



**HAL**  
open science

# Évaluation et mise en place d'un agent neutralisant les anticoagulants oraux directs au laboratoire d'hématologie du CHU de Caen

Iman Ariouat

► **To cite this version:**

Iman Ariouat. Évaluation et mise en place d'un agent neutralisant les anticoagulants oraux directs au laboratoire d'hématologie du CHU de Caen. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04494651

**HAL Id: dumas-04494651**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04494651v1>**

Submitted on 7 Mar 2024

**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.



# THESE

(Spécialité DES Biologie Médicale)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 2019

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

## EVALUATION ET MISE EN PLACE D'UN AGENT NEUTRALISANT LES ANTICOAGULANTS ORAUX DIRECTS AU LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DU CHU DE CAEN

Présentée par  
**ARIOUAT IMAN**

Soutenue publiquement le 06 Octobre 2023  
devant le jury composé de

Mme le Docteur Sophie KRIEGER	Praticien hospitalier – HDR, Laboratoire, Centre François Baclesse	Président du jury
M. le Docteur Benjamin GILLET	Praticien hospitalier, Laboratoire d'hématologie, CHU de Caen	Directeur de thèse
Mme le Docteur Marie BRIONNE- FRANÇOIS	Praticien hospitalier, Laboratoire d'hématologie, CHU de Caen	Examineur
M. le Docteur Damien LANEELLE	Praticien Hospitalier, Médecin Vasculaire, CHU de Caen	Examineur

Thèse dirigée par le Docteur Benjamin Gillet

---

Nom et Prénom de l'auteur : ARIOUAT Iman

## LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

### **Directrice de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

### **Assesseurs**

Professeur MALZERT-FREON Aurélie  
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

### **Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

### **Directrice administrative adjointe**

Madame Emmanuelle BOURDON

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES

<b>BOULOUARD Michel</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>BUREAU Ronan</b> .....	Biophysique, Chémoinformatique
<b>COLLOT Valérie</b> .....	Pharmacognosie
<b>DALLEMAGNE Patrick</b> .....	Chimie médicinale
<b>DAUPHIN François</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>DELEPEE Raphaël</b> .....	Chimie analytique
<b>FABIS Frédéric</b> .....	Chimie organique
<b>FRERET Thomas</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>GARON David</b> .....	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>GIARD Jean-Christophe</b> .....	Bactériologie, Virologie
<b>MALZERT-FREON Aurélie</b> .....	Pharmacie galénique
<b>ROCHAIS Christophe</b> .....	Chimie organique
<b>SCHUMANN-BARD Pascale</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>SICHEL François</b> .....	Toxicologie
<b>SOPKOVA Jana</b> .....	Biophysique, Drug design
<b>VOISIN-CHIRET Anne-Sophie</b> .....	Chimie médicinale

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

<b>ANDRE Véronique – HDR</b> .....	Biochimie, Toxicologie
<b>BOUET Valentine – HDR</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>BRIERE Joséphine</b> .....	Biostatistique
<b>CAILLY Thomas – HDR</b> .....	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
<b>DENOYELLE Christophe – HDR</b> .....	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
<b>DHALLUIN Anne</b> .....	Bactériologie, Virologie, Immunologie

<b>DUBOST Emmanuelle</b> .....	Chimie organique
<b>ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR</b> .....	Parasitologie, Mycologie médicale
<b>GROO Anne-Claire</b> .....	Pharmacie galénique
<b>KIEFFER Charline</b> .....	Chimie médicinale
<b>KRIEGER Sophie</b> (Praticien hospitalier) – <b>HDR</b> .....	Biologie clinique
<b>LAPORTE-WOJCIK Catherine</b> .....	Chimie bio-inorganique
<b>LEBAILLY Pierre – HDR</b> .....	Santé publique
<b>LECHEVREL Mathilde – HDR</b> .....	Toxicologie
<b>LEGER Marianne</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>LEPAILLEUR Alban – HDR</b> .....	Modélisation moléculaire
<b>N'DIAYE Monique</b> .....	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
<b>PAIZANIS Eleni</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>POTTIER Ivannah</b> .....	Chimie et toxicologie analytiques
<b>PREVOST Virginie – HDR</b> .....	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
<b>QUINTIN Jérôme</b> .....	Pharmacognosie
<b>RIOULT Jean-Philippe</b> .....	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>SAINT-LORANT Guillaume</b> (Praticien hospitalier) .....	Pharmacie clinique
<b>SINCE Marc– HDR</b> .....	Chimie analytique
<b>THEAULT BRYERE Joséphine</b> .....	Biostatistiques
<b>VILLEDIEU Marie – HDR</b> .....	Biologie et thérapies innovantes des cancers

