainsi que sa régulation.

2 L'Hémostase

2.1 Hémostase primaire

Le processus de l'hémostase peut être déclenché de manière normale par une lésion du vaisseau sanguin ; il peut aussi être déclenché de manière pathologique (plaques d'athéromes, cellules cancéreuses provenant de métastases) par une stimulation de la coagulation directe ou au niveau de l'endothélium altéré et capable de fixer les Facteurs de la coagulation et de les activer.

Dans des conditions normales, la présence d'une brèche vasculaire entraîne l'activation de l'hémostase. Tout d'abord il se produit une vasoconstriction qui diminue le diamètre des vaisseaux impactés, ce qui réduit la perte de sang. Il se forme ensuite un clou plaquettaire, qui se manifeste par l'agrégation et l'activation des plaquettes au niveau de cette brèche (Cunningham et al., 1965). La mise en place de ce clou hémostatique est facilitée par un facteur de la coagulation, le Facteur von Willebrand (vWF), qui potentialise la fixation des plaquettes au collagène sous-endothélial.

La figure 2 schématise le processus global de l'hémostase dont fait partie la coagulation; une activation en cascade des facteurs de la coagulation, ce qui aboutit à la formation d'un « réseau de Fibrine » qui emprisonne les cellules sanguines (caillot sanguin). Ce processus, appelé hémostase secondaire, ou activation de la cascade de coagulation, est décrit dans la suite de ce mémoire.

2.2 Hémostase secondaire (activation en cascade)

Les tableaux 1 et 2 présentent respectivement les facteurs de la coagulation, activateurs et inhibiteurs, ainsi que leurs fonctions.

Activateurs de la coagulation		
Numéro/ Abréviation	Nom	Fonction
FI	Fibrinogène	Après clivage par la thrombine, il polymérise et forme le réseau de Fibrine
FII	Prothrombine	Génère la thrombine, qui active FV, FVIII, FXI, FXIII, PC, Plaquettes, et coagule FI. Vitamine K dépendant.
FIII	Thromboplastine ou Facteur Tissulaire (FT)	Cofacteur du FVIIa, présent essentiellement dans les tissus extravasculaires
FIV	Calcium	Ion essentiel pour l'activité des Facteurs de la coagulation (fixation aux phospholipides)
FV	Pro-accélélerine	Cofacteur du FXa.
FVI ou FVa	Accélélerine, ancien nom du Facteur Va	Fait partie du complexe prothrombinase
FVII	Proconvertine	Lié au TF et activé en FVIIa, ce Facteur active FIX et FX. Vitamine K dépendant
FVIII	Facteur anti-hémophile A	Sous forme activée, cofacteur du FIXa
FIX	Facteur Christmas/ Facteur IX ou Facteur anti-hémophile B	La forme activée, FIXa, active FX. Vitamine K dépendant
FX	Facteur Stuart-Prower	Activé en FXa il active le FII en FIIa dans le complexe prothrombinase. Vitamine K dépendant
FXI	Facteur Rosenthal, Antécédent de la thromboplastine plasmatique	Activé en FXIa, il active FXII, FIX et Prékallikréine
FXII	Facteur Hageman	Activé en FXIIa il active la Prékallikréine
FXIII	Facteur de stabilisation de la Fibrine	Activé en FXIIIa il stabilise les polymères de Fibrine en introduisant des liaisons covalentes
vWF	Facteur von Willerbrand	Lie le FVIII, favorise l'adhésion des plaquettes dans le flux sanguin
PK	Prékallikréine ou Facteur Fletcher	Sa forme active, la Kallikréine, contribue à l'activation du FXII et clive le KHPM
KHPM	Kininogène de Haut Poids Moléculaire	Cofacteur pour l'activation de la phase contact impliquant le FXII, le FXI, et la Prékallikréine ; libère la bradykinine

Tableau 1 : Facteurs de la coagulation activateurs ; Première colonne : Numéro attribué ou abréviation
Deuxième colonne : Nom attribué Troisième colonne : Fonction dans la cascade de coagulation.

Inhibiteurs de la Coagulation		
Abréviation	Nom	Fonction
AT	Antithrombine (AT)	Inhibiteur de la Thrombine, FXa et FIXa
TM	Thrombomoduline	Cofacteur de la Thrombine dans l'activation de la protéine C (PC)
PC	Protéine C (PC)	Inhibe la coagulation en inactivant le FVIIIa et le FVa ; vitamine K dépendant
PS	Protéine S (PS)	Cofacteur de la protéine C ; vitamine K dépendant

Tableau 2 : Inhibiteurs de la coagulation ; Première colonne : abréviation**Deuxième colonne : Nom attribué Troisième colonne : Fonction dans la cascade de coagulation.**

2.2.1 Coagulation in vitro

Etudiée *in vitro*, la cascade de la coagulation fait intervenir 2 voies d'activation principales (voie intrinsèque et voie extrinsèque, se rejoignant au niveau du Facteur X et de son cofacteur le Facteur V (voie commune), **(figure 3)**).

La Voie intrinsèque, qui ne fait intervenir que des facteurs présents dans la circulation sanguine, est activée au niveau du sous endothélium, qui vient en contact avec le sang lors d'une brèche vasculaire. Elle est initiée par l'activation du FXII (Facteur Hageman) en FXIIa au contact de l'endothélium lésé (phase de contact). L'activation se fait par l'intermédiaire de structures micro-fibrillaires sous-endothéliales, chargées négativement. En présence de Prékallicréine, activée en Kallicréine et du Cofacteur Kininogène de Haut Poids Moléculaire (KHPM), le FXIIa entraîne l'activation du Facteur XI puis celui-ci du Facteur IX. Le Facteur IXa, ainsi formé, en présence de son Cofacteur le Facteur VIIIa, active le Facteur X (Facteur Stuart). Le Facteur Xa (Facteur X activé) est la molécule intervenant au carrefour des 2 voies décrites, intrinsèque et extrinsèque, et initie la voie commune.

La phase de contact, initiant cette voie de coagulation, joue également un rôle très important dans des fonctions biologiques autres que l'hémostase : elle induit l'activation de l'inflammation en réagissant à la présence de toute surface électronégative en contact avec le sang, elle provoque la vaso-dilatation par la Bradykinine produite suite à l'action de la Kallicréine sur le Kininogène de Haut Poids Moléculaire (KHPM) et elle peut activer directement le complément, ce qui active l'immunité innée.

La Voie extrinsèque est activée lorsqu'il y a contact du sang avec le milieu extravasculaire, lors d'une lésion des vaisseaux sanguins, le sang venant alors en contact avec un facteur normalement absent dans la circulation sanguine : le Facteur Tissulaire (FT). Le FT est une protéine transmembranaire glycosylée présente sur les cellules des vaisseaux sanguins (et dans le compartiment extravasculaire) et capable, à partir de ces derniers, d'initier la coagulation en cas de brèche vasculaire. Le FT est essentiel pour l'initiation de la coagulation : bien que présent uniquement à l'état de traces il active fortement la coagulation lorsque le sang rentre en contact avec le compartiment extravasculaire. Le FT est localisé dans les divers tissus, à des concentrations très variables, importantes au niveau du cerveau ou des poumons, et faibles au niveau des articulations par exemple. Dans les circonstances physiologiques normales, le FT n'est pas présent dans

la circulation, et les cellules sanguines ne l'expriment pas, sauf des traces infimes au niveau des monocytes ou de l'endothélium activé. En contact avec le sang, le FT se lie au Facteur VII (FVII) circulant, et l'active en Facteur VIIa (FVIIa). Il forme ensuite un complexe avec celui-ci, ce qui initie la coagulation par activation directe du FX en FXa. Toutefois, cette activation nécessite des concentrations importantes de FT. A faible concentration de FT, le complexe FT-FVIIa active préférentiellement le FIX en FIXa. A partir de l'activation du FX en FXa, intervient la voie commune.

Dans la Voie commune, le Facteur Va est le CoFacteur du Facteur Xa avec qui il se complexe à la surface des Phospholipides anioniques exposés par les plaquettes activées et certains tissus. Il se forme alors le complexe prothrombinase qui va transformer la Prothrombine (FII) en Thrombine (FIIa). Sous l'action de la Thrombine, le Fibrinogène est clivé et transformé en monomères de Fibrine. Ces monomères de Fibrine s'associent en polymères de Fibrine instables et encore solubles. Le FXIII, lui-même activé par le FIIa, intervient ensuite pour transformer ces polymères instables en polymères stables et insolubles par liaison peptidique (γ -glutamyl- ϵ -lysine). Ces polymères insolubles forment un réseau qui va emprisonner des globules rouges (GR) pour former le thrombus rouge.

Le FIIa est l'élément final du processus de coagulation, induisant la coagulation du Fibrinogène et la transformation du Fibrinogène soluble en un réseau de Fibrine stable par l'intermédiaire du FXIII.

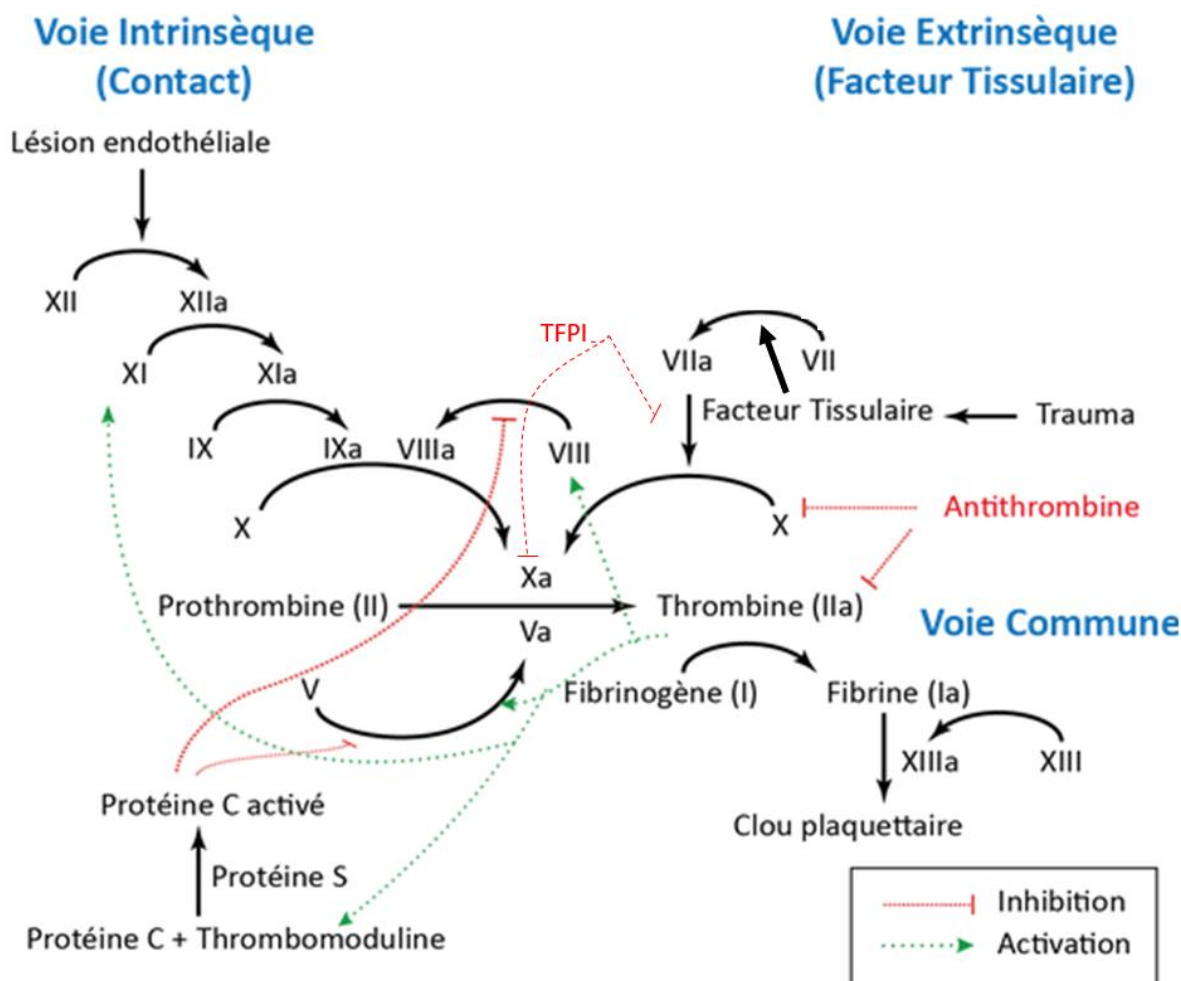


Figure 3 : Schéma de la cascade de coagulation *in vitro* (Schéma modifié issu du site Gecni: <https://gecni.medixen.fr/images/cascade-de-la-coagulation>). Les flèches noires indiquent l'activation des facteurs de coagulation. La cascade de la coagulation concerne un ensemble de facteurs pouvant être régulés positivement ou négativement, et symbolisés sur le schéma respectivement par les flèches vertes et rouges.

On distingue *in vitro* deux voies d'activation, l'une déclenchée par une lésion de l'endothélium (voie intrinsèque) et l'autre par un facteur provenant de l'extérieur des vaisseaux sanguins (voie extrinsèque). A partir de l'activation du FX, la suite de la cascade de la coagulation continue en tant que voie commune.

2.2.2 Coagulation *in vivo*

Le rôle de la voie endogène dans la coagulation a été fortement discuté, en particulier parce que les déficits en FXII ne provoquent pas de tendances hémorragiques. Il a été mis en évidence de multiples interactions entre les voies intrinsèque et extrinsèque. Par exemple, le FT à faible concentration et complexé au FVIIa va en premier lieu activer le FIX, au lieu d'activer directement le FX.

Il semble par conséquent plus exact de décrire la coagulation comme un mécanisme unique, avec des régulations différenciées selon le stimulus activateur (Kamikubo et al., 2017). Le premier modèle de la

cascade de coagulation, **figure 3**, a dû être reconsidéré. Un nouveau modèle a été proposé, plus conforme à la réalité *in vivo* (Hoffman et Monroe, 2001) (Hoffman, 2003) comme le montrent les **figures 4 à 6**.

Dans ce modèle, les mécanismes de la coagulation sont séparés en quatre phases : une phase d'initiation, une phase d'amplification, une phase de propagation et une phase de stabilisation.

Initiation :

Dès que les premières traces de FXa sont formées, de petites quantités de Prothrombine (FII) sont activées en Thrombine (FIIa), mais générées en quantité si faible qu'elles sont incapables de transformer le Fibrinogène en Fibrine. Ces traces de FIIa permettent toutefois d'activer le FV, le FVIII et les plaquettes, ce qui expose les phospholipides anioniques. Le complexe FT-FVIIa avec le FXa, est régulé par son inhibiteur naturel, le TFPI, ce qui aide à contrôler le processus de coagulation (**figure 4**).

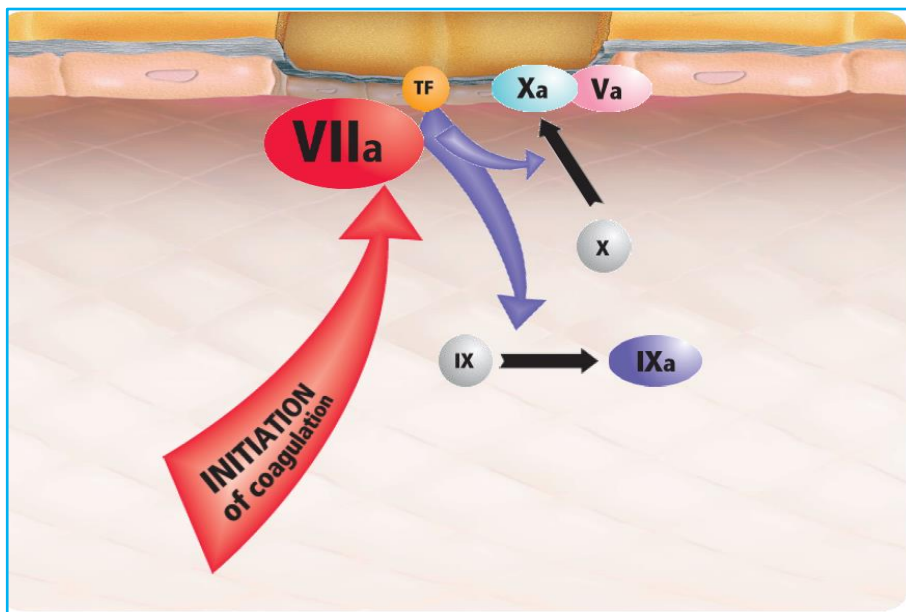


Figure 4 : Schéma de la cascade de coagulation actualisé, tel qu'intervenant *in vivo* :
Phase d'initiation de la cascade de coagulation (Hoffman et Monroe, 2001) (Hoffman, 2003).

Amplification :

Le FIIa initialement formé, active le FVIII, le FV, le FXI et les plaquettes. Le FIX peut être activé par deux mécanismes différents : soit par le FXIa à la surface des plaquettes activées, soit par le complexe FT-FVIIa. L'activation par le complexe TF-FVIIa du FIX puis du FX, « boucle Josso », aboutit à la thrombino-formation et le phénomène est fortement amplifié quand les premières traces de Thrombine formée activant le FVIII (**figure 5**).

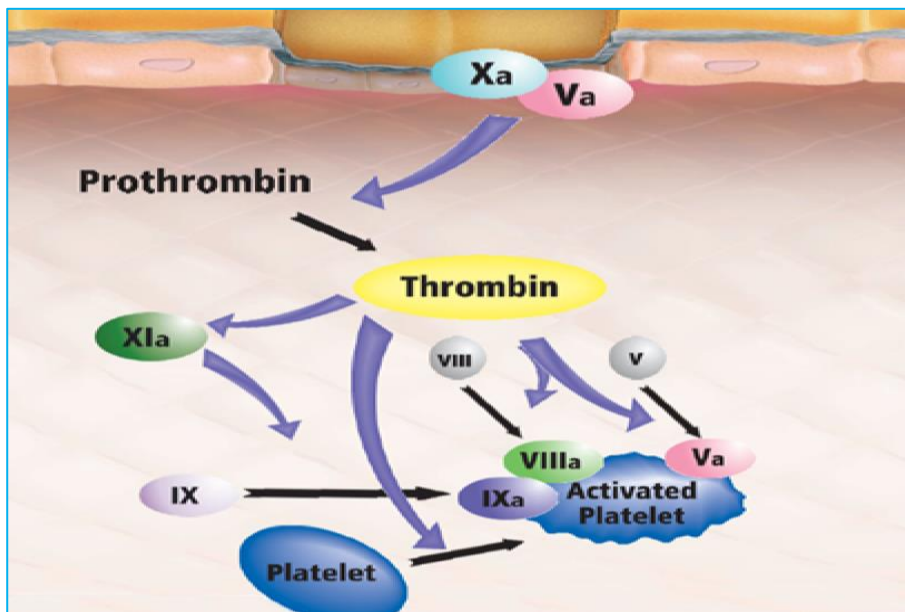


Figure 5 : Schéma de la cascade de coagulation actualisée, tel qu'intervenant *in vivo* :
Phase d'amplification de la cascade de coagulation (Hoffman et Monroe, 2001) (Hoffman, 2003).

Phase de propagation et de stabilisation

Le complexe FVIIIa – FIXa, localisé à la surface des plaquettes activées est appelé « Tenase intrinsèque ». Il augmente considérablement l'activation du FX. Le FXa en association avec le FVa constitue le Complexe Prothrombinase (FVa, FXa, PL, Ca²⁺). Ce complexe Prothrombinase induit une génération abondante de Thrombine clivant le Fibrinogène, ce qui aboutit à la formation du réseau de Fibrine et du thrombus rouge (figure 6).

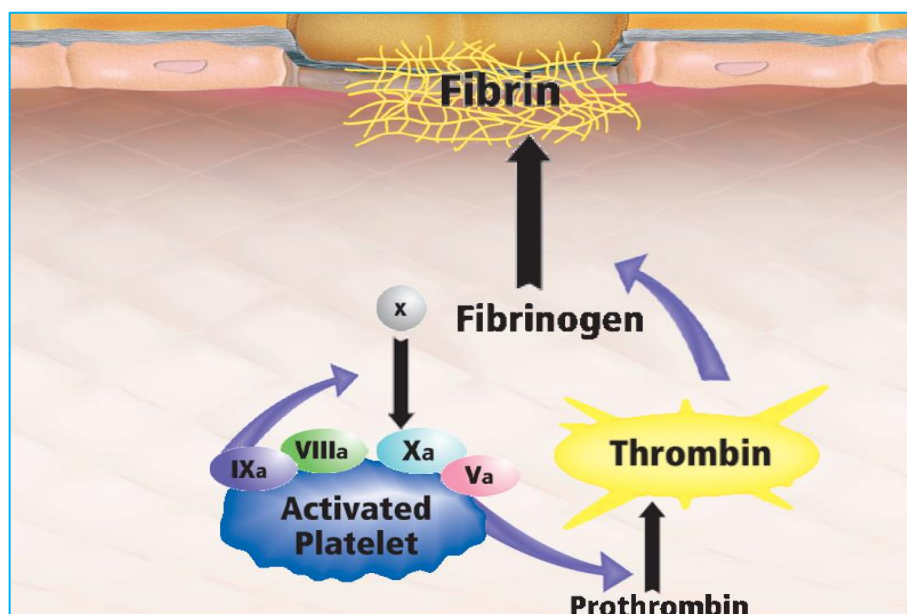


Figure 6 : Schéma de la cascade de coagulation actualisée, tel qu'intervenant *in vivo* : Phase de propagation et de stabilisation de la cascade de coagulation (Hoffman et Monroe, 2001) (Hoffman, 2003).

Les différents facteurs de la coagulation font toujours l'objet de recherches pour déterminer leur rôle exact et leurs interactions. Ainsi, la fonction du FT, d'abord limitée à un rôle d'initiateur de la voie extrinsèque,

aurait une action plus complexe en agissant comme un véritable récepteur de surface impliqué dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire comme la survie de cellules, l'angiogenèse et les métastases tumorales (Cimmino et Cirillo, 2018). Il a été démontré plus récemment que le FT peut avoir un rôle lorsqu'il est sous forme circulante, bien qu'il soit à l'état de traces. En effet, il peut être libéré par les globules blancs, plus particulièrement les monocytes activés, et peut se lier avec les plaquettes ou les microparticules issues de diverses cellules (Giesen et al., 1999), dont les cellules endothéliales stimulées. La cascade de coagulation est ainsi régulée par divers mécanismes subtils que nous développerons dans la partie suivante.

2.3 La régulation de la cascade de la coagulation

Le premier mécanisme de régulation se situe au niveau de la localisation de la coagulation, sur le site de la brèche vasculaire, où il est bénéfique qu'elle agisse physiologiquement. En effet, la coagulation ne se propage pas à l'ensemble de la circulation sanguine. Si l'activation de certains facteurs se produit en dehors du site d'initiation, elle reste très limitée et n'entraîne pas de risques de thrombose, en particulier parce que les traces de FIIa atteignant la microcirculation se fixent sur la Thrombomoduline endothéliale, et acquièrent alors une activité anticoagulante. La localisation du processus de coagulation est rendue possible par le fait que les facteurs de la coagulation ne sont actifs que fixés sur les phospholipides chargés négativement, et qui sont exposés sur la surface des cellules activées (plaquettes ou cellules endothéliales). Cela permet le maintien de la fluidité sanguine, tout en assurant la réparation de la brèche vasculaire (**Figure 7**).

En reprenant les schémas de la cascade de coagulation telle qu'intervenant *in vivo*, comme expliqué précédemment, les premières traces de FIIa générées induisent l'activation du Facteur V. Le FVa amplifie fortement l'activité de la Prothrombinase et permet ainsi d'augmenter de plus de 1000 fois la cinétique de génération des molécules de FIIa. Le FIIa active également le FVIII (Özge-Anwar et al., 1965).

A l'inverse, d'autres facteurs plasmatiques interviennent pour réguler et limiter la coagulation au site de la brèche vasculaire, comme la Protéine C (PC) ou l'Antithrombine (AT). Ainsi, la Protéine C est activée (PCA) par la Thrombine elle-même, quand celle-ci se fixe sur la Thrombomoduline présente sur la surface endothéliale. La PCA agit en présence de son Cofacteur : la Protéine S libre (PS). Le complexe PCA-PS inactive le FVIIIa et le FVa, ce qui inhibe la cascade de coagulation. Quant à l'antithrombine (AT), elle inhibe la Thrombine circulante et la neutralise progressivement.

Ces mécanismes assurent l'équilibre du sang entre activation et inhibition de la coagulation et permettent de prévenir l'hémorragie tout en empêchant la thrombose. Le diamètre des vaisseaux joue un rôle primordial. En particulier, la Thrombomoduline est présente à une concentration 1000 fois plus forte dans la microcirculation que dans les veines et artères. Elle joue un rôle de « filtre actif de la Thrombine », en la fixant et en transformant son activité; de coagulante elle devient anticoagulante et permet l'activation de la voie de la PC-PS. Ce mécanisme prémunit, ainsi, de la génération de micro-thrombi dans la microcirculation, dont la fluidité est ainsi préservée, tout en maintenant l'action procoagulante au niveau de la brèche vasculaire.

La Thrombine apparaît, de cette manière, comme une molécule centrale permettant d'activer et réguler la cascade de coagulation. Elle a le rôle d'initiateur du réseau de Fibrine, tout en étant un régulateur essentiel de sa propre génération.

INHIBITEURS DE LA COAGULATION

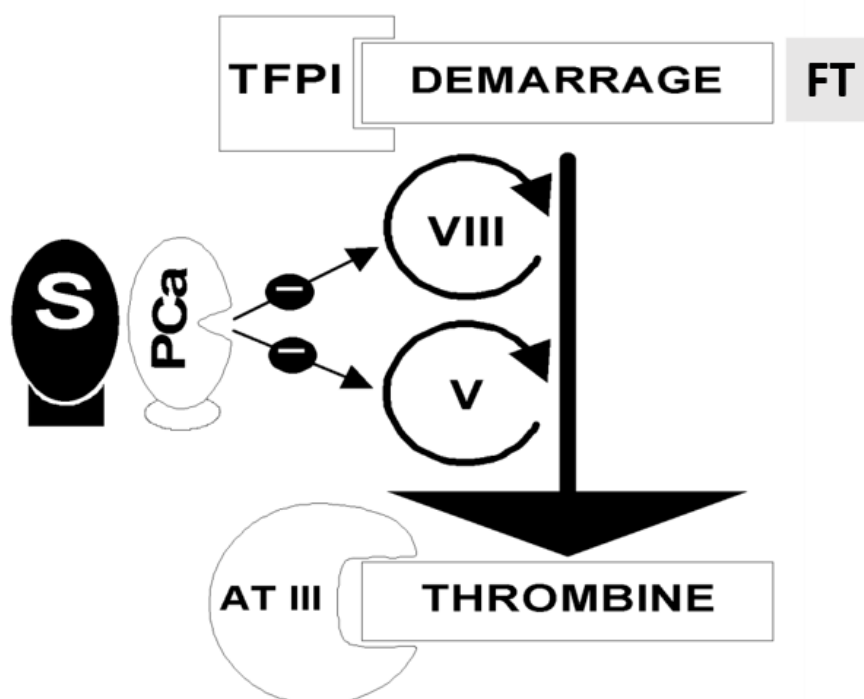


Figure 7 : Rôle clé de la Thrombine dans la coagulation et sa régulation : la Thrombine, dont les premières traces sont induites par le contact du sang avec le Facteur Tissulaire (FT), active les facteurs qui amplifient ou régulent la coagulation, et qui œuvrent alors en synergie avec d'autres régulateurs et inhibiteurs de la coagulation (Abréviations : FT : Facteur tissulaire ; VIII : Facteur VIII ; V : Facteur V ; PCA : Protéine C Activée ; S : Protéine S ; TFPI : Inhibiteur du Facteur Tissulaire ; ATIII : Antithrombine) (Griffin et al., 2012).

2.4 La Fibrinolyse

La lyse du réseau de Fibrine est réalisée par la Plasmine générée lors de la fibrinolyse, qui est la dernière étape de l'hémostase. Elle permet au sang de maintenir son état fluide, de lyser les caillots formés, et de rétablir une perméabilité normale du système vasculaire. Cette fibrinolyse agit avec un effet retard qui est nécessaire pour permettre la cicatrisation et la ré-endothélialisation des vaisseaux. L'effet retard de la fibrinolyse est en particulier régulé par l'Histidine-Rich-Glyco-Protein (HRGP) et le Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI), qui modulent la fixation de Plasminogène sur la Fibrine, et l'Alpha 2-AntiPlasmine (α 2-AP), qui est incorporée au caillot de Fibrine et inhibe la Plasmine formée au début de la fibrinolyse. Ce n'est qu'après la consommation de l' α 2-AP, que la Plasmine devient biologiquement disponible pour lyser la Fibrine. En présence de troubles de la fibrinolyse, en particulier lorsque celle-ci est diminuée, un état d'hypercoagulabilité peut survenir, ce qui est source de thromboses.

Le processus de fibrinolyse est mis en alerte (stimulé) dès la phase initiale d'activation de l'hémostase, mais les facteurs provoquant son déclenchement deviennent actifs physiologiquement avec un effet retard de quelques jours, lorsque leurs concentrations atteignent un seuil suffisant. La séquence d'activation de ces facteurs peut être décrite comme suit :

La Thrombine et l'inflammation stimulent la libération du t-PA à partir de l'endothélium ou des tissus. Le t-PA, qui est l'activateur principal du Plasminogène, se fixe à la Fibrine et forme le complexe t-PA-Fibrine-Plasminogène, conduisant à la formation de Plasmine qui dégrade la Fibrine en PDF (Produits de dégradation de la Fibrine), exposant les épitopes D-dimères. La quantité de tPA active, capable de se lier au caillot de Fibrine pour activer la fibrinolyse est régulée par son inhibiteur, le PAI-1. La **figure 8** représente ce système, qui est la principale voie d'activation de la fibrinolyse.

Il existe aussi un système d'activation qui n'est pas représenté sur la **figure 8**. Il peut être décrit brièvement. Ce système met en jeu à la fois la Pro-Urokinase et l'Urokinase. La Pro-Urokinase est synthétisée par les cellules rénales plasmatiques. La Pro-Urokinase est clivée par la Plasmine, qui la transforme en Urokinase. Cette Pro-Urokinase peut être activée également par la Kallicréine (un facteur de la phase de contact de la coagulation) et devient capable de transformer le Plasminogène en Plasmine. Ce système agit comme amplificateur de la fibrinolyse mais n'en est pas le déclencheur (Alessi, 2002). Deux molécules jouent le rôle d'anti-fibrinolytique, Le PAI-1, qui inhibe le t-PA, et l' $\alpha 2$ -antiPlasmine, qui inhibe la Plasmine.

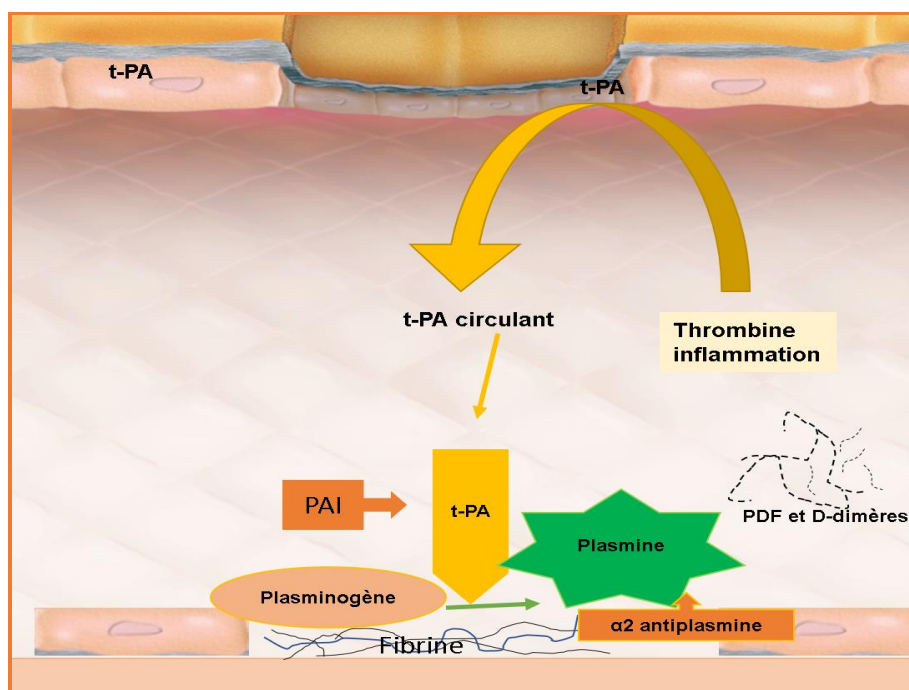


Figure 8 : Schéma de la fibrinolyse

Les PDF (produits de dégradation de la Fibrine) et les D-dimères (produit terminal de lyse) sont issus du clivage de la Fibrine par la Plasmine. Le PAI-1, inhibiteur du t-PA, et l' $\alpha 2$ anti-Plasmine, inhibiteur de la Plasmine régulent la fibrinolyse. La flèche verte symbolise l'activation du Plasminogène en Plasmine.

2.5 Les pathologies liées à l'hémostase.

Les maladies de l'hémostase sont le résultat d'un déséquilibre entraînant soit un saignement anormal ou hémorragie, soit une coagulation anormale ou thrombose (**figure 1**). Le déficit en Facteur VIII ou en Facteur IX, par exemple, provoque la maladie de l'hémophilie qui ne concerne que les hommes mais est véhiculée par les femmes. Une personne atteinte de ce trouble présentera une anomalie de la cascade de coagulation, ce qui implique un risque hémorragique spontané ou provoqué lors d'une petite blessure, d'un traumatisme ou d'une intervention chirurgicale. Les pathologies thrombotiques, déclenchées par exemple par une

altération de l'endothélium, peuvent être regroupées en 2 catégories : le thrombus rouge, qui est formé dans les veines et le thrombus blanc, généré principalement dans les artères. Le thrombus rouge est provoqué par une activation pathologique de l'hémostase dans son ensemble, jusqu'à la formation du caillot sanguin. Il provoque les maladies circulatoires sévères comme des embolies systémiques pouvant conduire à des AVC (Accidents Vasculaires Cérébraux), des TEV (Thromboembolies Veineuses) ou des CIVD (Coagulations Intravasculaires Disséminées), en cas de coagulopathie généralisée. Le thrombus blanc est formé dans les artères, là où le flux sanguin est plus rapide ; il est constitué essentiellement de plaquettes activées et agrégées, ce qui lui donne un aspect blanc. Il peut provoquer l'obstruction d'une artère, ce qui peut entraîner une ischémie ou un infarctus.

La pathologie thrombotique peut concerner à la fois les veines et les artères. Il existerait ainsi un lien entre les plaques d'athérosclérose, une maladie artérielle et l'activation anormale de la cascade de la coagulation pouvant provoquer les thromboses veineuses (Prandoni et al., 2003).

2.6 Exploration de l'hémostase

2.6.1 Exploration Biologique : Tests de Laboratoires globaux

L'exploration biologique est réalisée au laboratoire d'analyse médicale (hospitalier ou de ville) ou dans les laboratoires annexes de l'hôpital (chirurgie, urgence...). Ces tests sont nécessaires pour caractériser les anomalies de la coagulation, en particulier si une intervention chirurgicale doit intervenir et qu'il faut maîtriser le risque de complications. Par exemple, lors de ces interventions, le test de coagulation activée « ACT » (Activated Clotting Time) peut être réalisé immédiatement sur du sang total, en particulier si l'intervention est thrombogène et réalisée sous couvert d'Héparine. Un activateur de la voie intrinsèque (Kaolin, verre) est ajouté au sang puis le temps de coagulation du sang total est mesuré à 37°C à l'aide d'un appareil. Ce test est le plus simple et rapide à mettre en œuvre. Il permet de détecter certaines anomalies, et d'ajuster la dose d'anticoagulant requise en cours d'intervention (notamment pour l'héparinothérapie).

- **Temps de saignement**

Le temps de saignement permet d'évaluer le fonctionnement général de l'hémostase primaire, selon la rapidité d'arrêt du saignement. Le contrôle de l'hémostase primaire implique également la numération plaquettaire, et des tests d'agrégométrie. Cela permet de diagnostiquer un défaut plaquettaire ou un excès de plaquettes pouvant provoquer des troubles hémostatiques.

- **TP, TCA**

Au laboratoire de diagnostic clinique, les tests de coagulation de routine, comme le TP (Temps de Prothrombine) ou le TCA (Temps de Céphaline Activé) sont réalisés en première intention, pour évaluer l'hémostase du patient. Ces tests peuvent mettre en évidence des déficits en facteurs de la coagulation, dont les causes peuvent être multiples. Un résultat anormal peut résulter d'un déficit protéique mais peut également être causé par des auto-anticorps circulants, ciblant précisément certains facteurs de la coagulation par exemple des anti-facteurs, ou par le Lupus anti-coagulant (Mannucci et al., 1979).

Le taux de Prothrombine (TP) permet d'explorer la voie extrinsèque, (**figure 3 - voie extrinsèque**). Le test TP met en présence un plasma citraté (plasma dont la coagulation est bloquée par chélation des ions calcium par le citrate) avec de la thromboplastine calcique (source de Facteur tissulaire et calcium). Ce dernier réactif intervient comme activateur tissulaire de la coagulation. Ce test permet de détecter un problème lié à un des

facteurs impliqués dans la voie exogène et la voie commune de la coagulation, notamment le Fibrinogène, la Prothrombine, le FX, le FV ou le FVII. Il est plus particulièrement utilisé pour surveiller et ajuster les traitements par les anticoagulants de la famille des anti-vitamine-K (AVK) (Rockson et Albers, 2004).

Le temps de céphaline activé (TCA) explore la voie intrinsèque, (**figure 3 - voie intrinsèque**) impliquant plus spécifiquement les Facteurs suivants : FVIII, FIX, FXI, FXII, la Prékallcréine, le KHPM, et les facteurs communs avec la voie extrinsèque comme le Fibrinogène, la Prothrombine, le FX et le FV. Pour la réalisation de ce test, la céphaline (un phospholipide anionique) en présence d'un activateur (kaolin, silice, acide ellagique, etc...) est ajoutée au plasma citraté, et après une incubation de 3 à 5 minutes selon les tests, la coagulation est déclenchée par l'addition de calcium. La céphaline apporte la surface phospholipidique électronégative, permettant de focaliser les réactions de la coagulation.

En résumé, ces deux tests globaux (TP et TCA) sont généralement utilisés comme les premiers outils de diagnostic, pour détecter des anomalies de la coagulation. Par exemple, en cas de CIVD le TP diminue et le TCA augmente. Les patients souffrant de fibrillation auriculaire (FA) (activité anormale de l'oreillette du cœur), peuvent développer des complications thrombotiques, et en particulier les AVC. L'examen clinique du patient (âge, accidents antérieurs) permet d'estimer le risque, et le traitement AVK au long cours est souvent prescrit. Pour les patients sous AVK, le clinicien ajuste le traitement pour optimiser le rapport risque-bénéfice, principalement à l'aide du test TP.

2.6.2 Exploration Biologique : Tests spécifiques

Pour affiner le diagnostic, d'autres tests plus spécifiques doivent être réalisés. Il existe de nombreux tests permettant de doser spécifiquement un ou des facteurs de la coagulation. Un dosage couramment pratiqué depuis de nombreuses années concerne l'évaluation quantitative du **Fibrinogène**, qui est le facteur terminal de la cascade de la coagulation, coagulé et polymérisé en Fibrine. Ce dosage permet de mettre en évidence un état inflammatoire et le dosage du Fibrinogène est également utilisé comme facteur de risque de pathologies cardiovasculaires ou thrombotiques, lorsque la concentration est augmentée (Henschen-Edman, 1999).

Le test **Temps de Thrombine** est le **temps** de coagulation d'un plasma sanguin citraté lors de l'ajout d'une quantité connue de **thrombine** et de calcium. Ce test permet de diagnostiquer la présence de produits de dégradation de la Fibrine ou une anomalie du Fibrinogène, mais aussi la présence de substances anti-IIa, dans le sang des patients, comme des anticoagulants héparinés. D'autres dosages permettent de doser des Facteurs spécifiques, comme les facteurs FX, FIX, FVIII, FVII, FV, FII, PS, PC, AT, etc... pour déterminer des déficits ou anomalies particulières.

Le dosage de l'activité des anticoagulants dans le plasma peut être effectué à l'aide de tests de coagulation similaires. Pour des dosages spécifiques, des tests adaptés ont été mis au point : voir le chapitre 5 de l'Etat de l'Art : « Dosage des anticoagulants ».

2.7 Les traitements disponibles

Les troubles thrombotiques sont traités par les anticoagulants, utilisés en médecine depuis plus de quatre-vingts ans. Le chapitre suivant passe en revue ces différents traitements et les diverses molécules qui sont utilisées.

3 Les anticoagulants

Les anticoagulants ont révolutionné le pronostic de beaucoup de complications thrombotiques et des maladies thromboemboliques. La découverte des divers anticoagulants et leur introduction, ainsi que leur utilisation en pratique clinique, ainsi que l'introduction récente des inhibiteurs directs de la Thrombine et du FXa sont présentées de façon schématique (**figure 9**).

3.1 Historique des Anticoagulants : Hirudine, Héparines et AVK

Les premiers anticoagulants ont été introduits par l'observation directe du monde vivant. L'Hirudine a été le premier anticoagulant utilisé : cette molécule est présente dans les sécrétions salivaires des sangsues, ou « *Hirudo Medicinalis* ». Si les sangsues sont utilisées en médecine comme thérapie depuis des millénaires, c'est JB Haycraft qui a découvert en 1884 que leur pouvoir anticoagulant provenait d'une substance présente dans leur salive. Cette substance fut appelée plus tard Hirudine : elle inhibe spécifiquement la Thrombine.

L'**Héparine** fut découverte en 1916 par M. Mac Lean et M H. Howell. Lors d'expérimentations animales, un composé issu de cellules de foie de chien semblait avoir un pouvoir anticoagulant. Six ans plus tard, le produit fut commercialisé mais les effets secondaires étaient tellement importants que des nouveaux tests sur l'homme furent nécessaires, et une application directe concluante ne put en être proposée qu'en 1937. L'Héparine neutralise les sérine-estérases de la coagulation, en particulier la Thrombine, le FXa, et le FIXa, en amplifiant considérablement l'activité de leur inhibiteur, l'AT, qui devient puissante et immédiate.

Les **Antivitamines K (AVK)** furent découvertes en 1921, par suite de l'observation dans certaines régions du Canada et des Etats-Unis, d'hémorragies inexplicables survenant chez des bovins. Des études montrèrent que ces troubles étaient provoqués par la nourriture des animaux. Il a été déterminé que ces hémorragies venaient de la consommation par les bêtes, du trèfle doux moisi des prairies après des périodes très pluvieuses. Ce ne fut que 20 ans plus tard que des scientifiques purent identifier correctement ce phénomène ; ces hémorragies étaient dues à la Coumarine, molécule présente dans le trèfle doux que les moisissures au cours de leur croissance transforment en Dicoumarol. Ce dernier a des capacités anticoagulantes car il neutralise la vitamine K. Ceci entraîne une diminution de l'activité des facteurs pro-coagulants vitamine K dépendants par défaut de carboxylation de l'acide glutamique, ce qui réduit leur capacité de réaction avec le calcium et les phospholipides.

Ainsi, les anticoagulants présentent des modes d'action très différents les uns des autres, pour réduire l'activité de la cascade de la coagulation et ils peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques variées.

L'industrie pharmaceutique a utilisé ces différentes molécules pour créer des médicaments anticoagulants qui offrent les avantages des premières molécules thérapeutiques introduites, tout en limitant leurs inconvénients.

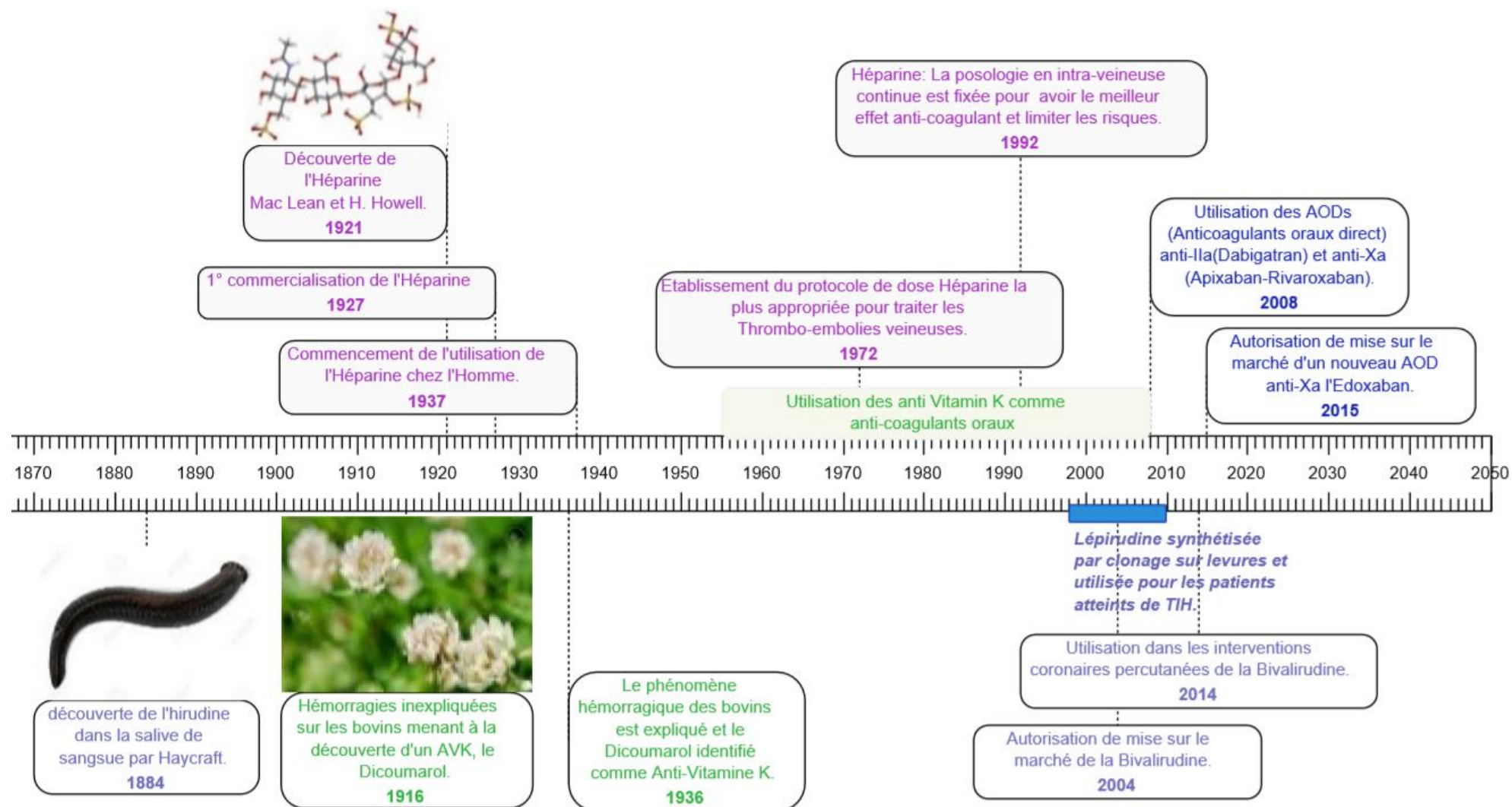


Figure 9 : Schéma chronologique montrant la découverte et l'introduction des anticoagulants.

3.2 Les Héparines

3.2.1 Présentation des Héparines

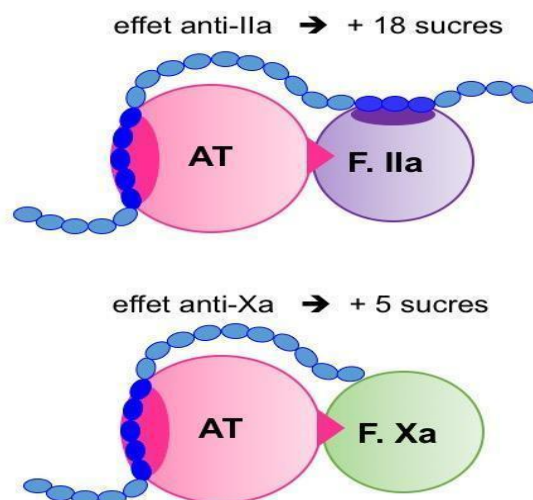
L'Héparine est un polysaccharide-sulfaté faisant partie de la famille des glycosaminoglycanes. L'Héparine permet d'inhiber l'action des Facteurs de la coagulation par l'intermédiaire de l'antithrombine (AT) (**figure 11**). L'action de l'Antithrombine est ainsi multipliée par un facteur de 1000 environ lorsqu'elle est liée à l'Héparine. Pour le dosage de l'Héparine, son action inhibitrice du FXa ou de la Thrombine (FIIa) en présence d'AT est utilisée. Cet anticoagulant est très actif mais peut être neutralisé par un antidote, le sulfate de protamine. Cet antidote est actuellement utilisé en clinique et présente un effet neutralisant de l'Héparine similaire à celui du polybrène dont l'effet a été prouvé dans les années 1950 (Preston et al., 1956).

L'Héparine est administrée sous forme injectable aux patients traités. C'est un traitement des phases aiguës ou d'urgence. Pour les traitements au long cours, la médication orale est préférable. L'Héparine est extraite de la muqueuse intestinale de porc (ou parfois des poumons de bœuf), et est un mélange complexe de mucopolysaccharides sulfatés qui ont des poids moléculaires compris entre 3000 et 30000 daltons. Elle est appelée Héparine non fractionnée (HNF). Les chaînes courtes d'Héparine ont une activité essentiellement anti-Xa, alors que les chaînes longues peuvent avoir des activités anti-Xa et anti-IIa. L'antithrombine se lie à une séquence de 5 saccharides spécifiques de l'Héparine (Olson et al., 1992). Ainsi, les Héparines de bas poids moléculaire (HBPM), obtenues par dépolymérisation des HNF, ont 2 à 4 fois plus de chaînes courtes que de chaînes longues et possèdent une activité anti-Xa 2 à 4 fois supérieures à celle de leur activité anti-IIa, alors que pour les HNF, le rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa est de 1 (Béguin et al., 1999).

3.2.2 Utilisation clinique des Héparines

Les Héparines ont démontré leur efficacité clinique, y compris pour des traitements médicaux autres que ceux nécessitant le contrôle de la coagulation. Elles ont, par exemple, une activité anti-inflammatoire, d'inhibition de la migration cellulaire, anti-angiogénique (Page, 2013) et anti-métastatique (Smorenburg et Van Noorden, 2001). Leur capacité de lutter contre les métastases reste toutefois sujet à controverse (Zhang et al., 2016). Une difficulté majeure apparaît cependant dans l'utilisation de l'Héparine en tant qu'anticoagulant. En effet, chez certains patients elle peut entraîner le développement d'une maladie auto-immune appelée TIH (Thrombopénie Induite par l'Héparine) (Warkentin, 2007). La TIH est d'abord diagnostiquée par la chute des thrombocytes. Il s'agit alors d'une TIH de type II, résultant de la fixation des anticorps Héparine-dépendants au Facteur plaquettaire 4 (PF4) puis sur les thrombocytes, qui sont ensuite activés et phagocytés par les macrophages. Chez les patients atteints de TIH, l'Héparine devient paradoxalement procoagulante et les patients peuvent développer des thromboses veineuses et artérielles. Il existe également une forme de TIH, dite de type I, qui n'est pas anticorps-dépendante, mais est caractérisée par la diminution des plaquettes induite par l'Héparine, et dont le mécanisme n'est pas totalement élucidé (Liu et al., 2018).

Pour les patients développant une TIH de type II, immuno-allergique, l'alternative est d'utiliser un anticoagulant n'activant pas les plaquettes comme l'Argatroban, le Dabigatran ou la Bivalirudine.



2

Figure 11 Liaison de l'Héparine à l'AT pour l'inhibition du FIIa et du FXa.

L'Antithrombine (AT) est représentée par un cercle rose, le Facteur Xa un cercle vert, la Thrombine (FIIa) un cercle violet. Le triangle rose symbolise la liaison de l'AT au FXa ou au FIIa. Le chaînon bleu représente les Héparines de différents poids moléculaires. Pour exprimer une activité anti-IIa en plus de l'activité anti-Xa, les Héparines doivent être composées de plus de 18 oligosaccharides. La séquence de pentasaccharide de l'Héparine se fixant soit à l'AT est représentée en bleu foncé.

pharmacomédicale.org : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anticoagulants-par-voie-injectable-heparines-et-derives>.

3.3 Hirudine et analogues

Les premiers anticoagulants découverts ont servi de modèle pour la création de nouvelles molécules. L'Hirudine inhibe de façon spécifique et directe la Thrombine. Sa liaison à la Thrombine est irréversible. Par conséquent, dans certains cas, elle peut entraîner des saignements chez des patients et des réactions allergiques sévères. C'est pourquoi l'industrie pharmaceutique a développé des analogues (Désirudine, Bivalirudine) qui limitent le risque d'hémorragie et de réaction anaphylactique chez les patients traités (Meddahi et Samama, 2011).

L'Hirudine se compose de 65 acides aminés et a une masse moléculaire d'environ 7 kDa. Le domaine N terminal présente un encombrement stérique dû à la présence de 3 ponts disulfures, contrairement au domaine C-terminal qui est désordonné. L'Hirudine normale contient un mélange de diverses isoformes de la protéine. Cependant, des techniques de production par technologie recombinante peuvent être employées pour produire des préparations homogènes d'Hirudine. La Lépirudine (qui a été utilisée comme médicament) est produite de cette manière. La Désirudine conserve une forme moléculaire très proche de la Lépirudine, tandis que la Bivalirudine, inspirée du modèle moléculaire de l'Hirudine, ne contient que 20 acides aminés. La Bivalirudine a une action réversible d'inhibition de la Thrombine, ce qui diminue les risques de saignement chez les patients traités, en comparaison avec la Lépirudine ou la Désirudine (Meddahi et Samama, 2011). Lors de la pratique d'opérations chirurgicales, la Lépirudine a fini par être abandonnée, au profit de la Bivalirudine ou de l'Héparine. Le mode de fonctionnement de l'anticoagulant Bivalirudine, utilisé dans certaines chirurgies, est développé dans le chapitre suivant.

3.4 La Bivalirudine

3.4.1 Présentation de la Bivalirudine

La Bivalirudine est un médicament utilisé sous forme injectable et administré nécessairement par le personnel de santé. Son nom commercial est Angiox.

Il s'agit d'une protéine de 20 acides aminés, ayant une activité anticoagulante par inhibition de la thrombine, comme l'Hirudine. Elle se fixe à la Thrombine de manière réversible (**figure 10**). Sa masse moléculaire est de 2180 daltons.

Du fait de sa petite taille moléculaire, et à la différence de l'Héparine qui agit en se fixant sur l'AT, la Bivalirudine inhibe à la fois la Thrombine circulante ou celle présente dans le caillot. Elle n'active pas les plaquettes circulantes. Elle peut, par conséquent, être utilisée chez les patients ayant des risques de thrombopénie induite par l'Héparine (TIH) dans le cadre d'interventions chirurgicales réalisées avec circulation extravasculaire (Warkentin, 2007). Son activité anticoagulante provient du fait qu'elle bloque le site catalytique de la Thrombine ainsi que l'exosite 1 de cette molécule (Veale et al., 2005) (**figure 10**). Après sa fixation à la Thrombine, la Bivalirudine est clivée et libère le site catalytique de la Thrombine, capable de transformer le Fibrinogène en Fibrine. Cependant, une partie de la Bivalirudine reste fixée à l'exosite 1 de la Thrombine, impliqué dans la fixation de la Thrombine au Fibrinogène. De ce fait, la Thrombine ne retrouve pas complètement son activité coagulante (Nimjee et al., 2009). La Bivalirudine agit au début comme un inhibiteur non compétitif sur la neutralisation de la Thrombine, puis comme un inhibiteur compétitif après son clivage, ce qui permet à la Thrombine d'agir sur d'autres facteurs de la coagulation. La Bivalirudine est utilisée principalement en milieu hospitalier aux Etats Unis. Elle a démontré son efficacité par comparaison avec l'Hirudine (Lépirudine) car elle réduit le risque de saignement chez les patients, grâce à son action réversible sur la Thrombine.

3.4.2 Utilisation clinique de la Bivalirudine

Dans les études cliniques, et comparativement à d'autres protocoles thérapeutiques pour la prévention des thromboses, la Bivalirudine a montré son efficacité en cas d'intervention coronaire percutanée (Verdoia et al., 2017) : elle diminue les risques de saignement chez les patients subissant ce type d'intervention chirurgicale (Wang et al., 2017). Par ailleurs, en cas de pose d'une prothèse endovasculaire, la prescription de Bivalirudine à une dose élevée, et de manière prolongée, permet de réduire les saignements ou les accidents léthaux, de façon plus efficace que les traitements usuels (Héparine + inhibiteur de la glycoprotéine IIb/IIIa) (Fahrni et al., 2016). La Bivalirudine est même supérieure au traitement usuel pour la survie de patients victimes d'un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST (un infarctus de grande sévérité), nécessitant une intervention percutanée (Shah et Feldman 2012) (Shah et al. 2016).

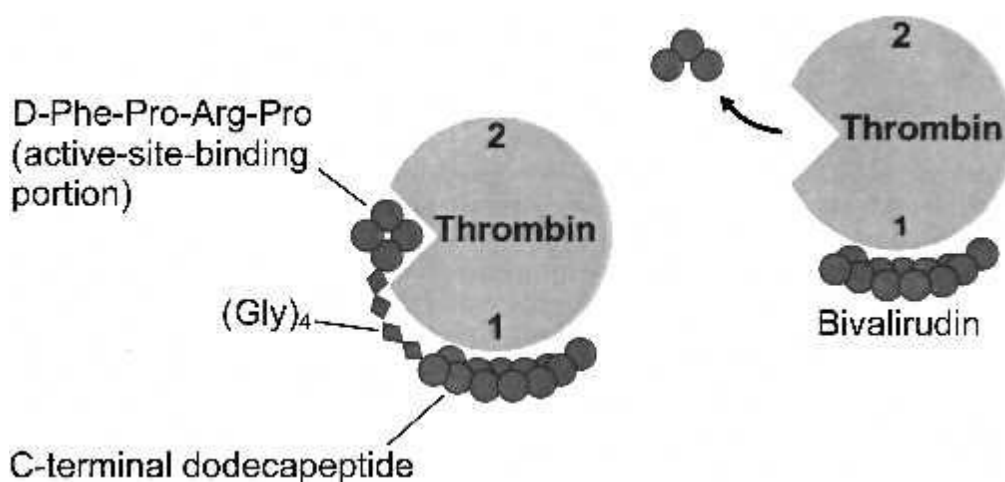


Figure 10 : Mécanismes d'action de la Bivalirudine. La Bivalirudine se fixe à la Thrombine sur l'exosite 1 et sur le site catalytique (site capable de cliver le Fibrinogène) et l'inhibe. La Bivalirudine est ensuite clivée et se détache du site catalytique de la Thrombine qui peut à nouveau cliver le Fibrinogène. La Thrombine ne récupère, toutefois, pas une activité coagulante complète car une partie de la Bivalirudine reste fixée à l'exosite 1. Cet exosite permet normalement à la Thrombine de se fixer au Fibrinogène et d'accroître ainsi son efficacité dans sa fonction coagulante (Veale et al., 2005, Nimjee et al., 2009).

3.5 Anticoagulants oraux directs (AODs)

3.5.1 Présentation des AODs

Des médicaments introduits ces dix dernières années sont maintenant disponibles pour les médecins, afin de traiter et de prévenir les maladies thromboemboliques : ce sont les anticoagulants oraux directs (AODs) qui sont des inhibiteurs directs et réversibles d'enzymes de la coagulation. On distingue les inhibiteurs de la Thrombine, un seul est disponible le Dabigatran, et ceux du FXa, dont trois sont actuellement disponibles, le Rivaroxaban, l'Apixaban et l'Edoxaban, et un quatrième, le Betrixaban, est en voie d'introduction. Ces AODs présentent l'avantage de la voie orale, de ne pas nécessiter en général d'ajustement posologique, de ne pas avoir d'interférence significative avec l'alimentation, de ne pas nécessiter de dosage régulier au laboratoire (sauf dans quelques situations particulières) et de présenter une efficacité thérapeutique au moins équivalente à celle des traitements habituels. Des antidotes spécifiques sont disponibles depuis peu, ce qui permet leur neutralisation rapide en cas de saignement (Martin et al., 2017).

3.5.2 Utilisation clinique des AODs

Les AODs ont l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la prévention des maladies thromboemboliques veineuses, en chirurgie orthopédique (Meddahi et Samama, 2014), dans la prévention des attaques vasculaires cérébrales (AVC) (Oertel and Fogerty, 2017), ou de la fibrillation auriculaire, dans le traitement des thromboses veineuses profondes (Kairov et al., 2018 -Weitz et al., 2017). Leur efficacité a été montrée également chez les patients cancéreux susceptibles de thromboser (Brunetti et al., 2017). Les contraintes alimentaires étant inexistantes, les traitements AODs sont en général mieux suivis par les patients âgés que les traitements AVKs (Baker et al., 2018 - Lip et al., 2018). Avant l'introduction des AODs, les AVKs étaient les seuls anticoagulants oraux utilisés. **L'annexe 4** présente les mécanismes d'action des AVKs ainsi que leur contexte d'utilisation.

Le tableau 3 décrit les principaux AODs leur action anticoagulante, leur voie d'élimination et leur posologie.

Nom du médicament	Bevyxxa®	Eliquis®	Lixiana®	Xarelto®	Pradaxa®
Nom de la molécule active	Betrixaban	Apixaban	Edoxaban	Rivaroxaban	Dabigatran
Facteur de la coagulation ciblé	Facteur Xa	Facteur Xa	Facteur Xa	Facteur Xa	Facteur lia
Demi-vie (H)	19–27	12	10–14	5–9	12–17
Prévention AVC/thrombose/MTEV	80 mg 1 fois /j*	≈5mg 2fois/j*	60mg 1 fois/j	≈15-20mg 1fois/j	≈110mg 2fois/j ou 150/220 mg 1 fois/j*
Tmax (H)	3–4	1–3	1–2	2–4	2
Biodisponibilité (%)	34	50	62	66	7
Excrétion rénale (%)	15	25	35	66	>80
Excrétion fécale (%)	85	46.7-56	62.2	26.4	8.2–8.8
CYP450 métabolisme par le foie	Non	Oui	Non	Oui	Non
T1/2	12-14	9-13	8-15	9-11	37 (PD T1/2 =20 h)

*Dose recommandée en prévention des risques de récurrence ; ajustable si phase aiguë des maladies.

Tableau 3 : Pharmacologie comparative des AODs.

Abréviations : **MTEV** : Maladie Thromboembolique veineuse, **Tmax** : temps pour atteindre le pic de concentration dans le plasma après une dose orale ; H : heures ; **CYP450** : cytochrome 450 **T1/2** : Temps de 1/2 vie du médicament ;

PD T1/2 : 1/2 vie pharmacodynamique (Delavenne et Zufferey, 2012) (Bouvenot Gilles et al., 2014) (Bornet et al., 2016) (Huisman et Klok, 2018).

3.5.3 Intérêt du dosage des AODs

L'élimination des AODs s'effectue essentiellement par le foie et le rein, mais de façon variable selon l'AOD : rein essentiellement pour le Dabigatran ; foie préférentiellement pour le Rivaroxaban et l'Apixaban ; foie et rein pour l'Edoxaban (**tableau 3**). Si ces organes présentent des anomalies, la cinétique de l'élimination est diminuée, et le médicament peut s'accumuler dans la circulation, exposant le malade à un risque hémorragique. C'est pourquoi, la mesure de l'activité anticoagulante des AODs nécessite dans certains cas un dosage dans le sang des patients.

Il existe, par conséquent, des contextes où ces dosages sont nécessaires :

- Vérification du bon respect du protocole thérapeutique (prise régulière du médicament)
 - o Recherche en priorité d'un surdosage éventuel, Facteur de risque hémorragique.
- Chez les patients présentant des Facteurs de risque
 - o Age, insuffisance rénale et/ou hépatique, interactions médicamenteuses
 - o Poids corporel extrême : < 50 kg ou > 120 kg)
 - o Patients avec un risque hémorragique élevé.

- Récurrence des thromboses liée à un état d'hypercoagulabilité (Kairov et al., 2018).
- Survenue d'hémorragies ou de thromboses en cours de traitement.
- Lors d'une opération chirurgicale (avant ou après)
 - Avant toute procédure invasive ou chirurgie d'urgence (afin de vérifier que la concentration sanguine du médicament est suffisamment faible et ne pas risquer de saignement), chez les patients traités.
 - Avant l'instauration d'un traitement fibrinolytique pour AVC (accident vasculaire cérébral)
 - En cas de relais d'un anticoagulant par un autre avant ou après une opération chirurgicale.

3.6 L'Edoxaban

3.6.1 Utilisation hospitalière et études cliniques

L'Edoxaban est un anticoagulant récent approuvé par la FDA (Food Drug Administration) en Janvier 2015 pour la prévention des attaques cérébrales et des embolies systémiques. C'est un anticoagulant oral, AOD, proposé à une posologie de 60 mg par jour, en une seule prise quotidienne.

L'Edoxaban est un AOD, inhibiteur spécifique du FXa. Il s'agit d'un médicament pouvant être prescrit en prévention des thromboses après une opération chirurgicale, ou en relais d'un anticoagulant injectable pour des patients à risque thrombo-embolique important. En dehors de ce contexte, il peut également être prescrit en prévention des thromboses chez des personnes à risque (Kubli et al., 2016) (Dzeshka and Lip, 2015). Il a été démontré dans une étude de Phase III, l'étude Hokusai, que l'Edoxaban était au moins aussi performant que le Warfarine, un AVK, dans la prévention des AVC et des embolies systémiques chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire non-valvulaire, tout en ne présentant pas les contre-indications alimentaires des AVKs (Bounameaux and Camm, 2014). Dans les pays d'Amérique latine, les médecins prescrivent ce médicament pour le traitement des thromboses associées au cancer (TAC) ou les thromboses veineuses profondes (TVP) (Ramacciotti et al., 2018). La dégradation de l'Edoxaban dans le corps humain, par les mécanismes naturels, induit l'apparition de molécules modifiées qui peuvent également présenter une activité anti-Xa. Ces molécules sont appelées métabolites.

3.6.2 Impact des métabolites de l'Edoxaban sur l'activité anti Xa

L'Edoxaban est métabolisé par le foie et il est excrété par le rein et dans les intestins par diffusion passive et majoritairement par un transporteur membranaire, la P-Glycoprotéine (Parasrampur et al., 2016). D'autres transporteurs membranaires majeurs OAT 1,2,3 et OCT, importants dans l'excrétion des médicaments (Nigam et al., 2015), semblent peu sollicités pour transporter l'Edoxaban, ce qui permet d'envisager selon Tsuyoshi Mikkaichi que lors de son élimination l'Edoxaban a peu de risque d'interagir avec d'autres médicaments (Mikkaichi et al., 2014) ; cela rend l'Edoxaban avantageux dans une prophylaxie multi-médicamenteuse. Cependant, des interactions de médicaments peuvent provenir des

métabolites car leur élimination est différente que celle de l'Edoxaban, par exemple le métabolite M4 est transporté par le transporteur membranaire OATP1B1.

La principale voie du métabolisme de l'Edoxaban se trouve dans les microsomes du foie et se déroule par hydrolyse qui produit les molécules M4 et M1 après la perte d'un groupement d'atomes. Ce métabolisme se fait indépendamment de la NADPH (Bathala et al., 2012). D'autres métabolites, M6 et M8, proviennent de la catalyse par l'isoenzyme CYP3A4/5. Enfin, les métabolites M2, M3 et M5 sont à l'état de traces et n'interviennent pas dans l'effet anticoagulant lié à l'Edoxaban. Tous les métabolites sont excrétés par les urines ou les fèces ou reviennent dans la circulation sanguine. Ils peuvent également être excrétés dans la bile (Parasrampur et Truitt, 2016) (**figure 12**).

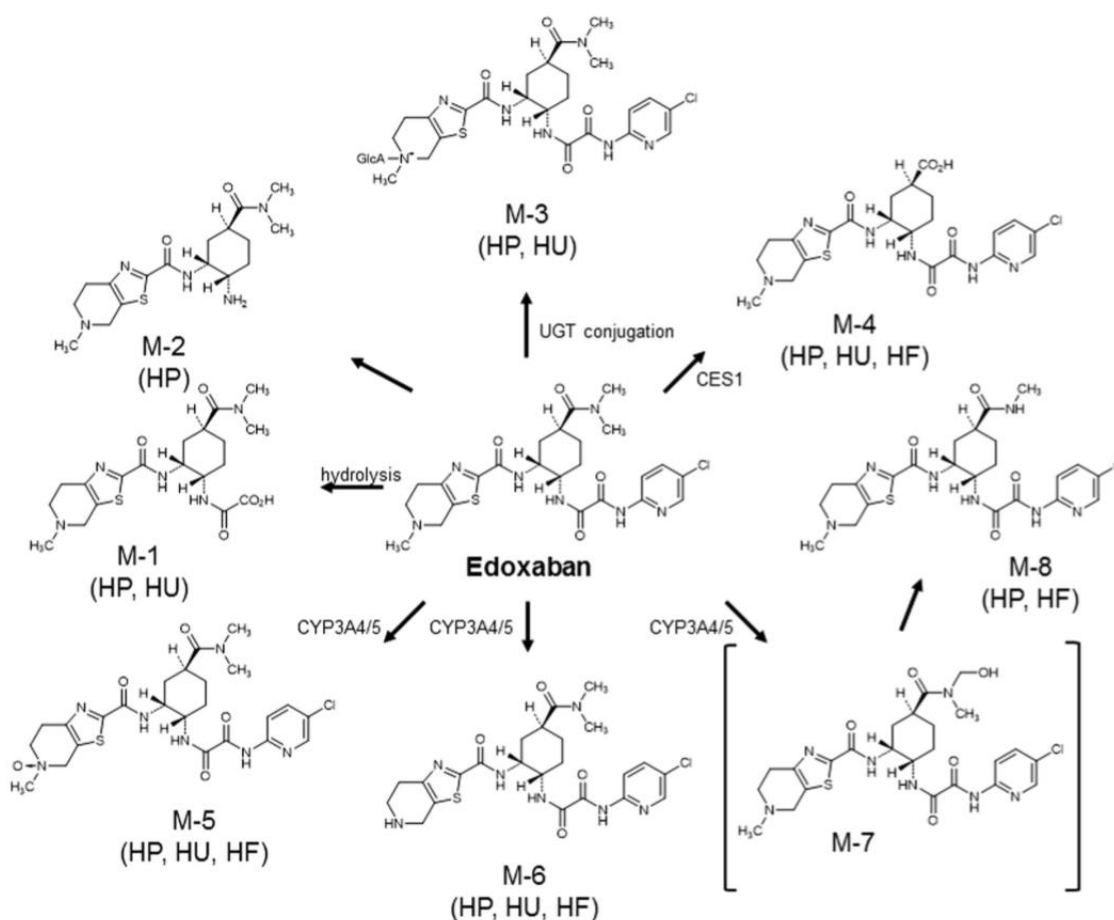


Figure 12 : Voies métaboliques proposées pour l'Edoxaban, (Parasrampur et Truitt, 2016).

CES1: carboxylesterase-1, CYP3A4/5: isoenzyme cytochrome P450 isoenzyme 3A4/5, HF : fèces humaines, HP: plasma humain, HU :urine humaine, M :métabolite, UGT :urine 50-diphosphoglucuronosyltransférase

3.7 Le Dabigatran

Le Dabigatran, fait partie, tout comme l'Edoxaban, des AODs (anticoagulants oraux directs) (**figure 13**). Il est administré de façon orale sous forme de Dabigatran Eteixilate, qui sous cette forme n'exerce aucune activité anticoagulante. Le Dabigatran Eteixilate est rapidement absorbé après ingestion, et il est converti en Dabigatran par une réaction d'hydrolyse catalysée par une estérase dans le plasma et dans le foie. Le Dabigatran développe une activité anti-IIa, à l'instar de l'Hirudine ou de la Bivalirudine. Il a un mode d'action

compétitif et réversible sur la Thrombine. C'est un anticoagulant oral direct, à action rapide et à demi-vie assez courte. La posologie habituelle est d'1 à 2 prises quotidienne. Il est prescrit aux patients souffrant de fibrillation atriale non valvulaire (FANV), pour éviter qu'ils développent des thromboses veineuses profondes (TVP) ou qu'ils fassent un accident vasculaire cérébral (AVC) (pharmacomedicale.org « **Dabigatran** » : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anticoagulants-oraux-directs-aods>) (Villines et al., 2018). Le Dabigatran peut aussi être donné à titre préventif lors de la programmation d'une intervention chirurgicale, après un accident thromboembolique veineux ou pour des patients ayant déjà souffert de TVP (Kairov et al., 2018). Si le Dabigatran est présent en trop grande concentration, supérieure à 50 ng/ml ou 30 ng/ml selon les recommandations (ANSM pour la France), toute intervention chirurgicale avec risque de saignement doit être retardée, jusqu'à ce que le taux permette de la réaliser en toute sécurité. Un taux trop élevé peut être le signe d'un dysfonctionnement rénal qui peut conduire à des hémorragies. Par conséquent, la surveillance clinique et le dosage de cet AOD est nécessaire face à ces situations critiques.

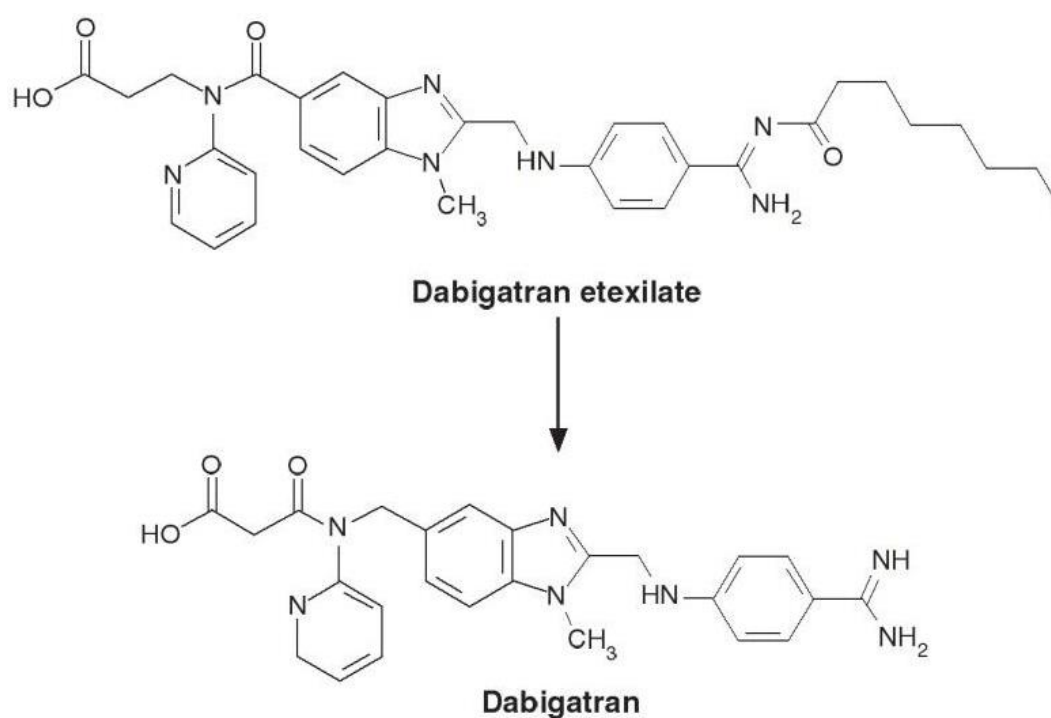


Figure 13 : Le Dabigatran doit être métabolisé dans le plasma et le foie par une estérase pour être actif (Aljohani et al., 2018).

4 Dosage des anticoagulants

4.1 Historique du suivi des traitements anticoagulants

Au cours de l'utilisation des médicaments anticoagulants pour le traitement des patients souffrant de thromboses, le suivi du traitement et le contrôle du risque encouru se sont avérés nécessaires. En effet, des saignements peuvent survenir, à la suite d'un surdosage, alors qu'une dose trop faible peut ne pas être suffisamment efficace pour soigner la maladie thrombotique. Pour contrôler l'impact de l'anticoagulant sur la coagulation les tests classiques de coagulation TP et TCA étaient réalisés. Des tests allongés

pouvaient signifier la présence d'anticoagulants, mais aussi indiquer un autre problème impliquant les facteurs de la cascade de coagulation. Ainsi, les cliniciens eurent rapidement besoin de tests plus précis et adaptés à un anticoagulant particulier. En effet les tests TP et TCA, en plus de ne pas être spécifiques, présentent des variabilités entre les laboratoires et ne peuvent servir de référence.

Par voie de conséquence, des tests adaptés à chaque anticoagulant ont été mis au point, progressivement au cours du temps. Pour la réalisation de ces dosages, il est nécessaire de disposer d'une bonne compréhension de l'action de ces anticoagulants sur les facteurs de la coagulation. La **figure 14** présente les principaux anticoagulants et leur mode d'action dans la cascade de la coagulation.

L'Histoire de la mise au point des tests de dosage suit celle de l'utilisation des anticoagulants en médecine. Les premiers tests utilisés pour explorer la coagulation, ont servi de base aux tests de suivi des premiers anticoagulants utilisés : AVKs, Héparine et Hirudine.

Comme expliqué dans la partie de ce mémoire présentant les anticoagulants, les médicaments AVKs, d'administration orale, agissent en réduisant l'activité de certains facteurs de la coagulation. Un test basé sur la mesure d'un seul facteur de la coagulation n'est pas pertinent pour suivre les patients prenant ce traitement, pour cette raison le test TP reste le plus approprié pour suivre l'effet des AVKs mais il rencontre un problème de variabilité inter-réactifs et inter-laboratoires. Pour surmonter cette difficulté, une méthode de normalisation a été développée et permet une homogénéisation des valeurs (détaillé plus loin). Par cette méthode il est ainsi possible de déterminer si la posologie des AVKs est correcte. Les autres anticoagulants qu'il a fallu doser très tôt sont l'Héparine et l'Hirudine, du fait de l'ancienneté de leur utilisation. Ces anticoagulants étaient d'abord suivis indirectement par l'intermédiaire du test TT, associé au dosage du Fibrinogène. L'utilisation de l'Héparine se généralisant, puisqu'elle a été préférée à l'Hirudine en chirurgie, un test de dosage chromogène quantitatif de l'Héparine, basé sur l'inhibition du seul FXa, a été l'un des premiers à être mis au point. Son utilisation s'est ensuite répandue (Houbouyan et al., 1996).

Les molécules exclusivement anti-IIa purent également être dosées par la suite, grâce à l'utilisation de leur capacité à inhiber la Thrombine, soit par mesure chromométrique (Spannagl et al., 1991) soit par mesure chromogène (Gray et al., 2005) (Curvers et al., 2012).

Avec le développement des nouveaux anticoagulants oraux directs et leur utilisation en médecine, de nouveaux tests ont été mis au point par les industriels pour pouvoir les doser. Avant l'introduction d'une nouvelle molécule, des tests cliniques sont nécessaires. Lorsqu'aucune autre méthode de dosage n'est disponible, le nouvel anticoagulant peut être dosé par méthode chromatographique LC:MS/MS, qui indique sa concentration massique. Cependant, pour le contrôle des patients, il est préférable de disposer d'un test spécifique facile d'utilisation, et mesurant l'activité anticoagulante. Les industriels développent, par conséquence, des tests chromogènes ou coagulants dans cet objectif. Les nouveaux anticoagulants, qui concernent les anti-IIa ou les anti-Xa, une adaptation particulière de tests existants est nécessaire pour leur évaluation, comme c'est le cas pour le test chromométrique spécifique du Dabigatran, adapté à partir d'un test disponible pour l'Hirudine (Amiral et al., 2016).

Le dosage pondéral de l'anticoagulant ne permet cependant pas de tester leur impact direct sur la cascade de coagulation. En revanche, des tests permettant de mesurer la consommation d'un facteur au cours du temps permet de l'observer. Pour les anti-Xa par exemple, il est possible de suivre la consommation du Facteur X (Arpino et al., 2005) (Austin et al., 2012).

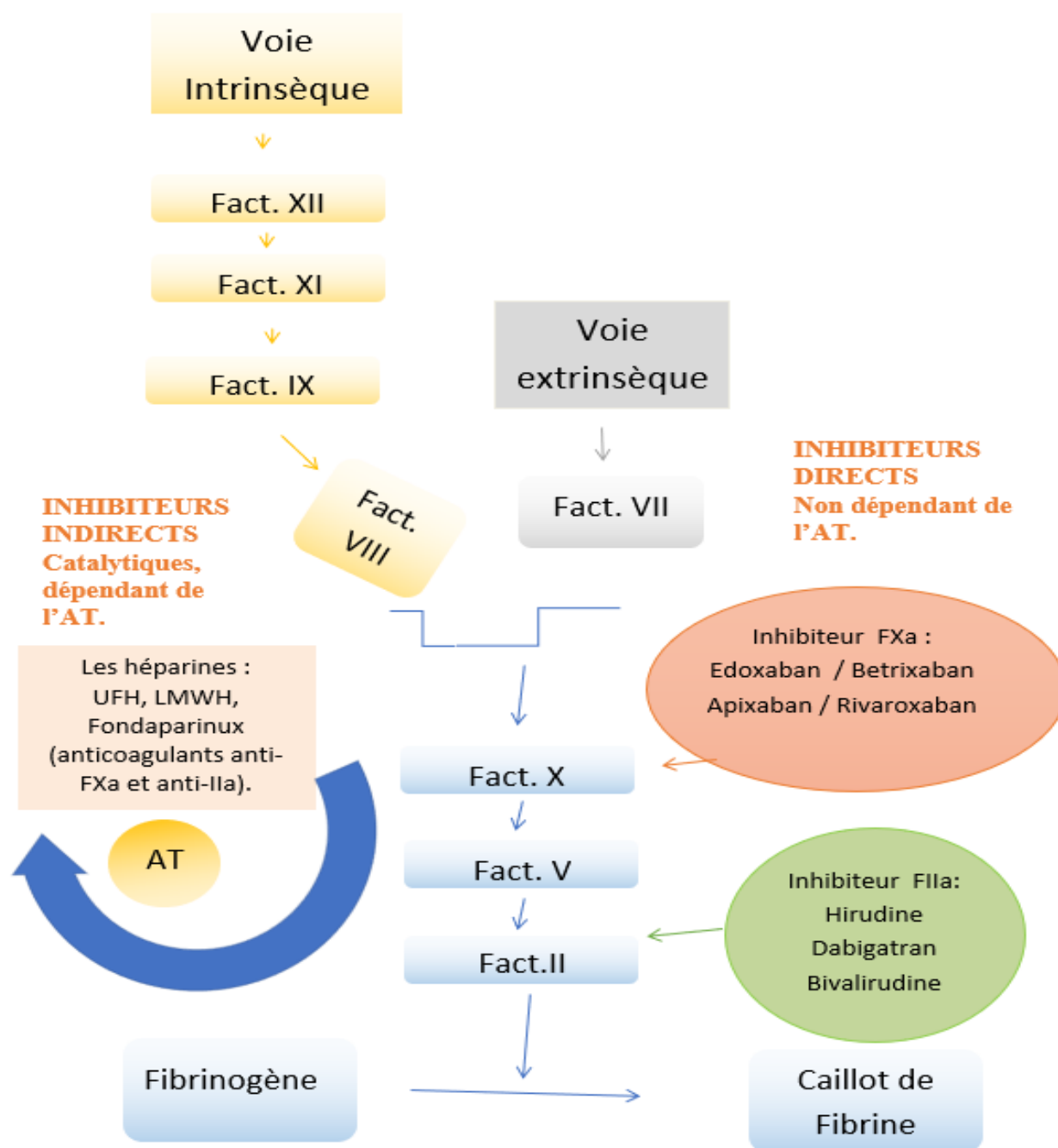


Figure 14 : Action des anticoagulants sur la cascade de coagulation :

On distingue les anticoagulants inhibant le Facteur Xa (Héparines, Edoxaban, Apixaban, Rivaroxaban) et ceux inhibant la Thrombine (Hirudine, Dabigatran, Bivalirudine). L'Hirudine, la Bivalirudine et les Héparines sont injectables. Les Héparines nécessitent la présence d'AT (Antithrombine) pour être efficaces et bloquer le Facteur Xa, contrairement à l'Edoxaban, Apixaban et Rivaroxaban qui sont des inhibiteurs directs du FXa. Dabigatran, Edoxaban, Apixaban, Rivaroxaban sont d'administration orale, tout comme les AVK (Antivitamine K).

Les AVK réduisent fortement le taux de vitamine K et diminuent la coagulabilité globale en diminuant la concentration des formes activables des Facteurs de la coagulation qui en sont dépendants (défaut de carboxylation) ; ils agissent simultanément sur plusieurs Facteurs de la coagulation comme la prothrombine (FII), les Facteurs VII, IX et X, mais également sur la Protéine C, la Protéine S et la Protéine Z. (Abréviations : AT: antithrombine; HNF Héparine non fractionnée ; HBPM Héparine de Bas Poids Moléculaire).

4.2 Suivi des patients sous AVKs

Les anticoagulants AVKs ne sont pas dosés directement mais leur impact sur la cascade de coagulation est évalué grâce au test TP associé au calcul de l'INR (International Normalised Ratio), permettant de standardiser le résultat pour tous les réactifs, quel que soit le fournisseur. Une valeur de sensibilité est déterminée spécifiquement pour caractériser un lot de réactif, par rapport à une préparation de référence internationale. Cette valeur est appelée ISI (Indice de sensibilité international), et permet de calculer l'INR de manière standard entre les laboratoires. Le test TP normalisé consiste en la mesure du temps de Quick, obtenu par la mesure du temps de coagulation du plasma d'un patient induit par la thromboplastine calcique. Pour déterminer la valeur de l'INR du patient, il faut diviser le temps obtenu pour le patient, par le temps de Quick témoin, le tout à la puissance ISI. Le temps témoin peut être soit indiqué par le fournisseur soit déterminé par le laboratoire, en moyennant le temps de Quick d'un nombre suffisant de plasmas individuels normaux (Mean Normal Prothrombin Time : MNPT).

L'INR permet d'ajuster la posologie d'un patient traité par AVK:

Un INR de 1,0 est dit normal pour des patients sans traitement AVK. Un INR entre 2,0 et 3,0 est caractéristique des patients sous AVK en ambulatoire. Une INR supérieure à 4,0 indique un surdosage en AVK. Le test TCA ne peut pas être utilisé pour ajuster le traitement AVK.

4.3 Evaluation du traitement avec test globaux : exemple du suivi des patients héparinés (ou hirudinés)

Le suivi des patients héparinés (ou hirudinés avant l'abandon de cet anticoagulant) s'est fait au cours du temps de différentes manières. Le test TP n'est pas utilisable, d'autant plus qu'en règle générale il contient un inhibiteur de l'Héparine. Le TCA, utilisé au début, a montré ses limites pour le suivi des patients traités. Le test TT, est utile pour mettre en évidence les concentrations résiduelles d'Héparine ou d'Hirudine, en fin de traitement, ou en cas de relais, en particulier associé au dosage du Fibrinogène. Il n'y a, en effet, que deux causes possibles de l'allongement du tests TT : un défaut de Fibrinogène ou la présence d'un anticoagulant anti-IIa.

En cas de dosage Fibrinogène normal, l'allongement du TT chez un patient provient de la présence d'une activité anti-IIa, résultant de l'anticoagulant utilisé (Héparine ou plus rarement Hirudine). Ce test permet de détecter la présence d'un anticoagulant anti-IIa mais ne peut, cependant, pas détecter un anti-Xa, ni indiquer une valeur précise de la concentration en anticoagulant, ce qui est pourtant nécessaire pour ajuster plus précisément la posologie. Les techniques utilisées en pratique pour la mesure de l'activité anticoagulante utilisent les méthodes chromogènes ou coagulantes anti-Xa spécifiques, ou les méthodes anti-IIa. Pour certaines molécules, la concentration massique de l'anticoagulant peut être déterminée par méthode LC:MS/MS, mais cette pratique concerne surtout les études cliniques et la recherche.

4.4 Dosage LC:MS/MS

Avant la mise sur le marché des nouveaux traitements anticoagulants, ceux-ci doivent faire l'objet d'études cliniques, comparativement aux thérapies usuelles, et des tests d'évaluation et de suivi sont nécessaires. Très fréquemment, dans ces études cliniques, les anticoagulants sont dosés par technique de

chromatographie liquide associée à un spectromètre de masse (Liquid Chromatography : Mass Spectrometry ; LC :MS/MS). Le médicament à tester dans le plasma est dans un premier temps séparé par chromatographie. Ensuite il est ionisé dans une cellule dédiée, puis un procédé de nébulisation permet de solubiliser les ions dans de petites gouttelettes et enfin de les individualiser par évaporation du solvant. Au niveau du spectromètre de masse, chaque ion génère un signal électrique dépendant du rapport masse sur charge. Pour terminer, les données sont traitées informatiquement. Cette méthode n'est réalisée que par des centres très spécialisés, disposant de l'équipement adéquat, et n'est pas utilisable dans les laboratoires d'analyse hospitaliers ou de ville. Elle permet d'identifier des molécules particulières et de déterminer leur concentration. Le temps et le coût de réalisation sont très élevés. De plus, l'équipement est très spécifique et volumineux et nécessite des manipulateurs expérimentés. Cette technique de mesure n'est donc pas applicable en routine au laboratoire, contrairement aux dosages chromogènes ou chromométriques des anticoagulants.

4.5 Dosages chromogènes/coagulants

L'utilisation des anticoagulants oraux a nécessité l'adaptation ou la création de tests adaptés pour chaque nouvelle molécule. Ces tests ont été développés en premier pour doser les Héparines ou l'Hirudine, puis ils ont été étendus au dosage des AODs. De ces dosages découlent du mode d'action spécifique des AODs, avec inhibition spécifique de la Thrombine pour le Dabigatran ou du FXa pour le Rivaroxaban, l'Apixaban, l'Edoxaban et le Betrixaban.

4.5.1 Dosage des anti-Xa

L'anticoagulant principal utilisé en péri-opératoire a été pendant longtemps l'Héparine, encore largement utilisée de nos jours. L'Hirudine/Lépirudine, utilisée dans certains contextes particuliers (TIH, CEC,...) a été abandonnée en raison de ses effets secondaires. Pour doser l'Héparine, la méthode la plus couramment utilisée est un dosage en retour anti-Xa réalisé en présence d'AT (de source exogène, apportée par le réactif, ou endogène et présente dans le plasma à tester). Il s'agit d'un test cinétique chromogène, où le FXa en quantité constante et définie est incubé avec le plasma à tester apportant l'AT endogène. La quantité de FXa inhibée est directement proportionnelle à la concentration d'Héparine sur la zone de mesure. Le FXa résiduel est mesuré par son activité sur un substrat chromogène spécifique avec génération de pNA mesuré à 405 nm. Dans le test cinétique, l'inhibition du FXa par l'AT-Héparine a lieu en une seule étape. Cette méthode anti-Xa permet de doser tout médicament inhibant le FXa, et présent dans le plasma des patients. Toutefois, l'utilisation d'une gamme de plasmas de calibration et de plasmas de contrôle de qualité préparés spécifiquement avec chaque médicament à doser est nécessaire afin de quantifier chaque molécule. En effet, chaque molécule avec activité anti-Xa directe ou indirecte a ses propres caractéristiques d'inhibition et sa mesure doit être effectuée de façon « like to like » (c'est-à-dire même molécule pour la calibration que celle à doser). Les gammes obtenues avec l'Héparine ou ses dérivés les méthodes anti-Xa ne sont pas utilisables pour les AODs spécifiques du FXa. Le **tableau 4** montre les tests de dosage pour les anti-Xa indirects, comme l'Héparine ou ses dérivés.