#### **PROFESSEUR AGREGE (PRAG)**

<b>PRICOT Sophie</b> .....	Anglais
----------------------------	---------

#### **PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)**

<b>SEDILLO Patrick</b> .....	Pharmacie officinale
<b>SEGONZAC Virginie</b> .....	Pharmacie officinale

**Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

A madame le **Docteur Sophie Krieger**, vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A monsieur le **Docteur Benjamin Gillet**, je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse.

A madame le **Docteur Marie Brionne-François**, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'avoir grandement aidé à réaliser cette thèse.

A monsieur le **Docteur Damien Laneelle**, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

A monsieur le **Docteur Yohann Repesse**, je te remercie pour tes conseils et ton aide en ce qui concerne les manipulations et les statistiques.

A mes parents, mes frères et ma sœur qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études, je vous aime.

À ma tata qui m'a aidé à réussir et à ma famille, merci pour votre soutien.

A Djahid merci pour ton soutien et ta bonne humeur infailible.

A Sara et Lizzy mes acolytes de pharma, merci pour les bons moments passés ensemble.

A Amina et Sara je vous remercie pour nos aventures de voyage.

A Rihab, Marie-flore, Amine et Lamia merci pour ces belles années de pharma à réviser et jouer ensemble.

A Jules, PA et Vince merci pour ces moments passés au DU, sans vous l'internat et le DU auraient été différents.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes études et notamment ces années de thèse.

À ma belle-famille, merci de m'avoir accueilli parmi vous avec autant de gentillesse et à Claudine d'avoir relu ma thèse.

A Vincent merci de ton aide précieuse pour cette thèse et pour ces belles années d'internat.

# SOMMAIRE

SOMMAIRE .....	6
LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
LISTE DES FIGURES .....	12
LISTE DES TABLEAUX.....	16
TABLE DES ANNEXES.....	17
1 INTRODUCTION.....	18
1.1 Hémostase .....	19
1.1.1 Hémostase primaire.....	19
1.1.1.1 Temps vasculaire .....	19
1.1.1.2 Temps plaquettaire.....	20
1.1.1.2.1 Adhésion plaquettaire.....	20
1.1.1.2.2 Activation et sécrétion plaquettaire.....	21
1.1.1.2.3 Aggregation plaquettaire .....	21
1.1.2 Hémostase secondaire (coagulation) .....	21
1.1.2.1 Coagulation in vitro.....	24
1.1.2.1.1 La voie extrinsèque .....	24
1.1.2.1.2 La voie intrinsèque .....	24
1.1.2.1.3 La voie commune .....	26
1.1.2.2 La coagulation in vivo .....	27
1.1.2.2.1 Phase d'initiation .....	27
1.1.2.2.2 Phase d'amplification .....	27
1.1.2.2.3 Phase de propagation .....	27
1.1.2.2.4 Phase de stabilisation .....	28
1.1.3 Régulation de la cascade de coagulation .....	28
1.1.3.1 Les inhibiteurs de la coagulation .....	28
1.1.4 Fibrinolyse .....	28
1.2 Exploration de l'hémostase .....	30
1.2.1 Prélèvement.....	30
1.2.2 Technique de dosage .....	30
1.2.2.1 Test chronométrique.....	31
1.2.2.2 Test enzymatique avec réaction chromogénique (amidolytique)....	32