Nom du médicament	HEPARINE CHOAY	LOVENOX	ARIXTRA®	ORGARAN®
Nom de la molécule active	HNF (Héparine Non Fractionnée)	HBPM (Héparine de Bas Poids Moléculaire)	Fondaparinux (Pentasaccharide)	Danaparoïde Sodique
Kit de dosage	Test chromogène dosant tous les anti-Xa (dépendant ou non de l'AT endogène) (Réactif FXa). Les calibrations sont spécifiques à chaque molécule à doser.			
Gammes de dosage	Spécifique de la molécule à doser. De 0,0 à 1,0 ou de 0,0 à 2,0 UI/mL pour HNF, HBPM et Orgaran®. De 0,0 à 1,0 ou de 0,0 à 2,0 µg/mL pour Arixtra®.			

Tableau 4 : Méthodes de dosage des Héparines et anticoagulants indirects anti-Xa dépendant de l'AT endogène.

Contrairement aux Héparines, les AODs anti-Xa ont un pouvoir anticoagulant ne dépendant pas de l'AT : ils neutralisent directement le Facteur Xa. Des tests de dosage spécifiques ont été développés pour mesurer spécifiquement ces AODs anti-Xa, en évitant l'interférence des Héparines. Cela peut permettre de déterminer que l'effet anticoagulant mesuré dépend de l'AOD anti-Xa et non de la présence éventuelle d'Héparine résiduelle, en cas de relais Héparine à AOD ou inversement.

Le dosage des AODs anti-Xa est réalisé à l'aide de tests chromogènes anti-Xa, mais l'AT n'est pas requise. Les tests utilisables sont en 1-temps (cinétiques)*, ou en 2-temps**. Le **tableau 5** présente ces méthodes de dosage anti-Xa disponibles pour les AODs :

Nom du médicament	Xarelto®	Eliquis®	Lixiana®	Bevyxxa®
Nom de la molécule active	Rivaroxaban	Apixaban	Edoxaban	Betrixaban
Action	Anti-Xa	Anti-Xa	Anti-Xa	Anti-Xa
Kits de dosage utilisables	– Tests chromogènes avec anti-Xa : *Dosent tous les anti FXa (directs ou indirects et requérant l'AT endogène). **Dosent seulement les anti-Xa directs. Les tests sont adaptés à chaque molécule à doser – Technique de dosage chromatographique LC:MS/MS			
Gammes de dosage	Gamme basse : 0-100 ng/mL Gamme standard : 30 ou 50 - 500 ng/mL		Non développée	Non développée

Tableau 5 : Méthodes de dosage des Héparines et anti-Xa directs, ne dépendant pas de l'AT.

4.5.2 Dosage des anti-IIa

Pour le dosage de L'Hirudine ou autres anti-IIa directs d'administration parentérale (comme l'Argatroban), deux tests principaux ont été développés : un test chromogène basé sur le dosage en retour d'inhibition de la Thrombine, et un test de coagulation basé sur un temps de Thrombine après dilution du plasma du patient à tester dans du plasma normal. Dans les deux cas la neutralisation de la Thrombine permet de doser précisément l'anticoagulant. Ces deux tests nécessitent l'utilisation d'une gamme de calibration et

d'un protocole adapté spécifiquement à la molécule à doser. Le seul AOD anti-IIa (ou DTI d'administration orale), est le Dabigatran, qui peut également être dosé avec les mêmes techniques, **tableau 6**.

Nom du médicament	Refludan®	Revasc®	Angiox®	Pradaxa®	Arganova®
Nom de la molécule active	Lépirudine*	Désirudine	Bivalirudine	Dabigatran	Argatroban
Kit de dosage utilisable	Tests chromogène et coagulométrique (Réactif FIIa). Les tests sont adaptés pour chaque molécule à doser.				
Gammes de dosage	Gamme basse : 0-2 µg/mL Gamme standard : 0,5- >5 µg/mL	Non développée	A développer	Gamme basse : 0-100 ng/mL Gamme standard : 30 ou 50 - 500 ng/mL	Gamme : 0-2 µg/mL

* La Lépirudine n'est plus utilisée dans la plupart des pays (risque hémorragique et anaphylactique)

Tableau 6 : Méthodes de dosage de la Lépirudine et dérivés et autres molécules anti-IIa.

Parmi les anti-IIa parentéraux, la Bivalirudine, utilisée comme anticoagulant dans la circulation extravasculaire et la chirurgie cardiaque aux Etats-Unis, n'a pas encore de tests permettant son dosage. Les tests anti-IIa pourraient convenir du moment qu'un étalon spécifique de la Bivalirudine est disponible, et que la zone de mesure et le protocole du dosage sont ajustés à ce médicament.

4.6 Tests à usage unique

Pour répondre à la pratique des dosages des AODs quand ils sont requis, la disponibilité de méthodes de détection et quantification rapides et unitaires est souhaitable. Un test urinaire pour les AODs a déjà été développé par une société allemande, DOASENSE. Ce test permet une estimation rapide de la concentration des AODs et ne nécessite aucun appareillage spécialisé : cette méthode utilise une bandelette à usage unique et est semblable à un test de grossesse. Si Les anticoagulants anti-IIa ou/et anti-Xa sont présents dans l'urine, ils colorent une zone spécifique du test, marquant ainsi la positivité. Même si des AODs dont la présence est recherchée ne sont pas majoritairement excrétés par voie urinaire, cette méthode reste efficace, puisque la concentration des AODs dans l'urine est supérieure à la concentration sanguine, évaluée sur plasma. En effet, le volume de distribution des AODs est plus faible dans l'urine que dans le sang, en raison de liaisons non spécifiques moins nombreuses (Harenberg et al., 2019). Pour la plupart des AODs, les études cliniques renseignent sur une concentration normale thérapeutique dans le plasma mais il existe, à cette date, peu de données de ce genre pour les concentrations urinaires. Ainsi, l'utilisation d'une méthode semi-quantitative avec un test urinaire ne serait pas suffisante pour le suivi des patients. Par conséquent, en plus de ce test urinaire à usage unique, les industriels pensent aussi à développer un test semi-quantitatif dosant les AODs dans le plasma et qui pourrait se substituer aux tests coagulants ou chromogènes, en vue d'une utilisation dans un contexte d'urgence.

4.7 Les tests commerciaux utilisés pour le suivi des traitements

4.7.1 Les Tests fonctionnels d'HYPHEN BioMed

HYPHEN BioMed est une société créée en 1999, et qui a développé de nombreux kits pour doser les anticoagulants. Les principaux coffrets de dosage des anticoagulants comprennent des étalons spécifiques des molécules à doser et des contrôles de qualité en plasma, associés aux réactifs de dosages spécifiques. Les principaux dosages concernent :

- Les anticoagulants injectables anti- Xa : Coffret BIOPHEN™ HEPARIN-LRT (réactif liquide). Des plasmas étalons et des contrôles spécifiques sont commercialisés pour les dosages des Héparines non fractionnées ou de bas poids moléculaire, ainsi que pour les l'Orgaran® et l'Arixtra®.
- Les AODs anti-Xa : un coffret spécial a été développé, le Kit BIOPHEN™ DiXaI, dosage anti-Xa en 2-temps, qui limite l'interférence des anticoagulants anti-Xa requérant l'AT, principalement les Héparines. Des gammes de plasmas étalons et de contrôles de qualité adaptés et lyophilisés ont été développés pour l'Apixaban et le Rivaroxaban. Il est à noter que ces AODs peuvent être également dosés avec le kit BIOPHEN™ HEPARIN-LRT, mais en cas de présence d'Héparine dans l'échantillon testé le résultat est surévalué.
- Les anti-IIa injectables : Coffret réactif BIOPHEN™ DTI (Lyophilisé) ou HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors, utilisables pour doser les Hirudines (lorsque ce médicament était utilisé) et l'Argatroban, avec toujours des étalons et contrôles spécifiques proposés pour chaque molécule.
- L'AOD anti-IIa Dabigatran, qui peut être dosé avec les coffrets BIOPHEN™ DTI et HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors grâce aux étalons et contrôles spécifiques développés pour cette molécule.

Dans le contexte hospitalier, ces réactifs sont utilisés sur des automates qui permettent de gérer un grand nombre d'échantillons. Pour chaque molécule à doser et chaque méthode utilisée, un protocole est spécifiquement développé et validé pour les dosages sur automates. Chaque protocole, ainsi adapté à un automate particulier, est appelé sous le terme générique : « adaptation ». Accessoirement, ces méthodes sont également utilisables en protocole manuel en point final. Chaque automate nécessite une adaptation particulière. La particularité d'HYPHEN BioMed est d'être spécialisé sur les réactifs d'hémostase et de proposer des méthodes de dosage multiplateformes, utilisables sur les divers instruments disponibles en laboratoire.

4.7.2 Les Tests fonctionnels des principaux concurrents

Les principaux concurrents d'HYPHEN BioMed pour les tests Héparine-anti Xa, nécessitant AT endogène, sont les suivants :

- **HemosIL** – Liquid Heparin (dosage de l'Héparine HNF ou HBPM)
- **STAGO**- STA®- Liquid anti-Xa/Stachrome Heparin
- **SIEMENS**- Berichrom Heparin; Innovance Heparin
- **TECHNOCLONE**- anti-Xa® Technoclone.

Le principal concurrent pour les tests des AODs anti-Xa et anti-IIa directs est la société STAGO qui propose deux tests :

- **STAGO** - Liquid anti-Xa® pour le dosage des anti Xa

- **STAGO** - STA ECA II pour le dosage des anti IIa.

Cette liste n'est pas exhaustive et ne représente pas l'éventail de tous les tests présents sur le marché. Les concurrents d'HYPHEN-BioMed ont aussi leurs propres automates sur lesquels leurs propres tests sont adaptés.

4.7.3 Les automates

Il existe 4 types principaux d'automates dans les laboratoires, permettant la réalisation des tests chromogènes ou coagulants d'hémostase, qui sont :

- Gamme STA-R® (Diagnostica Stago, France)
- Gamme ACL-Top® (Werfen – IL, Italie, Espagne)
- BCS-XP et Attelica COAG 360® (Siemens, Allemagne)
- Gamme CS® (Siemens, Japon)

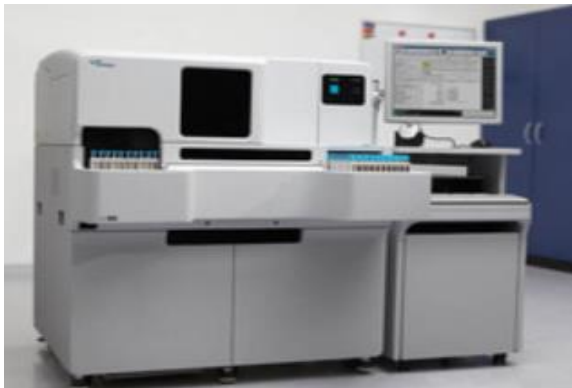
Pour les tests chronométriques, la détection de la formation du caillot peut être réalisée de façon mécanique, comme c'est le cas pour le STA-R, ou de façon optique, par modification de l'absorbance lors de la coagulation, comme c'est le cas pour les autres instruments.

Ces 4 groupes d'automates sont disponibles dans le monde entier. Ils sont capables de gérer plusieurs tests et plusieurs échantillons simultanément, en utilisant en général les réactifs fournis par les fabricants des automates. Les adaptations informatiques sont généralement fournies avec l'automate sous forme informatique, et sont associés aux réactifs spécifiques. Les fabricants de réactifs et d'automates proposent en général des services forfaitaires pour accompagner les clients après leur acquisition. Pour une utilisation routinière et optimale des réactifs, des maintenances sont réalisés régulièrement par ces fournisseurs. HYPHEN-BioMed, en proposant des réactifs utilisables sur les différents automates, accompagne les clients dans l'installation et l'utilisation des réactifs proposés, et propose une adaptation pour chaque machine particulière. Les différents automates ont des fonctionnements similaires pour la mécanique et la lecture spectrophotométrique, mais il y a une grande différence de performances dans la gestion des réactifs et la cadence de réalisation des tests.

J'illustre sur **la figure 15** le fonctionnement des automates en citant l'exemple du CS5100. C'est l'automate le plus performant de la gamme CS de chez Sysmex.

Les protocoles des tests développés peuvent être totalement gérés par cet automate, une fois programmé. L'automate dispose de plusieurs bras équipés chacun de pipettes, et peut prélever de manière précise les volumes d'échantillons et de réactifs. Les réactifs et les échantillons sont prélevés et déposés dans les cuvettes réactionnelles. Après chaque étape, un temps d'incubation précis peut être programmé. Entre chaque prélèvement, un lavage des pipettes de prélèvement est réalisé (afin d'éviter toute contamination entre dosages) et l'intensité de ce lavage est programmable (adapté au risque de contamination des réactifs prélevés). Dans le cas de réalisation d'un test chromogène, la réaction colorée est lue en continu grâce à un système spectrophotométrique intégré.

Les automates de gamme CS (CS5100-CS2500-CS2100) [SYSMEX] fonctionnent sur une détection optique. L'automate CS 5100 permet la réalisation de grandes séries, dans des temps très courts (**figure 15**).



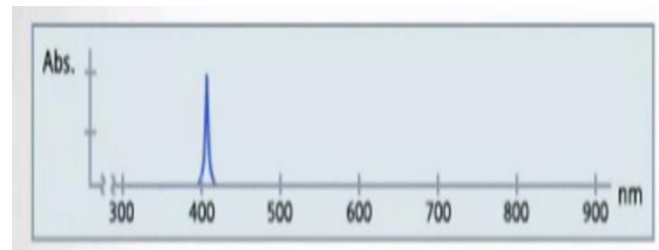
A



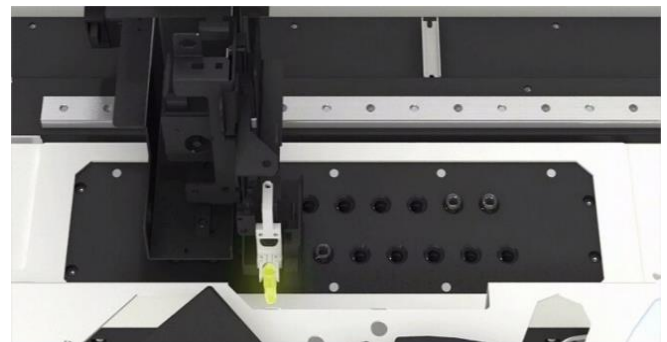
B



C



D



E

Figure 15 : Exemple d'automate de la gamme CS. Apparence globale de l'appareil automatique, CS 5100 capot fermé (A) et capot ouvert (B). Lecture de la densité optique selon le filtre de longueur d'onde sélectionné (C), sélection de la longueur d'onde adéquate (405 nm) (D). Bras pour le prélèvement des cuvettes réactionnelles (E). La longueur d'onde utilisée est ici de 405 nm et correspond à la coloration jaune produite par la libération d'un peptide, le pNa.

Pour chaque mesure, la cinétique de la réaction est générée automatiquement, et donne la Densité Optique (DO) par rapport au temps de réaction. La DO indiquée correspond à la mesure brute, et est exprimée en DO/min par l'automate (**figure 16**).

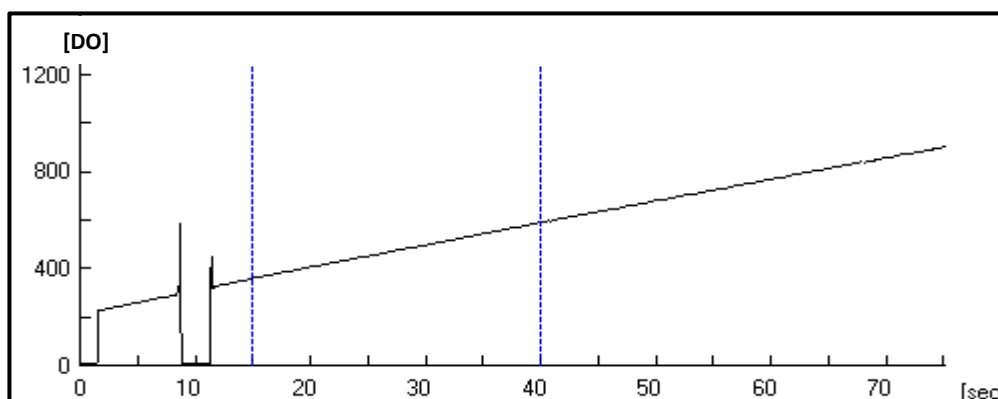


Figure 16 : Exemple de la mesure cinétique de la DO avec l'automate CS.

La Densité optique est mesurée sur la fenêtre de lecture entre 15 et 40 secondes à 405 nm. Elle est ensuite exprimée en DO/min

La lecture optique des CS permet de détecter les réactions coagulantes à la longueur d'onde de 660 nm et de les transcrire informatiquement. Toutefois, pour le Fibrinogène la longueur d'onde utilisée est de 405 nm, l'utilisation d'un plasma dilué permet d'utiliser cette longueur d'onde qui permet d'obtenir un signal de mesure plus sensible. En coagulation, quelque-soit la longueur d'onde utilisée, la lecture optique permet de mesurer l'opacification du milieu réactionnel, grâce à la lumière transmise. Le traitement informatique de la transmission de la lumière dans le temps à travers le milieu réactionnel peut être visualisé sous forme d'une courbe comprenant deux paliers, le premier palier représentant le temps avant l'apparition du coagulum est suivi d'une pente descendante correspondant à la courbe de polymérisation du caillot lors de la coagulation. Le palier final marque l'aboutissement du processus de coagulation. Différents paramétrages permettent de régler la sensibilité de la détection entre les deux plateaux, de début et de fin de réaction : le réglage des $\Delta T/\text{sec}$ (baisse de la transmission par seconde), différenciellement, permet de définir les deux plateaux et la pente matérialisant la réaction de coagulation. Le pourcentage de la coagulation globale, à laquelle la mesure du **TC** (temps de coagulation) est effectuée, peut-être réglé également, 100% de coagulation correspondant à la différence totale de transmission entre le début et la fin de la coagulation située entre les deux plateaux. Selon la force de la coagulation obtenue, et son aspect, les deux paliers et la pente peuvent être plus ou moins marqués. Par exemple, dans le cas d'une courbe de polymérisation peu marquée, il est possible d'augmenter la valeur du $\Delta T/\text{sec}$ pour les phases de plateau : Dans ce cas, l'écart entre le $\Delta T/\text{sec}$ déterminant le plateau et la pente de coagulation est plus réduit. Il est aussi possible de jouer sur le pourcentage total de la réaction de coagulation pour fixer le TC. Si ce pourcentage est réduit, le TC obtenu est raccourci, ce qui permet d'avoir des temps acceptables pour une réaction de coagulation faible. Par exemple, une sensibilité de 20% indique le temps nécessaire pour atteindre 20 % de coagulation, et donne un temps plus court que si ce pourcentage est réglé à 50%, pour une même réaction coagulante (**figure 17**).

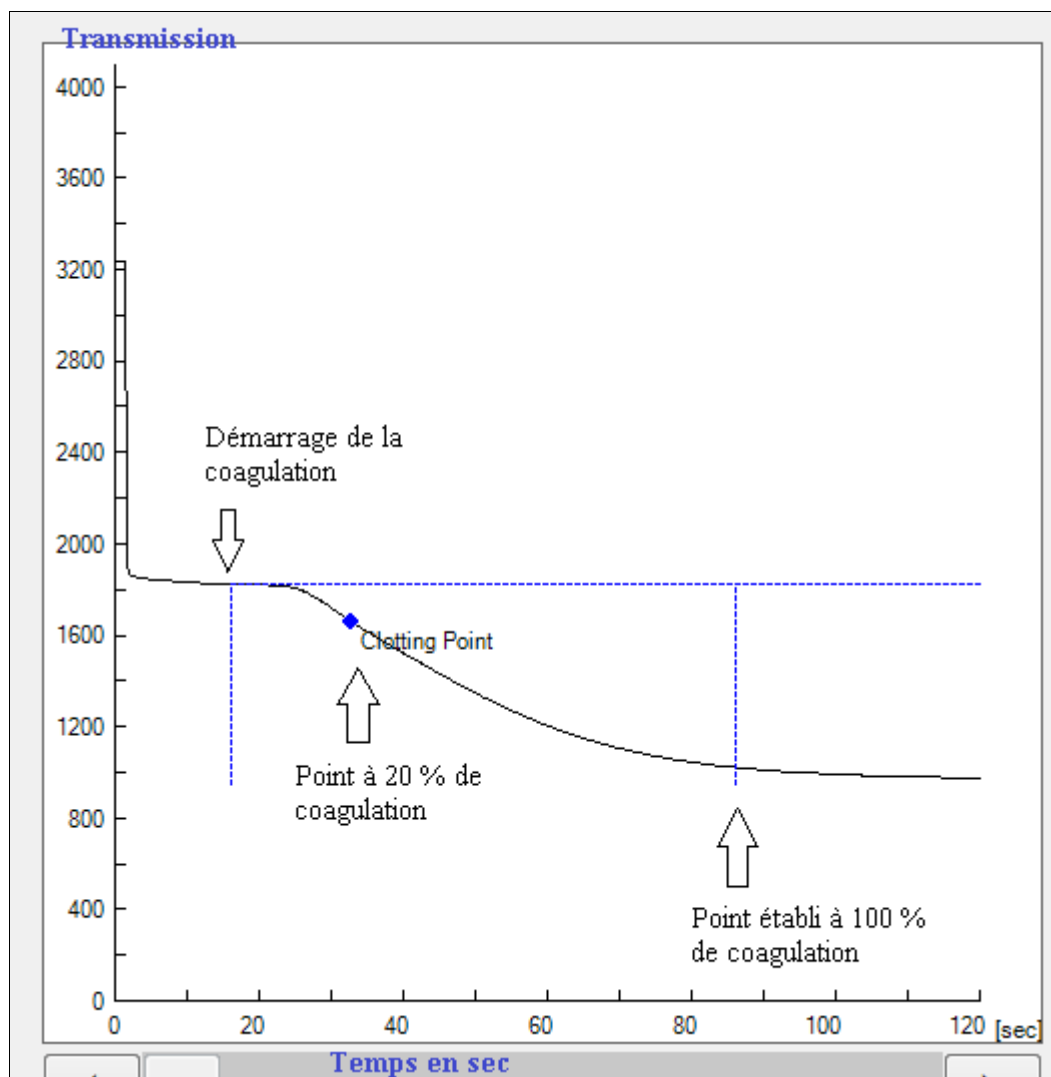
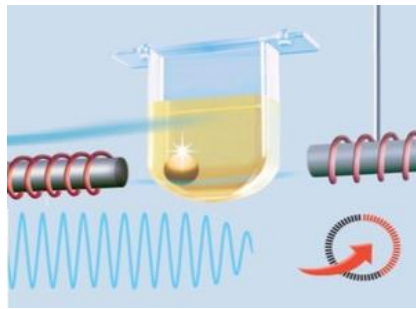


Figure 17 : Exemple de la mesure de la coagulation à l'aide de l'automate CS.

Mesure de la cinétique de la transmission optique de la coagulation. Les deux traits verticaux bleus montrent la fenêtre de lecture de la réaction de coagulation. Les deux plateaux sont, pour celui du début, avant le premier trait vertical bleu et, pour celui de la fin, après le deuxième trait vertical bleu. Le réglage de $\Delta T/\text{sec}$ marque le plateau, même si la variation de Transmission continue de diminuer au niveau du plateau de fin de réaction. Ces réglages sont différentiels pour le début et la fin de la réaction. Le point 20% de coagulation indique le temps de lecture de la coagulation. Jouer sur ces réglages permet d'ajuster la détection du caillot en fonction de sa force.

Les automates de Siemens et I-L détectent de la même manière les réactions de coagulation par une lecture optique, mais l'automate STA-R de STAGO dispose d'une lecture mécanique par barreau aimanté. Le principe de la détection mécanique du caillot est indiqué ci-après (**figure 18**).



A



B

Figure 18: Coagulation sur automate STAR [Diagnostica-STAGO] en coagulation en détection mécanique: Détection mécanique par arrêt d'agitation d'une bille aimantée en mouvement dans un champ magnétique (A) ; automate STAR (B).

Pour cette gamme d'automates, la mesure de la coagulation est plus directe que sur les automates CS, car elle repose sur l'arrêt du mouvement d'une bille aimantée dans le milieu réactionnel, dès que la coagulation apparaît. En effet, la cuvette où se déroule la réaction avec l'échantillon et les réactifs est munie d'une bille aimantée qui est soumise à un champ magnétique et qui par conséquent se met à osciller. L'apparition du caillot provoque l'arrêt du mouvement de la bille métallique. Le temps mesuré, entre l'ajout du réactif déclenchant et cet arrêt, marque le temps de coagulation. En programmation, les réglages de caillot faible moyen ou fort permettent d'ajuster la force du mouvement de la bille dans le champ magnétique, afin de détecter toutes sortes de coagulation.

5. Objectifs du travail

Mon mémoire est réalisé dans le cadre des activités de la société HYPHEN-BioMed, dont l'objectif est de développer, produire et commercialiser des tests de diagnostic innovants pour l'exploration de l'hémostase et de la thrombose. Ces réactifs sont destinés aux laboratoires d'analyses, afin de répondre aux attentes des cliniciens.

L'objectif de ce travail a été de développer diverses méthodes permettant de mesurer l'activité de plusieurs anticoagulants, en particulier ceux introduits récemment ou en cours d'introduction, dans le plasma des patients. Ces anticoagulants inhibent le FIIa ou le FXa, soit directement (Inhibiteurs directs), soit indirectement en potentialisant l'action de l'AT, comme l'Héparine et ses dérivés (Héparines non fractionnées, Héparines de bas poids moléculaires, Danaparoïde de sodium, Fondaparinux). Grâce à la mise à disposition de ces tests, pouvant être utilisés pour l'ajustement de la posologie comme pour l'HNF ou les HBPM, une meilleure maîtrise du risque de saignement est possible. Le dosage de l'anticoagulant est particulièrement utile avant de procéder à des interventions d'urgence, en s'assurant que sa concentration sanguine n'expose pas le patient à des complications hémorragiques.

La première partie de mon travail a consisté à développer de nouveaux tests pour le dosage d'anticoagulants directs. J'expose les différentes étapes pour le développement de tests pour le dosage de l'Edoxaban et de la Bivalirudine dans le plasma de patients, en insistant particulièrement sur les méthodes et outils développés pour établir ces dosages de manière standardisée.

L'Edoxaban peut être dosé directement à l'aide de tests anti-Xa chromogènes en méthode 2-temps, ou en méthode cinétique 1-temps, en utilisant dans les deux cas la capacité de cet AOD à neutraliser le Facteur Xa.

Pour tester la fiabilité des tests que nous mettons au point pour doser **l'Edoxaban**, nous cherchons à déterminer si la présence de ses métabolites, produits dans le corps humain, perturbe la précision et l'efficacité des dosages. Pour cela, l'activité inhibitrice sur le FXa de chaque métabolite important a été étudiée par comparaison avec celle de l'Edoxaban. De ces résultats nous tirons nos conclusions sur l'efficacité des dosages élaborés par rapport à la méthode de référence LC:MS/MS, en s'appuyant sur des études cliniques.

Le dosage de la Bivalirudine, inhibiteur direct du FIIa, est développé à partir d'un test anti-IIa chromogène en méthode cinétique 1-temps ou en utilisant le test coagulant du Temps de Thrombine dilué en plasma normal. Ces deux tests ont pour principe la capacité de la Bivalirudine à neutraliser la Thrombine, ce qui donne une relation inverse entre DO et concentration de Bivalirudine pour le test chromogène, et une relation directe entre concentration et temps de coagulation pour le test chronométrique. Pour cet anticoagulant, les deux dosages développés ne présentent pas le même profil d'interférences des molécules biologiques ou des médicaments pouvant être présents dans le plasma des patients. Nous comparons les deux tests développés pour les interférences, ce qui nous amène à conclure pour les applications cliniques l'intérêt d'utiliser l'un ou l'autre de ces tests.

L'objectif de la seconde partie de mon travail consiste à améliorer des tests déjà disponibles. Nous abordons différentes manières d'améliorer le suivi des patients en modifiant certains dosages

commercialisés. Ces tests sont utilisés en diagnostic dans les laboratoires d'analyses depuis de nombreuses années mais présentent certaines limites :

- D'une part nous étudions un moyen de réduire l'interférence des Héparines et dérivés dans un test anti-Xa en deux temps, couramment utilisé pour doser les anticoagulants oraux (AODs) anti-Xa, le test BIOPHEN™ DiXal. Nous allons aussi étudier la possibilité de supprimer cette interférence dans le test cinétique BIOPHEN™ HEPARIN-LRT. En effet, beaucoup de sites préfèrent n'avoir à utiliser qu'un seul test Anti-Xa, pour doser tous les médicaments avec activité indirecte ou directe anti-Xa. La suppression de l'interférence de l'Héparine dans ces dosages permet de mesurer spécifiquement les AODs, en particulier lors du relais thérapeutique. Chaque activité anticoagulante peut être ainsi estimée séparément. Ces situations peuvent se présenter en cas d'intervention chirurgicale urgente nécessitant une héparinothérapie, chez un patient traité par un AOD anti-Xa où après ce type d'opération, lorsqu'un AOD anti-Xa est prescrit.
- D'autre part, la présence des AODs dans le plasma des patients traités perturbe les tests de coagulation de routine TP, TCA et TT, qui sont alors inopérants pour diagnostiquer des problèmes de coagulation. Nous allons donc tester un procédé de neutralisation des AODs dans le plasma avant réalisation des tests de coagulation. En supprimant cette interférence, cela permet d'utiliser à nouveau ces tests de façon fiable chez les patients sous traitement AOD. Dans la partie discussion, nous évoquons l'apport que ces nouveaux procédés pour la pratique diagnostique.

La dernière partie de mon travail a concerné le développement d'un nouveau concept de dosage des AODs, appliqué au Dabigatran. C'est un test sur bandelette, réalisable en sang total, et ne nécessitant aucun appareillage de laboratoire (automate, centrifugeuse...), autre qu'un mini-lecteur pour la mesure de l'intensité de la réaction. Dans le but de fournir le meilleur outil possible à la fois aux médecins et pour le bénéfice des patients, nous étudions la possibilité de réaliser **ce test en méthode semi-quantitative, avec une détermination précise au niveau du seuil de signification clinique. L'essai utilise comme modèle d'AOD, l'anticoagulant anti-IIa, Dabigatran** avant de poursuivre éventuellement sur le dosage d'autres AODs. Dans la partie discussion nous abordons la faisabilité de ce nouveau procédé.

III MATERIELS ET METHODES

1 Mise au point et études des tests de dosages de l'Edoxaban et la Bivalirudine

1.1 Automates STAR et CS-5100 utilisés pour les mesures coagulantes et chromogènes dans les dosages

Les automates utilisés pour mettre au point les dosages de l'Edoxaban et de la Bivalirudine sont le **CS5100 de Sysmex**, dont la lecture optique permet à la fois la mesure chromogène à 405 nm ou coagulante à 660 nm, et l'automate **STAR de Stago**, qui dispose d'une lecture optique pour les tests chromogènes et d'une lecture mécanique pour les méthodes coagulantes. Les mécanismes de mesure ont été présentés en introduction pour chacun de ces automates. Nous décrivons dans ce mémoire les adaptations des protocoles qui ont été validés, pour doser l'Edoxaban et la Bivalirudine.

Pour les méthodes chromogènes les protocoles présentés sont adaptés sur l'automate CS5100 : les tests B. DiXal et B. HLRT pour le dosage de l'Edoxaban et le test B. DTI pour doser la Bivalirudine.

La méthode coagulante par détection mécanique est présentée pour l'automate STA-R, dans le dosage de la Bivalirudine par le test HTI.

Le protocole le plus approprié, la dilution de l'échantillon, la fenêtre de lecture pour les tests chromogènes ou le réglage de la force de détection du caillot pour la méthode coagulante, ainsi que le choix des volumes de réactifs et les temps d'incubation ont nécessités plusieurs essais préalables non décrits dans ce mémoire. Ces paramètres relèvent de la mise au point des protocoles dont le choix final a été résumé sur l'annexe 2 pour les protocoles Edoxaban et l'annexe 3 pour les protocoles Bivalirudine.

1.2 Dosage de l'Edoxaban

1.2.1 Les outils de dosage

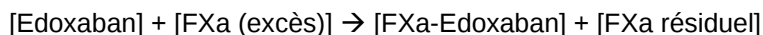
L'Edoxaban a une affinité 10 000 fois supérieure pour le FXa que pour la Thrombine (FIIa). La spécificité de cette activité anti-Xa est utilisée pour l'élaboration d'un test chromogène. Ce dosage peut être réalisé grâce à l'utilisation d'un ensemble de réactifs développés et commercialisés par la société HYPHEN BioMed. Plus particulièrement, deux trousse (ou kits) de dosage de l'activité anti-Xa sont disponibles : le coffret BIOPHEN™ HEPARIN LRT (B. HLRT - méthode chromogène cinétique) et le coffret BIOPHEN™ DiXal (B. DiXal - méthode chromogène en 2-temps) : le FXa en concentration constante et en excès est incubé avec l'échantillon contenant l'anticoagulant à doser, ce qui l'inhibe de façon dose dépendante. Le FXa résiduel est ensuite mesuré par son action catalytique sur un substrat chromogène spécifique donnant un composé coloré dont la coloration peut être lue à 405 nm, le pNA.

1.2.2 Principe du test B. DiXal

Le test B DiXal fonctionne en deux temps réactionnels. La première étape met en présence l'échantillon contenant l'Edoxaban avec le réactif FXa, ce qui provoque sa neutralisation à concurrence de la concentration d'Edoxaban. Dans la seconde étape, le FXa en excès réagit avec le substrat (**Figure 19**). Le coffret B. DiXal est

composé de deux réactifs R1 et R2, lyophilisés et reconstitués par 2,5 mL d'eau distillée lors de l'utilisation, et d'un tampon R3. Le réactif R1 contient le FXa et le réactif R2 le substrat spécifique du FXa. Le principe du test est présenté sur la **figure 19**.

1° étape : Réactif Xa incubé avec le plasma de patient contenant l'Edoxaban, qui inhibe le FXa



2° étape : Réaction du Facteur Xa résiduel qui clive le substrat, générant le pNa

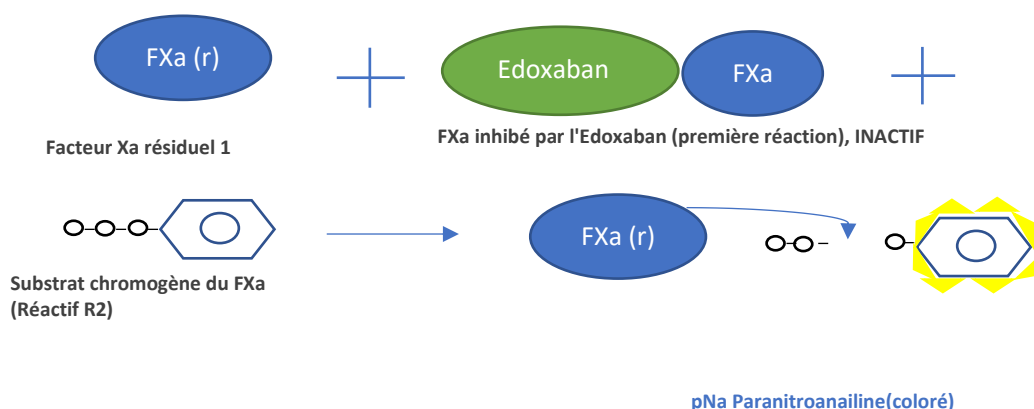


Figure 19 : Principe réactionnel avec le coffret B. DiXal

Dans cette méthode, il y a une réaction en deux temps distincts. L'échantillon à tester (et contenant l'Edoxaban) est mélangé avec le FXa en excès, qui réagit avec l'Edoxaban et est inhibé. Le substrat est ajouté ensuite, ce qui déclenche la réaction chromogène. Le FXa résiduel (FXa (r)) va cliver le substrat ce qui va libérer du pNa. Le pNa produit une coloration jaune, mesurable à 405 nm. Il y a une relation indirecte entre la concentration d'Edoxaban, et la quantité de FXa résiduel, donc de pNa généré et de la DO à 405 nm.

Composition du coffret B. DiXal : R1 : Réactif FXa - R2 : Substrat du FXa – R3 : Tampon du coffret

1.2.3 Principe du test B. HLRT

La trousse de réactifs B. HLRT, est destinée au dosage des Héparines (non fractionnées ou HNF ou les Héparine bas poids moléculaire ou HBPM), par méthode cinétique anti-Xa, en présence d'Antithrombine (AT) endogène, nécessaire pour exprimer l'activité anticoagulante des HNF ou HBPM. Ce coffret peut aussi bien être utilisé pour doser les Héparines (anticoagulant inhibant de manière indirecte le Facteur Xa en présence d'AT) que les AODs (anticoagulants oraux directs) comme l'Edoxaban, dirigés contre le FXa, l'AT n'étant pas nécessaire dans ce cas. La réaction est réalisée en un seul temps réactionnel et il y a compétition du FXa pour cliver le Substrat et générer le pNa ou pour réagir avec l'Edoxaban qui l'inhibe (**figure 20**). La méthode est dite cinétique. Le coffret B. HLRT

ne nécessite pas de reconstitution par de l'eau distillée, il est composé de deux réactifs R1 et R2 sous forme liquide. La réalisation du test nécessite du sérum physiologique, qui n'est pas fourni mais est disponible en laboratoire. Le réactif R1 contient le substrat spécifique du FXa et le réactif R2 le FXa.

1° étape : Non réactionnelle ; le substrat Edoxaban est incubé avec le plasma du patient contenant l'Edoxaban (ce qui ne produit aucune réaction)

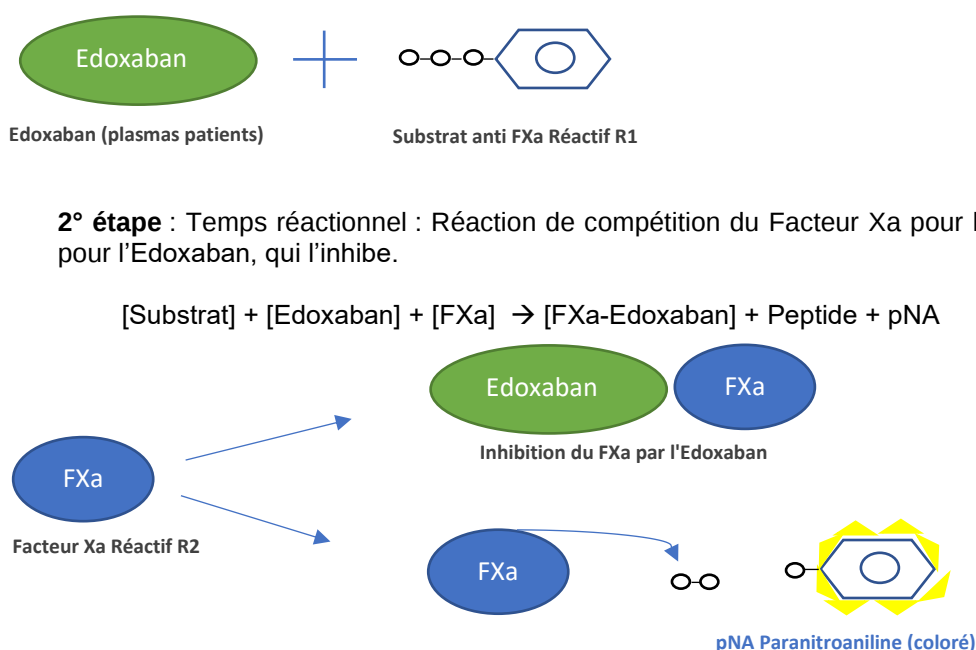


Figure 20 : Principe réactionnel avec le coffret B. HLRT.

L'échantillon à tester (et contenant l'Edoxaban) est mélangé avec le substrat spécifique du FXa, et le FXa est ajouté ensuite, ce qui déclenche la réaction chromogène. La réaction est dite cinétique ou de compétition. Dans cette méthode, il y a une réaction simultanée du FXa avec l'Edoxaban (qui l'inhibe) et l'hydrolyse du substrat, par le FXa en excès. La cinétique de génération de pNA (coloration mesurée à 405 nm) est donc ralentie en présence d'Edoxaban, de façon dose-dépendante. Il y a une relation inverse entre la concentration d'Edoxaban et la DO mesurée à 405 nm.

Composition du coffret B. HLRT : R1 : Substrat du FXa - R2 : Réactif FXa

Tampon : Sérum physiologique (0,15 M NaCl), non fourni avec le coffret.

1.2.4 Intérêt des deux coffrets

Le kit B. DiXal est insensible à l'Héparine (jusqu'à 0,5 UI/mL), car la réaction est réalisée en présence d'une force ionique élevée (Réactif R3) qui dissocie l'interaction AT-Héparine, et est donc spécifique des AOD dirigés contre le FXa.

Le B. HLRT permet, quant à lui, de détecter l'activité anti-Xa globale dans un plasma de patient. En cas de transition d'un anticoagulant hépariné vers un AOD anti-Xa ou d'un AOD vers une Héparinothérapie, comme les

2 médicaments ont une activité anti-Xa, et que seule l'Héparine nécessite de l'AT, le B. DiXal permet un dosage spécifique de l'activité anti-Xa induite par l'AOD pour des patients ayant été sous Héparine.

1.2.5 Préparation des étalons et contrôles Edoxaban et des plasmas enrichis en métabolites

Pour mettre au point une trousse complète de dosage, il faut proposer une gamme de plasmas étalons, avec des concentrations connues d'Edoxaban, qui permettent de réaliser une courbe d'étalonnage couvrant la zone de mesure des plasmas de patients à tester. Ces plasmas étalons Edoxaban sont obtenus en ajoutant une concentration précise d'Edoxaban à un pool de plasmas.

Poches de Plasmas Humains :

Comme les dosages d'Edoxaban chez les patients sont effectués sur plasma citraté obtenu à partir du sang total citraté centrifugé, il faut donc réaliser des étalons en matrice plasmatique. Il est nécessaire de constituer un pool de plusieurs plasmas normaux citratés, ne contenant pas de trace de l'anticoagulant à doser. Ce pool est préparé à partir de poches de plasma (à usage non thérapeutique) fournies par l'Etablissement Français du Sang (EFS), dans le cadre d'une convention. Ces poches permettent d'obtenir le pool de plasma nécessaire à la réalisation des étalons et des plasmas de contrôle de qualité, après addition de la quantité requise d'Edoxaban. Le pool est supplémenté en Mannitol, pour permettre une meilleure dissolution du lyophilisat, en glycine et Hépès pour maintenir le pH, ce qui occasionne après lyophilisation un épaississement de la galette.

Edoxaban :

L'Edoxaban est une molécule apolaire (**figure 21**). Elle est fournie sous forme de poudre par la société DAIICHI et constitue le principe actif du médicament prescrit au patient, le LIXIANA.

L'Edoxaban n'est pas directement miscible dans l'eau. Il doit être d'abord dissout dans un solvant organique ou en solution saline acidifiée. En pratique, après étude des conditions de solubilisation, nous utilisons le DMSO pour préparer une solution mère d'Edoxaban à 500 µg/mL. Cette solution d'Edoxaban est ensuite diluée dans un tampon Tris 0,05M, DMSO-25% pH : 7,4 , pour constituer une gamme 50 fois concentrée d'Edoxaban (par rapport aux concentrations finales ciblées dans le plasma). Ces solutions sont diluées au 1 /50 en plasma pour obtenir les concentrations finales souhaitées (**tableau 7**). Lors de sa dissolution, l'Edoxaban perd un groupement moléculaire (le Tosylate) dont il faut tenir compte lors de la pesée, pour déterminer les concentrations massiques exactes de molécule active. Il faut aussi prendre en compte le degré de pureté fourni par le fabricant.

Les étapes de préparation des plasmas de calibration et de contrôle peuvent être réalisées de façon extemporanée, en supplémentant des pools de plasmas fraîchement décongelés. Toutefois, comme le but est de fabriquer des plasmas Edoxaban pour la réalisation d'une trousse complète de dosage, contenant les étalons et les contrôles d'Edoxaban en plasma, stables dans le temps, ces préparations devront être proposées sous forme lyophilisée, ce qui permet de conserver plusieurs années ces plasmas étalons et contrôles. Les concentrations d'Edoxaban à mesurer chez les patients traités peuvent être très variables, allant de fortes concentrations > 600 ng/ml en cas de surdosage, à < 30 ng/ml, concentration en dessous de laquelle une intervention chirurgicale est considérée être sans risque hémorragique lié à l'anticoagulant.

Tout au long de l'étude, différents étalons ont été réalisés et il a été déterminé que selon la sensibilité de la méthode il est préférable de réaliser 2 gammes d'étalons permettant des dosages d'Edoxaban à des niveaux

différents : la gamme basse pour doser l'Edoxaban dans une zone de 0 à 100 ng/mL et une gamme haute pour les concentrations d'Edoxaban de 80 à 500 ng/mL. Les échantillons d'Edoxaban, dont la concentration est supérieure à 500 ng/mL doivent alors être retestés après complément de dilution en plasma normal. Les taux exacts d'Edoxaban, dans les préparations lyophilisées, sont déterminés, en parallèle, par méthode LC:MS/MS, grâce à notre collaboration avec Daiichi.

En pratique, la gamme d'étalonnage basse présente 3 niveaux en ciblant les concentrations 0, 50 et 100 ng/mL d'Edoxaban pour la gamme basse et 3 niveaux, 0, 250, et 500 ng/mL pour la gamme haute (cette dernière gamme d'étalonnage est appelée standard) (**tableau 7**). Pour chaque gamme, 2 contrôles de qualité sont fabriqués, permettant de valider la courbe de calibration. Pour la gamme basse, les contrôles fabriqués sont ciblés à 50 et 75 ng/mL et pour la gamme haute (ou Standard) à 150 et 350 ng/mL. Les contrôles sont préparés à des jours différents, avec des plasmas différents. Ils permettent de valider la courbe de calibration, en début et en fin de manipulation et d'un jour sur l'autre, ce qui permet d'éviter de refaire la calibration.

En pratique, la quantité d'Edoxaban surchargée dans les plasmas de calibration et de contrôle de qualité, est augmentée de 10% par rapport aux concentrations ciblées, afin de tenir compte d'une légère diminution des concentrations mesurées sur plasma lyophilisé et reconstitué avec l'eau distillée. Cela est dû d'un part au fait que le volume est très légèrement supérieur après reconstitution par rapport au volume distribué dans le flacon, et d'autre part à l'effet du processus de lyophilisation.