1.2.2.3	Test immunologique .....	33
1.3	Bilan de thrombophilie .....	35
1.3.1	Définition.....	35
1.3.2	Définition d'anticoagulant lupique .....	35
1.3.3	Recherche d'un anticoagulant lupiques « LA ».....	36
1.3.3.1	Le dépistage d'anticoagulant lupique « LA » se fait comme suit ....	36
1.3.3.1.1	Temps de céphaline plus activateur « TCA » sensibilisé « APTT-SP»	36
1.3.3.1.2	Temps de coagulation par le venin de vipère Russel dilué « dRVVT-screening- dRVVT-S » .....	37
1.3.3.2	Test de confirmation : phospholipides dépendants SCT Silica Clotting Time.....	38
1.4	Les anticoagulants.....	40
1.4.1	Les traitements disponibles .....	40
1.4.2	L'héparine .....	41
1.4.2.1	Définition .....	41
1.4.2.2	Mécanisme d'action.....	42
1.4.2.3	Pharmacocinétique :.....	43
1.4.2.4	Réversion : .....	43
1.4.2.5	Indication : .....	44
1.4.3	Anti-vitamines K.....	45
1.4.3.1	Définition .....	45
1.4.3.2	Mécanisme d'action.....	45
1.4.3.3	Pharmacocinétique.....	47
1.4.3.4	Indication .....	49
1.4.4	Anticoagulants oraux directs.....	49
1.4.4.1	Définition .....	49
1.4.4.2	Mécanisme d'action.....	50
1.4.4.3	Pharmacocinétique.....	51
1.4.4.4	Réversion .....	52
1.4.4.5	Indication .....	53
1.4.4.6	Interférences des anticoagulants oraux directs avec les tests d'hémostase .....	54
1.4.4.6.1	Examens de routine et spécialisés .....	54



1.5	Intérêt du charbon .....	56
1.5.1	Définition.....	56
1.5.2	Choix des pastilles de charbon .....	57
1.5.2.1	DOAC Stop™: (DS, Haematex Research, Hornsby,Australia) .....	57
	Protocole traitement par DOAC-Stop™ .....	57
1.5.2.2	DOAC Remove.....	58
1.5.2.3	DP-Filter®.....	58
2	MATERIELS ET METHODES.....	59
2.1	Automates/outils de dosage .....	59
2.1.1	Hémostase de routine.....	59
2.1.2	Hémostase spécialisée .....	59
2.2	Méthodologie de dosage .....	61
2.2.1	Préparation des solutions de travail.....	61
2.2.2	Protocole.....	61
2.2.3	Préparation des échantillons.....	63
2.2.4	Tests d'hémostase de routine.....	65
2.2.5	Tests d'hémostase spécialisée .....	65
2.2.6	Tests statistiques .....	65
3	RESULTAT .....	66
3.1	Mesure à conditions différentes.....	66
3.2	Influence du DMSO .....	67
3.3	Influence du charbon .....	67
3.4	Effet du charbon sur les concentrations mesurées en apixaban et rivaroxaban .....	69
3.5	Influence de l'apixaban sur les tests d'hémostase.....	70
3.5.1	TP .....	70
3.5.2	TCA .....	72
3.5.3	Facteur V .....	73
3.5.4	Facteurs VIII .....	75
3.6	Influence du rivaroxaban sur les tests d'hémostase .....	76
3.6.1	TP .....	76
3.6.2	TCA .....	78
3.6.3	Facteur V .....	79

3.6.4	Facteur VIII .....	80
3.7	Effet de l'apixaban sur l'hémostase spécialisée .....	82
3.7.1	Antithrombine.....	82
3.7.2	APTT-SP.....	84
3.7.3	dRVVT-S.....	86
3.7.4	dRVVT-c .....	89
3.7.5	Protéine S.....	90
3.7.6	Protéine C.....	92
3.8	Effet du rivaroxaban sur l'hémostase spécialisé.....	94
3.8.1	Antithrombine.....	94
3.8.2	APTT-SP.....	95
3.8.3	dRVVT-S.....	98
3.8.4	dRVVT-c .....	100
3.8.5	Protéine S.....	101
3.8.6	Protéine C.....	103
3.9	Comparaison de l'effet apixaban versus rivaroxaban.....	104
3.9.1	Test réalisé sur l'Atellica ® COAG 360 : .....	104
3.9.2	Test réalisé sur ACL-TOP ® 970 : .....	106
4	DISCUSSION ET PERSPECTIVE .....	108
5	CONCLUSION .....	112
6	BIBLIOGRAPHIE .....	113
7	ANNEXES.....	119