Les concentrations ajoutées sont ainsi de :

Gamme basse : 0, 55 et 110 ng/ml pour les étalons ; 55 et 82,5 ng/ml pour les contrôles.

Gamme haute : 0, 275 et 550 ng/ml pour les étalons ; 165 et 385 ng/ml pour les contrôles.

Origine	Edoxaban 50X en tampon Tris 0,05 M–DMSO 25%					
Préparation	pour Gamme Basse			pour Gamme Standard		
Edoxaban en tampon Tris 0,05M-DMSO 25% (en µg/mL)	0	2,75	5,50	0,0	13,75	27,5
Dilution en pool de plasma normal	Si 400 mL sont à Lyophiliser : 8 mL des solutions 50X + 392 mL de pool de plasma normal. Une augmentation de 10% des concentrations est nécessaire dû au volume de la galette s'ajoutant après la lyophilisation et la reconstitution (1,0 mL reconstitué correspond à 1,1 mL final).					
Répartition	Sous 1,0 mL puis Lyophilisation.					
Concentration avant Lyophilisation (en ng/mL)	0	55	110	0	275	550
Concentration « attendue » après Lyophilisation (en ng/mL)	0	50	100	0	250	500

Tableau 7 : Préparation des étalons Edoxaban. Les contrôles Edoxaban sont préparés de la même manière pour la gamme basse et standard à un jour différent et avec un pool de plasma différent.

Les flacons obtenus lyophilisés contiennent une concentration définie d'Edoxaban après reconstitution par 1,0 mL d'eau distillée. Ces flacons de concentrations précises sont utilisables pour réaliser les dosages d'Edoxaban. Les lots prototypes de plasmas Edoxaban étalon ou contrôle de qualité pour la gamme basse et standard sont

réalisés avec 400 flacons de chaque niveau, ce qui permet de réaliser un nombre important de dosages pour valider les tests développés.

L'**annexe 1** présente le processus de lyophilisation.

Trois lots sont produits de façon identique pour fabriquer les étalons et contrôles de qualité.

Le processus de Lyophilisation n'occasionnant les mêmes écarts entre surcharge et produit lyophilisé, les étalons et contrôles sont testés, après lyophilisation, par la méthode de référence de dosage chromatographique, LC:MS/MS. Des concentrations précises peuvent, ainsi être attribuées à chaque étalon et contrôle, grâce à cette méthode de référence.

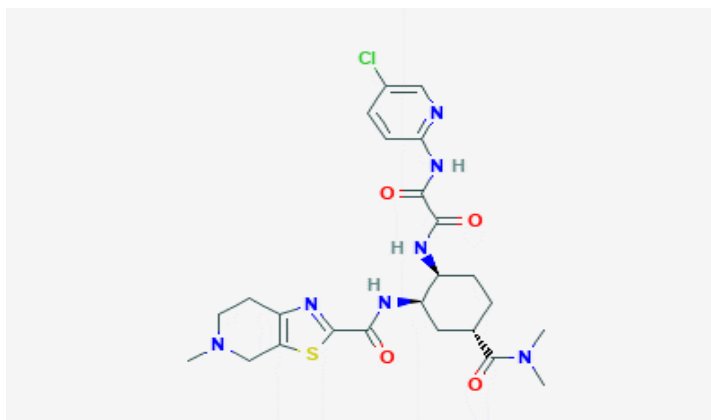


Figure 21: Représentation de l'Edoxaban purifié en solution :

Lors de sa mise en solution, la masse molaire de l'Edoxaban est de 548,06 g/mol (après le détachement d'un groupement Tosylate non réactionnel). Le fournisseur est DAIICHI. Lors de la pesée il faut tenir compte du groupement Tosylate, portant la concentration molaire à 720,3 g/mol et du degré de pureté de la poudre, indiqué par le fabricant. Pour une pureté de 90 % et une pesée de 1,0 g la masse réelle d'Edoxaban en solution est de 685 mg après perte du groupement Tosylate.

Plasmas de patients :

Des plasmas de patients traités par l'Edoxaban ont été obtenus grâce à des partenariats avec des hôpitaux ou cliniques intéressés par ces tests. Par ailleurs, la société DAIICHI a pu nous fournir des plasmas de patients issus de prélèvements effectués à différentes heures, 2 H -12 H et 24H, après la prise d'Edoxaban, et provenant des études cliniques réalisées pour ce médicament.

1.3 Dosage de la Bivalirudine

1.3.1 Les outils de dosage

La Bivalirudine est un peptide inhibiteur de la thrombine (FIIa), et son métabolisme est simple. Son dosage n'est pas perturbé par la présence d'autres métabolites pouvant interférer. Cependant, ce peptide inhibiteur de la Thrombine (FIIa) présente une activité réversible sur cette enzyme, ce qui se répercute sur la linéarité de la courbe dose réponse lors de son dosage. Nous avons étudié la manière la plus efficace pour développer les tests chromogènes et coagulants pour son dosage, en définissant la zone de mesure possible limites des dosages. Les trousses de dosage utilisables pour la Bivalirudine ont pour principe l'inhibition de la Thrombine (**figure 10**). Deux trousses peuvent être utilisées : Le test B. DTI (BIOPHEN™ Direct Thrombin Inhibitors) ou le test coagulant HTI (HEMOCLLOT™ Thrombin Inhibitors). Ces trousses permettent de doser d'autres anticoagulants ayant une activité anti-IIa, comme l'Hirudine ou le Dabigatran.

Lors de la mise au point du dosage de la Bivalirudine, la réversibilité de la liaison de la Bivalirudine à la Thrombine influence la linéarité du dosage. En effet, le pouvoir anticoagulant de la Bivalirudine est exprimé de différentes manières, au cours de son contact avec la Thrombine, comme expliqué en introduction. Elle agit d'abord comme inhibiteur direct de la Thrombine ; elle est ensuite clivée par celle-ci et joue ensuite un rôle de frein de la coagulation sans la stopper, en limitant la fixation de la Thrombine au Fibrinogène.

1.3.2 Test chromogène B. DTI

La méthode B. DTI est un dosage chromogène basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Thrombine par l'inhibiteur direct de la Thrombine (DTI) à doser, ici la Bivalirudine, et la mesure de la Thrombine résiduelle par son action sur un substrat chromogène spécifique. L'hydrolyse du substrat par la Thrombine génère du pNA. La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est fonction de la quantité de Thrombine résiduelle. Elle est inversement proportionnelle à la concentration de DTI (Direct Thrombin Inhibitor) présent dans le milieu réactionnel. Comme pour le test B. HLRT, la réaction est compétitive. En effet, l'échantillon contenant la Bivalirudine est d'abord mis en contact avec le substrat chromogène, et le réactif Thrombine (α -Thrombine) est ajouté ensuite. La Thrombine est donc soit neutralisée par la Bivalirudine, soit elle agit sur le substrat en donnant une réaction colorée, (**figure 22**). La cinétique de génération du pNA, (coloration mesurée à 405 nm) est ralentie, en présence de Bivalirudine, de manière dose-dépendante. Il y a une relation inverse entre la concentration de Bivalirudine et la DO mesurée à 405 nm. Le coffret B. DTI est composé de deux réactifs R1 et R2, devant être reconstitués par 2,5 mL d'eau distillée lors de l'utilisations, et du tampon du test, R3 (Tris 0,05M ; NaCl ; 0,15M et albumine bovine 1%, pH=8,40), qui est prêt à l'emploi. Le réactif R1 contient le substrat spécifique du FIIa et le réactif R2 le FIIa.

1° étape, Non réactionnelle : Substrat mis en contact avec le plasma patient contenant la Bivalirudine

$[Bivalirudine] + [Substrat] \rightarrow$ Pas d'Interaction



2° étape : Réaction de compétition du FIIa clivant le pNA du substrat ou étant neutralisé par la Bivalirudine
 $[Bivalirudine] + [Substrat] + [FIIa] \rightarrow [FIIa-Bivalirudine] + \text{Peptide} + \text{pNA}$

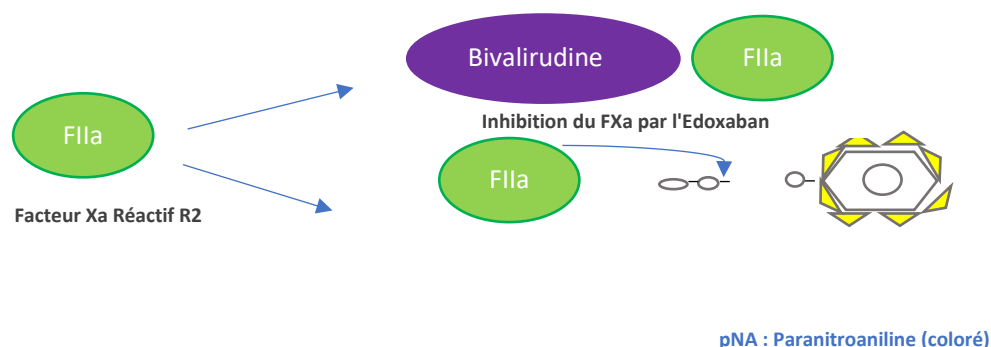


Figure 22 : Principe Réactionnel du coffret B. DTI

L'échantillon à tester contenant la Bivalirudine est mélangé avec le substrat spécifique du FIIa. Le FIIa est ensuite ajouté, ce qui déclenche la réaction chromogène. La réaction est dite cinétique ou de compétition. Dans cette méthode, le FIIa est donc soit neutralisé par la Bivalirudine, soit il réagit directement avec le substrat en donnant une réaction colorée. Il y a une relation inverse entre la concentration de Bivalirudine et la DO mesurée à 405 nm.

Au cours de cette réaction, la molécule de Bivalirudine est également clivée par le FIIa (**figure 10**) :

[FIIa-Bivalirudine] → [FIIa-peptide de Bivalirudine] + [Bivalirudine clivée inactive]

Composition du coffret B. DTI : R1 : Substrat du FIIa - **R2** : Réactif FIIa - **R3** : Tampon du coffret

1.3.3 Test coagulant HTI

Pour doser la concentration plasmatique de Bivalirudine, ou tout autre inhibiteur direct de la Thrombine, (DTI) **avec la trousse HTI**, l'échantillon à tester est dans un premier temps dilué et mélangé avec un pool de plasma humain normal citraté contenant tous les facteurs nécessaires à la coagulation (réactif : R1). La coagulation est ensuite initiée par ajout de Thrombine humaine, hautement purifiée, essentiellement sous forme d' α -Thrombine (réactif : R2). Dans le test, la quantité de Thrombine ajoutée a été ajustée pour induire une réaction de coagulation en environ 30 secondes. La présence de Bivalirudine augmente le temps de coagulation, de façon dose dépendante. Le temps de coagulation obtenu est proportionnel à la concentration de Bivalirudine ou autre DTI dosé dans le plasma à tester (**figure 23**). Le coffret HTI est composé de deux réactifs, R1 et R2, devant être reconstitués par 2,5 mL d'eau distillée avant utilisation ; le tampon de dilution du test, l'imidazole, est fourni de manière séparée du coffret. Le réactif R1 contient le pool de plasma normal et le réactif R2 le FIIa.

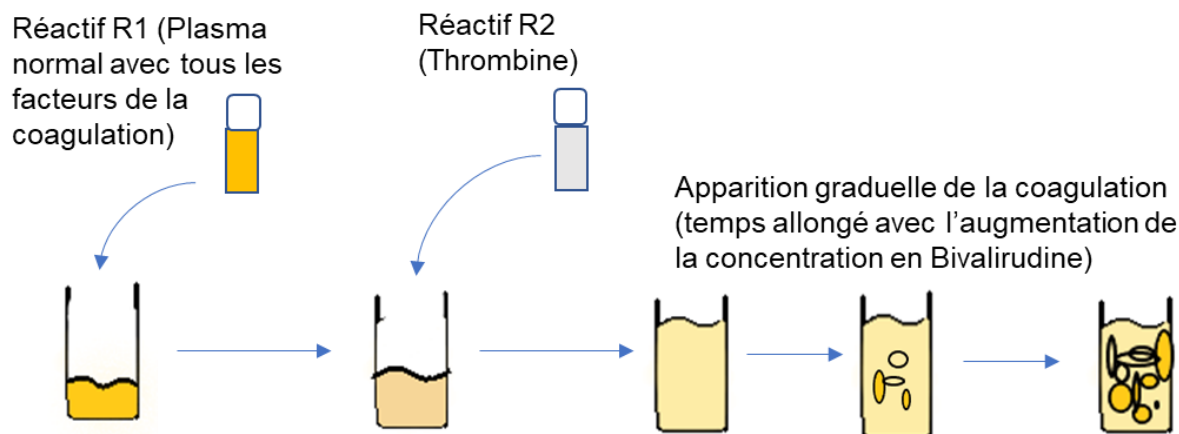


Figure 23 : Principe réactionnel du coffret HTI.

L'échantillon à tester contenant la Bivalirudine est mélangé avec un pool de plasma humain normal citraté. Le FIIa est ensuite ajouté, ce qui déclenche la réaction de coagulation en un temps d'environ 30 secondes. La présence de Bivalirudine augmente ce temps de manière dose dépendante par sa capacité à neutraliser la Thrombine.

Ces 2 méthodes vont être mises au point pour le dosage de la Bivalirudine, en utilisant 2 types d'automates :
 Automate STAR fourni par STAGO, et automate CS provenant de SYSMEX.

Composition du coffret HTI : R1 : Pool de plasmas normaux - **R2** : Réactif FIIa

Tampon de dilution : Imidazole, non fourni dans le coffret

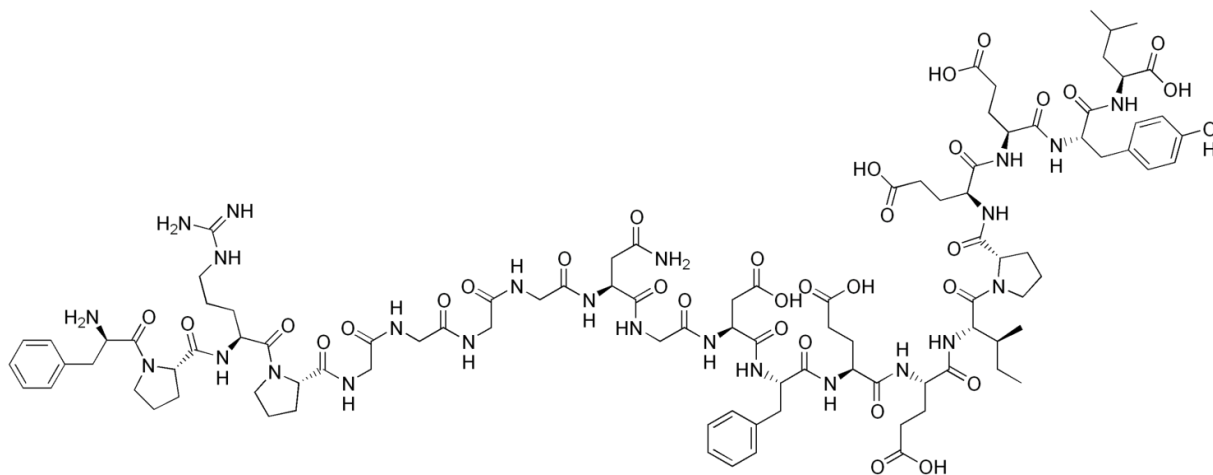
1.3.4 Préparation des étalons Bivalirudine et des plasmas de contrôle

Tout comme pour la préparation des étalons et contrôles Edoxaban, les étalons et contrôles de Bivalirudine sont obtenus en supplémentant un pool de plasma avec cette molécule, aux concentrations souhaitées. Cette supplémentation s'apparente à celle effectuée avec l'Edoxaban avec les différences propres au développement du dosage de la Bivalirudine.

Le pool de plasma est obtenu en mélangeant plusieurs plasmas citratés, préparés dans les mêmes conditions que précédemment pour la mise au point du dosage Edoxaban.

La Bivalirudine est fournie sous forme de poudre. C'est un peptide de 20 acides aminés (**figure 24**), qui est dissous directement dans un milieu aqueux et salin contenant de la BSA (Albumine Sérique Bovine). La BSA est ajoutée afin d'éviter la perte de protéine diluée ; en effet, si la Bivalirudine diluée est introduite en l'absence de molécule « protectrice » elle peut se fixer sur la paroi du récipient, et la concentration dans la solution est alors inférieure à celle attendue.

A)



B) D-phenylalanyl- L-prolyl-L-arginyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-glycyl-glycyl-L-asparagyl-glycyl-L-aspartyl-L-phenylalanyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-prolyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-tyrosyl-L-leucine trifluoroacetate

Figure 24 : Formule de la Bivalirudine : Moléculaire (A), en séquence d'acides aminés (B).

Fournisseur : PolyPeptide GROUP

Formule Moléculaire : C₉₈H₁₃₈N₁₄O₃₃ (Forme Libre)

MM : 2180 Da (g/mol)

Les étalons et contrôles sont réalisés par dilution au 1:100 en plasma d'une solution 100 fois concentrée de Bivalirudine dans une solution Tris-NaCl (NaCl 0,15M – BSA 1% - Tris 0,05M) à pH 7,50. Pour la réalisation du dosage de Bivalirudine, 5 étalons et 2 contrôles sont préparés, et lyophilisés en flacons de 1,0 ml.

Le domaine de mesure recherché est de 0 à 5 µg/mL de Bivalirudine :

Trois lots prototypes d'étalons et de contrôles sont préparés pour cette étude et les concentrations avant Lyophilisation ont été réajustées afin d'obtenir les concentrations finales voulues. En effet, la concentration après Lyophilisation est inférieure d'environ 15%, ce qui est dû au volume du produit reconstitué (dissolution de la galette) et au processus de Lyophilisation :

La concentration finale ciblée, après Lyophilisation, pour les étalons est de : 0 ; 1 ; 2 ; 3,5 et 5 µg/mL. Il est donc préparé une gamme 100 fois concentrée en Tris-NaCl, soit : 0 ; 115 ; 230 ; 402 et 575 µg/mL, qui est ensuite diluée au 1/100 en plasma pour obtenir une concentration de 0 ; 1,15 ; 2,30 ; 4,02 et 5,75 µg/mL avant Lyophilisation.

Le même processus est suivi pour la fabrication des contrôles de qualité avec un pool plasmatique différent et pour obtenir des taux respectifs d'environ 1,5 et 3,0 µg/mL.

Comme pour l'Edoxaban, chaque étalon et contrôle est réparti sous un grand nombre de flacons, ayant une concentration fixe de Bivalirudine.

Les étalons et contrôles sont testés, après lyophilisation, afin de leur attribuer une concentration exacte. Il n'existe pas de standard international (WHO) pour le dosage de la Bivalirudine. De même, contrairement au cas du dosage de l'Edoxaban et de ses dérivés, la méthode LC:MS/MS n'est pas disponible pour la Bivalirudine.

Les concentrations des étalons sont déterminés en 18 séries de dosages indépendants de la Bivalirudine, avec le test HTI sur l'automate STAR et B. DTI sur l'automate CS, annexe2, par rapport à des gammes fraîches supplémentées exactement avec 3 lots différents de Bivalirudine, provenant de 2 fournisseurs différents (Polypeptide et Selleck Chem). 36 flacons d'étalons et contrôles reconstitués sont dosés sur des jours différents et par 3 opérateurs différents à partir de gammes de Bivalirudine réalisés extemporanément. 9 séries sont réalisées en HTI sur STAR et 9 séries en B. DTI au CS. La moyenne des résultats permet de fixer les taux pour chaque étalon et contrôle.

Plasmas de patients : Pour la Bivalirudine, une étude en partenariat a été réalisée avec l'hôpital Lariboisière, département hémostase, à Paris (Prof Ludovic Drouet et Dr Claire Bal dit Soulier), ce qui nous a permis de tester 100 plasmas de patients d'un protocole clinique, traités par la Bivalirudine .

1.4 Lyophilisation des étalons et contrôles Edoxaban et Bivalirudine, voir annexe 1.

La lyophilisation permet de déshydrater les préparations de plasma et d'obtenir des lyophilisats stables dans le temps, sous forme de poudre compacte (galette), dans des flacons hermétiquement fermés. La lyophilisation est réalisée par congélation à très basse température (- 35°C), suivie d'une déshydratation sous vide (sublimation) et d'une dessiccation secondaire pour enlever le l'eau résiduelle. Les flacons sont bouchés ensuite sous vide. La conservation d'un plasma lyophilisé contenant l'Edoxaban ou la Bivalirudine est ainsi d'au moins 30 mois.

Les flacons sont lyophilisés sous 1,0 ml en flacons de verre siliconé. Lors de l'utilisation, ils sont ensuite reconstitués par un volume précis de 1,0 ml d'eau distillée. Le taux d'Edoxaban ou de Bivalirudine est ensuite déterminé précisément pour chaque concentration utilisée, par plusieurs séries de dosages, comme détaillé antérieurement. Pour la lyophilisation, des excipients sont ajoutés au plasma. Lors de la reconstitution, le volume obtenu est légèrement augmenté par la dissolution de la galette, ce qui induit un volume reconstitué légèrement supérieur à celui du plasma introduit dans le flacon avant lyophilisation. Le taux d'Edoxaban ou de Bivalirudine est de ce fait légèrement inférieur sur le produit lyophilisé et reconstitué, par rapport à la solution répartie pour lyophilisation. Pour compenser cet effet, ainsi qu'une légère variation du taux due au processus de lyophilisation, les plasmas sont surchargés avec une concentration d'Edoxaban 10% supérieure à celle des taux attendus après

lyophilisation et 15% pour la Bivalirudine (le Facteur correctif est adapté pour chaque produit à lyophiliser, et déterminé après lyophilisation de divers lots d'essais).

Pour la répartition des produits à lyophiliser **une multipette Eppendorf répétitive, de type M4**, est utilisée. Il s'agit d'une pipette automatique munie d'un réservoir et d'un embout de répartition, permettant de distribuer un volume exact de façon reproductible et répétée. En général, l'instrument est réglé de manière qu'une aspiration permette de distribuer vingt fois le même volume, avant recharge. En plus de cet outil, il est aussi utilisé une balance de précision, permettant le contrôle du volume distribué par pesées régulières, la densité du produit étant connue (masse attendue pour 1,0 ml de plasma déterminé expérimentalement pour chaque fabrication $\approx 1,04$ g/L).

Les flacons utilisés sont siliconés, ce qui permet d'éviter toute activation de la coagulation (par contact avec le verre) du plasma.

Par ailleurs, afin d'évaluer une perte possible d'activité de l'Edoxaban ou la Bivalirudine lors de l'étape de congélation, des produits conservés congelés et non lyophilisés sont testés par rapport à une gamme fraîche du produit à tester, préparée de manière extemporanée.

1.5 Vérification des performances des méthodes de dosage de l'Edoxaban et de la Bivalirudine

Les performances des tests chromogènes et coagulants développés pour le dosage de l'Edoxaban et de la Bivalirudine ont été testées en se basant sur les guides de vérification établis par l'institut des standards en clinique et laboratoire (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI).

1.5.1 Protocole de vérification des performances des méthodes

Les protocoles pour chaque paramètre étudié sont basés sur le guide de référence publié et remis à jour régulièrement (<https://clsi.org/>)

Le protocole est adapté à un instrument automatisé.

1.5.2 Test de la calibration

Ce test permet de vérifier la validité globale du dosage. Etablir la courbe d'étalonnage moyenne, à partir d'au moins 3 séries indépendantes (chaque point en double), avec un étalon de référence.

Tester en parallèle 3 répliques ($N=3$), un plasma de contrôle haut et un plasma de contrôle bas pour chaque série.

Spécification des critères d'acceptation : Vérifier la conformité de la pente définie ($r^2 \geq 0,98$) et les contrôles mesurés doivent être conforme à la fourchette d'acceptation. Il faut de plus s'assurer de la bonne répétabilité des manipulations ($CV \leq 5\%$). La valeur CV peut être augmentée jusqu'à 10% en fonction du réactif testé.

1.5.3 Test de la contamination inter-échantillon

Ce test est effectué en testant successivement une série d'un plasma haut et ensuite une série d'un plasma bas surchargés en molécule à doser, et d'analyser les résultats obtenus par rapport à la position dans la série : cela permet de voir si le taux obtenu pour un plasma bas suivant immédiatement un plasma haut, ou vice-versa, est contaminé par l'échantillon qui le précède. Pour cela, le protocole suivant est utilisé :

Etablir la courbe d'étalonnage moyenne (N=3), tester en parallèle les plasmas de contrôle haut et bas, pour valider la courbe d'étalonnage.

Tester 3 fois consécutives le plasma de contrôle haut (H1, H2, H3) et après 3 fois consécutives un plasma de contrôle bas (L1, L2, L3). Répétez 4 fois l'opération dans une même série de dosage.

Les valeurs moyennes mL1 et mH3 des différents passages sont calculées, ainsi que la valeur moyenne de tous les contrôles élevés mH : ils permettent de calculer le pourcentage de contamination (voir partie, test statistiques).

Critère d'acceptation : Vérifier la conformité de l'étalonnage ($r^2 \geq 0,98$) et des contrôles mesurés, qui doivent être conformes à l'intervalle d'acceptation défini. Le taux de contamination doit être inférieur à 5%. Si la contamination est supérieure à 5%, il faut ajuster le réglage des lavages.

1.5.4 Test de répétabilité

Ce test permet de vérifier la répétabilité du dosage dans une même série : dosage d'un même échantillon sur une même courbe de calibration.

Etablir la courbe d'étalonnage moyenne, et tester en parallèle (N=3) des plasmas contrôles élevés et bas, pour valider la courbe d'étalonnage.

Tester les 30 aliquotes d'un plasma de contrôle haut et d'un plasma de contrôle bas dans la même série.

Critère d'acceptation : Vérifier la conformité de la pente définie ($r^2 \geq 0,98$) et des contrôles mesurés, qui doivent être conformes à l'intervalle d'acceptation défini. La variabilité des mesures intra-série est évaluée et doit être conforme aux valeurs spécifiées (en règle générale $CV \leq 5\%$).

1.5.5 Test de linéarité

Test de la linéarité dans la zone de dosage et à des concentrations supérieures.

Préparer un ensemble d'au moins 12 niveaux de la molécule à tester dans la zone de linéarité prévue, à partir de 2 solutions : une à concentration basse (B) et une à concentration haute (H) délimitant les bornes de cette zone.

Pour préparer ces N=12 dilutions, utiliser le schéma suivant comme exemple :

1 : Bas (B)	7 : $0.5B + 0.5H$
2 : $0.975B + 0.025H$	8 : $0.375B + 0.625H$
3 : $0.925B + 0.075H$	9 : $0.25B + 0.$
4 : $0.875B + 0.125H$	10 : $0.125B + 0.875H$
5 : $0.75B + 0.25H$	11 : $0.075B + 0.925H$
6 : $0.625B + 0.375H$	12 : Haut (H)

Critère d'acceptation : la conformité de la pente définie ($r^2 \geq 0,98$) et des contrôles mesurés doivent être conformes à l'intervalle d'acceptation spécifié. L'écart entre les valeurs est aussi évalué ($CV \leq 10\%$). Le pourcentage de différence relative (calcul en partie 4.1) permet de déterminer si la linéarité de la méthode est acceptable. Si ce n'est pas le cas, la plage de linéarité doit être réduite et l'analyse refaite. Ainsi la limite inférieure de quantification peut être déduite (LIDQ) et la limite supérieure de quantification (LSDQ), différence relative en % < 10%. La LIDQ est différente de la LdB et la LdD décrites plus loin et représente la concentration minimale mesurable des valeurs inférieurs ne sont donc pas considéré comme exactes, mais peuvent apparaître en analyse.

1.5.6 Interférences

1.5.6.1 Principe

L'analyse des interférences permet d'évaluer l'impact de molécules pouvant être présentes dans l'échantillon à tester sur les résultats du dosage. Ces interférences peuvent résulter de molécules biologiques présentes naturellement dans le plasma, parfois à forte concentration, ou d'autres anticoagulants que celui testé. Pour cette analyse, les molécules évaluées sont ajoutées en concentration croissante dans l'échantillon testé, et le dosage est ensuite effectué comparativement à un témoin non supplémenté. S'il y a interférence, cela impacte les valeurs mesurées.

Pour toutes les manipulations de supplémentation, le plasma de référence ou "blanc" (sans substance interférente) doit être préparé selon le même protocole et les mêmes volumes que le plasma supplémenté, afin de conserver la même matrice de base et la même concentration du paramètre testé. Les mêmes pools de plasma et les mêmes solutions mères doivent être utilisés tout au long de l'expérience.

Pour chaque gamme de dosage, les plasmas supplémentés pour l'étude des interférences doivent contenir une concentration haute et basse de la molécule à doser, comme appliqué à l'Edoxaban et à la Bivalirudine.

Certaines substances peuvent interférer en raison de leur absorption optique, et « saturer » la zone de linéarité du signal (**figure 25**). D'autres substances, comme les anticoagulants, peuvent « fausser » le résultat en surestimant l'activité de la molécule testée.

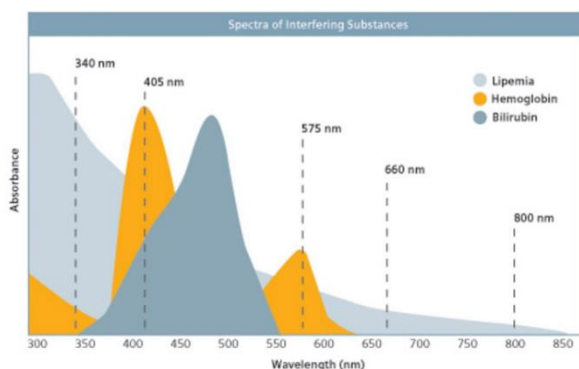


Figure 25 : Interférence des molécules biologiques pouvant être présentes dans le plasma et adsorbant la lumière à diverses longueurs d'onde ; les tests chromogènes sur CS et STAR sont lus à 405 nm ; les tests de coagulation sur CS sont mesurés à 660 nm (excepté le Fibrinogène à 405 nm). Des molécules biologiques peuvent interférer à 405 nm, Lipides, Hémoglobine ou Bilirubine, et également à 660 nm, où l'interférence la plus importante provient des lipides.

1.5.6.2 Protocole

La courbe de calibration est établie et validée à l'aide d'un plasma de contrôle élevé et d'un plasma de contrôle bas.

Chaque point de test est mesuré en triplicate (dans un ordre aléatoire), dans la même série de dosages.

Les différentes interférences aux Héparines, aux AODs (Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban, Dabigatran), à la Bilirubine libre ou liée, à l'Hémoglobines, aux Intralipides (Lipides et phospholipides) sont analysées.

Les plasmas bas et hauts à doser et supplémentés avec les interférents à tester sont préparés comme ci-après :

Préparation des échantillons avec les interférents :

Les plasmas à supplémenter en interférent sont deux plasmas contenant la Bivalirudine pour les dosages de Bivalirudine et de l'Edoxaban pour les dosages d'Edoxaban. Ils contiennent la molécule à doser à des concentrations basses ou hautes dans chaque gamme testée. Par exemple pour le dosage Edoxaban gamme basse (0 à 100 ng/mL) les deux plasmas supplémentés en interférent ont respectivement 30 et 75 ng/mL d'Edoxaban, et pour le dosage de Bivalirudine (0 à 5 µg/mL) deux plasmas à 2 et 3,5 µg/mL de Bivalirudine sont supplémentés.

Héparine (HNF et HBPM) : 0 - 0,5 - 1 - 1,5 - 1,5 - 2 UI/mL, (tableau 8).

La matière première HNF ou HBPM pour les interférences provient de standards internationaux Héparines (WHO/NIBSC, Potters Bar, UK). Ce sont des étalons concentrés à environ 1000 UI/mL (la concentration exacte est indiquée sur la notice fournie). Ces flacons sont reconstitués selon les indications du fournisseur et une dilution est ensuite réalisée pour obtenir une concentration finale à 100 UI/mL dans un tampon TBSA (Tris : 0,05M, albumine bovine à 1%, Na,Cl : 0,15M, à pH 7,50). Cette solution est répartie en cryotubes qui sont congelés et directement utilisables pour préparer les plasmas interférents, après décongélation.

Les solutions plasmatiques pour tester les interférences : Une solution à 2 UI/mL est préparée dans un pool de plasma **contenant la molécule à doser** (Bivalirudine ou Edoxaban). En pratique, une dilution 1:50 de 100 UI/mL de solution héparinée est réalisée dans les pools de plasma à doser. Puis, en mélangeant en proportions variables du plasma à tester avec celui supplémenté à 2 UI/mL d'Héparine, des plasmas contenant la Bivalirudine ou l'Edoxaban avec les concentrations d'Héparine suivantes sont obtenus:

	Concentration en Héparine HNF ou HBPM			
	2 UI/mL	1.5 UI/mL	1 UI/mL	0,5 UI/mL
Plasma à 2 UI/mL	1 volume	0.75 volume	0.5 volume	0.25 volume
Blanc plasma	-	0.25 volume	0.5 volume	0.75 volume

Tableau 8 : Tableau de réalisation des solutions d'Héparine en plasma. (Le blanc plasma contient la molécule à doser de concentration identique au plasma 2 UI/mL en Héparine).

Les supplémentations sont réalisées, de la même manière pour chaque niveau de concentration de molécule à doser :

Les gammes plasmatiques héparinées sont ainsi préparées, adaptées aux tests de dosage, et elles contiennent pour chacune la molécule à doser en concentration identique, à un niveau haut ou bas de la zone de mesure. Les gammes héparinées, selon leur concentration en molécule à doser, sont dosées sur la gamme basse ou la gamme standard pour les dosages d' Edoxaban avec les tests B. DiXal et B. HLRT, et sur la gamme standard pour le dosage de la Bivalirudine en HTI ou en B. DTI.

AODs (Dabigatran pour le dosage de l'Edoxaban et Edoxaban-Rivaroxaban-Apixaban pour le dosage de la Bivalirudine) : 100 - 200 - 400 ng/mL (tableau 9).

Matière première AODs : Les solutions d'AODs sont congelées à des concentrations spécifiques. Elles ont été préparées par HYPHEN BioMed par dissolution de l'AOD concentré en poudre dans le tampon approprié : tampon DMSO (DMSO 25%, Tris 0,05M, pH :7,40) pour le Rivaroxaban (BAYER), Edoxaban (DAICHII) et Apixaban (Bristol-Myers Squibb) et tampon TBSA pour le Dabigatran (BOEHRINGER INGHELEIM). Les solutions disponibles sont l'Edoxaban, le Rivaroxaban et l'Apixaban à 400 µg/mL, et le Dabigatran à 110 µg/mL. Tous les AODs sont dilués à 40 µg/mL en tampon TBSA pour le Dabigatran et en tampon DMSO pour les AODs anti-Xa .

Les solutions plasmatiques pour tester les interférences : Une solution à 400 ng/mL est préparée dans les plasmas contenant la molécule à doser : pour chaque AOD une dilution 1:100 est réalisée à partir des solutions à 40 µg/mL en AOD préparées précédemment et les plasmas à tester (selon le cas Bivalirudine ou Edoxaban). Ensuite, des mélanges en proportions variables de plasma à doser (contenant des concentrations définies de Bivalirudine ou d'Edoxaban) et de celui supplémenté à 400 ng/mL d'AOD dont l'interférence est testée, sont préparés :

	Concentration en AODs (Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban ou Edoxaban selon l'AOD interférent)		
	400 ng/mL	200 ng/mL	100 ng/mL
Plasma à 400 ng/mL	1 volume	0.50 volume	0.25 volume
Blanc plasma	-	0.50 volume	0.75 volume

Tableau 9 : Tableau de préparation des solutions d'AODs en plasma.

(Le blanc plasma contient la molécule à doser en concentration identique à celle du plasma 400 ng/mL d'AOD).

De la même manière que pour tester l'interférence des Héparines, les plasmas supplémentés en AODs et contenant la molécule à doser (Edoxaban ou Bivalirudine), à concentration haute ou basse pour chaque gamme de dosage, sont testés avec les réactifs et les tests appropriés .

Bilirubine : 0 - 5 - 10 - 10 - 25 - 60 mg/dL (0 - 85,5 - 171,5 - 425 - 1020 µmol/L) (tableau 10, figure 26).

Concentration plasmatique totale normale de Bilirubine < 1,3 mg/dL (< 22 µmol/L).

À partir d'une solution de référence ou commerciale de Bilirubine, une solution concentrée est préparée avec précision à 60 mg/dL dans le plasma (contenant Edoxaban ou Bivalirudine à doser). Puis, en mélangeant différents volumes de plasma de référence (blanc : contenant la même concentration de molécule à doser) et de plasma supplémenté à 60 mg/dL de bilirubine, préparer les dilutions suivantes :

	Concentration en Bilirubine				
	60 mg/dL	25 mg/dL	10 mg/dL	5 mg/dL	0 mg/dL
Plasma à 60 mg/dL	1 volume	0.42 volume	0.17 volume	0.08 volume	-
Blanc plasma	-	0.58 volume	0.83 volume	0.92 volume	1 volume

Tableau 10 : Tableau de préparation des solutions de Bilirubine en plasma.

(Le blanc plasma contient la molécule à doser en concentration identique à celle du plasma à 60 mg/dL de Bilirubine).

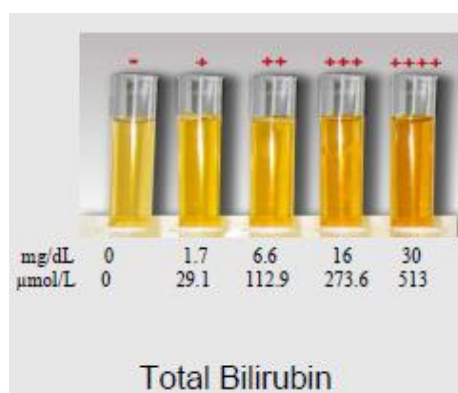


Figure 26 : Exemple de préparation des échantillons de Bilirubine.

Hémoglobine (Hb) : 0 - 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 mg/dL (0 - 8 - 16 - 40 - 80 - 160 μmol/L),
(tableau 11, figure 27).

Concentration plasmatique normale d'hémoglobine (Hb) : 1 à 4 mg/dL (0,16 à 0,62 μmol/L).

À partir d'une solution d'hémoglobine de référence ou commerciale, une solution concentrée à 1000 mg/dL d'Hb humaine est préparée dans le plasma à doser (contenant la Bivalirudine ou l'Edoxaban à doser). Cette solution est utilisée pour réaliser la gamme suivante de Hb avec une concentration constante de molécule à doser :

	Concentration en Hb					
	1000 mg/dL	500 mg/dL	250 mg/dL	100 mg/dL	50 mg/dL	0 mg/dL
Plasma à 1000 mg/dL	1 volume	0.5 volume	0.25 volume	0.1 volume	0.05 volume	-
Blanc plasma	-	0.5 volume	0.75 volume	0.9 volume	0.95 volume	1 volume

Tableau 11 : Tableau de préparation des solutions d'Hémoglobine en plasma (Le blanc plasma contient la molécule à doser en concentration identique à celle du plasma 1000 mg/dL d'Hb).

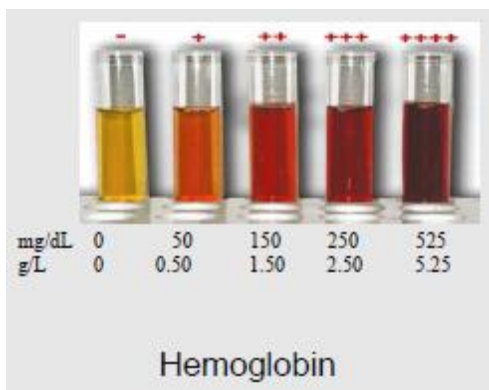


Figure 27 : Exemple de préparation des échantillons Hémoglobine.

Intralipides (Lipides et phospholipides) : 0 - 50 - 100 - 250 - 500 - 500 - 1000 mg/dL (tableau 12, figure 28).

Concentration plasmatique normale des triglycérides (TG) : homme : 0,50 - 2,00 mmol/L (4,5-17,5 mg/dL) ou femme : 0,40 - 1,60 mmol/L (3,5-14 mg/dL).

A partir d'une solution d'Intralipides de référence ou commerciale (Intralipids® SIGMA - concentré de lipides et phospholipides stabilisée) une solution concentrée à 1000 mg/dL d'Intralipide est préparée dans le plasma à doser (contenant la Bivalirudine ou l'Edoxaban). Ensuite, en mélangeant des volumes de plasma de référence (blanc) et celui contenant 1000 mg/dL d'Intralipides, préparer les dilutions suivantes dans le plasma :

	Concentration en Intralipides					
	1000 mg/dL	500 mg/dL	250 mg/dL	100 mg/dL	50 mg/dL	0 mg/dL
Plasma at 0.6 mg/mL	1 volume	0.5 volume	0.2 volume	0.1 volume	0.05 volume	-
Blank plasma	-	0.5 volume	0.8 volume	0.9 volume	0.95 volume	1 volume

Tableau 12 : Tableau de préparation des solutions d'Intralipides en plasma. (Le blanc plasma contient la molécule à doser en concentration identique à celle du plasma 1000 mg/dL d'Intralipides).

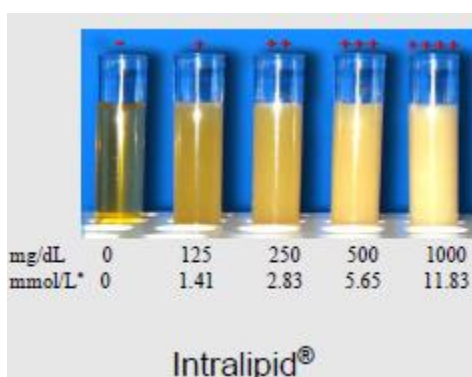


Figure 28 : Exemple de préparation des échantillons Intralipides.

Les différents niveaux d'échantillons en concentration fixe en molécule à doser et variable en molécules interférentes de Bilirudine, d'Hémoglobine et d'Intralipide sont préparés et dosés de la même manière que pour les dosages testant l'interférence aux Héparines. Les concentrations fixes en molécule à doser couvrent la zone basse et haute de chaque dosage. Les dosages sont réalisés sur leurs réactifs étalons et tests appariés.

Critères d'acceptation :

La conformité de l'étalonnage ($r^2 \geq 0,98$) et des contrôles mesurés est vérifiée. Ils doivent être conformes aux spécifications.

L'échantillon à concentration élevée doit être mesuré avec un taux conforme à celui du plasma de référence ou blanc (Biais % $\leq \pm 10$). L'échantillon à concentration faible doit être mesuré avec un taux conforme à celui du plasma de référence ou blanc (Biais % $\leq \pm 20$).

1.5.7 Reproductibilité de jour à jour

Le but de ce test est de déterminer la précision de la mesure de jour à jour, avec ou sans recalibration. Pour cette étude les dosages sont effectués sur plusieurs jours ($N=5$) et plusieurs cycles d'étalonnage sont réalisés afin d'analyser la robustesse de la méthode par rapport aux divers facteurs de variabilité possibles en utilisant un seul lot de contrôles et d'étalons et un seul lot de réactif.

L'expérience se déroule sur un total de 5 jours à raison de 2 passages par jour. Un nouvel étalonnage est effectué à chaque nouvelle série ou après la reconstitution d'un nouveau réactif. Chaque série, comprend la courbe d'étalonnage en $N=2$, un plasma de contrôle élevé et un plasma de contrôle bas, pour valider cette courbe d'étalonnage.

Critères d'acceptation : Vérifier la conformité de l'étalonnage ($r^2 \geq 0,98$) et des contrôles mesurés, qui doivent être conformes aux spécifications. La moyenne des échantillons est conforme aux valeurs attendues de CV $\leq 10\%$ et de biais $\leq 20\%$.

1.5.8 Limite de blanc (LdB), Limites de détection (LdD)

La limite de blanc permet de déterminer la valeur de la réactivité en l'absence de la substance à analyser et sans la matrice testée (ici le plasma). La limite de détection indique la valeur la plus faible mesurable avec la méthode dans la matrice testée (ici le plasma).

Etablir la courbe d'étalonnage moyenne ($N=3$), et tester un plasma de contrôle élevé et un plasma de contrôle bas, pour valider la courbe d'étalonnage

La LdB est déterminée avec le tampon de dilution, sur au moins 60 déterminations ($NB \geq 60$). La LdD est déterminée avec 4 plasmas différents sans analyte sur au moins 5 déterminations ($NB \geq 60$) sur un total de 3 jours ($NB \geq 60$).

Critères d'acceptation : Vérifier la conformité de l'étalonnage ($r^2 \geq 0,98$) et des contrôles mesurés, qui doivent être conformes aux spécifications. La moyenne des échantillons est conforme à l'attribution de valeurs, CV $\leq 5\%$ et biais $\leq 20\%$.

Pour la LdB déterminer la moyenne, la valeur minimum (Min) et la valeur maximale (Max) ainsi que l'écart type (ET) de l'échantillon (tampon sans analyte et sans matrice plasma). Faire de même avec la LdD en mettant en commun les résultats des 4 plasmas (plasma sans analyte). Les valeurs de LdB et LdD sont déterminées statistiquement comme indiqué dans la guideline CLSI EP17.

1.5.9 Comparaison de méthodes et d'automates

Deux méthodes de dosage différentes peuvent être comparées entre-elles sur un même automate ou pour une même méthode de dosage cette comparaison peut concerner deux automates différents.

L'étude se déroule sur un total de 5 jours à raison d'une ou deux séries par jour. La courbe d'étalonnage est réalisée le premier jour et les contrôles de qualité sont passés. Chaque jour, et pour chaque série de dosages, ou en cas de reconstitution d'un nouveau réactif, les contrôles de qualité sont dosés.

Environ 100 échantillons de patients traités et non traités avec l'anticoagulant, répartis sur la zone dynamique de dosage sont analysés, avec un minimum de 30 patients normaux.

Critères d'acceptation : Vérifier la conformité de l'étalonnage ($r^2 \geq 0,98$) et des contrôles mesurés, qui doivent être conforme aux spécifications. Le coefficient de corrélation (r) entre les méthodes doit être supérieur à 0,90 et la pente comprise entre 0,90 et 1,1 avec l'axe Y comme méthode ou automate à tester et l'axe X comme méthode ou automate à comparer. La mesure de la dispersion **Syx** est utilisée comme indicateur de comparaison supplémentaire, permettant de s'assurer de l'homogénéité des valeurs autour de la droite de corrélation.

Syx est la mesure de la dispersion des observations autour de la ligne linéaire ajustée.

1.6 Etude spécifiques des métabolites de l'Edoxaban M4, M6 et M8

Les supplémentations en pool de plasma des métabolites M4, M6 et M8 nécessitent de disposer de ces différentes molécules sous forme de poudre ; elles ont également été fournies par la société DAIICHI. Pour ces métabolites, les dilutions sont réalisées extemporanément selon le protocole établi pour les dilutions de l'Edoxaban avec prise en compte du degré de pureté indiqué par le fabricant, comme pour l'Edoxaban.

Protocole pour test de réactivité sur une gamme Edoxaban avec les coffrets B. DiXal et B. HLRT :

Nous avons étudié les métabolites ayant une activité anti-Xa conséquente, principalement les métabolites M4, M6 et M8. Ces trois métabolites ont été supplémentés dans des plasmas à différentes concentrations, (40, 75, 250 et 350 ng/mL) puis dosés selon les protocoles pour l'Edoxaban, avec B. DiXal et B. HLRT, et avec la gamme basse d'Edoxaban pour les points 40 et 75 ng/mL, ou la gamme standard pour les points 250 et 350 ng/mL. L'instrument utilisé est le CS 5100. Chaque gamme est contrôlée pour la conformité des contrôles de qualité appropriés avec l'intervalle d'acceptation défini.

Pour obtenir des résultats significatifs, la supplémentation des métabolites dans le plasma a été réalisée en double, de manière indépendante. Chaque plasma supplémenté est dosé en double contre les courbes de calibration appropriées. La globalité de la manipulation de dosage et de supplémentation est répétée une deuxième fois. Les valeurs mesurées pour les métabolites sont rapportées en pourcentage d'activité selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'activité (\%)} = \frac{\text{Concentration mesurée}}{\text{Concentration réelle supplémentée}} \times 100$$

Par conséquent, pour chacune des quatre concentrations de chaque métabolite, 8 valeurs sont obtenues. Les métabolites sont dosés avec une gamme d'Edoxaban et l'activité des métabolites peut donc être exprimée directement en pourcentage par comparaison avec l'activité de l'Edoxaban étalon. Ainsi, pour chaque métabolite,

32 valeurs sont obtenues, permettant de lisser les écarts pouvant résulter des variations expérimentales ou de l'imprécision des mesures. Le test statistique de Grubbs est utilisé pour retirer les valeurs aberrantes sur l'ensemble de la série de dosages. Les valeurs de chaque dosage peuvent ensuite être comparées entre elles grâce au test statistique de Student. Ce dernier test permet d'établir s'il existe une différence de dosage entre les tests B. DiXal et B. HLRT.

Protocole pour test de réactivité d'une gamme Edoxaban avec le coffret B. HLRT, selon le type de FXa utilisé pour le réactif R2 (humain ou bovin) :

Préparation du réactif FXa (humain) : un réactif R2 est préparé pour le test B. HLRT en remplaçant le FXa bovin par du FXa humain. Pour cela le FXa humain est dilué à 4 µg/ml en tampon de dilution : Hépès 0,05M NaCl ; 0,05M BSA-1%, pH :7,85.

La concentration de FXa à 4 µg/mL, est la concentration optimale sélectionnée pour le réactif R2, utilisé avec le substrat du coffret B. HLRT (réactif R1).

Les protocoles suivis sont exactement les mêmes que pour le réactif B. HLRT classique présenté en **annexe 2**.

Préparation des supplémentations de plasma en métabolites :

Quatre supplémentations de plasma sont réalisées en double (40, 75, 200 et 350 ng/mL) pour chacun des métabolites M4, M6, et M8. Ces préparations sont ensuite dosées avec une gamme d'Edoxaban appropriée en utilisant le coffret B. HLRT avec soit du FXa bovin (test classique) ou du FXa humain (nouveau protocole développé). Le dosage est répété une seconde fois. Cela permet d'obtenir pour chaque métabolite 16 valeurs de dosage à différents niveaux de la gamme (quatre concentrations de chaque métabolite en double, dosées deux fois).

Comme pour le premier test, l'activité de chaque préparation est exprimée en pourcentage de l'activité d'Edoxaban.

2 Amélioration des tests de dosage existants pour réduire les interférences liées aux anticoagulants

Certains tests donnent des résultats faussement pathologiques en raison de la présence d'anticoagulants autres que l'anticoagulant à doser ou lors de l'exploration de la coagulation chez des patients traités.

Deux types de solutions ont été envisagées pour enlever ces interférences :

- Elimination des interférences des Héparines dans le dosage des AODs.
- Elimination des interférences des AODs, présents dans les plasmas à tester, pour les tests de coagulation.

2.1 Amélioration du coffret B. DiXal pour supprimer l'interférence de l'Héparine dans le dosage des AODs.

Des interférences avec les Héparines persistent en gamme basse dans le dosage des AODs anti-Xa avec le coffret B. DiXal. Une solution a été recherchée pour les diminuer. Nous testons donc l'ajout graduel de polybrène

dans le tampon R3 du kit. Le polybrène était autrefois utilisé comme antidote car il permet de neutraliser l'Héparine (voir Etat de l'Art 3.2).

Le coffret B. DiXal est composé de deux réactifs R1 et R2 reconstitués par 2,5 mL d'eau distillée et d'un tampon R3. Le réactif R1 contient le FXa et le réactif R2 le substrat spécifique du FXa.

Protocole de détermination de la concentration optimale de polybrène :

Pour éliminer les interférences des Héparines, l'ajout de polybrène dans le tampon du coffret B. DiXal a été testé dans le test de dosage de l'anticoagulant AOD anti-Xa : Rivaroxaban. Plusieurs tampons R3 du coffret B. DiXal ont été préparés avec augmentation progressive de la concentration en polybrène : 3, 5, 10, 20, 50, et 200 µg/mL, **tableau 13.**

Le tampon B. DiXal R3 a la composition suivante : Tris: 0,05M – NaCl: 0 ;45 M à pH 7.85.

Le tampon B. DiXal R3 supplémenté en Polybrène Sigma est préparé avec ajout de 200 µg/mL de polybrène, (R3-poly-200), puis ce tampon est mélangé à différentes proportions avec du tampon R3 sans polybrène pour préparer des tampons R3 avec concentration croissante de polybrène.

Polybrène en µg/mL	3	5	10	20	50	200
Tampon B DiXal R3	0,3 mL	0,5 mL	1,0 mL	2,0 mL	5,0 mL	20,0 mL
Tampon B. DiXal R3 poly-200	19,7 mL	19,5 mL	19,0 mL	18,0 mL	15,0 mL	/

Tableau 13 : Tableau de préparation du tampon R3 (B. DiXal) à diverses concentrations de polybrène.

Protocole de dosage des plasmas héparinés :

Préparation d'un pool plasmatique supplémenté en Héparine HBPM ou HNF à 1 et 2 UI/mL de la même manière que pour les tests des interférences. Ce même pool est supplémenté avec le même volume de tampon que celui utilisé pour les supplémentations, pour avoir le plasma un témoin sans Héparine.

Le dosage est réalisé en Rivaroxaban selon le protocole validé et sur instrument CS-5100 avec le coffret B. DiXal. La gamme d'étalonnage est réalisée avec 3 étalons Rivaroxaban sur une zone de mesure basse, de 0 à 100 ng/mL de Rivaroxaban. La validité de la courbe est vérifiée avec les 2 contrôles, dosés en N=3. La courbe de calibration et le dosage des contrôles sont réalisés avec un coffret B. DiXal classique et un tampon R3 sans polybrène. Les pools de plasmas normaux et supplémentés en Héparine sont ensuite dosés en N=2 avec les différents tampons supplémentés en polybrène sur cette courbe de calibration.

Interprétation : La conformité de l'étalonnage ($r^2 \geq 0,98$) est confirmée par les contrôles mesurés, qui doivent être conforme aux spécifications. La comparaison des dosages des pools supplémentés en HNF et HBPM avec le pool de plasma normal témoin permet de définir la concentration la plus faible en polybrène dans le tampon R3, permettant de neutraliser l'interférence des Héparines jusqu'à 2 UI/mL.

Protocole de test sur le différents AODs anti-Xa du R3 du B. DiXal supplémenté en polybrène :

La concentration en polybrène optimale dans le tampon R3 étant déterminée à l'étape précédente, le tampon R3 avec la concentration déterminée de polybrène est ensuite utilisé dans le dosage de différents AODs anti-Xa, mesurables avec le coffret B. DiXal : Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban.

Une courbe d'étalonnage est réalisée sur CS 5100 avec les étalons appariés et les protocoles automatisés adaptés à chaque AOD. Les courbes sont validées si les linéarités sont supérieures à $R^2 \geq 0,98$ et si le dosage des contrôles appariés, testés en N=2, sont dans les fourchettes d'acceptation

Diverses préparations plasmatiques contenant chaque AOD anti-Xa et l'Héparine HNF ou HBPM sont réalisées : Des solutions d'HBPM et HNF en tampon TBSA à 100 et 50 UI/mL sont préparées, et les plasmas avec AODs anti-Xa sont ensuite supplémentés avec de l'Héparine UFH et de l'Héparine LMWH à 1 et 2 UI/mL selon le **tableau 14** suivant :

		AOD anti-Xa à 100 ng/mL (Edoxaban, Rivaroxaban, Apixaban).		
Héparine HBPM ou HNF Concentration finale		2 UI/mL	1 UI/mL	0,0 UI/mL
Héparine HBPM ou HNF en TBSA	100 UI/mL	0,05 volumes		
	50 UI/mL		0,05 volumes	
Tampon TBSA				0,05 volumes
Plasma avec AOD anti Xa à 105,3 ng/mL		0,95 volumes	0,95 volumes	0,95 volumes

Tableau 14 : Tableau de préparation des plasmas avec AOD-anti-Xa et Héparines.

Pour chaque AOD, la supplémentation en TBSA permet d'obtenir les témoins sans Héparines. Tous les plasmas sont dosés en B. DiXal et en N= 3 dans les dosages correspondants avec le tampon R3 avec optimum de polybrène et le tampon R3 sans polybrène.

Interprétation : Pour chaque AOD testé, la comparaison des mesures effectuées entre les plasmas témoins et ceux contenant l'AOD + HNF ou l'AOD + HBPM et dosés soit en B. DiXal avec polybrène ou B. DiXal sans polybrène, permet de vérifier si le tampon R3 optimisé par ajout de polybrène neutralise correctement les Héparines dans chacun des dosages.

2.2 Neutralisation des AODs dans les plasmas de patients.

Les AODs interfèrent dans de nombreux tests de coagulation, et rendent leur interprétation difficile ou impossible chez les patients traités. Nous avons évalué une méthode de neutralisation des AODs dans les plasmas de patients sous traitement, pour supprimer cette interférence dans les tests de routine TP, TCA et TT. Cette neutralisation est obtenue à l'aide d'une pastille de charbon actif, électropositif, qui a la capacité de lier les AODs

anti-Xa ou anti IIa, qui eux sont électronégatifs. Nous avons utilisé des pastilles fournies par la société Haematex (Australie).

Préparation des plasmas à traiter

Les plasmas contenant les AODs testés sont :

- AODs Anti-Xa : Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban:
- AOD Anti-IIa : Dabigatran.

Plasmas lyophilisés repris par 1,0 mL d'eau distillée contenant pour chaque AOD : 100, 250 ou 500 ng/mL.

Plasmas témoins : Pool de plasma normal

Protocole de préparation : une pastille de charbon actif est ajoutée à 1,0 mL de plasma contenant un AOD anti-Xa ou anti-IIa à tester. Agiter vigoureusement, puis laisser en incubation 5 minutes à température ambiante et sous agitation. Centrifuger ensuite à 2000 g pendant 30 secondes puis récupérer le plasma surnageant. Le pool de plasma témoin est traité de la même manière.

2.3 Test des plasmas neutralisés

Tests de routine évalués sur automate CS de chez SYSMEX :

- PT-Phen de HYPHEN BioMed permettant de tester le Temps de Prothrombine (TP), pour l'exploration de la voie extrinsèque avec Facteur tissulaire recombinant (TF) humain (**figure 3 présentée en Introduction**).
- Cephen de HYPHEN BioMed permettant de tester le temps de Céphaline activé (TCA), pour l'exploration de la voie intrinsèque (**figure 3 présentée en Introduction**).
- HEMOCLOT™ Thrombin Time de Hyphen-BioMed. Test permettant de mesurer le temps de Thrombine (TT) d'un plasma.

Protocole de tests :

Tester les

plasmas AODs neutralisés avec les pastilles de charbon actif avec les tests TP, TCA et TT. En parallèle, tester avec les mêmes réactifs, les plasmas AODs n'ayant pas été neutralisés et le pool témoin de plasma normal. Les tests sont réalisés sur l'automate CS-5100.

3 Test rapide de dosage du Dabigatran

Le **test rapide de dosage du Dabigatran que nous avons développé** est un test de migration latérale sur une bandelette de nitrocellulose.

3.1 Principe du test Dabigatran sur Bandelette

Nous allons présenter ici le principe du test qui a été conçu et modélisé pour la réalisation d'un dosage unitaire semi-quantitatif du Dabigatran, avec une sensibilité permettant de détecter le seuil de décision clinique dans un contexte d'urgence (30 ng/mL). Ce test a été réalisé en collaboration avec la société NG-Biotech. C'est un test compétitif entre le Dabigatran à doser et l'Hirudine immobilisée, vis-à-vis d'une quantité constante de FIIa humain.

L'échantillon à doser migre par capillarité sur la bandelette de nitrocellulose comme présenté sur **les figures 29 à 33**. Un témoin de migration permet de valider la bonne exécution du test.

Ce test est une compétition entre le Dabigatran à doser et l'Hirudine immobilisée (exprimée en concentration des solutions utilisées pour réaliser l'immobilisation sur la bandelette de nitrocellulose, lors du processus de fabrication) vis-à-vis d'une quantité constante et limitée de Thrombine (FIIa) fixée sur des billes de cellulose colorées en rouge (FIIa-r). L'Hirudine a une affinité plus forte pour le FIIa que le Dabigatran. De plus, le Dabigatran présente une réaction d'inhibition réversible sur le FIIa, contrairement à l'Hirudine, dont la réaction est irréversible. Le plasma à tester, contenant le Dabigatran, est mis en contact avec le FIIa fixé sur des billes de cellulose, ce qui forme des complexes FIIa-Dabigatran (FIIa-r-Dab). Les complexes migrent sur la bandelette par capillarité. Quand ces complexes FIIa-r-Dab viennent en contact avec l'Hirudine immobilisée à 1mg/mL, la quantité de FIIa fixée est une fonction inverse de la concentration en Dabigatran, car seules les billes FIIa non liées au Dabigatran se fixent. Cependant, lorsque les complexes FIIa-r-Dab rencontrent une seconde bande d'Hirudine immobilisée à 2 mg/mL, la quantité fixée de billes FIIa-r est alors proportionnelle à la concentration de Dabigatran, car l'Hirudine immobilisée, à cette concentration, est plus réactive avec le FIIa que ne l'est le Dabigatran, ce qui provoque une dissociation du complexe FIIa-r-Dab, (le nombre de billes FIIa-r libre non liées au Dabigatran étant négligeable car fixées sur la première ligne d'Hirudine immobilisée à 1mg/mL). Cette réaction permet d'expliquer le principe général du test.

La Thrombine (FIIa) utilisée est une Thrombine stabilisée par réticulation, ce qui permet de la stabiliser et de préserver entièrement son activité pendant toute la durée de vie du produit. Un témoin de migration est introduit et constitué de billes de cellulose bleues, sensibilisées avec des anti-IgG monoclonales (Mab-b), et qui vont réagir avec une bande contenant des IgG.

La présentation et l'interprétation du test global sont décrites sur la **figure 29**, et les interactions entre les différents réactants lors de la migration sont détaillées sur les **figures 30 à 33**.

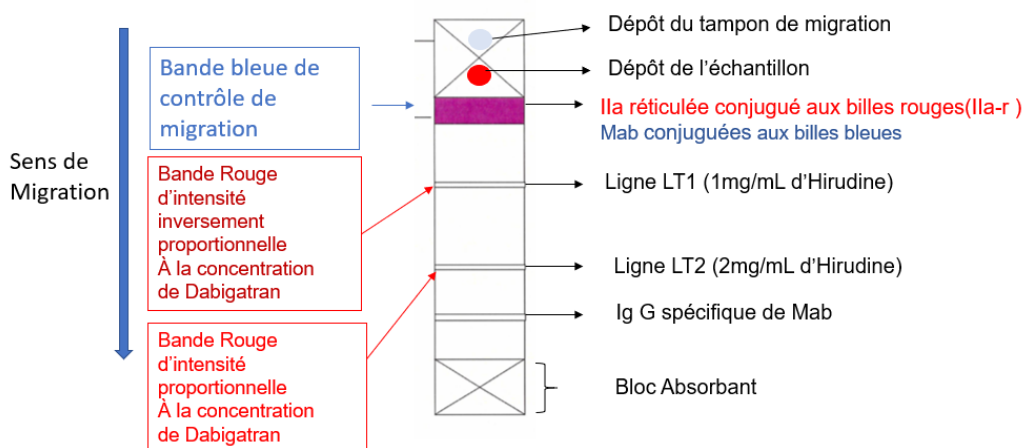


Figure 29: Test de migration latérale sur bandelette de nitro-cellulose pour le dosage du Dabigatran.

Dans le sens de la migration, la bandelette comporte les zones suivantes :

- **Zone de dépôt** du tampon de migration.
- **Zone de dépôt** de l'échantillon, plasma ou sang total.
- **Zone du conjugué (rectangle violet)** : une surface où sont déposés deux types de conjugués : du FIIa réticulée et fixée à des billes de cellulose de couleur rouge (FIIa-r), ainsi que des billes de couleur

bleue, conjuguées avec un anticorps monoclonal (Mab-b), pouvant se lier à des Ig-G spécifiques. Ces dernières billes servent de témoin de contrôle de migration.

- **Lignes d'Hirudine** : une ligne d'Hirudine de 1 mg/mL, puis une autre ligne d'Hirudine de 2 mg/mL. Des concentrations différentes sont utilisées pour les 2 lignes d'Hirudine, permettant la fixation de la Thrombine en excès d'abord (1^{ère} ligne), puis en dissociant les complexes Thrombine-Dabigatran (2^{ème} ligne).
- **Ligne de contrôle de migration** composée d'IgG spécifiques du Mab, juste avant la bande absorbante.
- **Bloc absorbant**

Réalisation du test :

- L'échantillon de plasma à tester est déposé dans la zone de dépôt puis le tampon est introduit, ce qui va permettre la migration par capillarité. En présence de Dabigatran, les billes de FIIa réticulée (FIIa-r) vont former un complexe avec le Dabigatran (FIIa-r-Dab). Le tampon de migration permet l'entraînement des billes avec soit le FIIa-r-Dab, soit le FIIa-r résiduel (en excès), de couleur rouge ainsi que les billes de conjugué bleues (Mab-b), témoin de migration (**figure 30**).

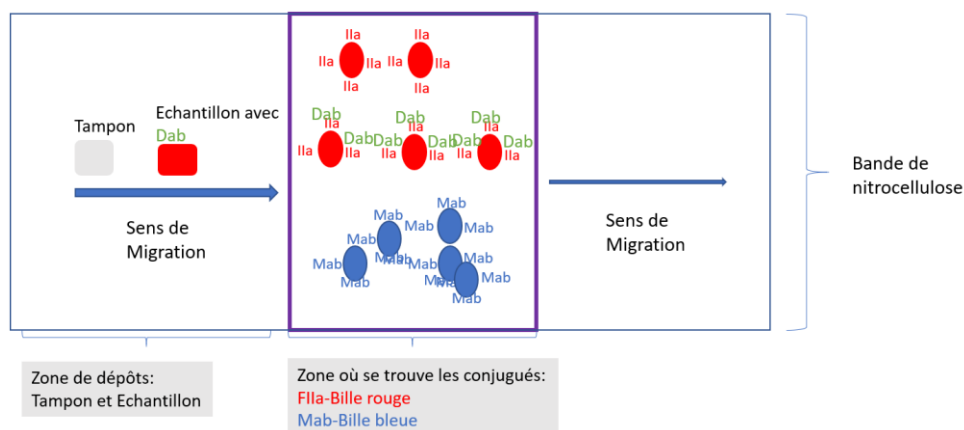


Figure 30: Principe du test rapide de dosage du Dabigatran : Migration par capillarité après dépôts de l'échantillon et du tampon et formation du complexe FIIa-r-Dab sur les billes rouges. Entraînement des billes FIIa-r, FIIa-r-Dab et Mab-b.

- Les billes migrent jusqu'à la ligne sensibilisée avec de l'Hirudine 1 mg/mL, seules les billes FIIa-r sont retenues par l'Hirudine, tandis que les billes FIIa-r-Dab continuent majoritairement à migrer. La concentration d'Hirudine sur cette ligne n'est pas suffisante pour permettre le décrochage du Dabigatran. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration de Dabigatran de l'échantillon (**figure 31**).

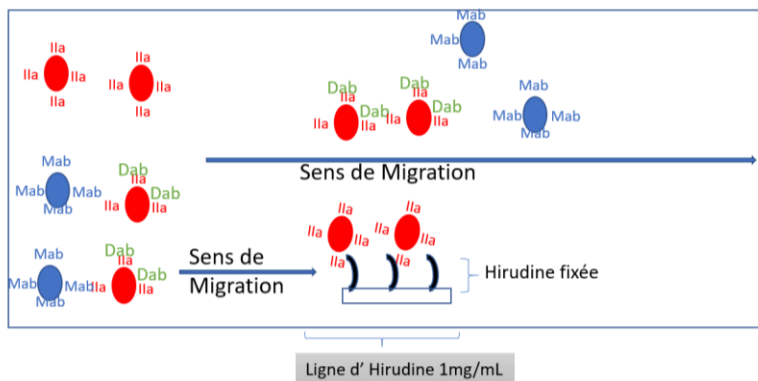


Figure 31: Principe du test rapide de dosage du Dabigatran : Fixation des billes FIIa-r par le complexe du FIIa-Hirudine sur la ligne d'Hirudine à 1 mg/mL.

- Au niveau de la seconde ligne d'Hirudine, sensibilisée à 2 mg/mL, ce sont les billes avec les complexes FIIa-r-Dab qui arrivent majoritairement (les billes FIIa-r libre ont été retenues par la première bande d'Hirudine). Comme la concentration d'Hirudine est plus importante, avec 2 mg/mL, les billes de FIIa-r-Dab, en concentration croissante avec celle de Dabigatran, vont réagir avec l'Hirudine par dissociation du Dabigatran d'une partie des complexes. Les billes FIIa-r dissociées se fixent donc sur cette bande d'Hirudine car cette molécule a une affinité supérieure pour le FIIa que le Dabigatran. L'intensité de la coloration de cette seconde bande est proportionnelle à la concentration de Dabigatran de l'échantillon (**figure 32**).

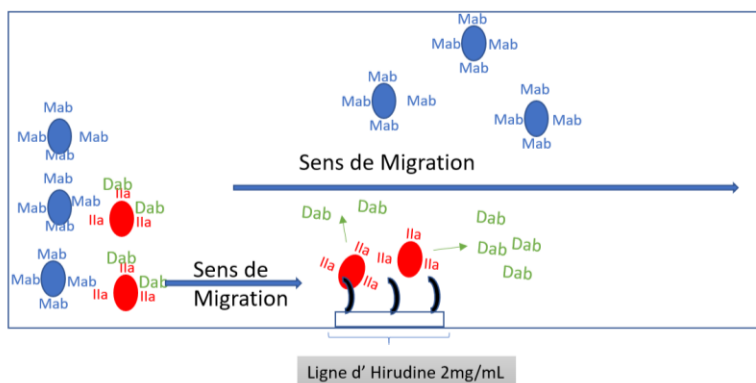


Figure 32: Principe du test rapide de dosage du Dabigatran : Fixation des billes FIIa-r-Dab sur l'Hirudine et décrochage du Dabigatran qui a moins d'affinité pour le FIIa que l' Hirudine, permettant aux billes de cellulose de réagir avec la seconde bande d'hirudine à 2 mg/mL.

- Les anticorps Ig G se complexent aux billes Mab. Les complexes sont retenus sur la 3^e ligne et attestent de la bonne migration du liquide et précipitent les billes Mab en donnant une couleur bleue. Si ce témoin n'est pas coloré, la migration a été incorrecte et le test doit être refait (**figure 33**).

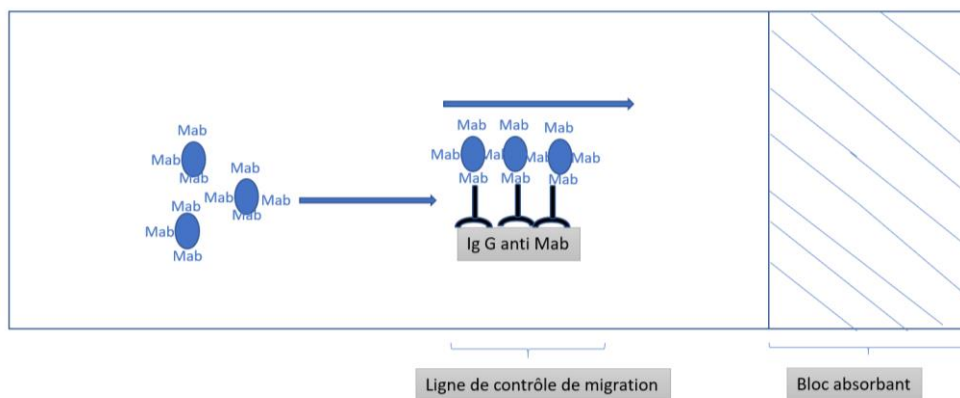


Figure 33: Principe du test rapide de dosage du Dabigatran : Fixation des billes Mab-b sur des anticorps Ig-G spécifiques fixés marquant le témoin de contrôle de la migration.

Protocole du dosage :

10 μ L d'échantillon sont déposés dans la zone de dépôt de l'échantillon (plasma ou sang total), 70 μ L de tampon de migration sont ajoutés ensuite. Le test sur bande de nitrocellulose est réalisé à température ambiante pendant 15 minutes pour permettre la migration totale, jusqu'à la partie absorbante. Plusieurs conditions opératoires sont testées ; en sang total ou plasma sans Dabigatran, puis en faisant migrer plusieurs points d'une gamme plasmatique de Dabigatran et en testant plusieurs temps de migration, en utilisant des bandelettes stockées à 2-8°C ou à température ambiante.

Un scan de la bandelette est ensuite réalisé grâce au lecteur NG-Biotech et l'intensité de chaque coloration peut être interprétée à l'aide du logiciel NG-Biotech adapté, afin d'obtenir une mesure semi-quantitative, éventuellement quantitative.

Gamme plasmatique de Dabigatran :

Plasmas Lyophilisés de HYPHEN-BioMed repris par 1,0 mL d'eau distillée.

3.2 Interprétation du résultat du dispositif

La première ligne sensibilisée à 1 mg/mL d'Hirudine se colore en rouge, et l'intensité de coloration est inversement proportionnelle à la concentration de Dabigatran. Sur la une deuxième ligne sensibilisée avec 2 mg/mL d'Hirudine l'intensité de coloration est directement proportionnelle à la concentration de Dabigatran. L'utilisation de 2 lignes sensibilisées avec l'Hirudine à différentes concentrations permet de d'obtenir un double signal, l'un avec relation inverse et l'autre directe par rapport à la concentration de Dabigatran.

La figure 29 présente la composition de la bandelette, avec la zone de dépôt, les lignes d'Hirudine révélant la réaction et la ligne de contrôle.

4 Analyses statistiques

L'interprétation des résultats a été effectuée à l'aide de tests statistiques et des calculs de probabilité avec le logiciel Excel 16.0 et le module analyse-it version 5.11. Ce module est une référence acceptée pour l'enregistrement des produits par les agences européenne (IVDR) et américaine (FDA).

4.1 Validation des tests à l'aide des calculs de probabilité sur Excel

Validation des dosages, de la calibration, répétabilité et reproductibilité :

Calcul de l'écart type (ET ou σ) :

N= Nombre d'échantillons - x_i =Valeur d'échantillon particulier μ = Moyenne de la valeur de tous les échantillons

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

Calcul du Coefficient de Variation (CV), les résultats sont amenés en % :

$$CV = \frac{\sigma}{Mean}$$

Calcul du Biais - V_c = valeur cible - V_m =Valeur mesurée

$$Biais \% = 100 * \left(\frac{V_c - V_m}{V_c} \right)$$

Validation du test de contamination inter-échantillons :

Le pourcentage de contamination est établi par les calculs : de la moyenne des valeurs des échantillons élevés H(1,2,3) mH, de la moyenne du premier passage des échantillons bas, ainsi que la moyenne du dernier passage des échantillons bas L3=mL3. Le pourcentage de contamination est ensuite calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ contamination} = \frac{(mL1 - mL3)}{(mH - mL3)} \times 100$$

Validation du test de linéarité :

Pour valider le test de linéarité en plus du calcul de l'ET du CV, le pourcentage de différence relative est calculé :

$$\text{Pourcentage de différence relatif} = \frac{\text{Valeur vraie} - \text{Valeur mesurée}}{\text{Valeur vraie} + \text{Valeur mesurée}} * \frac{1}{2} * 100$$

Elimination de valeurs aberrantes :

Sur un échantillonnage de 3 à 10 valeurs pour évaluer si une valeur est aberrante ou non le test de Dixon est utilisé et réalisé sur le logiciel Excel, avec le risque alpha de 5%. Le Test de Grubbs est choisi pour évaluer la pertinence des valeurs sur un échantillonnage supérieur à dix valeurs <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>, avec le risque alpha de 5%. Les valeurs non homogènes à l'ensemble des valeurs, s'écartant statistiquement de la moyenne des valeurs selon ces tests, peuvent ainsi être retirées.

4.2 Logiciel Analyse It

Test de comparaison méthodes ou instruments :

Le coefficient de corrélation et l'écart entre les valeurs sont déterminés par la méthode des moindres carrés. Analyse-it est une macro d'Excel, utilisée pour les statistiques des études cliniques et épidémiologiques en particulier, et conforme aux exigences de la FDA. En plus des études techniques et scientifiques, ce logiciel d'analyse statistique peut être utilisé pour tous les dossiers d'enregistrement soumis aux autorités réglementaires, pour les études cliniques des médicaments, ou les validations des réactifs de diagnostic *in vitro* (IVD).

4.3 Test statistique spécifique:

Le test de Student réalisé avec le logiciel R est effectué pour comparer les moyennes de deux groupes de valeurs ; le calcul de la probabilité permet de déterminer si un ou plusieurs échantillons sont mesurés statistiquement de manière identique ou non.

IV RESULTATS

1 Dosage de l'Edoxaban avec deux méthodes chromogènes Anti-Xa (2-Temps et cinétique)

1.1 Le dosage in vitro de l'Edoxaban

Le développement et la validation des méthodes anti-Xa spécifiques permettent de mesurer l'activité anti-Xa de l'Edoxaban (AOD anti-Xa) dans le plasma, et nécessitent l'utilisation et l'optimisation de plasmas étalons spécifiques pour la calibration. Pour réaliser les tests, nous avons utilisé les lots d'essais d'Edoxaban étalon gamme basse et gamme standard, associés pour chaque gamme à deux contrôles de qualité appariés. Les étalons et les contrôles de qualité sont lyophilisés et le processus de fabrication a été présenté en Matériels et Méthodes.

Dans ce travail, nous nous focalisons sur le dosage de l'activité anti-Xa de l'Edoxaban dans le plasma, porté essentiellement par la forme active, mais pouvant également provenir en partie, mais de façon marginale, de certains de ses métabolites (Bathala et al. 2012 ; Parasrampur et Truitt 2016). L'Edoxaban est dosé directement à l'aide du test anti-Xa chromogène en méthode 2-temps, test B. DiXal, ou en méthode cinétique 1-temps, test B. HLRT. Ces deux tests sont basés sur la neutralisation du FXa. Dans le premier test, la réaction chromogène intervient dans un deuxième temps, après neutralisation du FXa par l'Edoxaban, dans le second test, elle se fait de manière compétitive, simultanément à la neutralisation du FXa. La mise au point de ces dosages nécessite d'évaluer leurs caractéristiques, et l'optimisation des divers paramètres est décrite ci-après.

1.2 Résultats des dosages

L'objectif de l'optimisation est de développer un test de dosage répondant aux besoins des cliniciens pour le suivi des patients quand cela est nécessaire.

Un patient sous Edoxaban peut être en surdosage par suite d'une prise excessive de médicament ou d'une insuffisance rénale, et les pics de concentration d'Edoxaban peuvent atteindre 400 ng/mL ou plus dans le plasma des patients (Parasrampur et Truitt, 2016).

Un patient sous AOD Edoxaban peut être suivi en cas de nécessité de chirurgie d'urgence ; il faut donc prendre en compte le seuil de décision qui correspond à la concentration maximale, permettant de réaliser l'intervention chirurgicale sans risque hémorragique résultant de l'anticoagulant. Ce seuil est de 30 ng/mL pour l'Edoxaban. Lors de l'optimisation des dosages, il a été décidé de réaliser deux gammes de dosages pour pouvoir mesurer de manière précise en zone haute (gamme d'étalonnage standard) et basse (gamme d'étalonnage basse). Les dosages ont été adaptés sur l'automate CS-5100. Après avoir déterminé les volumes optimaux d'échantillons et de réactifs, et la dilution optimale de l'échantillon, un protocole définitif a été mis au point, permettant d'obtenir une droite avec un coefficient de corrélation acceptable $r^2 \geq 0,98$ et une différence de DO/min ($\Delta DO/min$) entre les 2 points extrêmes de la calibration $\geq 0,500$. L'**annexe 2** résume les protocoles utilisés pour les dosages, en gamme basse et standard, avec les trousses B. DiXal et B HLRT. La **figure 34** montre un exemple des gammes d'étalonnage obtenues avec ces dosages :

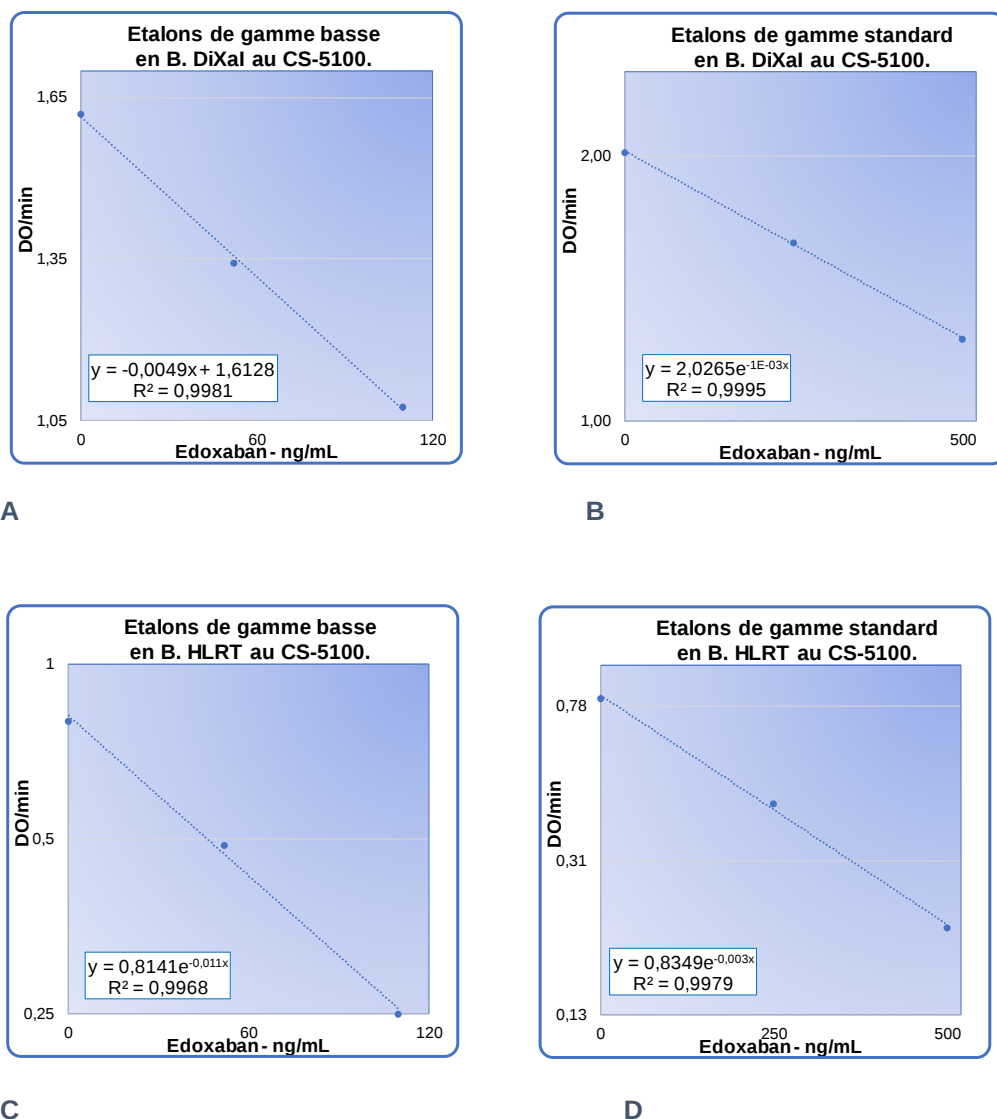


Figure 34 : Représentation graphique des courbes de calibration de l'Edoxaban :

Courbes obtenues sur instrument CS 5100, en utilisant 3 étalons Edoxaban avec les 2 réactifs pour la gamme basse : 0-50-100 ng/mL (A en B. DiXal C en B. HLRT), ou pour la gamme standard : 0,0 – 250 – 500 ng/mL (B. en DiXal D en B. HLRT).

Pour chaque réactif, divers tests sont utilisés pour évaluer les performances :

- Test de la répétabilité, intra-essai, dans une série avec une même courbe de standardisation, ou test de reproductibilité inter-essai, de jour à jour, avec différentes courbes de calibration.
- Evaluation de la contamination lors du passage des échantillons forts et des échantillons faibles permettant de vérifier la qualité de lavage des aiguilles de prélèvement des échantillons et des réactifs.
- Test des interférences liées aux différentes substances biologiques, ou aux différentes molécules pouvant être présentes dans le plasma.

Ces tests sont résumés dans le **tableau 15** suivant :

		Echantillons passé sur le test B. DiXal				Echantillons passé sur le test B. HLRT			
		Intra-essai (N=40)		Inter-essai (N=40)		Intra-essai (N=40)		Inter-essai (N=40)	
		Moy. (ng/mL)	CV (%)	Moy. (ng/mL)	CV (%)	Moy. (ng/mL)	CV (%)	Moy. (ng/mL)	CV (%)
Test en gamme basse	Cont. 1 (27 ng/mL)	25	6,0	32	7,0	28	1,7	28	4,9
	Cont.2 (78 ng/mL)	73	2,0	89	5,1	85	1,8	86	3,8
Test en gamme standard	Cont. 1 (150 ng/mL)	148	3,5	153	3,7	149	1,6	146	1,5
	Cont.2 (305 ng/mL)	295	2,1	317	2,7	314	0,9	306	1,5

Zone de mesure analytique en	B. DiXal		B. HLRT	
	Gamme basse	Gamme standard	Gamme basse	Gamme standard
Concentration en Edoxaban (ng/mL)	7 – 190	29 - 916	2 – 180	23 - 916

Test de Contamination	B. DiXal		B. HLRT	
	Gamme basse	Gamme standard	Gamme basse	Gamme standard
Evaluation en %	-1,3%	1,3 %	0,3 %	- 0,3 %

Tableau 15 : Etude des performances des réactifs B.DiXal et B.HLRT dans le dosage de l'Edoxaban. Cont 1 : Contrôle bas de gamme Cont 2 : Contrôle haut de gamme Moy. : Moyenne
Tableaux présentés de haut en bas : Répétabilité de la mesure en Intra et Inter-essai – Zone de mesure dynamique de l'Edoxaban – Test de contamination.

Le test B. DiXal donne des répétabilités de dosages inférieures au test B. HLRT. Le CV reste néanmoins inférieur à 10 % en gamme basse et 5% en gamme standard. Les résultats restent fiables : par comparaison la méthode de référence LC:MS/MS admet des CV inférieur à 10% quelque-soit la concentration mesurée.

Une valeur inférieure à 5% atteste de l'absence de contamination dans les test développés B. DiXal et B. HLRT, démontrant que les lavages des aiguilles sont corrects.

Les limites de linéarité ont été vérifiées en extrapolation, avec les coffrets B. HLRT et B. DiXal et elles sont d'au moins 900 ng/mL avec les gammes standards et d'au moins 120 ng/mL pour les gammes basses.

La limite de quantification permet de mesurer en gamme basse à partir d'au moins 7 ng/mL et en gamme standard à partir d'au moins 29 ng/mL, pour les deux tests B. HLRT et B. DiXal. Il est à noter qu'en limite de mesure basse le test B. HLRT permet des mesures plus faibles que le test B. DiXal.

Les interférences de molécules biologiques ou médicamenteuses ont été testées dans les dosages avec les coffrets B. HLRT ou B. DiXal. L'impact de interférences peut être résumées dans le **tableau 16** suivant :

Pas d'interférences en B. HLRT et B. DiXal jusqu'à			
Bilirubine (Libre)	25 mg/dL (425 µmol/L)	Dabigatran	400 ng/mL
Bilirubine (Conjuguée)	25 mg/dL (300 µmol/L)	Héparines (HNF et HBPM)	B. HLRT : Sensible
Intralipides	1000 mg/dL		B. DiXal* : 0,5 UI/mL gamme basse 1,0 UI/mL gamme standard
Hémoglobine	250 mg/dL		

*La sensibilité aux Héparines a été supprimée avec une amélioration du réactif présentée plus loin

Tableau 16 : Etude des interférences aux substances biologiques et aux anticoagulants Dabigatran et Héparines (HNF, HBPM). Concentration Interférente indiquée = Concentration en molécule interférente la plus haute jusqu'à laquelle les dosages ne sont pas perturbés, présentée pour les dosages B. HLRT et B. DiXal les plus sensibles (gammes basses).

Les interférences en Bilirubine Libre et Conjugué Hémoglobine, Intralipides sont identiques en B. DiXal et B. HLRT. Le test B DiXal classique est, en outre, peu sensible à la présence d'Héparine Bas Poids Moléculaire ou non fractionnée jusqu'à 0,5 UI/mL en gamme basse et 1,0 UI/mL en gamme standard.

Les critères de dosages définis au début de la mise au point sont bien respectés ; les deux dosages B. HLRT et B. DiXal mesurent l'Edoxaban en dessous du seuil de 15 ng/mL et au-dessus de 400 ng/mL. En cas de relais d'anticoagulants après une opération chirurgicale, le patient peut passer d'un traitement hépariné à la prise d'Edoxaban. En présence d'Héparine dans les doses usuelles, le test B. DiXal permet de mesurer spécifiquement la concentration plasmatique d'Edoxaban. On notera que le réactif B. DiXal a pu être amélioré par la suite, permettant de supprimer complètement la sensibilité à l'Héparine y compris pour des concentrations élevées de cet anticoagulant, cette étude est présentée plus loin.

1.3 Comparaison des méthodes développées et la méthode référence LC:MS/MS pour le dosage de l'Edoxaban sur des échantillons cliniques

Dans cette étude, 125 plasmas traités avec l'Edoxaban sont testés avec les deux trousse B. HLRT et B. DiXal et les protocoles présentés en **annexe 2**. Le taux d'Edoxaban de chaque plasma est également mesuré par LC:MS/MS (méthode de référence des études cliniques). Les valeurs obtenues peuvent être comparées : Les méthodes B. HLRT et B. DiXal peuvent être comparées entre elles et chacune de ces méthodes est comparée au dosage LC:MS/MS.