## LISTE DES ABREVIATIONS

AC : *Activated Carbon* : Charbon activé  
ACC : AntiCoagulants Circulant  
ADP: Adénosine 5'-diphosphate  
Ag : Antigène  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament  
AOD : Anticoagulant Oral Direct  
APTT : *Activated Partial Thromboplastin Time*  
AT : Antithrombine  
AVK : Antivitamine K  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DO : Densité optique  
dRVVT : temps de venin de vipère Russell dilué  
EP : embolie pulmonaire  
FI à FXIII : Facteurs (F) de la coagulation I à XIII  
FIIa à FXIIIa : Facteurs (F) de la coagulation I à XIII activés  
FT : Facteur Tissulaire  
GP : Glycoprotéine  
H : Heure  
HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire  
HNF : Héparine Non Fractionnée.  
INR : *International Normalized Ratio* : Rapport Normalisé International  
KHPM : Kininogène de Haut Poids Moléculaire  
KK : Kallicréine  
LA : Anticoagulant Lupique  
MTEV : Maladie Thrombo-Embolique Veineuse  
PAI-1 : Plasminogene Activator Inhibitor-1  
PBS : solution saline tamponnée au phosphate  
PC : protéine C  
PF4 : Facteur 4 plaquettaire  
P-gP : Permeability-GlycoProtein

pKK : PréKalliCréine

PL : Phospho-Lipide

pNA : para-Nitro-Aniline

PNP : Pool Normal de Plasma

PS : protéine S

SAPL : Syndrome des Anti-PhosphoLipides

SCT : *Silice clotting time*-temps de coagulation avec silice

TCA : Temps de Céphaline avec Activateur

TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor*- inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

TP : Temps de Prothrombine

tPA : Tissue Plasminogene factor

TQ : Temps de Quick

TVP : thrombose veineuse profonde

TXA2: Thromboxane A2

VWF: Von Willebrand Factor

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration du processus hémostatique (image créée sur Biorender) (1).....	
Figure 2 : Interaction Plaquettes et sous-endothélium (3) .....	
Figure 3 : Voie de coagulation (image créée sur Biorender). + : Activation / * : A faible concentration .....	
Figure 4: : Phase contact (image créée sur Biorender) .....	
Figure 5: voies de coagulation explorées par le TCA (rouge) et le temps de Quick (en bleu) (TQ) (EMC : exploration de l'hémostase) .....	
Figure 6 : Fibrinolyse (image créée sur Biorender). t-PA : Activateur tissulaire / PAI-1 : plasminogen activator inhibitor .....	29
Figure 7: Tube citraté (25) .....	30
Figure 8 : méthode chromométrique (image créée sur Biorender) .....	
Figure 9: Dosage chromogénique du facteur FVIII (28).....	
Figure 10: Dosage immunologique (image créée sur biorender).....	
Figure 11 : Arbre décisionnel pour la recherche d'ACC (CHU de Caen) / * ou faiblement positif.....	39
Figure 12: Mode d'action des anticoagulants (EMC) .....	40
Figure 13 : Activité des chaînes d'héparine A : pour l'HNF et B pour HBPM (EMC : surveillance des traitements anticoagulants). AT : Antithrombine .....	
Figure 14: Mécanisme d'action des AVK(39).....	46
Figure 15: Calcul de l'INR.....	
Figure 16: Interprétation de l'INR sous AVK .....	
Figure 17 : Pharmacocinétique des AOD (ANSM 2016).....	
Figure 18 : Andexanate (40) .....	
Figure 19: Mécanisme d'action de l'idarucizumab (42).....	
Figure 20 : structure du charbon activé .(37) .....	
Figure 21 : DOAC-Stop™ (57) .....	57
Figure 22 : Procédure d'utilisation du DP-filter®(40) .....	
Figure 23: Atellica® COAG 360 (siemens) (59).....	59
Figure 24 : ACL-TOP® 970 (Werfen) (image prise au laboratoire du CHU de Caen)...	
Figure 25 : Dilution à partir de la solution mère et préparation de solution de travail à : 500, 250, 100 ng/ml. V : volume / C : concentration .....	
Figure 26 : Préparation de solution de travail à : 50, 25 ng/ml.....	