Les diagrammes de corrélation sont présentés sur la figure ci-dessous (**figure 35**) :

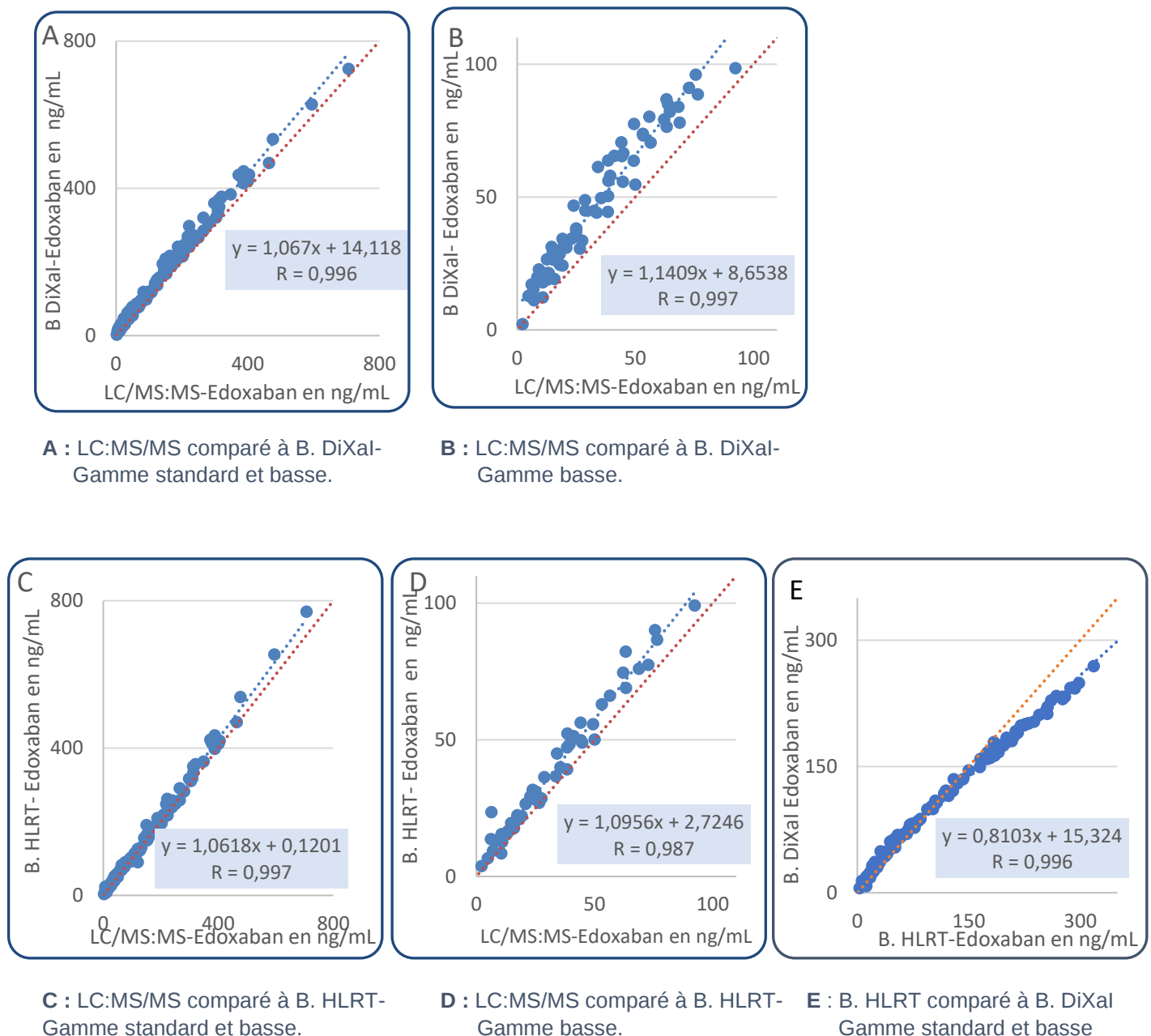


Figure 35 : Comparaison du dosage de 125 patients par les deux méthodes B. HLRT (1 temps) et B. DiXal (2 temps) et LC:MS/MS. Le dosage de chaque plasma de patient est matérialisé par des points bleus et la droite de corrélation est en pointillés bleus. Une droite rouge d'Equation $y=x$ représente la corrélation parfaite. Les dosages avec B. HLRT (A, B) et B. DiXal (C, D) figurent en ordonnées et sont comparés avec la méthode chromatographique de référence LC:MS/MS, qui est en abscisses. A et C représentent l'ensemble des dosages de 0 à 800 ng/mL obtenus avec les gammes standard et basse. C et D ne représentent que les taux d'Edoxaban inférieurs à 100 ng/mL mesurés avec la gamme basse. Les patients présentant des concentrations au-delà de la zone de mesure, ont été retestés après dilution supplémentaire en plasma. Enfin, le graphique E montre la comparaison des deux méthodes que nous avons développées pour les gammes standards et basse pour les points ne dépassant pas 350 ng/mL. Ces résultats montrent une légère surestimation des tests chromogènes par rapport au LC:MS/MS, et une surestimation des taux mesurés avec B. HLRT pour les concentrations > 200 ng/mL. Ces différences sont analysées et étudiées dans la suite de l'étude.

Sur tous les graphiques de comparaison des tests que nous avons développés avec la méthode de référence LC:MS/MS, les trousse B. DiXal et B. HLRT donnent des valeurs de dosage des plasmas plus élevées que la méthode LC:MS/MS (**figures 35 A à C**).

L'écart des concentrations est plus important en zone basse (taux inférieurs à 100 ng/mL). Cela est nettement visible sur les **figures 35 B et D**. Si les deux méthodes B. DiXal et B. HLRT sont comparées entre elles nous constatons que les points supérieurs à 200 ng/mL sont dosés de manière plus élevées avec la trousse B. HLRT, le coefficient directeur de 0,81 indique nettement que le test B. DiXal dose l'Edoxaban avec des valeurs inférieures à celles du test B. HLRT (**figure 35E**).

Pour comprendre ces différences, nous nous sommes penchés sur le métabolisme de l'Edoxaban dans l'organisme des patients traités.

L'Edoxaban, dans le sang des patients, se transforme en de multiples métabolites dont certains ont une réactivité anti-Xa. Il est, ainsi, possible que les concentrations plus élevées mesurées avec les trousse B. DiXal et B. HLRT, comparées avec la méthode référence LC:MS/MS, proviennent de ces métabolites. De même que les différences entre les tests B. DiXal et B. HLRT pourraient provenir de ces derniers. En effet, la méthode LC:MS/MS ne mesure que le type de molécule spécifique ciblé, dans notre cas c'est l'Edoxaban, tandis qu'avec les méthodes que nous avons développées l'activité globale anti-Xa est dosée. Ces métabolites pourraient aussi ne pas agir exactement de la même manière avec le test B. HLRT et le test B. DiXal, ce qui expliquerait les différences de dosages existant entre ces deux méthodes.

Pour vérifier ces hypothèses, l'activité spécifique des métabolites a été évaluée avec les tests B. DiXal et B. HLRT.

1.4 Etude de l'activité des métabolites de l'Edoxaban

1.4.1 Comparaison des kits B. DiXal et B. HLRT dans le dosage de l'activité de chaque métabolite de l'Edoxaban.

Comme évoqué dans la partie précédente et en introduction, l'Edoxaban est métabolisée en différents métabolites qui sont présents dans le sang des patients traités. Le métabolite le plus abondant est le M4 suivi ensuite par le M1, le M6 et le M8. Les métabolites M2, M3, M5 sont à l'état de traces et ne sont pas mesurables. Le métabolite M1 n'a pas d'activité anticoagulante. Par conséquent, l'activité des métabolites peut être évaluée en suivant uniquement les métabolites M4, M6 et M8.

La première problématique que nous étudions, concerne la différence obtenue entre nos deux coffrets de dosage B. HLRT et B. DiXal. Nous avons étudié les activités anti-Xa des divers métabolites M4, M6 et M8, à différents niveaux (40,75,250 et 350 ng/mL), supplémentés dans le plasma humain citraté normal, dans les dosages B. DiXal et B. HLRT. Ces dosages ont été effectués en utilisant les gammes basses et standards. Pour chaque dosage, 32 valeurs sont obtenues et les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à l'activité Edoxaban.

Le test de Grubbs a permis d'éliminer pour chaque dosage une valeur au plus. Les moyennes des pourcentages des activités anti-Xa des 2 dosages ont été obtenues sur au moins 31 valeurs. Les résultats obtenus sont synthétisés sur la **figure 36**.

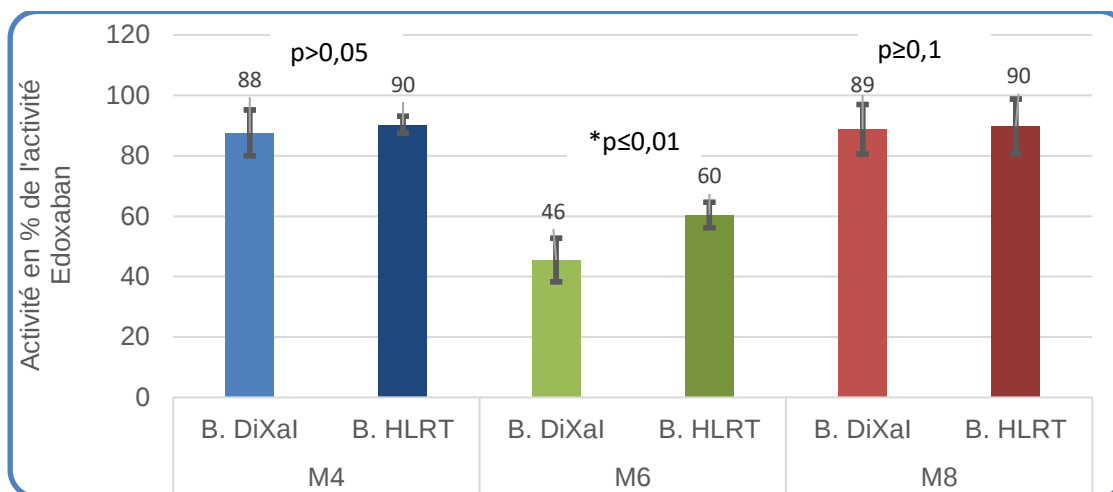


Figure 36 : Activité Anti-Xa des métabolites M4, M6 et M8 de l'Edoxaban

* : Marque une différence significative entre les moyennes (test Student).

Dosage, par rapport à une gamme Edoxaban, réalisé sur les préparations de plasmas supplémentés avec les différents métabolites, avec le test B. HLRT ou le test B. DiXal. Les résultats sont exprimés pour chaque métabolite en % par rapport à l'activité anti-Xa de l'Edoxaban. Les résultats sont analysés de manière statistique avec le test de Student. En haut de chaque histogramme, les taux moyens sont notés et les écarts-types sont représentés par des barres centrales.

Activité Anti- Xa par rapport à celle de l'Edoxaban (figure 36) :

Les métabolites M4 et M8 représentent environ 90% de l'activité de l'Edoxaban avec les deux tests et le métabolite M6 respectivement 46% et 60% avec les méthodes B. DiXal et B. HLRT. Un article a rapporté l'IC50 de chaque métabolite actif (Parasrampur et Truitt, 2016). Dans cet article, les IC50 des métabolites M8 et Edoxaban sont proches, respectivement 2,7nM et 3,0 nM, l'IC50 du M6 est de 6,9 nM et celui du M4 1,8 nM. D'après nos résultats en B. DiXal et B. HLRT, nous retrouvons une équivalence d'activité pour l'Edoxaban et le métabolite M8, ainsi qu'une activité inférieure pour le métabolite M6, en conformité avec leurs IC50. Pour le métabolite M4 l'activité trouvée avec nos tests est proche de celle de l'Edoxaban (90%), alors que l'IC50 du M4 démontre une neutralisation du FXa pour une concentration inférieure à celle de l'Edoxaban, ce qui laisse supposer une activité plus élevée pour ce métabolite. La liaison protéique importante du métabolite M4 de l'ordre de 80 %, alors que pour l'Edoxaban elle n'est que de 55% pourrait expliquer la différence d'activité que nous avons trouvée (Parasrampur et Truitt, 2016).

Comparaison des dosages B. HLRT et B. DiXal (figure 36) :

les valeurs obtenues avec les tests B. HLRT et B. DiXal sont comparées. Nous testons si les moyennes obtenues sont équivalentes par comparaison des deux groupes de valeurs obtenues par métabolite en utilisant le test statistique « Student » .

Avec le métabolite M4 $p = 0,065$, avec M8 $p = 0,832$ et M6 $p = 2.482 \times 10^{-14}$.

Le dosage est statistiquement équivalent ou très proche entre les deux méthodes développées pour les métabolites M4 et M8. Cependant, il existe une différence dans le dosage du métabolite M6, dont l'activité mesurée est plus forte avec le test B. HLRT que le test B. DiXal. L'origine de cette différence provient des caractéristiques de dosage de ces deux tests, nous étudions cela en formulant deux hypothèses de travail.

1.4.2 Hypothèse sur les différences observées dans les dosages des métabolites

Les coffrets B. HLRT et B. DiXal sont réalisés avec deux FXa d'origines différentes (B. HLRT : FXa bovin, B. DiXal : FXa humain). De plus, ils fonctionnent sur des cinétiques réactionnelles différentes. Le B. HLRT est une méthode compétitive du FXa vis à vis de l'inhibiteur et du substrat chromogène, tandis-que le B. DiXal est un test en deux temps, avec dans un premier temps la neutralisation du FXa, et dans un deuxième temps la réaction du FXa résiduel avec le substrat, comme représenté sur les **figures 19 et 20**, et décrit dans le paragraphe Matériel et Méthodes.

Notre hypothèse est que les différences de dosages entre B. HLRT et B. DiXal peuvent provenir de deux causes différentes :

- La nature du FXa utilisée
- Le principe de la réaction chromogène utilisée.

1.4.3 Rôle de l'origine humaine ou bovine du Facteur Xa dans les différences des dosages

Pour étudier ces deux hypothèses, nous avons élaboré un nouveau réactif de dosage, en nous basant sur le réactif B. HLRT. Dans ce nouveau réactif, le FXa bovin est remplacé par du FXa humain, après optimisation de la concentration à utiliser (non présenté ici). Les autres réactifs et le substrat restent identiques.

Nous utilisons ce réactif pour doser les préparations plasmatiques supplémentées avec les différents métabolites M4, M6, et M8, et en comparant les dosages B. HLRT classique (FXa bovin) et B HLRT modifié (FXa bovin). Les supplémentations ont permis d'obtenir 16 valeurs pour chacun des dosages (voir matériels et méthodes). Les résultats sont représentés sur la **figure 37**.

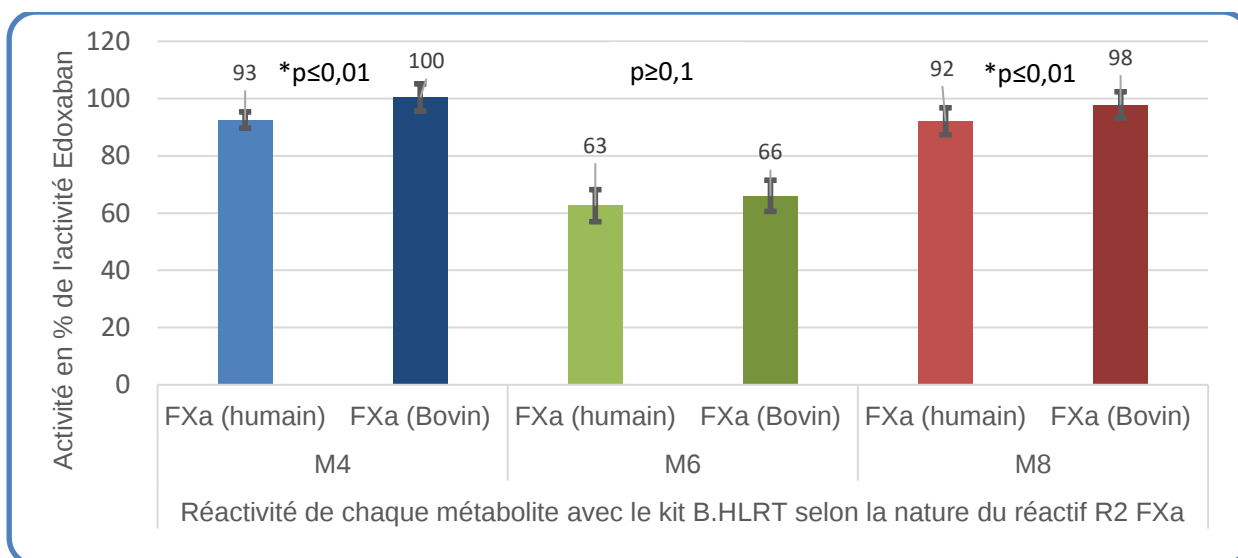


Figure 37 : Comparaison des dosages B. HLRT selon la nature du R2 FXa humain ou bovin :

Le test de Student est utilisé pour le dosage de chaque métabolite : comparaison des valeurs obtenues avec les tests B. HLRT R2-FXa humain et R2 FXa bovin. En haut de chaque histogramme, les taux moyens sont notés et les écart types sont représentés par des barres centrales.

Nous testons si les moyennes obtenues sont équivalentes (**figure 37**).

Avec le métabolite M4 $p = 6.3E-6$, avec M8 $p = 0,0017$ et M6 $p = 0,1074$.

Les différences de dosage en utilisant deux FXa d'origine différente (humaine ou bovine) avec le test B. HLRT montrent que l'activité relative de l'Edoxaban est légèrement plus élevée avec le FXa humain pour les métabolites M4 et M8, mais cette différence ne dépasse pas 10%.

Pour le métabolite M6, histogrammes verts, aucune différence significative dans les dosages n'a été mise en évidence.

1.4.4 Impact des métabolites sur les dosages B. HLRT et B. DiXal

Un seul métabolite semble avoir un impact significatif dans les dosages B. HLRT et B. DiXal, le métabolite M6 représenté par l'histogramme vert dans **la figure 36**.

Le réactif B. DiXal contient du FXa-humain et le réactif B. HLRT du FXa-bovin, mais le métabolite M6, semble peu impacté par la nature du FXa (**figure 37 - histogramme vert**). L'augmentation de la réactivité obtenue pour les métabolites avec le réactif B. HLRT proviendrait donc plus de la cinétique de dosage que de la nature du FXa. Le test B. HLRT compétitif pour le FXa, semble augmenter la réactivité relative du métabolite M6, par comparaison à sa réactivité dans le test B. DiXal, dont le principe repose sur une réaction en deux temps sans compétition pour le FXa.

Il existe également une légère différence des dosages des métabolites M4 et M8, correspondant respectivement aux histogrammes bleus et oranges, comparant les FXa humain et bovin utilisés pour le réactif B. HLRT (**figure 37**). Pour ces métabolites, il n'y a toutefois pas de différence des valeurs mesurées entre les tests B. HLRT-FXa bovin et B. DiXal-FXa humain (**figure 36**). Il est à noter que même si la réactivité des M4 et M8 est favorisée en B. HLRT avec le FXa-bovin par comparaison au B. HLRT avec FXa-humain, de manière significative, la différence entre les moyennes obtenues reste inférieure à 10%, (**figure 37**). De plus, et à l'inverse du métabolite M6, le défaut de réactivité semble compensé pour ces deux métabolites, lorsque la réaction avec le FXa n'est pas compétitive mais en deux temps, comme dans le dosage B. DiXal, bien que ce dernier test utilise le FXa humain moins réactif avec les métabolites M4 et M8 (**figure 36**).

2 Dosage de la Bivalirudine par méthodes chromogène et coagulante

2.1 Le dosage in vitro de la Bivalirudine

La Bivalirudine, un anti-IIa, peut être dosée à l'aide des 2 méthodes différentes que nous avons développées. Il n'existe pas de test de référence, ou de standard international, pour doser la Bivalirudine. Les deux tests utilisés, un test chromogène et un test coagulant, utilisent l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Thrombine (FIIa). Dans le test chromogène B. DTI, le FIIa résiduel génère une réaction colorée en réagissant avec le substrat spécifique. Il y a alors une réaction inverse entre la quantité de Bivalirudine à doser, et la quantité de FIIa résiduelle, donc de la coloration générée et mesurée à 405 nm.

Le test coagulant HTI est basé sur l'inhibition de la capacité de la Thrombine à coaguler un pool de plasma normal. La Bivalirudine ajoutée au milieu réactionnel inhibe la Thrombine de façon dose-dépendante, et le temps de coagulation est allongé, de façon directement proportionnelle à la concentration de Bivalirudine.

2.2 Résultats des dosages

Les dosages doivent permettre de mesurer des concentrations plasmatiques faibles de Bivalirudine ($\leq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$), tout en mesurant des concentrations élevées. Nous choisissons une gamme d'étalonnage s'étendant jusqu'à 5 $\mu\text{g/mL}$, utilisable avec les deux coffrets HTI et B. DTI. Pour les taux de Bivalirudine > 5 $\mu\text{g/mL}$, une redilution automatique est réalisée. Le domaine de mesure développé permet de tester la majorité des patients traités par la Bivalirudine. Cependant, quelques patients peuvent avoir des taux très élevées, au-delà de cette gamme, et nécessitent une dilution supplémentaire pour pouvoir être dosés.

Les tests initiaux ont utilisé une gamme d'étalonnage avec trois plasmas de calibration (surchargés en Bivalirudine). C'est la méthode habituellement utilisée dans le dosage des AODs. Pour la Bivalirudine, l'étalonnage n'étant pas parfaitement linéaire, nous avons décidé d'augmenter le nombre de plasmas de calibration pour pouvoir doser convenablement sur toute la zone de mesure. Cinq étalons sont donc finalement utilisés. Ces 5 étalons permettent d'établir une courbe de calibration polynomiale sur instrument STAR, pour le test Bivalirudine avec le réactif H. TI (H. TI/STAR). Sur instrument CS cette représentation polynomiale n'existant pas, nous choisissons pour le test B. DTI une représentation point à point, approchant au plus près la cinétique réactionnelle, comme montré sur la **Figure 38** (B. DTI/CS).

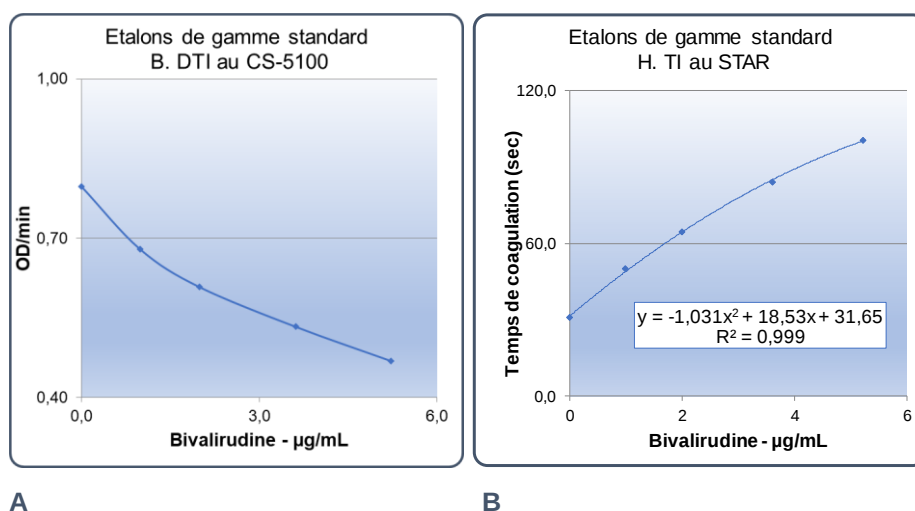


Figure 38 Courbes d'étalonnage pour les dosages de la Bivalirudine :

A: courbe obtenue sur instrument CS avec le coffret BIOPHEN™ DTI (B. DTI) avec 5 étalons de Bivalirudine à 0,0-1,0-2,0-3,5-5,0 $\mu\text{g/mL}$ en représentation « point à point ».

B: courbe obtenue sur instrument STAR avec le coffret HEMOCLOT™ TI (HTI) avec 5 étalons de Bivalirudine à 0,0-1,0-2,0-3,5-5,0 $\mu\text{g/mL}$ en représentation polynomiale.

Sur la **figure 38** nous pouvons observer qu'avec le test B. DTI sur CS 5100 et les test HTI sur STAR, les courbes de dosages ne sont pas linéaires. Il existe un point d'inflexion à environ 2 $\mu\text{g/mL}$: la pente est plus faible pour les concentrations de Bivalirudine comprises entre 2 et 5 $\mu\text{g/mL}$, par comparaison aux concentrations comprises entre 0 et 2 $\mu\text{g/mL}$.

Comme pour l'Edoxaban, les dosages développés ont été testés dans différents paramètres (**tableau 17**).

		Echantillons passé sur le test B. DTI/CS				Echantillons passé sur le test HTI/STAR			
		Intra-essai (N=40)		Inter-essai (N=40)		Intra-essai (N=40)		Inter-essai (N=40)	
		Moy. (µg/mL)	CV (%)	Moy. (µg/mL)	CV (%)	Moy. (µg/mL)	CV (%)	Moy. (µg/mL)	CV (%)
Test en gamme standard	Cont. 1 (1,5 µg/mL)	1,57	3,2	1,64	2,4	1,39	3,6	1,59	3,3
	Cont.2 (4,1 µg/mL)	4,05	3,2	4,10	2,7	4,27	2,1	4,14	3,1

Zone de mesure analytique en	B. DTI/CS	HTI/STAR
Concentration en Bivalirudine (µg/mL)	0,3-20*	0,3-20,0**

*Au-delà de 5µg/mL la dilution est réalisée en plasma

**Au-delà de 5 µg/mL la dilution est réalisée en Imidazole

Test de Contamination	B. DTI/CS	HTI/STAR
Evaluation en %	0,82 %	0,31

Tableau 17 : Etude des performances des réactifs B. DTI sur CS et HTI sur STAR dans le dosage de la Bivalirudine : Cont 1 : Contrôle bas de gamme Cont 2 : Contrôle haut de gamme Moy. : Moyenne
Tableaux présentés de haut en bas : Répétabilité de la mesure en Intra et inter-essai – Zone de mesure possible de l'Edoxaban – Test de contamination.

Les tests HTI/STAR et B. DTI/CS sont évalués : en répétabilité de la mesure inter et intra-essai, la zone de mesure possible avec les tests développés est ensuite définie, la non-contamination des échantillons faibles dosés à la suite d'échantillons forts, ainsi que les interférences des molécules biologiques ou anticoagulantes pouvant être présentes dans le plasma sont pour finir déterminées (**tableau 17**).

Les tests avec les réactifs B. DTI sur CS 5100 et HTI sur STAR ont un coefficient de variation inférieur à 5% en B HLRT et en B DiXal dans les tests inter- ou intra-essais. Des dilutions supplémentaires permettent de doser au-delà de la gamme, en tampon imidazole pour le test HTI et en plasma pour le test B. DTI. Ces dilutions complémentaires peuvent être programmées directement sur les automates STAR et CS. Il est ainsi possible de doser jusqu'à 20 µg/mL. La limite de quantification permet un dosage efficace à partir de 0,3 µg/mL avec le test HTI/STAR et le test B. DTI/CS.

Il n'existe pas de contaminations entre les échantillons élevés et bas, les lavages d'aiguilles sont donc corrects. Cependant il est nécessaire d'étudier de manière plus précise les interférences des molécules biologiques, nos deux dosages ayant révélé des sensibilités très différentes.

2.3 Etude des interférences dans les dosages de Bivalirudine Résultats des dosages

Des molécules présentes naturellement dans le plasma ou dues à un traitement anticoagulant peuvent interférer dans les dosages. Notre analyse vise à déterminer le niveau des interférences dues à ces molécules. Pour établir les performances des deux tests, nous avons évalué la sensibilité des dosages en présence de différentes molécules pouvant interférer et potentiellement présentes dans les plasmas des patients.

Pour la zone basse, inférieure à 2 µg/mL de Bivalirudine, on admet une tolérance sur le dosage jusqu'à 20 % comme étant acceptable, tandis que pour la zone située entre 3 et 5 µg/mL cette différence est jugée acceptable si elle ne dépasse pas 10%. Nous avons défini cela en nous basant sur les normes CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015). Les plasmas des patients à doser en Bivalirudine peuvent contenir des molécules biologiques comme l'Hémoglobine, la Bilirudine conjuguée (C) et libre (L), ou des lipides. Pour tester les interférents, les substances susceptibles d'interférer sont ajoutées aux plasmas contenant de la Bivalirudine. Cette étude nous a permis de déterminer les concentrations les plus élevées de ces molécules ne présentant pas d'interférence significative dans les dosages de Bivalirudine, comme montré sur la **figure 39**.

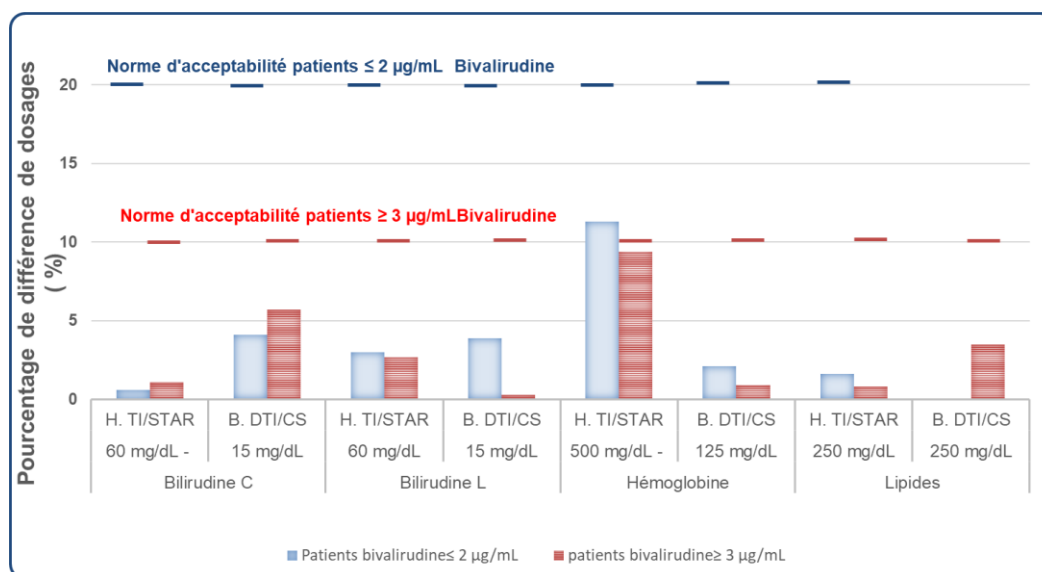


Figure 39: Etude des interférences dans les dosages de Bivalirudine (interféroents :Bilirubine, Hémoglobine, Lipides). A des plasmas contenant de la Bivalirudine est associée différentes molécules interférentes pouvant se trouver naturellement dans le plasma.

Le pourcentage de variation dans le dosage de la Bivalirudine en ordonnance indique la différence de dosage de Bivalirudine en pourcentage en présence ou en absence de molécules interférentes. La variation acceptée est différente selon la dose de Bivalirudine pour des dosages ≤ 2 µg/mL de Bivalirudine elle est de 20% (ligne bleue interrompue), pour les dosages ≥ 3 µg/mL elle est de 10% (ligne rouge interrompue).

En abscisse première ligne figure le type de test de Bivalirudine réalisé et associé à l'instrument et au dosage : STAR/HTI : test HTI sur instrument STAR – CS/B. DTI Test B. DTI sur Instrument CS.

En abscisse seconde ligne figure la concentration maximale, de molécules interférentes, ajoutée au plasma contenant la Bivalirudine présentant une variation de dosage acceptable (<20% pour plasma Bivalirudine ≤ 2 µg/mL et <10% pour plasma Bivalirudine ≥ 3 µg/mL).

En abscisse troisième ligne figure le type d'interfèrent testé Bilirudine C : Bilirudine conjugué – Bilirudine L : Bilirudine Libre, Hémoglobine et Lipides.

Le dosage B. DTI / CS est acceptable, jusqu'à 15 mg/dL de Bilirudine conjuguée (C) ou liée (L), 125 mg/dL d'Hémoglobine et 250 mg/dL de Lipides. Le test H. TI/STAR est moins sensible aux liquides biologiques et ne subit pas d'interférences (ou faible) jusqu'à 60 mg/dL Bilirudine C et L, 500 mg/dL d'Hémoglobine, 250 mg/dL de Lipides. Les interférences liées aux médicaments anticoagulants sont représentées sur la **figure 40**.

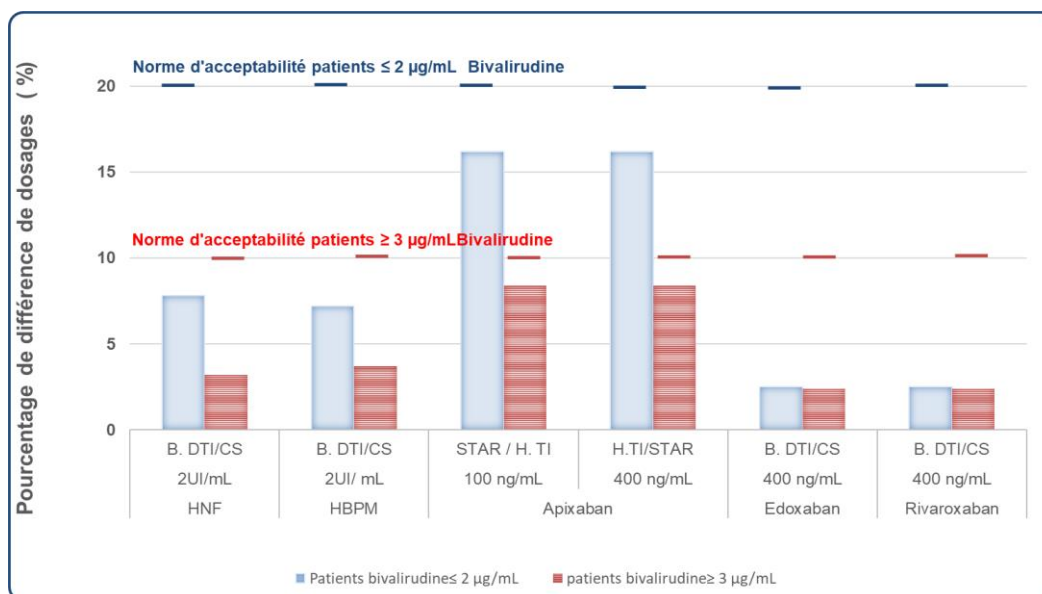


Figure 40 : Etude des interférences des anticoagulants (AODs anti-Xa et Héparine) dans les dosages de Bivalirudine : A des plasmas contenant de la Bivalirudine est associé différentes molécules interférentes pouvant se trouver dans le plasma après un traitement anticoagulant.

Le pourcentage de variation dans le dosage de la Bivalirudine en ordonnance indique la différence de dosage de Bivalirudine en pourcentage en présence ou en absence de molécules interférentes. La variation acceptée est différente selon la dose de Bivalirudine pour des dosages $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ de Bivalirudine elle est de 20% (ligne bleue interrompue), pour les dosages $\geq 3 \mu\text{g/mL}$ elle est de 10% (ligne rouge interrompue).

En abscisse première ligne figure le type de test de Bivalirudine réalisé et associé à l'instrument et au dosage : STAR/HTI : test HTI sur instrument STAR – CS/B. DTI Test B. DTI sur Instrument CS.

En abscisse seconde ligne figure la concentration maximale, de molécules interférentes, ajoutée au plasma contenant la Bivalirudine présentant une variation de dosage acceptable ($<20\%$ pour plasma Bivalirudine $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ et $<10\%$ pour plasma Bivalirudine $\geq 3 \mu\text{g/mL}$).

En abscisse troisième ligne figure le type d'interfèrent testé HNF, HBPM (Héparines non fractionnées et de bas poids moléculaire), Apixaban, Edoxaban et Rivaroxaban

Le test B. DTI/CS n'est pas interféré pour des concentrations élevées d'AODs anti-Xa (Apixaban, Edoxaban, Rivaroxaban,) jusqu'à 400 ng/mL ou des doses en Héparine (UFH, LMWH) atteignant 2 UI/mL. Le test HTI/STAR étant sensible à de faibles doses d'Héparines (UFH ou LMWH) d'Edoxaban et de Rivaroxaban, l'interférence étant trop importante est non représenté sur la figure 40. Le test HTI/STAR dans le dosage de la Bivalirudine est relativement moins interféré avec l'AOD Apixaban, il admet une dose de 100 ng/mL.

2.4 Comparaison des méthodes développées pour le dosage de la Bivalirudine sur des échantillons cliniques

Pour doser les échantillons cliniques, nous avons dû ajuster les dilutions utilisées, et gérées par l'automate. Ainsi, une dilution supplémentaire d'un facteur 1/5 peut être programmée en imidazole pour le test HTI/STAR et en plasma normal pour le test B. DTI/CS, ce qui permet de tester des échantillons pouvant atteindre 20 $\mu\text{g/mL}$, avec une gamme initiale de 0 à 5 $\mu\text{g/mL}$. Le dosage de 109 plasmas de patients traités peut ainsi être réalisé, et les résultats sont présentés (figure 41).

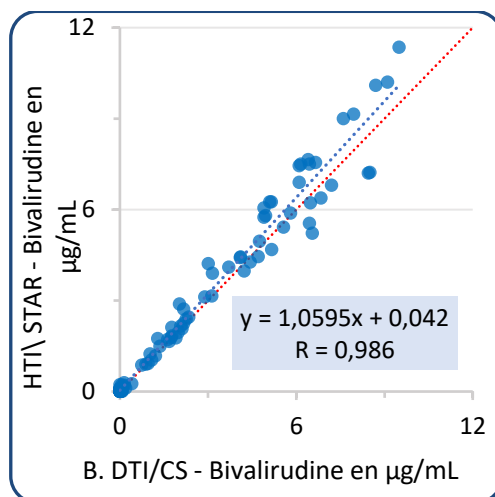


Figure 41 : Dosage de la Bivalirudine sur les plasmas : 109 plasmas dosés à l'aide des deux méthodes HTI/STAR et B. DTI/CS mesurant l'activité de la Thrombine

En bleu : droite de corrélation – En rouge : droite obtenue pour une corrélation hypothétique parfaite.

Les points au-delà de 5 µg/mL ont été testés par dilution au 1:5 en plasma normal citraté, test B. DTI/CS ou en imidazole pour le test HTI/STAR, par programmation spécifique des automates. Coefficient de corrélation entre les deux méthodes $r=0,986$.

Il apparaît une bonne corrélation des taux de Bivalirudine mesurés sur les plasmas de patients avec les méthodes B. DTI sur CS ou HTI sur STAR avec un coefficient $r \geq 0,90$ (0,986 dans l'étude réalisée) et il existe un biais très faible de mesure entre les deux dosages : comme le coefficient directeur est compris entre 0,90 et 1,10 les deux dosages peuvent être considérés comme équivalents.

3 Amélioration des performances des tests existants pour les AODs

Le développement de nouvelles méthodes pour doser les anticoagulants Edoxaban et Bivalirudine améliore le suivi des patients, en offrant la possibilité aux cliniciens de suivre ces traitements, et de prendre les décisions appropriées en fonction de la concentration sanguine d'anticoagulant. Cependant certaines méthodes de dosages présentent des limites et peuvent encore être optimisées. Pour améliorer le suivi des patients il peut aussi être utile de pouvoir doser spécifiquement un anticoagulant sans interférence d'autres traitements, en particulier en cas de relais thérapeutique. Cela concerne d'abord les tests de coagulation de routine qui ne sont pas exploitables chez les patients sous anticoagulants, en particulier les AODs. Nous avons testé et validé par conséquent une méthode pour éliminer ces interférences, en adsorbant l'activité anticoagulante dans les plasmas à tester. Ces résultats sont présentés en 3.1. Ensuite, lors du relais d'un traitement hépariné vers un AOD anti-Xa, le dosage B. DiXaI utilisé pour doser l'activité anti-Xa de l'AOD doit être insensible à l'héparine, ce qui est le cas pour la majorité des patients. Cependant, au-delà de 0,5 UI/mL d'Héparine dans le plasma, et en cas de dosage en gamme basse des AOD-anti-Xa, il persiste une légère interférence. Dans ce travail, nous avons développé une approche pour supprimer cette interférence, et les résultats sont présentés en 3. 2.

3.1 Neutralisation des AODs dans les plasmas de patients.

Les AODs présents dans les plasmas à tester ont été neutralisés selon le protocole décrite en Matériels et Méthodes à l'aide de pastilles de charbon actif, qui adsorbent ces AODs. L'efficacité de cette adsorption

a été évaluée sur les tests de routine, en particulier le TP, le TCA et le TT. Ces tests ont été réalisés sur des plasmas surchargés avec les divers AODs, avant et après adsorption par les pastilles de charbon actif. Les résultats, obtenus sur automate CS 5100 sont présentés sur la **figure 42**.

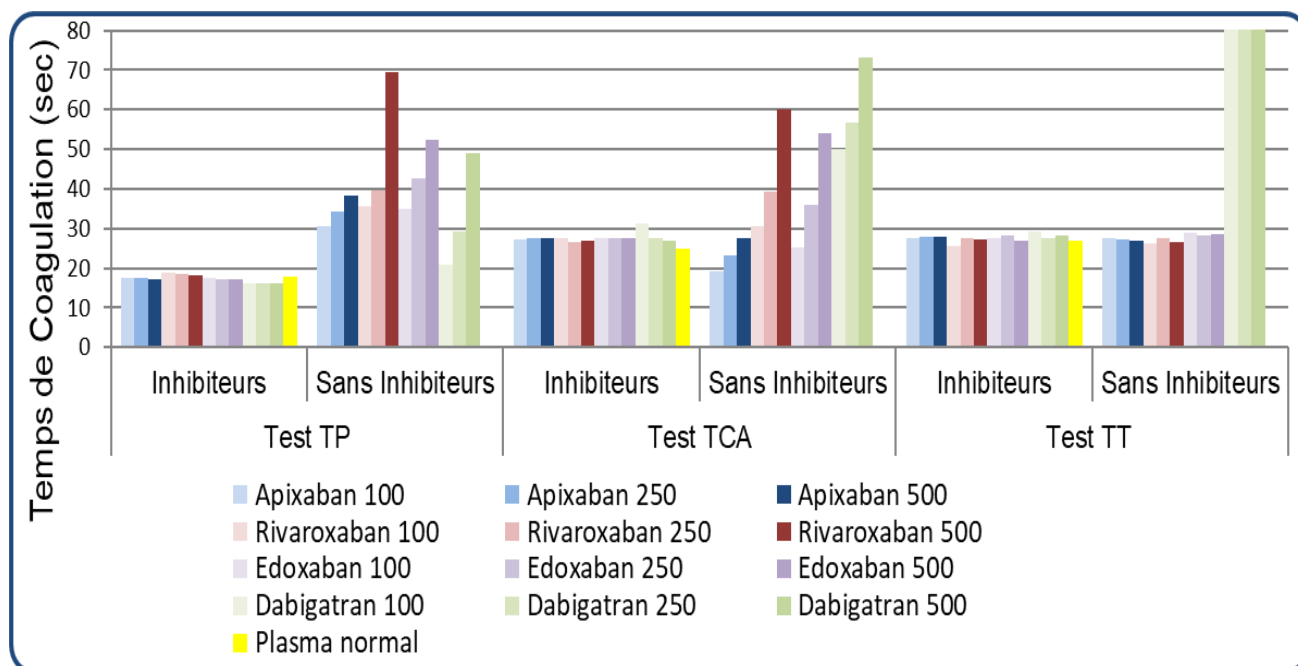


Figure 42 : Effet de l'absorbant « charbon actif » (inhibiteur des AODs) sur les tests de coagulation des plasmas contenant les AODs : Les pastilles d'absorbant (pastilles de charbon actif) sont introduites dans les plasmas contenant les différents AODs (Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban, Dabigatran) et les tests de coagulation, TP, TCA et TT sont effectués sur ces plasmas avant et après traitement au charbon actif. Les chiffres 100 -250 et 500 représentent les concentrations en ng/mL utilisées pour les différents AODs testés.

Les anticoagulants AODs Apixaban (histogrammes bleus), Rivaroxaban (histogrammes mauves), Edoxaban (histogrammes violets), Dabigatran (histogrammes verts) ont une action anticoagulante affectant les tests de routine. Les plasmas contenant les AODs (sans inhibiteurs) augmentent le temps de coagulation mesuré par le test TP. Pour le test TCA, ce temps n'augmente pas significativement en présence d'Apixaban, mais est allongé en présence de Rivaroxaban, d'Edoxaban et de Dabigatran à partir de 250 ng/mL. Le test TT, dont le réactif est la Thrombine, est affecté uniquement par la présence de Dabigatran à partir de 500 ng/mL, ce qui provoque une augmentation du temps de coagulation. L'adsorption des AODs avec les pastilles de charbon actif permet de normaliser tous les temps de coagulation quel que soit le test et l'AOD. Après adsorption, les valeurs obtenues pour les divers plasmas supplémentés en AODs correspondent à des plasmas normaux sans anticoagulants (**Figure 42, Test TP, TCA, TT avec inhibiteur**) .

3.2 Elimination de l'interférence de l'Héparine dans le dosage des AODs anti-Xa avec le test B. DiXal.

Le but est d'améliorer les dosages des AODs anti-Xa commercialisés en les rendant plus spécifiques des AODs et en supprimant l'interférence des Héparines. Les inhibiteurs directs du FXa, l'Apixaban, le Rivaroxaban ou l'Edoxaban peuvent être dosés avec le test B. DiXal et sont insensibles aux Héparines

jusqu'à 0,5 UI/mL en gamme basse et 1,0 UI/mL en gamme standard, grâce à l'utilisation d'une force ionique élevée pour le tampon de dilution. Nous cherchons à améliorer la sensibilité du test pour qu'il puisse doser exclusivement les AODs anti- Xa dans des plasmas contenant jusqu'à 1 à 2 UI/mL d'Héparine. Pour cela, la formule du tampon de dilution du coffret B. DiXal a été légèrement modifiée avec addition de polybrène. Le polybrène est utilisé car c'est l'une des substances efficaces pour neutraliser l'héparine (Preston et al., 1956). Pour valider l'efficacité de cette approche, les plasmas contenant des AODs anti-Xa et de l'héparine à diverses concentrations sont testés avec le tampon usuel et le tampon supplémenté avec l'inhibiteur de l'héparine.

3.2.1 Optimum de polybrène dans le tampon R3 du B. DiXal

Pour tester l'optimum de polybrène devant être ajouté au tampon, le dosage B. DiXal est effectué sur des échantillons contenant du Rivaroxaban, et en utilisant la gamme basse. La courbe de calibration est validée par la conformité des plasmas de contrôle de qualité et la linéarité avec $r^2 \geq 0,98$ (en absence de polybrène). Plusieurs dosages de pools de plasmas supplémentés en Héparine HNF ou HBPM à 1 et 2 UI /mL sont effectués sur automate CS, en augmentant progressivement la concentration de polybrène dans le tampon du réactif B. DiXal. Ceci doit permettre de déterminer la concentration de polybrène permettant de neutraliser totalement la présence d'HNF ou de HBPM dans les plasmas testés avec le B. DiXal. Un témoin normal est préparé comme suit : pool de plasma témoin sans Héparine dosé en l'absence de polybrène. Les résultats sont présentés sur la **figure 43**. Chaque dosage est réalisé en double.

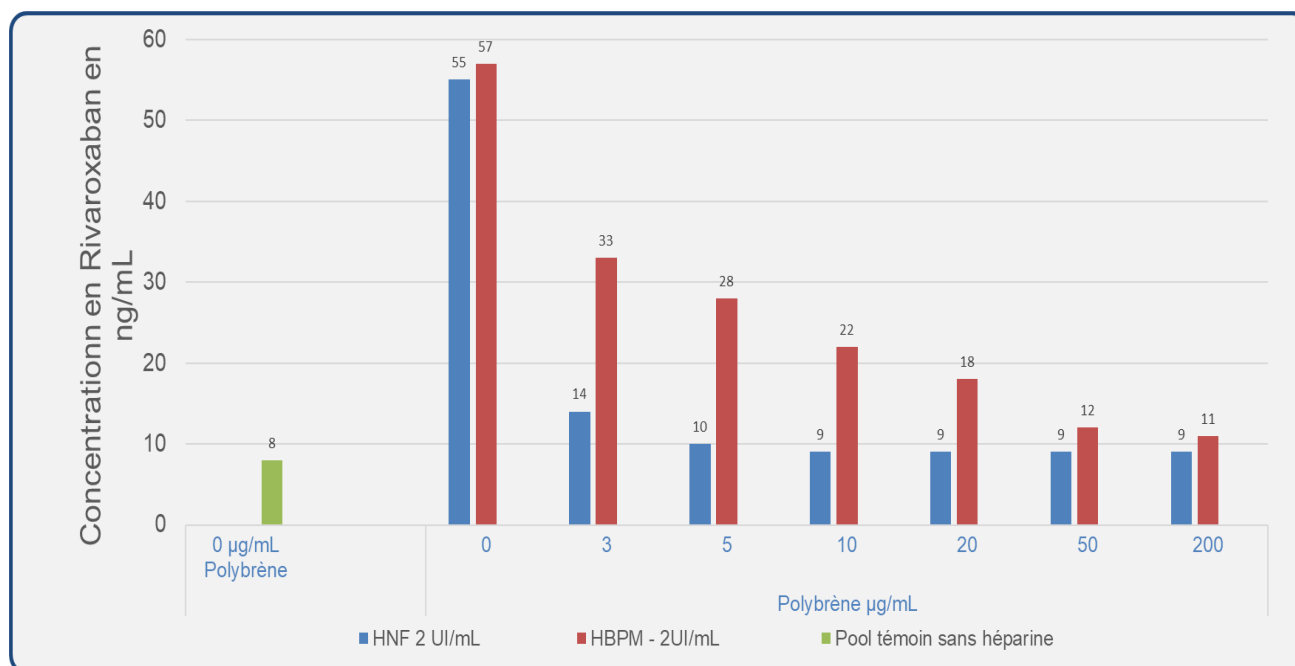
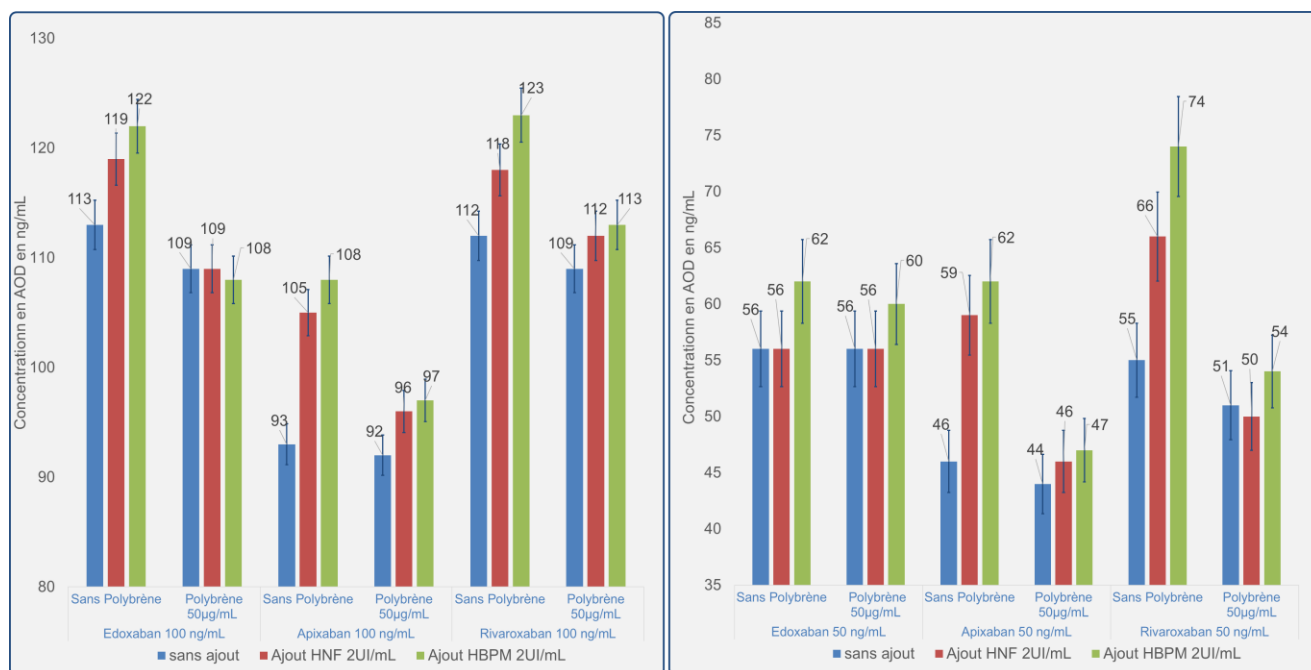


Figure 43 : Neutralisation des Héparines dans le test B. DiXal en gamme basse par ajout progressif de polybrène dans le tampon du réactif : Le pool de plasma témoin est supplémenté en Héparine Bas Poids Moléculaire (HBPM 2 UI/mL, barres rouges) ou Non Fractionnée (HNF 2 UI/mL, barres bleues). Le pool de plasma témoin, dosé sans polybrène, est représenté par un histogramme vert. Le dosage du pool de plasmas supplémenté en HBPM ou HNF (histogrammes bleus et rouge) est réalisé en présence de concentrations croissantes de polybrène de 0 à 200 µg/mL. Les valeurs moyennes obtenues (en haut des histogrammes) indiquent les concentrations en « équivalent Rivaroxaban ».

Pour ce premier test visant à déterminer la concentration optimale de polybrène, lorsque le signal obtenu dans le test B. DiXal correspond à un taux $< 12,5$ ng/mL (le Rivaroxaban en B.DiXAl gamme basse est quantifié en limite basse à partir de 11 ng/mL, seuil de significativité du dosage, indiquant que les valeurs plus basses ne sont pas considérées comme significatives, comme expliqué en Matériels et Méthodes), l'interférence des Héparines est considérée comme correctement neutralisée. Pour l'Héparine HNF (barres bleues), des valeurs proches du pool de plasma normal testé sans polybrène (barre verte) sont retrouvés dès 5 μ g/mL de polybrène dans le tampon du B. DiXal. Pour l'Héparine HBPM (barres rouges), l'interférence de l'Héparine est neutralisée à partir de seulement 50 μ g/mL de polybrène dans le tampon R3. Cette différence est attendue, car le polybrène neutralise beaucoup plus efficacement l'HNF que les HBPM. Le taux de 50 μ g/mL est retenu comme optimum de polybrène à ajouter dans le tampon de dilution (réactif R3) du dosage B. DiXal.

3.2.2 Test du tampon R3 avec 50 μ g/mL de polybrène dans le dosage des autres AODs anti-Xa

Les résultats précédents sont vérifiés pour les autres AODs anti-Xa, Apixaban et Edoxaban comparativement au Rivaroxaban. Pour chaque AOD testé (Edoxaban, Apixaban, Rivaroxaban), le dosage est réalisé en utilisant la gamme basse et le protocole correspondant à chaque AOD, pour le réactif B. DiXal (application validée par la société HYPHEN-BioMed). Chaque dosage est réalisé avec le tampon R3 contenant 50 μ g/mL de polybrène comparativement au tampon R3 classique sans polybrène. Pour tester l'absence d'interférence des Héparines, une concentration de 2 UI/mL de HBPM ou d'HNF sont ajoutés à des plasmas contenant chacun de ces AODs à des concentrations de 50 et de 100 ng/mL. Les témoins sont les mêmes plasmas non supplémentés en Héparines, auxquels une quantité équivalente de diluant est ajoutée, afin d'avoir le même volume final pour ces plasmas ou les plasmas avec Héparines. Ces échantillons sont ensuite dosés en utilisant la gamme basse spécifique à chaque l'AOD, avec les deux types de tampon R3 (avec ou sans polybrène). Chaque test est réalisé en double, et les résultats sont présentés sur la **figure 44**.



A **B**
Figure 44 : Dosage des différents AODs avec le B. DiXal (gamme basse) avec ou sans polybrène dans le diluant. A Les dosages de 100 ng/mL et B de 50 ng/mL des différents plasmas supplémentés en AOD (Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban) sont analysés, en l'absence (histogramme bleu) ou en présence de 2 UI/mL de HNF (histogramme rouge) ou d'HBPM (histogramme vert). Chaque condition a été testée en double et la moyenne des 2 dosages est présentée. Les barres transversales au-dessus et en dessous des histogrammes indiquent l'imprécision de 6% pour le point bas 50 ng/mL et de 2% pour le point haut 100 ng/mL (basé sur les tests intra-essais, **tableau 14**).

Nous avons dosé des échantillons de plasma contenant chacun des trois AODs à une concentration de 50 ou 100 ng/mL, en présence ou non d'Héparine dans l'échantillon (Héparine HNF ou HBPM à 2 UI/mL), (**figure 44**). Nous vérifions si l'ajout de Polybrène dans le tampon R3 permet de limiter l'interférence des Héparines dans les dosages des AODs. Avec le tampon R3 B. DiXal classique les dosages des AODs à 100 ng/mL subissent une augmentation comprise entre 5% et 14% en présence d'Héparine (14% pour le dosage de l'Apixaban en présence d'HBPM 2,0 UI/mL), alors qu'avec le tampon R3 B. DiXal supplémenté en polybrène, la présence d'Héparine n'entraîne plus d'augmentation du dosage pour l'Edoxaban et l'accroissement de la mesure reste inférieure à 5% pour les dosages de l'Apixaban et du Rivaroxaban. Cette observation est encore plus marquée avec le dosage des AODs à la concentration de 50 ng/mL, qui est surévalué avec l'utilisation du tampon R3 usuel, jusqu'à 35% pour les dosages de l'Apixaban et du Rivaroxaban en présence d'HBPM 2 UI/mL, alors qu'avec l'utilisation du tampon R3-polybrène cette augmentation du dosage ne dépasse pas 7%. Pour chaque condition, l'échantillonnage reste insuffisant pour avoir des données statistiques. Cependant la tendance d'amélioration des dosages semble être attestée pour les trois AODs anti-Xa, en utilisant le tampon R3 à 50 µg/mL de polybrène : l'augmentation des valeurs de dosages ne dépassent pas les critères définis dans les guides CLSI-2015, qui admettent une augmentation de 20% pour un point bas du dosage (50 ng/mL) et 10 % pour le point haut (100 ng/mL). Il faut de plus considérer que des patients en relais d'anticoagulants, avec une présence plasmatique d'Héparine à 2 UI/mL et d'un AOD anti-Xa, est un cas extrême qui n'est pas rencontré (un taux d'Héparine très élevé en cas de relais d'anticoagulant est 1,0 UI/mL). L'utilisation des protocoles de dosages B. DiXal

des AODs anti-Xa avec le tampon R3-polybrène permet un dosage efficace des AODS anti-Xa en présence ou non d'Héparine

4 Dosage du Dabigatran en Test compétitif de filtration tangentielle sur bandelettes

Les tests développés pour doser les anticoagulants sont réalisés au laboratoire, sur des automates de coagulation, et souvent en série. Afin de permettre un dosage rapide et précis des AODs, en particulier dans un contexte d'urgence, nous avons travaillé sur le développement d'un test unitaire, quantitatif ou semi-quantitatif, utilisable à proximité des services d'urgence ou du bloc opératoire. Nous avons envisagé un procédé de dosage par lecture directe du taux d'anticoagulant, et ne nécessitant qu'un appareillage léger et mobile.

Le développement d'un test sur bandelette est innovant car il permettrait d'effectuer un dosage rapide et quantitatif, utilisable directement au chevet du malade, dans les services d'urgence. Développer ce type de test pourra servir de modèle et pourrait permettre de généraliser ce principe de dosage à d'autres anticoagulants oraux (AODs).

Le dosage semi-quantitatif, voire quantitatif, du Dabigatran a été envisagé en utilisant un test rapide de migration latérale sur bandelette. Nous avons travaillé avec une société partenaire externe pour réaliser cette bandelette, la société NG-Biotech, qui a développé un modèle de technologie de migration tangentielle. Le type de bandelette qui a été conçu a été présenté en matériel et méthode. Trois types de tests des bandelettes ont été réalisés, l'un avec dépôt de plasma, le deuxième avec dépôt de sang total et pour le troisième, 6 bandelettes sont testées en concentration croissante de Dabigatran plasmatique, comme indiqué sur la **figure 45**. La gamme de dosage de Dabigatran est testée dans plusieurs conditions opératoires, en modifiant le temps d'incubation ou la température de conservation des bandelettes, (**figure 46 et 47**).

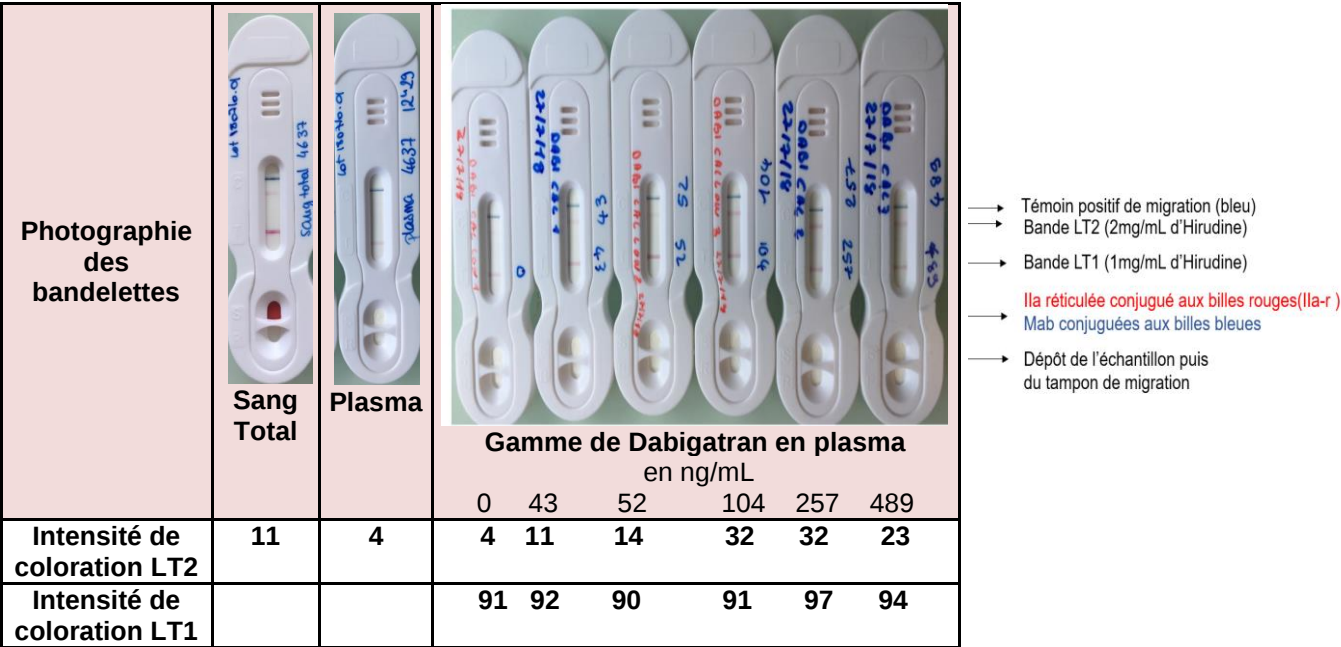
Le but est de doser le Dabigatran en plasma ou sur sang total sur une gamme de concentrations allant de 30 à 300 ng/mL, avec une précision acceptable au seuil de 30 ng/ml. Cette limite basse de 30 ng/mL correspond à la concentration maximale permettant de réaliser une intervention chirurgicale en urgence, chez les patients traités, sans risque hémorragique majeur lié à l'anticoagulant. Ce critère est également important pour le médecin qui suit le patient : il permet de prendre une décision pour l'ajustement de posologie ou la prescription éventuelle d'un autre anticoagulant. Nous avons résumé les spécifications envisagées pour ce test unitaire dans le **tableau 18**.

	Paramètres	Critères de validation initiaux
Premier objectif	Réactivité générale.	Obtenir une gamme permettant de doser de manière dose dépendante le Dabigatran
Objectifs secondaires	Limite inférieure de mesure acceptable	30 ng/mL
	Domaine de mesure souhaité pour le dosage	30-300 ng/mL

Tableau 18 : Spécifications d'entrée pour le développement de migration latérale sur bandelettes.

4.1 Test de diffusion latérale sur bandelette

La réalisation de ce test est présentée sur la figure 45.



4.2 Test d'augmentation du temps de remise à température des bandelettes, avant utilisation

L'objectif de la manipulation est de tester l'influence de la température à laquelle les tests sont réalisés, afin d'obtenir les spécifications attendues, par interprétation de la ligne LT2 (**tableau 18**).

Une gamme plasmatique de Dabigatran de 0, 40, 100, 250, et 500 ng/mL est testée avec ce test unitaire (une bandelette par concentration), selon le protocole défini. L'intensité de coloration à la ligne LT2 est évaluée avec le logiciel NG-Biotech. Après stockage à 2-8°C, les bandelettes ont été utilisées après un temps d'équilibration à 20-25°C, soit de 15 minutes soit de une nuit. Les courbes obtenues sont représentées sur la **figure 46**.

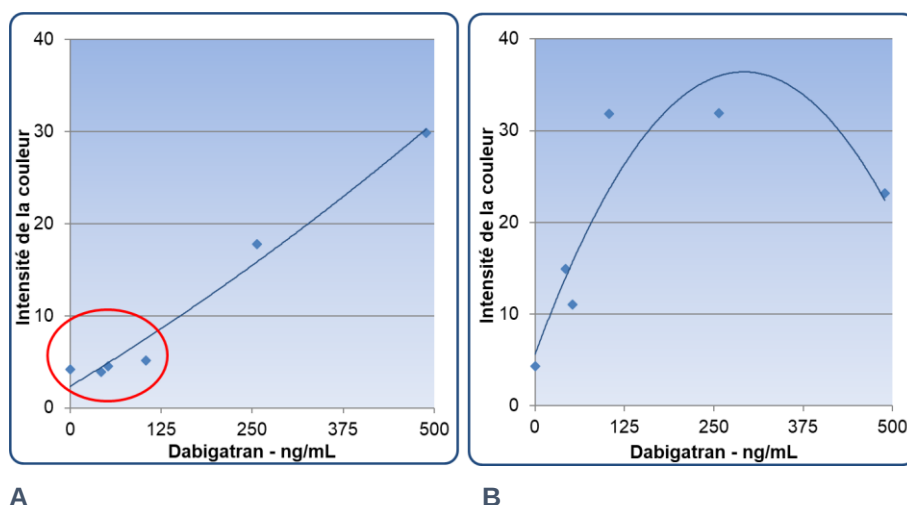


Figure 46 : Test d'une gamme plasmatique de Dabigatran avec des bandelettes stockées à 2-8°C et équilibrées 15 minutes à 20-25°C (A) ou une nuit à 20-25°C (B) : La migration dure 15 minutes et l'intensité de coloration lue avec le logiciel NG-Biotech. Le cercle rouge, graphique A, représente une zone insensible de la réaction

Les bandelettes stockées à 2-8°C ne donnent des résultats interprétables que entre 100 et 500 ng/mL; entre 0 et 100 ng/mL, l'intensité de coloration est un plateau, et le dosage est insensible. A l'inverse les bandelettes laissées une nuit à 20-25°C permettent une mesure du Dabigatran interprétables entre 0 à 100 ng/mL, mais au-delà de 250 ng/mL il y a un effet crochet, et le point 500 ng/mL est sous-dosé.

L'équilibrage des bandelettes pendant une nuit à température ambiante permet de se rapprocher des conditions souhaitées. Nous allons tester différents temps de migration après dépôt de l'échantillon et du tampon, pour améliorer le dosage.

4.3 Evaluation du temps de migration dans le dosage d'une gamme plasmatique de Dabigatran

Une gamme plasmatique de Dabigatran est testée sur plusieurs bandelettes, laissées équilibrer en température une nuit à 20-25°C, et différents temps de migration 15 ;20 ;40 ; et 60 minutes après dépôt de l'échantillon sont comparés (modification du temps de migration dans le protocole - **figure 47**).

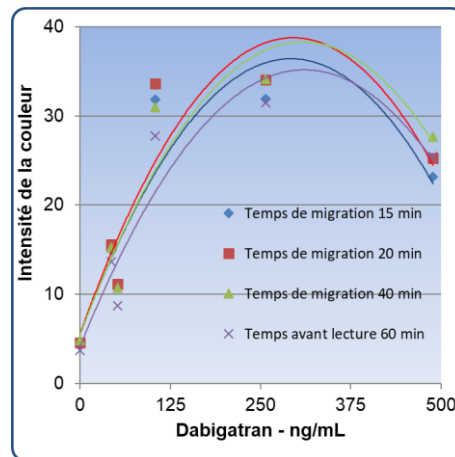


Figure 47 : Test d'une gamme plasmatique de Dabigatran, après différents temps de migration, puis lecture de la coloration avec le logiciel NG-Biotech : Bleu 15 min, Rouge 20 min, Vert 40 min et violet 60 minutes de migration. Les courbes tendances reliant les points sont des polynômes de degré 2.

L'allongement du temps de migration ne permet pas d'amélioration de l'aspect de la courbe de dosage. Celle-ci conserve l'effet crochet quel que soit le temps de migration. De plus des points de gamme supplémentaires ont été testés entre 10 et 40 ng/mL. Le dosage sur bandelette ne permet donc actuellement que de mesurer les points entre 40 et 100 ng/mL. La zone de dosage est trop restreinte par rapport aux spécifications visées : le dosage des concentrations <40 ng/mL est impossible et des points élevés en Dabigatran (point 500 ng/mL sur le graphique) sont sous-dosés. La mise au point doit se poursuivre, pour obtenir la sensibilité voulue permettant de doser à partir de 30 ng/mL jusqu'à 300 ng/mL sans risquer un effet crochet au-delà de cette concentration.

V DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce mémoire présente le travail de développement et de validation pour des méthodes de laboratoire destinées à doser sur plasma l'activité anticoagulante de nouveaux médicaments, récemment introduits dans la pratique clinique. Les réactifs élaborés sont destinés à compléter l'ensemble de la gamme déjà développée et proposée par la société HYPHEN BioMed, entreprise où ce travail a été réalisé.

Les nouvelles techniques développées et validées concernent 5 méthodologies :

Le dosage de l'activité anti-Xa de l'Edoxaban, avec les deux méthodes chromogéniques anti-Xa existantes : dosage des Héparines (B. HLRT), ou dosage spécifique en 2 temps des AODs anti-Xa (B. DXal).

Le dosage de l'activité anti-Thrombine (anti-IIa) de la Bivalirudine, avec les réactifs existants en méthode coagulante (HTI) ou en méthode chromogène (B. DTI).

L'élimination de l'interférence des AODs dans les dosages de routine ou spécialisés, chez les patients traités par ces anticoagulants, grâce à l'utilisation de pastilles de charbon actif qui adsorbent ces molécules et rendent les dosages interprétables et fiables.

L'amélioration du dosage des AODs Anti-Xa avec le test Anti-Xa cinétique (B. HLRT), développé initialement pour les dosages des Héparines, afin de permettre la mesure de l'activité de ces AODs sans interférence des Héparines. De même nous avons supprimé l'interférence résiduelle des Héparines dans le test anti-Xa en 2-temps (B. DiXal), en particulier pour la gamme basse.

Enfin, le développement (toujours en cours) d'un dosage individuel, semi-quantitatif et rapide, du Dabigatran, à l'aide d'une méthode compétitive de migration latérale, associée à la mesure quantitative de la réaction colorée et à un logiciel d'analyse des résultats.

Pour l'Edoxaban et la Bivalirudine, le travail a consisté à développer des plasmas de calibration et de contrôle de qualité, et d'adapter les dosages à la mesure des activités de ces molécules sur 2 automates de laboratoire (STA-R et CS 5100), à l'aide des réactifs disponibles.

Pour le dosage du Dabigatran, c'est une nouvelle technologie développée en partenariat avec la société NG-Biotech qui a été conçue et évaluée, et est toujours en cours de développement.

Enfin, les deux autres points traités, visant à améliorer les dosages et tests existants, vont permettre d'améliorer nettement le diagnostic clinique en élargissant l'utilisation de ces procédés, et en supprimant les interférences des héparines, chez les patients qui peuvent avoir ponctuellement les deux anticoagulants, lors des relais thérapeutiques.

La discussion des résultats obtenus est effectuée par sujet traité et est développée ci-dessous.

1 Les dosages de l'Edoxaban

1.1 Etude des tests mis au point

L'Edoxaban a longtemps été dosé uniquement par technique LC:MS/MS, en particulier pour les études cliniques de validation de cet anticoagulant. Cette méthode a été largement utilisée dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du médicament. Cette technique mesure la quantité de médicament non métabolisé. Elle ne permet de tester qu'un nombre limité d'échantillons par jour et n'est réalisée que par des centres très spécialisés, disposant de l'équipement adéquat. En pratique courante, elle n'est pas utilisable dans les laboratoires d'analyse hospitaliers ou de ville. De plus, la méthode LC:MS/MS ne mesure que la concentration pondérale de la molécule et pas son activité anti-Xa. Les tests de dosage de l'Edoxaban que nous avons mis au point utilisent une réaction chromogène. Plus précisément, le principe repose sur la capacité de l'Edoxaban à neutraliser le Facteur FXa, en quantité constante, et est associé à la génération d'une réaction colorée, en clivant un substrat spécifique, par le FXa résiduel. Cette méthode est facilement utilisable et automatisable. Nous avons développé le test en utilisant deux trousse de dosages anti-Xa, le test B. HLRT et le test B. DiXal. Ces deux trousse de dosage ont des caractéristiques et des applications différentes.

Dans le dosage avec la trousse B. DiXal, il y a inhibition du FXa dans un premier temps, et dans un second temps le FXa résiduel est mesuré par sa réaction sur le substrat spécifique. Par ailleurs ce test est réalisé en utilisant un diluant à concentration saline élevée, ce qui empêche les anti-Xa indirects, comme les Héparines, de réagir avec le FXa (démonstré jusqu'à une concentration d'Héparine de 0,5 UI/mL en gamme basse et de 1,0 UI/mL en gamme standard) : ce test est dit insensible à l'Héparine.

La trousse B. HLRT repose sur une réaction compétitive du FXa, qui réagit soit avec le substrat, soit avec l'Edoxaban (présent dans l'échantillon). Dans ce cas, il y a réaction simultanée (donc compétitive) du FXa avec son substrat spécifique (génération d'une coloration), ou avec l'Edoxaban qui l'inhibe.

Pour répondre aux besoins des cliniciens, nous avons réalisé deux gammes de dosage permettant de doser à la fois de faibles concentration d'Edoxaban, inférieures à 100 ng/mL et permettant de tester l'élimination du médicament, et des concentrations élevées pouvant dépasser 500 ng/mL d'Edoxaban, dans le cas de surdosage ou d'accumulation du médicament dans le sang des patients. Les dosages que nous avons développés ont ensuite été validés pour les divers critères : reproductibilité, interférence des molécules biologiques ou des médicaments, risques de contamination et donc de l'efficacité du lavage des aiguilles de l'automate, comparaison des dosages développés avec la méthode LC:MS/MS à l'aide de plasmas de patients traités par l'Edoxaban. Les spécifications définies en début de développement pour ces dosages sont respectées, que cela soit pour les caractéristiques générales de reproductibilité, les interférences et risques de contamination, et les limites de dosages. Les tests développés en B. DiXal et B. HLRT sont ainsi capable de doser entre 10 et 800 ng/mL d'Edoxaban.

Cependant il a été constaté de légères différences dans l'évaluation des taux des patients, d'une part entre les méthodes anti-Xa que nous avons développées, mais aussi entre celles-ci et la méthode LC:MS/MS. Cette observation nous a amené à étudier plus en détail les métabolites générés dans le plasma humain

chez des patients traités par Edoxaban, et l'impact que ces métabolites peuvent avoir sur les dosages B. DiXal et B. HLRT développés.

Pour la disponibilité d'un dosage efficace et précis, les différents métabolites d'Edoxaban doivent être pris en compte. Pour analyser leur impact dans les dosages, nous nous basons sur les articles de Bathala (Bathala et al. 2012) et de Parasrampur (Parasrampur et Truitt, 2016).

1.2 Test des métabolites de l'Edoxaban

1.2.1 Etude de la réactivité des métabolites en B. HLRT et B. DiXal

Il a été constaté une différence de dosage entre le test B. HLRT et le test B. DiXal (**figure 35 E**).

Une différence importante de l'activité entre les deux tests anti-Xa a été observée pour le métabolite M6 mais pas pour les métabolites M4 et M8 : le métabolite M6 a une activité de 46 % en B. DiXal et de 60% en B. HLRT par rapport à la même concentration d'Edoxaban, figure 36. Pour ce métabolite M6, c'est le type de test anti-Xa, compétitif ou en deux temps, et non la nature du FXa (humain ou bovin), qui entraîne la différence d'activité observée. En effet, en changeant l'origine du FXa (bovin ou humain) dans le test B. HLRT, l'activité globale reste équivalente, comme présenté sur la figure 37. Pour rappel, dans la publication de Parasrampur, l'IC₅₀ de l'Edoxaban se situe à 2,7 nM, celle du métabolite M4 à 1,8 nM, celle du métabolite M8 à 3,0 nM, et celle du métabolite M6 à 6,9 nM (Parasrampur et Truitt, 2016).

Lorsqu'il est dosé sur une gamme d'Edoxaban, le test compétitif semble augmenter artificiellement l'activité inhibitrice du métabolite M6, moins affin pour le FXa, par comparaison au test B. DiXal en 2 temps. Au contraire, les métabolites M8 et M4, d'affinité similaire ou supérieure pour le FXa par rapport à l'Edoxaban, ne sont pas impactés significativement par le type de test utilisé.

Une explication possible pourrait être que dans le test B. DiXal la réaction avec le FXa est sensible à la vitesse d'inhibition, et la réaction du temps 1 pourrait ne pas être complète pour le métabolite M6. Le temps de contact avec le FXa dans cette étape peut être critique, d'autant plus que l'inhibiteur est réversible. Ceci pourrait expliquer la mesure d'une activité apparente plus faible avec le B. DiXal par rapport au test compétitif B. HLRT.

Pour vérifier cette hypothèse il serait intéressant de tester l'Edoxaban et chacun de ses métabolites, avec le test B. DiXal en faisant varier le temps 1 (correspondant à l'inhibition du FXa), le temps 2 restant inchangé. Si des temps plus longs permettent d'augmenter l'activité anti-Xa mesurée pour le métabolite M6, cela confirmerait l'hypothèse de l'incidence de la constante d'inhibition pour le FXa, pour un inhibiteur réversible.

L'IC₅₀ du métabolite M4 présente une activité plus élevée pour l'inhibition du FXa que l'Edoxaban mais il n'a pas d'effet observé entre les tests B. DiXal et B. HLRT. Ces deux tests mesurent l'activité du M4 à environ 90% de celle de l'Edoxaban. Selon l'article de Parasrampur (Parasrampur et Truitt, 2016), la liaison aux protéines plasmatiques du métabolite M4 pourrait diminuer son activité pour le FXa : cette liaison aux protéines est donnée à 80% pour ce métabolite M4 et seulement à 55 % pour l'Edoxaban.

Un test supplémentaire pourrait être envisagé pour tester l'impact de la liaison aux protéines en effectuant des dosages des métabolites en plasma, ou en tampon avec albumine ou sans albumine mais avec PEG comme molécule protectrice pour les faibles concentrations. Une diminution d'activité en plasma ou en présence d'albumine, par rapport au tampon sans albumine, montrerait l'incidence de la liaison protéique.

Pour représenter les conditions d'inhibition du FXa in vivo, le test B. DiXal semble plus indiqué, car la réaction avec le FXa est directe et il n'y a pas compétition avec le substrat. Pour la suite de l'étude, seul ce test a été utilisé.

1.2.2 Impact des métabolites dans le dosage sur plasma des patients

Pour étudier le rôle des métabolites dans le dosage de l'activité anti-Xa de l'Edoxaban sur les plasmas des patients traités, nous avons ré-analysé les résultats publiés de 6 patients, extrait de l'article Bathala de 2012 (Bathala et al. 2012), dont les concentrations des métabolites majoritaires d'Edoxaban ont été mesurées dans le temps, après prise du médicament. Chaque molécule forme une courbe avec un pic (Cmax), représentant le cycle métabolique de présence et d'élimination dans le plasma (Bathala et al., 2012). Nous avons choisi cinq temps significatifs : Cmax (40 min) (temps où la concentration de l'Edoxaban est au maximum), 1H40, 6H, 12H, et 24H, et avons exprimé les résultats, en activité anti-Xa comparativement à l'Edoxaban en nous basant sur les mesures obtenues avec le test B. DiXal. Ainsi, pour chaque temps, nous sommes en mesure d'estimer la proportion des différents métabolites chez les patients, et leur contribution à l'activité anti-Xa globale, comme montré sur la figure 48.

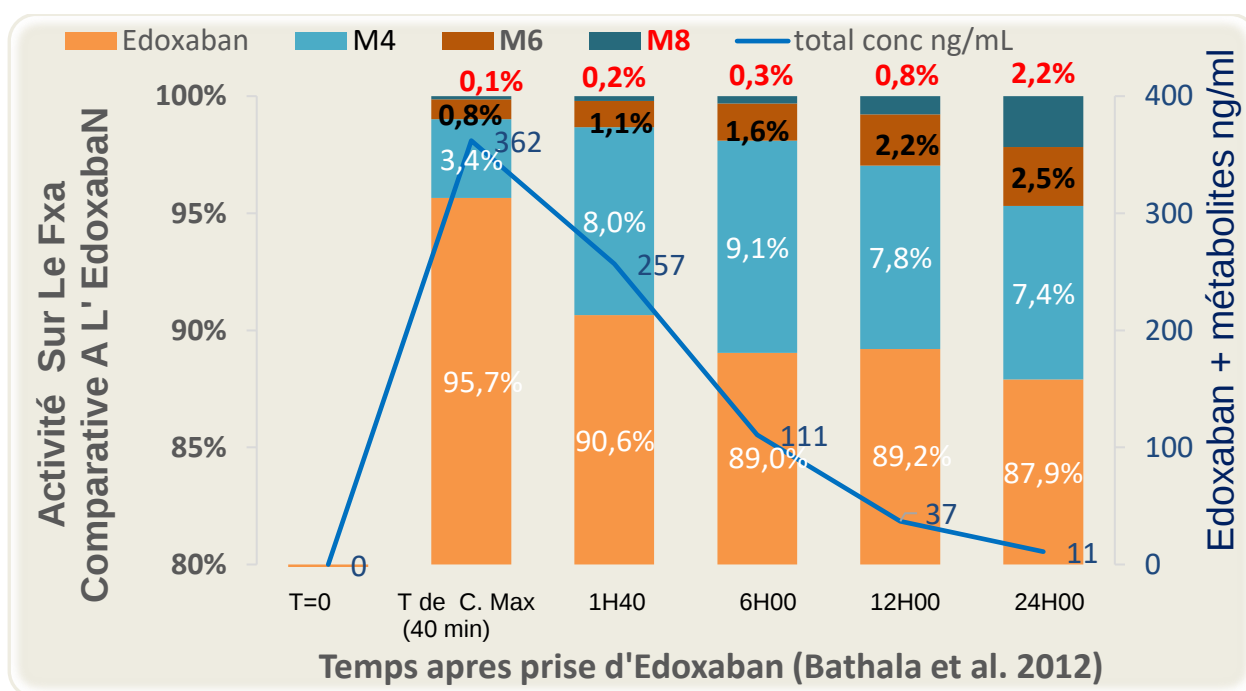


Figure 48 : Estimation de la contribution de chaque métabolite sur l'activité anti-Xa lors du métabolisme de l'Edoxaban dans le corps humain, après retraitement des résultats. Activité de l'Edoxaban et de ses métabolites à différents temps après administration orale de l'Edoxaban sur 6 sujets. Travail réalisé d'après les résultats présentés par Bathala et al (Bathala et al. 2012) et mesure des activités anti-Xa avec le coffret B. DiXal L'activité (en pourcentage de l'activité d'une concentration équivalente d'Edoxaban) mesurée en B. DiXal pour chaque métabolite par rapport à l'Edoxaban est de : 88 % pour M4 - 46% pour M6 et 89% pour M8, le métabolite M1 n'est pas représenté car il n'a pas d'activité anti-Xa. La courbe bleue marque aux différents temps la concentration totale d'Edoxaban et ses métabolites.

En 1H40, l'activité de l'ensemble des métabolites représente le 10% de celle de l'Edoxaban. Jusqu'à 12H cette activité des métabolites est due principalement au métabolite M4, ensuite aux métabolites M6 et M8. Au bout de 24H, les métabolites M6 et M8 représentent jusqu'à 40% des activités anti-Xa de l'ensemble des métabolites.

Il faut mettre en relation ces résultats avec la concentration totale moyenne dans le plasma des patients à ces différents temps indiqués sur **la figure 48** et repris dans le **tableau 19** ci-dessous.

		C. Max (40 min)	1H40min	6H	12H	24H
Edoxaban et métabolites	Concentration en ng/mL	362	257	111	37	11

Tableau 19 : Concentration moyenne en ng/mL à chaque temps de l'Edoxaban et ses métabolites, sur 6 patients, extrait des résultats de Bathala et al (Bathala et al. 2012).

L'activité des métabolites devient significative 1H40 après la prise du médicament où elle représente 10% de l'activité globale de l'Edoxaban, ce qui n'est pas négligeable puisque la concentration de l'Edoxaban et de ses métabolites est proche de 250 ng/mL en moyenne sur les 6 patients testés. L'activité des métabolites reste ensuite >10%, jusqu'à l'élimination totale de l'activité anti-Xa.

La différence de dosage entre le test B. DiXal et B. HLRT est due essentiellement au métabolite M6 (figure 36), dont la proportion augmente seulement 12H après la prise d'Edoxaban, alors que sur 6 patients le taux moyen mesuré d'Edoxaban et de métabolites est d'environ 35 ng/mL (Bathala et al. 2012). La différence de taux observée entre les deux tests est observable pour des patients dosés à plus de 150 ng/mL (**figure 35E**). Cette différence de dosage n'est donc pas totalement comprise à ce stade, et pourrait être expliquée par la réactivité des tests anti-Xa chromogènes décrits dans la partie précédente. Le test B. DiXal semble donc préférable pour doser l'Edoxaban, en l'état actuel de nos connaissances, par son insensibilité relative aux Héparines et son mécanisme d'action, plus conforme au mécanisme in vivo. Toutefois, la corrélation avec le test B. HLRT demeure acceptable ($r=0,996$, figure 35E) même si le B. DiXal donne des résultats légèrement inférieurs pour les concentrations d'Edoxaban + métabolites > 150 ng/mL.

1.3 Comparaison avec la méthode de référence LC:MS/MS

La méthode chromatographique de référence LC/MS:MS dose les AODs par leur concentration pondérale, et requiert beaucoup de temps. Pour les tests développés, le dosage est réalisé en moins d'1 heure et mesure l'activité anti-Xa. De plus, la méthode LC:MS/MS nécessite une instrumentation volumineuse, qui ne peut être adaptée que difficilement en laboratoire d'analyses. Le coût de cette méthode est aussi très élevé par rapport à un test chromogène. Les tests chromogènes développés permettent de mesurer l'activité anti-Xa globale de l'Edoxaban et de ses métabolites. Le test LC:MS/MS ne mesure que l'Edoxaban et peut sous-estimer de 10% son activité, en ne prenant pas en compte les métabolites (qui doivent être

mesurés individuellement, avec une calibration pour chaque métabolite). Les tests B. DiXal et B. HLRT sont avantageux, tant en précision, en coût global et en temps, comparativement à la méthode LC:MS/MS.

L'utilisation du test B. DiXal reflète mieux, dans l'état actuel de nos connaissances, l'activité anticoagulante de l'Edoxaban in vivo (méthode 2-temps). En quelques minutes, ce test permet de rendre un résultat exact de l'effet anticoagulant induit par l'Edoxaban, et n'est pas influencé par de faibles doses d'Héparine, pouvant être présentes en cas de relais de l'Edoxaban en remplacement de l'Héparine (HNF ou HBPM).

2 Les dosages de la Bivalirudine

2.1 Etude des tests mis au point HTI/STAR et B. DTI/CS

La Bivalirudine est utilisée principalement aux Etats Unis pour des interventions cardiaques et en particulier lors des CEC (circulation extra-corporelle) (Verdoia et al. 2017). Le dosage de la Bivalirudine est important afin d'ajuster la bonne dose d'anticoagulant et de prévenir les saignements pendant ce type d'intervention et de surveiller le risque d'accumulation en cas de mauvaise élimination de la Bivalirudine. Nous avons développé deux tests pour doser la Bivalirudine dans le plasma des patients. Ces 2 tests ont des caractéristiques de dosage différentes quant aux interférences des molécules plasmatiques, mais tous deux mesurent la Bivalirudine de façon identique (corrélation de dosage $r=0,985$).

Les méthodes de dosage développées sont HEMOCLET™ DTI-Bivalirudine sur instrument CS (B. DTI/CS) et HEMOCLOT™ HTI-Bivalirudine sur instrument STAR (HTI/STAR).

Dans un premier temps, nous avons dû développer une gamme de calibration de la Bivalirudine en plasma pour la réalisation des 2 tests. Comme la courbe dose-réponse n'est pas linéaire pour les 2 méthodes, notre choix s'est porté sur le développement de 5 standards pour couvrir un domaine de mesure allant de 0 à 5 µg/mL. En effet, la courbe de la réaction réactionnelle n'est pas linéaire sur tout le domaine de mesure, la sensibilité du dosage étant meilleure entre 0 et 2 µg/mL, qu'entre 2 et 5µg/mL. La courbe est du type polynomial de degré 2. Il y a un point d'inflexion de la courbe aux environ de 2 µg/mL, **(figure 38 A et B)**. En fonction des instruments, la représentation graphique de l'étalonnage est en « point à point » au CS, qui ne dispose pas d'un logiciel permettant d'utiliser des courbes polynomiales et polynomiale de degré 2 avec le STAR (voir résultats). Ce type de réactivité non linéaire, pourrait être expliqué par la particularité de la Bivalirudine, qui est clivée après sa fixation sur le FIIa. Lors de ce clivage, un peptide de la Bivalirudine reste fixé sur le FIIa et bloque ainsi son site de liaison pour d'autres molécules de cet anticoagulant. A partir d'une certaine concentration en Bivalirudine, le milieu réactionnel est saturé en Bivalirudine clivée et le FIIa est lié au peptide de la Bivalirudine, ce qui diminue les possibilités de réaction FIIa-Bivalirudine et provoque, ainsi, une diminution de la cinétique réactionnelle **(figure 10)** (Veale et al., 2005).

Les spécifications définies pour les dosages en début de développement sont conformes pour les caractéristiques générales de reproductibilité, les interférences, le risque de contamination, et les limites des dosages. Les tests développés en B. DTI et HTI permettent ainsi de doser entre 0,5 à 20 µg/mL de Bivalirudine, grâce à des dilutions adaptées au-delà de 5µg/mL. La différence majeure entre les deux tests se situe au niveau des interférences des molécules biologiques ou des médicaments anticoagulants.

2.2 Etude des interférences avec les tests HTI/STAR et B. DTI/CS

Nous avons vu, dans la partie résultats, que le test B. DTI/CS est insensible aux anticoagulants oraux directs (AODs) spécifiques du FXa contrairement au test HTI/STAR, dû à une incidence de ces AODs sur la structure du caillot, ce qui impacte la détection mécanique (Undas et Zabczyk, 2018) (Oka et al. 2020). Inversement le test HTI/STAR est moins sensible à la Bilirudine libre ou conjuguée ou à l'Hémoglobine que le test B. DTI/CS, ces molécules pouvant être présentes dans le plasma en cas de pathologie hépatique ou d'hémolyse. Le test HTI/STAR est insensible à des taux élevés d'Héparine HNF ou HBPM (2 UI/mL) alors que le test B. DTI/CS est sensible aux faibles taux d'Héparine (**figures 39, 40**). Bien qu'il existe des différences de sensibilité, les deux tests développés permettent de doser la Bivalirudine sur le plasma des patients traités, de manière équivalente, dès lors que les molécules interférentes ne sont pas présentes (**figure 41**).

Nous proposons donc aux cliniciens des outils permettant le suivi des patients sous Bivalirudine durant l'intervention, afin d'ajuster l'optimum de concentration ou d'effectuer le suivi dans la phase post-opératoire. En cas de prescription d'anticoagulant postopératoire, par exemple un AOD anti-Xa, le test HTI/STAR permet un dosage exclusif de la Bivalirudine et permet de vérifier que son élimination est conforme.

Ainsi, en informant l'utilisateur des limites des dosages, ces deux tests constituent des outils de diagnostic très utiles et complémentaires. Le test B. DTI sera utilisé pour doser des patients en transition vers un anticoagulant AOD anti-Xa, tandis-que le test HTI permet un dosage précis des patients avec plasmas très hémolysés ou chargés en Bilirudine.

Néanmoins, en pratique courante, les laboratoires hospitaliers ne disposent que d'un seul type d'instrument automatisé, comme le CS, le STAR ou autre. Nous avons développé des applications avec le réactif HTI sur CS et B. DTI au STAR, mais n'avons pas encore testé les interférences sur ces deux méthodes quand elles sont adaptées à d'autres instruments d'hémostase. Nous envisageons de poursuivre le travail en complétant les applications de ces méthodes sur les autres automates de coagulation. Le mode de détection du caillot peut impacter les performances du dosage, en particulier pour l'HTI. En effet, la réaction coagulante est détectée optiquement sur CS, tandis qu'elle est mécanique sur STAR. Cela pourrait jouer un rôle au niveau des interférences. Pour le test B. DTI sur STAR le mode de détection optique pour la méthode chromogénique est identique à celui de l'instrument CS, ce qui nous permet d'envisager des niveaux d'interférence identiques. Ces deux tests peuvent être adaptés également à d'autres instruments, comme la gamme ACL-Top (IL-Werfen), ou les BCS-XP et Atellica (Siemens).

2.3 Applications des dosages développés

Les deux dosages développés, HTI/STAR et B. DTI/CS, permettent un dosage équivalent de la Bivalirudine mais présentent des interférences différentes aux molécules biologiques et aux médicaments anticoagulants. Ces tests peuvent être utilisés en salle opératoire pour déterminer si la dose de Bivalirudine injectée est adéquate et éviter, ainsi, des surdosages ou les défauts d'anticoagulation. Ce sont de nouveaux outils de diagnostic.

3 Amélioration des tests de dosage des anticoagulants

3.1 Amélioration du test B. DiXal dans la neutralisation des inhibiteurs indirect du FXa

Nous avons mis en évidence que l'ajout de polybrène (inhibiteur de l'Héparine) à 50 µg/mL permet une neutralisation de l'effet anticoagulant des Héparines dans le test B. DiXal, en particulier pour la gamme basse, et ce jusqu'à 2,0 UI/mL, comme cela a été montré pour le Rivaroxaban. Des tests supplémentaires utilisant le réactif B. DiXal pour l'Apixaban et l'Edoxaban ont montré de la même manière la neutralisation de l'Héparine à des niveaux très élevés (jusqu'à 2 UI/mL). Le test B. DiXal mis au point pour l'Edoxaban pourra bénéficier directement de cette innovation.

3.2 Pastilles de charbon actif adsorbant les AODs

Les plasmas de patients sous AODs présentent souvent des résultats anormaux dans les tests de coagulation de routine. Les temps de coagulation mesurés sont souvent allongés. Ces tests de routine sont primordiaux pour diagnostiquer certains troubles de la coagulation et la présence des AODs peut fausser le résultat, par exemple suggérer à tort un déficit en facteur de la coagulation ou la présence d'anticoagulants circulants inhibant certains facteurs de la coagulation. Outre les tests de dosages des différents AODs, il semble utile de fournir une méthode pour réaliser les tests d'hémostase chez des patients sous traitement AOD au long cours, sans interférence de ces anticoagulants. Ceci peut être obtenu en absorbant les AODs présents dans les plasmas à doser à l'aide d'un comprimé de charbon actif, introduit dans le plasma à tester.

Le processus est simple et concerne l'ajout d'une pastille de charbon actif au plasma de patient avant de réaliser le test, ce qui permet de supprimer (par adsorption) l'interférence des anticoagulants anti-Xa ou anti-FIIa. Les tests de routine, mais également les tests spécialisés d'hémostase, peuvent alors être réalisés sans incidence des AODs. Diverses études publiées récemment ont confirmé l'efficacité du charbon actif pour supprimer les interférences des AODs dans les tests de coagulation chez les patients traités (Godier et al., 2015).

Nous avons évaluée cette méthode et elle permet effectivement de neutraliser les anticoagulants AODs (partie 3.1 de Résultats, **Figure 42**) . Elle peut être utilisée pour permettre la réalisation de tests de coagulation de routine, interprétables, chez les patients sous AOD, et ainsi détecter des anomalies de la coagulation.

Les pastilles de charbon actif ajoutées à un plasma permettent un gain de temps important pour le diagnostic clinique et sont de mise en œuvre facile. Cela permet d'éviter les interférences et de réaliser un test précis, et ainsi de pouvoir correctement explorer les patients par d'autres tests plus spécifiques.

Cette procédure est à recommander pour la réalisation de tests de coagulation chez les patients sous traitement AOD. Un test spécifique de l'anticoagulant prescrit est indispensable et permet d'évaluer la bonne élimination ou non du médicament, il vient compléter le diagnostic.

Nous pouvons illustrer cela par un exemple concret : un patient ayant pris de l'Edoxaban et ayant arrêté le traitement présente des saignements. Au plasma du patient prélevé sous citrate est ajoutée une pastille de charbon actif, puis les tests TP et TCA sont réalisés à la fois sur le plasma/charbon actif et un autre test sur le plasma seul. Si le temps de coagulation est corrigé avec les tests TP et TCA sous charbon actif, la cause du saignement vient probablement de l'Edoxaban (ou d'un autre AOD) présent encore dans son plasma. Un test de dosage de l'Edoxaban comme ceux que nous avons développés pourra être réalisé. Dans le cas contraire, il s'agit d'un défaut de Facteur de la voie intrinsèque (test TP allongé) ou de la voie extrinsèque (test TCA allongé).

Nous voyons donc, ici, l'intérêt du développement de ce genre de procédé dans le diagnostic.

4 Le dosage du Dabigatran en test rapide

Notre équipe, en partenariat avec NG Biotech, est parvenue au premier objectif consistant à réaliser un test de migration tangentielle pour le Dabigatran, avec une gamme de coloration d'intensité croissante en fonction de la concentration. Cependant, l'objectif d'obtenir au minimum une gamme de 30 à 300 ng/mL n'a pas encore été atteint. Les échantillons inférieurs à 40 ng/mL de Dabigatran ne sont pas mesurés précisément, ainsi que ceux supérieurs à 200 ng/mL. Au-delà de 300 ng/mL, il y a un effet crochet et la concentration de Dabigatran est sous-estimée à très sous-estimée.

Le développement de ce test doit être poursuivi, et il faut revoir la conception et la méthode de fabrication des bandelettes, même si le principe du dosage a été confirmé par les premiers résultats obtenus.

Le début d'optimisation du test sur bandelette a permis d'obtenir une coloration d'intensité croissante en fonction de la concentration en Dabigatran dans le plasma, sur la deuxième ligne d'Hirudine LT2, c'est-à-dire avec une relation directe entre l'intensité de la coloration et le niveau de Dabigatran.

Cependant, ce dispositif n'est pas encore satisfaisant car il ne dose qu'entre 40 et 200 ng/mL et la précision est insuffisante au-delà de 100 ng/mL. Par exemple, un échantillon contenant 500 ng/mL de Dabigatran peut donner une coloration d'intensité similaire à un autre n'en contenant que 100 ng/mL, à cause de l'effet crochet.

Le résultat pourrait également être mesuré à l'aide de la ligne LT1 qui est une réaction inverse entre l'intensité de coloration et la concentration de Dabigatran mais la conception de la bande ne permet aucune sensibilité de cette ligne à l'augmentation de la concentration en Dabigatran. En portant l'incubation des bandelettes à température ambiante avant utilisation d'autres résultats obtenus, en cours d'optimisation, n'ont pas été présentés : le dosage donne une intensité de coloration élevée en absence de Dabigatran, puis décroît rapidement jusqu'à une valeur seuil en plateau, dès les faibles concentrations de Dabigatran jusqu'aux concentrations plus élevées testées (test réalisé entre 30 à 300 ng/mL). Cette ligne est intéressante pour une optimisation à venir de la bandelette car elle semble très sensible à de faibles concentrations de Dabigatran.

Ce dosage doit être revu et optimisé, en particulier en travaillant sur les concentrations d'Hirudine sur les lignes LT1 et LT2, et sur la concentration de Thrombine sur les billes de cellulose. L'optimum ne semble pas atteint pour les quantités d'Hirudine fixées sur les 2 lignes de la bandelette de nitro-cellulose, par rapport à la gamme de Dabigatran à mesurer. En effet, la première ligne d'Hirudine LT1 doit permettre de

fixer les billes de Thrombines non liées au Dabigatran pour permettre à celles fixées de circuler sans entrave jusqu'à la ligne LT2. Au niveau de LT2, les billes-Thrombine sans Dabigatran sont en nombre réduit, et la quantité d'Hirudine fixée doit permettre de fixer les billes de Thrombine complexée au Dabigatran de façon dose-dépendante. Cela a été rendu possible grâce à l'optimisation des concentrations d'Hirudine fixées sur LT1 et LT2. Cet optimum en premier lieu été défini en prenant en compte la réversibilité de la liaison de la Thrombine au Dabigatran d'une part et d'autre part une affinité supérieure de la Thrombine pour l'Hirudine par rapport au Dabigatran (Meddahi et Samama, 2011). Il doit faire l'objet de nouvelles investigations car le bruit de fond augmente sur la ligne LT2 si le nombre de billes de Thrombine sans Dabigatran fixé sur la ligne LT1 est insuffisant. Nous devons trouver un moyen de diminuer le bruit de fond et permettre une linéarité de la réaction jusqu'à des doses plus importantes de Dabigatran.

Il a été constaté, également, un bruit de fond plus important sur sang total qu'en plasma ce qui ne permet pas à l'heure actuelle de finaliser le dosage en sang total. Ce bruit de fond devrait pouvoir être réduit, en optimisant les conditions de réalisation du test, et de dilution de l'échantillon : soit en utilisant un protocole avec une dilution plus importante de l'Echantillon et un système d'interaction du Dabigatran avec les billes rouges de Thrombine réticulée plus efficace, soit un système permettant de neutraliser le bruit de fond avec par exemple un système de filtre au niveau du dépôt.

Ces possibilités doivent être étudiées pour obtenir un test correspondant aux spécifications définies : une gamme de dabigatran mesurable entre 30 et 300 ng/mL, sans effet crochet.

VI CONCLUSIONS

Ce mémoire m'a permis d'effectuer une revue générale de l'hémostase et de ses mécanismes, tout en les reliant aux désordres pathologiques présents chez les patients. J'ai pu aborder mon métier selon une perspective plus générale, en réfléchissant aux besoins de hôpitaux et des cliniques pour le suivi des patients. L'objectif de recherche de la société dans laquelle je travaille est de véritablement proposer les meilleurs outils de diagnostic, de répondre aux attentes des cliniciens dans toutes sortes de situations et également d'anticiper leurs besoins, en introduisant les outils adaptés au suivi des traitements innovants.

J'ai mis en évidence dans ce rapport le lien étroit qui existe entre le développement des réactifs et l'amélioration du travail du laboratoire, ainsi que la prise en charge dont peuvent bénéficier les patients.

Comme cela a été expliqué en introduction, les tests que nous développons permettent de doser certains anticoagulants directs utilisés pour traiter des patients ayant développé des thromboses ou étant à risque. Nous avons illustré cela par le développement du dosage de l'Edoxaban. Les anticoagulants oraux directs ont été développés et introduits afin d'améliorer le traitement et de limiter le suivi biologique extrêmement contraignant qui existe avec les médicaments Antivitamine K. Les Antivitamine K, en plus des contraintes alimentaires, nécessitent un suivi de laboratoire de manière régulière (mesure de l'INR avec le test Temps de Prothrombine). Les AODs, en revanche, ne nécessitent pas de suivi particulier. Cependant, en présence de certaines pathologies rénales ou hépatiques, ou de situations particulières, comme les sujets âgés, les individus avec un poids extrême (grande maigreur ou obésité), ou ne répondant pas au traitement (manque d'adhérence au protocole), il est nécessaire de suivre de manière plus précise et régulière la concentration sanguine du médicament, qui peut s'écarter significativement des valeurs prédictibles. Ceci en réduit l'efficacité en cas de défaut ou en augmente le risque hémorragique en cas d'excès de concentration dans le sang. Dans certains cas, le médicament peut par ailleurs s'accumuler avec le temps, en cas de clairance incomplète. Le suivi peut aussi être indispensable dans le cadre d'études pour évaluer les effets secondaires ou l'efficacité d'un traitement.

Les besoins des hôpitaux et des patients sont le moteur pour le développement et l'amélioration des tests que nous proposons. Nous cherchons à les faire évoluer constamment, pour répondre aux nouveaux besoins et assurer des performances optimisées au laboratoire, ainsi qu'un meilleur suivi des patients. Nous avons par exemple réussi à accroître la spécificité du test B. DiXal pour la mesure des AODs (anti-Xa) et à le rendre presque totalement insensible aux Héparines. Ce test permet donc de doser exclusivement un anticoagulant direct anti-Xa, en présence d'Héparine, même à des doses supérieures aux doses usuelles présentes dans le plasma, lors d'un relais du traitement anticoagulant. Cela permet entre autres d'accroître encore la spécificité du test Edoxaban B. DiXal que nous avons développé.

Les tests de routine ou spécialisés en coagulation sont inutilisables chez des patients sous AODs, car ces derniers interfèrent dans les résultats rendus. Dans ce travail, nous avons démontré que l'ajout de comprimés de charbon actif permet de retrouver les valeurs justes de ces tests, en supprimant l'interférence des AODs. Ce nouvel outil permet de diagnostiquer les causes d'un saignement ayant une origine différente que celle de l'AOD prescrit au patient.

L'industrie pharmaceutique offre des nouveaux moyens thérapeutiques pour le traitement des thromboses dans diverses situations cliniques. La Bivalirudine inhibe la Thrombine de manière réversible, et est utilisée dans la chirurgie cardio-pulmonaire, avec risque élevé de thrombose, ou la mise en place d'une circulation extracorporelle (A. Shah et Feldman 2012, R. Shah et al. 2016). La mise au point de tests de dosage permet de mesurer l'activité anti-Thrombine de la Bivalirudine, ou le risque de son accumulation anormale dans le sang. Nous avons pu documenter dans ce développement l'utilisation de deux tests, en étudiant leurs sensibilités et les interférences des molécules biologiques dans les dosages. Ce travail nous a permis de proposer deux tests, l'un par méthode chromogène et l'autre par méthode coagulante, pour les dosages automatisés de la Bivalirudine sur plasma citraté. Ces méthodes de dosage sont nouvelles et inexistantes jusqu'ici dans les laboratoires hospitaliers. Ils permettent un dosage fiable précis et spécifique de cet anticoagulant.

Développer des outils innovants pour doser les anticoagulants en laboratoire est une réelle avancée dans le suivi des patients, mais dans certaines situations il pourrait être préférable de proposer des tests unitaires, utilisables directement par le personnel hospitalier, directement en salle opératoire ou au service d'urgence. Nous avons commencé à étudier cette possibilité avec le dosage du Dabigatran sur bandelette, par migration tangentielle. Si nous avons obtenu des résultats intéressants, le travail est loin d'être finalisé et nécessite un développement plus approfondi. Ce genre de tests est prometteur mais la mise au point nécessite de nouvelles phases de développements pour venir à bout des limites rencontrées. Le bruit de fond est encore trop important et la gamme de dosage mesurée (40 à 100 ng/mL actuellement) est trop réduite, dans l'état actuel de notre recherche.

Globalement, ce travail a permis d'étudier, développer et optimiser des méthodes de dosage spécialisé de divers anticoagulants utilisant des méthodes de laboratoire variées et complémentaires, pouvant être mis à la disposition des laboratoires d'analyse, en particulier en milieu hospitalier.

BIBLIOGRAPHIE

Articles cités

- Alessi, M.C., 2002. Le système fibrinolytique : activation et inhibition. Ses modifications en cas de CIVD. *Réanimation* 11, 591–598.
- Aljohani, M.M., Chinnappan, R., Eissa, S., Alsager, O.A., Weber, K., Cialla-May, D., Popp, J., Zourob, M., 2018. *In Vitro* Selection of Specific DNA Aptamers Against the Anti-Coagulant Dabigatran Etexilate. *Sci Rep* 8, 1–8.
- Amiral, J., Dunois, C., Amiral, C., Seghatchian, J., 2016. An update on laboratory measurements of Dabigatran: Smart specific and calibrated dedicated assays for measuring anti-IIa activity in plasma. *Transfus. Apher. Sci.* 54, 428–437.
- Arpino, P.A., Demirjian, Z., Van Cott, E.M., 2005. Use of the chromogenic factor X assay to predict the international normalized ratio in patients transitioning from Argatroban to warfarin. *Pharmacotherapy* 25, 157–164.
- Austin, J.H., Stearns, C.R., Winkler, A.M., Paciullo, C.A., 2012. Use of the chromogenic factor X assay in patients transitioning from Argatroban to warfarin therapy. *Pharmacotherapy* 32, 493–501.
- Baker, C.L., Dhamane, A.D., Mardekian, J., Dina, O., Russ, C., Rosenblatt, L., Lingohr-Smith, M., Menges, B., Lin, J., Nadkarni, A., 2018. Comparison of Drug Switching and Discontinuation Rates in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation Treated with Direct Oral Anticoagulants in the United States. *Adv Ther.*
- Bathala, M.S., Masumoto, H., Oguma, T., He, L., Lowrie, C., Mendell, J., 2012. Pharmacokinetics, biotransformation, and mass balance of edoxaban, a selective, direct factor Xa inhibitor, in humans. *Drug Metab. Dispos.* 40, 2250–2255.
- Béguin, S., Welzel, D., Al Dieri, R., Hemker, H.C., 1999. Conjectures and refutations on the mode of action of heparins. The limited importance of anti-factor xa activity as a pharmaceutical mechanism and a yardstick for therapy. *Haemostasis* 29, 170–178.
- Bornet, S., Dolapsakis, C., Petignat, P.-A., Gobin, N., 2016. [Direct oral anticoagulants: some practical considerations]. *Rev Med Suisse* 12, 1453–1459.
- Bounameaux, H., Camm, A.J., 2014. Edoxaban: an update on the new oral direct factor Xa inhibitor. *Drugs* 74, 1209–1231.
- Bouvenot Gilles, Bounhoure JP, Montastruc JL, Vacheron A, 2014. Les anticoagulants oraux directs (AOD). Académie Nationale de Médecine Rapport-10 juin 2014.
- Brenner, B., Hull, R., Arya, R., Beyer-Westendorf, J., Douketis, J., Elalamy, I., Imberti, D., Zhai, Z., 2019. Evaluation of unmet clinical needs in prophylaxis and treatment of venous thromboembolism in high-risk patient groups: cancer and critically ill. *Thromb J* 17, 6.
- Brunetti, N.D., Gesuete, E., Gennaro, L.D., Correale, M., Caldarola, P., Gaglione, A., Biase, M.D., 2017. Direct oral anti-coagulants compared with vitamin-K inhibitors and low-molecular-weight-heparin for the prevention of venous thromboembolism in patients with cancer: A meta-analysis study. *International Journal of Cardiology* 230, 214–221.
- Cimmino, G., Cirillo, P., 2018. Tissue factor: newer concepts in thrombosis and its role beyond thrombosis and hemostasis. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* 8, 581-593–593.
- Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guidelines - Second edition.

- Cunningham, G.M., Mcnicol, G.P., Douglas, A.S., 1965. EFFECT OF ANTICOAGULANT DRUGS ON PLATELET AGGREGATION IN THE CHANDLER'S TUBE. *Lancet* 1, 729–730.
- Curvers, J., van de Kerkhof, D., Stroobants, A.K., van den Dool, E.-J., Scharnhorst, V., 2012. Measuring direct thrombin inhibitors with routine and dedicated coagulation assays: which assay is helpful? *Am. J. Clin. Pathol.* 138, 551–558.
- Delavenne, X., Zufferey, P., 2012. Nouveaux anticoagulants oraux : mécanisme d'action et données pharmacocinétiques. *La lettre du pharmacologue*, pp. 78–82.
- Dzeshka, M.S., Lip, G.Y.H., 2015. Edoxaban for reducing the risk of stroke and systemic embolism in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Expert Opin Pharmacother* 16, 2661–2678.
- Fahrni, G., Wolfrum, M., De Maria, G.L., Banning, A.P., Benedetto, U., Kharbanda, R.K., 2016. Prolonged High-Dose Bivalirudin Infusion Reduces Major Bleeding Without Increasing Stent Thrombosis in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention: Novel Insights From an Updated Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc* 5.
- Fanikos, J., Burnett, A.E., Mahan, C.E., Dobesh, P.P., 2017. Renal Function Considerations for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation. *Am. J. Med.* 130, 1015–1023.
- Ferrari, E., Serre, S., Lesto, I., Berkane, N., Baudouy, M., 2001. [When is antithrombotic therapy indicated in the stable coronary patient?]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 94, 1274–1277.
- Giesen, P.L., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roqué, M., Fallon, J.T., Badimon, J.J., Himber, J., Riederer, M.A., Nemerson, Y., 1999. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2311–2315.
- Godier, A., I. Gouin-Thibault, N. Rosencher, P. Albaladejo, et Groupe d'Intérêt en Hémostase Périopératoire. 2015. « [Management of direct oral anticoagulants for invasive procedures] ». *Journal Des Maladies Vasculaires* 40 (3): 173-81.
- Gray, E., Harenberg, J., ISTH Control of Anticoagulation SSC Working Group on Thrombin Inhibitors, 2005. Collaborative study on monitoring methods to determine direct thrombin inhibitors lepirudin and Argatroban. *J. Thromb. Haemost.* 3, 2096–2097.
- Griffin, J.H., Zlokovic, B.V., Mosnier, L.O., 2012. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* 95, 333–345.
- Harenberg, J., Schreiner, R., Hetjens, S., Weiss, C., 2019. Detecting Anti-IIa and Anti-Xa Direct Oral Anticoagulant (DOAC) Agents in Urine using a DOAC Dipstick. *Semin. Thromb. Hemost.* 45, 275–284.
- Henschen-Edman, A.H., 1999. On the identification of beneficial and detrimental molecular forms of fibrinogen. *Haemostasis* 29, 179–186.
- Hoffman, M., 2003. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 17 Suppl 1, S1-5.
- Hoffman, M., Monroe, D.M., 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 85, 958–965.
- Houbouyan, L., Boutière, B., Contant, G., Dautzenberg, M.D., Fievet, P., Potron, G., Vassault, A., Gourmelin, Y., 1996. Validation protocol of analytical hemostasis systems: measurement of anti-Xa activity of low-molecular-weight heparins. *Clin. Chem.* 42, 1223–1230.
- Huisman, M.V., Klok, F.A., 2018. Pharmacological properties of betrixaban. *Eur Heart J Suppl* 20, E12–E15.
- Kairov, G.T., Solovlev, M.A., Kotlovskaya, L.Y., Udut, V.V., 2018. Features of Pharmacodynamics of the Anticoagulant Dabigatran in Secondary Thrombophilia. *Clin Appl Thromb Hemost* 1076029618814344.
- Kamikubo, Y., Mendolicchio, G.L., Zampolli, A., Marchese, P., Rothmeier, A.S., Orje, J.N., Gale, A.J., Krishnaswamy, S., Gruber, A., Østergaard, H., Petersen, L.C., Ruf, W., Ruggeri, Z.M., 2017. Selective factor VIII activation by the tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex. *Blood* 130, 1661–1670.

- Kubli, K.A., Snead, J.A., Cheng-Lai, A., 2016. Edoxaban: A Novel Factor Xa Inhibitor for the Management of Non-valvular Atrial Fibrillation and Venous Thromboembolism. *Cardiol Rev* 24, 205–210.
- Lip, G.Y.H., Pan, X., Kamble, S., Kawabata, H., Mardekian, J., Masseria, C., Phatak, H., 2018. Discontinuation risk comparison among “real-world” newly anticoagulated atrial fibrillation patients: Apixaban, warfarin, dabigatran, or rivaroxaban. *PLOS ONE* 13, e0195950.
- Liu, W., Zhang, C., Bai, Q., Zhang, Z., 2018. Rare heparin induced thrombocytopenia type I reaction in a hemodialysis patient. *Medicine (Baltimore)* 97. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013609>
- Mannucci, P.M., Canciani, M.T., Mari, D., Meucci, P., 1979. The varied sensitivity of partial thromboplastin and prothrombin time reagents in the demonstration of the lupus-like anticoagulant. *Scand J Haematol* 22, 423–432.
- Martin, A.-C., Godier, A., Smadja, D.M., Mauge, L., Fischer, A.-M., 2017. [State of the art: Direct oral anticoagulants and transfusion]. *Transfus Clin Biol* 24, 154–159.
- Meddahi, S., Samama, M.-M., 2014. Caractéristiques pharmacologiques et cliniques des inhibiteurs directs du Facteur Xa : rivaroxaban, apixaban, edoxaban et betrixaban. *Journal des maladies vasculaires* 39, 183–194.
- Meddahi, S., Samama, M.M., 2011. Les inhibiteurs directs de la thrombine, l’Hirudine, la bivalirudine, l’Argatroban, et le dabigatran etexilate. *Journal des Maladies Vasculaires* 36, 24–32.
- Mikkaichi, T., Yoshigae, Y., Masumoto, H., Imaoka, T., Rozehnal, V., Fischer, T., Okudaira, N., Izumi, T., 2014. Edoxaban Transport via P-Glycoprotein Is a Key Factor for the Drug’s Disposition. *Drug Metab Dispos* 42, 520–528.
- Nigam, S.K., Bush, K.T., Martovetsky, G., Ahn, S.-Y., Liu, H.C., Richard, E., Bhatnagar, V., Wu, W., 2015. The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. *Physiol Rev* 95, 83–123.
- Nimjee, S.M., Oney, S., Volovyk, Z., Bompiani, K.M., Long, S.B., Hoffman, M., Sullenger, B.A., 2009. Synergistic effect of aptamers that inhibit exosites 1 and 2 on thrombin. *RNA* 15, 2105–2111.
- Oertel, L.B., Fogerty, A.E., 2017. Use of direct oral anticoagulants for stroke prevention in elderly patients with nonvalvular atrial fibrillation. *J Am Assoc Nurse Pract* 29, 551–561.
- Oka, S., Wakui, M., Fujimori, Y., Kuroda, Y., Nakamura, S., Kondo, Y., Nakagawa, T., Katagiri, H., Murata, M., 2020. Application of clot-fibrinolysis waveform analysis to assessment of in vitro effects of direct oral anticoagulants on fibrinolysis. *Int J Lab Hematol*.
- Olson, S.T., Björk, I., Sheffer, R., Craig, P.A., Shore, J.D., Choay, J., 1992. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J. Biol. Chem.* 267, 12528–12538.
- Özge-Anwar, A.H., Connell, G.E., Mustard, J.F., 1965. The Activation of Factor VIII by Thrombin. *Blood* 26, 500–509.
- Page, C., 2013. Heparin and related drugs: beyond anticoagulant activity. *ISRN Pharmacol* 2013, 910743.
- Parasrampur, D.A., Mendell, J., Shi, M., Matsushima, N., Zahir, H., Truitt, K., 2016. Edoxaban drug–drug interactions with ketoconazole, erythromycin, and cyclosporine. *Br J Clin Pharmacol* 82, 1591–1600.
- Parasrampur, D.A., Truitt, K.E., 2016. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Edoxaban, a Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant that Inhibits Clotting Factor Xa. *Clin Pharmacokinet* 55, 641–655.
- Prandoni, P., Bilora, F., Marchiori, A., Bernardi, E., Petrobelli, F., Lensing, A.W.A., Prins, M.H., Girolami, A., 2003. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 348, 1435–1441.

- Preston, F.W., Hohf, R., Trippel, O., 1956. The neutralization of heparin with polybrene. *Q Bull Northwest Univ Med Sch* 30, 138–143.
- Ramacciotti, E., Aguiar, V.C.R., Castelli Júnior, V., Casella, I.B., Zerati, A.E., Fareed, J., 2018. Edoxaban for Venous Thromboembolism Treatment-The New Kid on The Block for Latin America. *A Practical Guide. Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 1076029618812955.
- Rockson, S.G., Albers, G.W., 2004. Comparing the guidelines: anticoagulation therapy to optimize stroke prevention in patients with atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 929–935.
- Shah, A., Feldman, D.N., 2012. Outcome of the HORIZONS-AMI trial: bivalirudin enhances long-term survival in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing angioplasty. *Vasc Health Risk Manag* 8, 115–123.
- Shah, R., Rogers, K.C., Ahmed, A.J., King, B.J., Rao, S.V., 2016. Effect of Post-Primary Percutaneous Coronary Intervention Bivalirudin Infusion on Acute Stent Thrombosis: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *JACC Cardiovasc Interv* 9, 1313–1320.
- Smorenburg, S.M., Van Noorden, C.J., 2001. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol. Rev.* 53, 93–105.
- Spannagl, M., Bichler, J., Birg, A., Lill, H., Schramm, W., 1991. Development of a chromogenic substrate assay for the determination of hirudin in plasma. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2, 121–127.
- Undas, A., Zabczyk, M., 2018. Antithrombotic medications and their impact on fibrin clot structure and function. *J. Physiol. Pharmacol.* 69.
- Veale, J.J., McCarthy, H.M., Palmer, G., Dyke, C.M., 2005. Use of Bivalirudin as an Anticoagulant During Cardiopulmonary Bypass. *J Extra Corpor Technol* 37, 296–302.
- Verdoia, M., Barbieri, L., Parodi, G., Bellandi, B., Schaffer, A., Suryapranata, H., De Luca, G., 2017. Impact of anticoagulation strategy with bivalirudin or heparin on nonaccess site bleeding in percutaneous coronary interventions: A meta-analysis of randomized trials. *Catheter Cardiovasc Interv* 90, 553–565.
- Villines, T.C., Ahmad, A., Petrini, M., Tang, W., Evans, A., Rush, T., Thompson, D., Oh, K., Schwartzman, E., 2018. Comparative safety and effectiveness of dabigatran versus rivaroxaban and apixaban in patients with non-valvular atrial fibrillation: a retrospective study from a large healthcare system. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.*
- Wang, H., Li, Y., Cong, H., Ding, S., Liu, B., Li, L., Chen, Y., Jia, S., Jing, Q., Zhao, X., Liu, H., Liang, Z., Li, J., Bao, D., Han, Y., 2017. Efficiency and safety of bivalirudin in patients undergoing emergency percutaneous coronary intervention via radial access: A subgroup analysis from the bivalirudin in acute myocardial infarction versus heparin and GPI plus heparin trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 89, 1157–1165.
- Warkentin, T.E., 2007. CHAPTER 44 - The Diagnosis and Management of Heparin-Induced Thrombocytopenia, in: Bergan, J.J. (Ed.), *The Vein Book*. Academic Press, Burlington, pp. 395–403.
- Weitz, J.I., Jaffer, I.H., Fredenburgh, J.C., 2017. Recent advances in the treatment of venous thromboembolism in the era of the direct oral anticoagulants. *F1000Res* 6, 985.
- Zhang, N., Lou, W., Ji, F., Qiu, L., Tsang, B.K., Di, W., 2016. Low molecular weight heparin and cancer survival: clinical trials and experimental mechanisms. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142, 1807–1816.

Sites web cités

Brèche vasculaire : http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/hemato05-hemostase_primaire.pdf

CLSI : <https://clsi.org/>

Test de Grubb : <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>

GECNi.com. : La cascade de la coagulation : <https://gecni.medixen.fr/images/cascade-de-la-coagulation>.

Guide Vidal : <https://www.vidal.fr/>

pharmacomédicale.org : « **Les Héparines** ». <https://pharmacomedicale.org/medicaments/specialites/item/anticoagulants-par-voie-injectable-heparines-et-derivees>.

pharmacomédicale.org : « **Dabigatran** » <https://pharmacomedicale.org/medicaments/specialites/item/anticoagulants-oraux-directs-aods>

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

DEVELOPPEMENT DE TESTS DE LABORATOIRE POUR LE SUIVI DE PATIENTS SOUS TRAITEMENT ANTICOAGULANT

AMIRAL Cédric

28/09/2020

Résumé

La prise en charge des patients présentant des risques hémorragiques ou de thrombose est un enjeu important de santé publique. De multiples causes peuvent en être à l'origine et beaucoup d'individus doivent faire face au cours de leur vie à ce type de problème. En effet, le vieillissement de la population et les problèmes d'obésité ou de fragilité cardiaque dus au mode de vie ou aux prédispositions génétiques ont amené la médecine à rechercher des thérapies de plus en plus efficaces et pratiques. L'industrie pharmaceutique met ainsi à disposition des médicaments permettant de contrôler l'excès de coagulation *in vivo* : les anticoagulants.

Les hôpitaux et cliniques nécessitent des outils de dosages performants pour suivre les patients à risque. Les anticoagulants récemment introduits ne peuvent pas être dosés avec les techniques classiques, et de nouveaux tests doivent être développés. Ces méthodes doivent être pertinentes en matière de coût ou de pratique. Les deux tests développés pour l'Edoxaban se sont avérés conformes à ces exigences, et plus accessible que le test de référence : le dosage chromatographique LC:MS/MS. Les résultats de notre étude nous poussent à recommander le test de dosage BIOPHEN™ DiXaI, plus apte à représenter l'effet anticoagulant de l'Edoxaban *in vivo*, en prenant en compte l'activité de ses divers métabolites.

Le dosage de la Bivalirudine est une innovation offrant aux hôpitaux une méthode de dosage de cet anticoagulant. Les deux tests de dosage de la Bivalirudine correspondent à des applications différentes selon le contexte clinique, et leurs limites sont différentes. Le test HEMOCLOT™ TI doit être privilégié en présence de plasmas hémolysés ou de plasmas provenant de sujets hépatiques (plasma pouvant contenir de la Bilirudine) ; le test BIOPHEN™ DTI est préférable lors du relais d'un anticoagulant oral anti-Xa vers la Bivalirudine. Dans une optique d'amélioration continue des dosages, nous avons pu rendre possible le suivi des patients sous anticoagulants oraux directs (AODs) dans les pathologies de la cascade de coagulation, grâce leur adsorption spécifique par ajout de charbon actif dans les plasmas testés. Nous avons pu également améliorer certains procédés de dosage des anticoagulants oraux anti-Xa en éliminant tout risque d'interférence des Héparines. Enfin, les tests rapides de dosage des anticoagulants, modélisé pour le Dabigatran, pourraient permettre d'envisager une pratique nouvelle en contexte d'urgence. Toutefois, ils nécessitent un développement supplémentaire pour devenir opérationnels. C'est pourquoi nous allons accentuer la recherche dans ce domaine car ces tests sur bandelettes pourraient être directement utilisables de manière décentralisée, en cas de besoin, pour un test rapide des patients et aider la prise en charge immédiate (intervention non programmée, saignement sans cause identifiée, ...).

MOTS-CLES : Anticoagulants Directs – Dosages – Anti-Facteur Xa – Anti-Facteur Thrombine – Thromboses – Edoxaban – Dabigatran – Bivalirudine - Migration tangentielle.

Annexe 1

Lyophilisation des plasmas surchargés

Descriptif du processus de lyophilisation des flacons de plasma surchargés en Edoxaban ou en métabolite M4 :

Les flacons sont pré-bouchés avec des bouchons de lyophilisation en caoutchouc, laissant passer l'air dans la phase de lyophilisation.

Pour la lyophilisation, le plasma (liquide) est d'abord congelé à basse température (-40°C), l'eau est sublimée sous vide, ce qui produit une « galette sèche compacte » (lyophilisat). Une fois la lyophilisation accomplie le bouchage hermétique est réalisé sous vide, dans le lyophilisateur.



Etapes de la lyophilisation

Congélation :

500 min sous vide partiel : à environ 795 mBar

Lyophilisation primaire :

Vide poussé jusqu'à une pression d'environ 100 µbar, rapidement, puis graduellement jusqu'à une pression < 50 µbar (10 µbar ici) sur > 1200 minutes, avec une température maintenue entre -40 et -35°C.

Dessiccation (ou lyophilisation secondaire) :

Montée progressive en température - Températures montées à -10°C

Puis graduellement sur 360 minutes de -10°C à + 40 /45°C, tout en maintenant un vide poussé (environ 10 µbars). Une fois la température à + 40 /45°C, les produits restent en dessiccation secondaire, sous vide, pendant 12 heures (cela permet « l'extraction » de l'eau liée, et donc de compléter la déshydratation du produit).



Fin de Lyophilisation et pré-bouchage

Fin de Lyophilisation

Les flacons sont bouchés automatiquement sous vide, puis la pression est ramenée graduellement à celle de l'atmosphère, et la température à la température ambiante. Les flacons peuvent alors être sortis du lyophilisateur.

Après la Lyophilisation

Les produits Lyophilisés sont bouchés sous vide. Il reste à les capsuler avec un bouchon à vis et les identifier par une étiquette. Ils peuvent être ainsi stockés, sans dégradation, pendant au minimum 30 mois sans ouverture et à une température de 2-8°C.

Utilisation des flacons



Chaque flacon doit être repris par 1,0 ml d'eau distillée stérile, avant utilisation, et contient une quantité déterminée d'Edoxaban, évaluée à environ 91% de la concentration de surcharge du départ. Cette concentration pourra être déterminée précisément, ultérieurement, par un test précis chromatographique LC :MS/MS.

Annexe 2

Description des tests Edoxaban développés avec le kit BIOPHEN™ DiXal sur automate CS

Dosage de 100 à 500 ng/mL (Gamme haute)	Dosage de 0 à 100 ng/mL (Gamme Basse)
60 µL d'échantillon dilué au 1 :15 Tampon R3 BDiXal 60 sec à 37°C	60 µL d'échantillon dilué au 1 :8 Tampon R3 BDiXal 60 sec à 37°C
60 µL B. DiXal Réactif R1 (Facteur FXa) Mélange moyen / Rinçage par Clean I des aiguilles 110 sec at 37°C	60 µL B. DiXal Réactif R1 (Facteur FXa) Mélange moyen / Rinçage par Clean I des aiguilles 50 sec at 37°C
60 µL B. DiXal Réactif R2 (Substrat pour FXa) Mélange moyen / Rinçage par Clean I des aiguilles	60 µL B. DiXal Réactif R2 (Substrat pour FXa) Mélange moyen / Rinçage par Clean I des aiguilles
Mesure entre 10-40 sec à 37°C Delta DO/min à 405 nm Calibration Linéaire: Lin-Log (concentration-OD/min)	Mesure entre 10-40 sec à 37°C Delta DO/min à 405 nm Calibration Linéaire: Lin-Lin (concentration-OD/min)

Description des tests Edoxaban développés avec le kit B. HLRT sur automate CS

Dosage de 100 à 500 ng/mL (Gamme haute)	Dosage de 0 à 100 ng/mL (Gamme Basse)
60 µL d'échantillon dilué au 1 :15 En eau physiologique (NaCl 0,15M) 20 sec à 37°C	60 µL d'échantillon dilué au 1 :3 En eau physiologique (NaCl 0,15M) 20 sec à 37°C
100 µL B. HLRT Réactif R1 (Substrat anti FXa) Mélange faible / Rinçage par Clean I des aiguilles 50 sec at 37°C	100 µL B. HLRT Réactif R1 (Substrat anti FXa) Mélange faible / Rinçage par Clean I des aiguilles 50 sec at 37°C
100µL B. HLRT Réactif R2 (Facteur FXa) Mélange fort / Rinçage par Clean I des aiguilles	100µL B. HLRT Réactif R2 Mélange fort / Rinçage par Clean I des aiguilles
Mesure entre 20-50 sec à 37°C Delta DO/min à 405 nm Calibration Linéaire : Lin-Log (concentration-OD/min)	Mesure entre 20-50 sec à 37°C Delta DO/min à 405 nm Calibration Linéaire: Lin-Lin (concentration-OD/min)

Les tests sont développés après étude et mise au point, non décrite ici.

Les deux tableaux décrivent les volumes respectifs assurant une bonne linéarité de la réaction respectivement en gamme haute basse et pour les deux tests B. DiXal et B. HLRT.

Pour le test avec le B. DiXal, Les temps de réaction est allongé pour la gamme haute, comparé à la gamme basse, après l'ajout du réactif R1. En effet, la dilution choisie assure une concentration plus importante d'Edoxaban en gamme haute qu'en gamme basse, dans le milieu réactionnel. Cela s'est avéré nécessaire pour obtenir une bonne linéarité et un bon $\Delta OD/min$ entre 100 et 500 ng/mL. Le temps de contact avec le réactif R1 est donc nécessairement allongé pour laisser le temps à la neutralisation du FXa de se faire.

Le test B. HLRT en un temps ne nécessite pas ce type d'ajustement, puisque la réaction est simultanée.

Dans les deux tests, la représentation graphique de la courbe de standardisation, le logarithme pour les DO/min s'applique ici pour la gamme haute, alors que celle linéaire est choisie pour la gamme basse. Il existe une amélioration de la linéarité pour le test B. HLRT en opérant de la sorte pour la gamme haute, dû à un effet matrice du plasma plus important en gamme basse, favorable à la linéarité. Pour le test B. DiXal gamme haute, les DO/min en logarithme compensent l'effet de saturation du FXa dans les concentrations d'Edoxaban élevées (se liant moins rapidement au FXa que dans celles plus faibles)

Annexe 3

Description des tests de dosage de la Bivalirudine développés avec le kit HEMOCLOT™ TI sur automate STAR

Dosage de 0,0 à 5,0 µg/mL (Gamme Standard)
50 µL d'échantillon dilué 1/10 en tampon Imidazole 100 µL Réactif R1 HEMOCLOT™ TI Intensive Rinçage intensif des aiguilles 240 sec à 37°C
100 µL Réactif R2 HEMOCLOT™ TI Rinçage spécial des aiguilles avec solution de désinfection
Mesure de la coagulation à 37°C Temps jusqu'à l'arrêt de rotation du barreau aimanté Calibration polynomial en Lin-Lin

Description des tests de dosage de la Bivalirudine développés avec le kit BIOPHEN™ DTI sur automate CS

Dosage de 0,0 à 5,0 µg/mL (Gamme Standard)
30 µL d'échantillon + 50 µL Tampon µL R3 B. DTI 20 sec à 37°C
80 µL B. DTI Réactif R1 (Substrat pour Facteur FIIa) Mélange moyen / Rinçage par Clean I des aiguilles 50 sec at 37°C
80 µL B. DTI Réactif R2 (Substrat pour FIIa) Mélange moyen / Rinçage par Clean I des aiguilles
Mesure entre 15-40 sec à 37°C Delta DO/min à 405 nm Calibration Point to Point: Lin-Lin (concentration-OD/min)

Les tests sont développés après étude et mise au point, non décrite ici.

Les deux tableaux décrivent les volumes respectifs assurant une bonne linéarité de la réaction respectivement deux tests HTI et B. DTI. Sur instrument STAR la réaction polynomiale est utilisable. Sur instrument CS cette représentation graphique n'existe pas, les tests doivent être réalisés de point à point (les concentrations des étalons suffisamment resserrées permettent de rendre cela possible en ayant des écarts de dosage acceptable, voir comparaison méthode sur 100 plasmas dans Résultats entre les deux méthodes).

Annexe 4

Les Anti-Vitamines K (AVK)

Présentation des AVKs

Les Antivitamine K (AVK) inhibent la formation de la vitamine K, vitamine essentielle dans la synthèse finale de certains Facteurs de la coagulation. Les AVKs ne sont pas des inhibiteurs directs des Facteurs activés de la coagulation, mais agissent sur leur synthèse, spécifiquement celles des Facteurs « vitamine K dépendants » : la Prothrombine (FII), la Proconvertine (FVII), le Facteur anti-hémophilique B (FIX) et le Facteur Stuart (FX), ainsi que sur des inhibiteurs de la coagulation, la Protéine C (PC), la Protéine S (PS) et la Protéine Z (PZ). Ces facteurs nécessitent une modification post-traductionnelle : la co-carboxylase vitamine K dépendante introduit des résidus γ -carboxy-glutamiques sur ces protéines, ce qui leur permet de fixer le calcium et par son intermédiaire de se fixer sur les phospholipides anioniques.

Le défaut de vitamine K entraîne la synthèse de facteurs acarboxylés ou hypo-carboxylés (absence ou réduction de résidus γ carboxy-glutamiques). Cela les rend peu ou pas actifs dans la coagulation. Ces facteurs sont alors appelés les PIVKA (Protein Induced by Vitamine K Absence or Antagonists). L'effet anticoagulant des médicaments Antivitamine K est ainsi lié à la perte d'affinité pour les phospholipides des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants, présents sous forme de PIVKAs. En effet, le rôle des phospholipides est de fixer les facteurs de la coagulation sur leur surface et ainsi de permettre leurs interactions, ce qui est essentiel pour permettre l'activation séquentielle de la coagulation. Un défaut de carboxylation des facteurs concernés entraîne donc une diminution de l'activité procoagulante des voies endogènes et exogènes.

Certains médicaments et les aliments riches en vitamine K peuvent perturber leur effet thérapeutique, en réduisant l'effet anticoagulant du traitement AVK. Afin de bénéficier de cette thérapie, les patients traités doivent donc suivre un régime alimentaire particulier. Malgré cela, le traitement ne peut pas être correctement stabilisé chez certains patients et les AVKs ne peuvent alors pas être utilisés. Les AVKs ont démontré leur efficacité pour diminuer les risques d'AVC chez les patients (surtout âgés) souffrant d'arythmie cardiaque, en comparaison avec l'aspirine qui n'est qu'un d'antiagrégant plaquettaire (Ferrari et al., 2001)

Utilisation clinique des AVKs

Si les traitements AVK s'avèrent efficaces, ils présentent néanmoins certains inconvénients : action retardée de quelques jours à partir du début du traitement, fortes interférences avec l'alimentation, difficulté d'ajustement de la posologie, nécessité d'un suivi régulier au laboratoire (par le TP), incidence importante d'accidents hémorragiques, avec parfois issue fatale, ce qui en fait la première cause de complication iatrogène des traitements (Beyth et al. 2002). Ce traitement AVK a été recommandé pour les patients de plus de 75 ans souffrant de troubles de fibrillation auriculaire (Belleville et al., 2014). L'avantage des AVK réside essentiellement dans le fait qu'ils sont pris oralement, mais ils présentent l'inconvénient de créer un dysfonctionnement de l'activation de la cascade de coagulation et de sa régulation, contrairement à d'autres anticoagulants ciblant directement certaines enzymes clés de celle-ci, comme les dérivés des Hirudines et les Héparines (Kimachi et al., 2017). Actuellement, les AVK ont tendance à être remplacés par les nouveaux anticoagulants, également à prise orale, mais inhibant directement certains Facteurs activés de la coagulation (Thrombine ou FXa). Ces médicaments sont maintenant appelés AODs (Anticoagulants Oraux Directs) (Di Lullo et al. 2017, Brunetti et al. 2017).

Bibliographie

- Belleville, T., Pautas, É., Gaussem, P., Siguret, V., 2014. [Management of vitamin K antagonists in the elderly]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 72, 185–192.
- Beyth, R.J., Milligan, P.E., Gage, B.F., 2002. Risk factors for bleeding in patients taking coumarins. *Curr. Hematol. Rep.* 1, 41–49.
- Di Lullo, L., Ronco, C., Cozzolino, M., Russo, D., Russo, L., Di Iorio, B., De Pascalis, A., Barbera, V., Galliani, M., Vitaliano, E., Campana, C., Santoboni, F., Bellasi, A., 2017. Nonvitamin K-dependent oral anticoagulants (NOACs) in chronic kidney disease patients with atrial fibrillation. *Thromb. Res.* 155, 38–47.
- Ferrari, E., Serre, S., Lesto, I., Berkane, N., Baudouy, M., 2001. [When is antivitamin K therapy indicated in the stable coronary patient?]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 94, 1274–1277.
- Kimachi, M., Furukawa, T.A., Kimachi, K., Goto, Y., Fukuma, S., Fukuhara, S., 2017. Direct oral anticoagulants versus warfarin for preventing stroke and systemic embolic events among atrial fibrillation patients with chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev* 11, CD011373.