Figure 27 : Comparaison des différents paramètres d'hémostase de routine entre plasma témoin et plasma traité avec du DMSO pour la série apixaban (jaune) et rivaroxaban (vert). Test Anova à mesure répétées p :p-Value .....	67
Figure 28 : Comparaison des différents paramètres d'hémostase de routine entre plasma témoin (bleu) et le plasma traité avec du charbon actif (orange) : p-Value ..	68
Figure 29 : Impact de DOAC-Stop™ sur différentes concentrations en apixaban et rivaroxaban avant et après AC .....	69
Figure 30 : Représentation en Box-plots de différentes concentration d'apixaban sur le TP en l'absence de charbon *p-value <0.05 .....	71
Figure 31 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur la mesure du TP avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	72
Figure 32 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur la mesure du TCA avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	73
Figure 33 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilité du Facteur V pour chaque concentration en concentration en Apixaban .....	
Figure 34 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur la mesure du Facteur V avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	74
Figure 35 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilité du Facteur VIII pour chaque concentration en concentration en Apixaban avant charbon .....	
Figure 36 : Représentation en dot-plot de l'effet de l'apixaban sur la mesure du facteur VIII avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	
Figure 37 : Représentation en Box-plots de différentes concentrations de rivaroxaban sur le TP en l'absence de charbon *p-value <0.05 .....	
Figure 38 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du TP avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	78
Figure 39 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du TCA avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	79
Figure 40 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilité du Facteur V pour chaque concentration en concentration en rivaroxaban .....	
Figure 41 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du FV avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	80
Figure 42 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilité du Facteur VIII pour chaque concentration en concentration en rivaroxaban .....	
Figure 43 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du FVIII avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	81
Figure 44 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilité de l'AT pour chaque concentration en concentration en apixaban .....	
Figure 45 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur la mesure de l'antithrombine avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	83

Figure 46 : Dispersion de points des différents ratio APTT-SP M/T obtenues à différentes concentrations en Apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC.....	84
Figure 47 : Dispersion de points des différents indices de Rosner obtenues à différentes concentrations en Apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité de l'indice de Rosner 15 et faiblement positif 12 Avant AC .....	85
Figure 48 : Dispersion de points des différents ratio M/T obtenues à différentes concentrations en Apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 Après AC .....	86
Figure 49: Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-S pour chaque répétabilité avant charbon.....	
Figure 50 : Dispersion de points des différents ratios de dRVVT-S M/T obtenues à différentes concentrations en apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 avant AC.....	87
Figure 51 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-S pour chaque répétabilité après charbon .....	
Figure 52 : Dispersion des différents ratios de dRVVT-S M/T, en nuage de points, obtenues à différentes concentrations en apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 après AC.....	88
Figure 53 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité avant charbon.....	
Figure 54 : Dispersion de points des différents ratios de dRVVT-c M/T obtenues à différentes concentrations en apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC.....	89
Figure 55 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité après charbon .....	
Figure 56 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine S avant ajout de charbon actif (AC) .....	
Figure 57 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine S après ajout de charbon actif (AC).....	
Figure 58 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine C avant ajout de charbon actif (AC).....	
Figure 59 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine C après ajout de charbon actif (AC).....	
Figure 60 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilités de l'AT pour chaque concentration en concentration en rivaroxaban .....	
Figure 61 : Représentation en Box-plots de l'effet de le rivaroxaban sur la mesure de l'AT avant et après ajout de charbon actif (AC) .....	95

Figure 62 : Dispersion des points des différents ratio du APTT-SP (M/T) obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC .....	96
Figure 63 : Dispersion de points des différents indices de Rosner obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité de l'indice de Rosner 15 avant AC .....	
Figure 64: Dispersion de points des différents ratios du APTT-SP M/T obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC .....	
Figure 65: Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité avant charbon.....	
Figure 66 : : Dispersion des points des différents ratios de dRVVT-S M/T obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 avant AC.....	99
Figure 67 : Dispersion en nuage de points des différents ratios de dRVVT-S M/T obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 après AC .....	100
Figure 68 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité avant charbon.....	
Figure 69 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité après charbon .....	
Figure 70 : Représentation en box-plot de l'effet du rivaroxaban sur l'activité de la protéine S avant ajout de charbon actif (AC) .....	102
Figure 71 : Représentation en box-plot de l'effet du rivaroxaban sur l'activité de la protéine S après ajout de charbon actif (AC).....	
Figure 72 : Représentation en box-plot de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine C avant ajout de charbon actif (AC).....	
Figure 73 : Représentation en box-plot de l'effet du rivaroxaban sur l'activité de la protéine C après ajout de charbon actif (AC).....	
Figure 74 : Impact du rivaroxaban et apixaban à différentes concentrations sur la mesure du taux de FV (%).....	105
Figure 75 : Impact du rivaroxaban et apixaban à différentes concentrations sur la mesure du taux de facteur FVIII (%).....	105
Figure 76 : Histogrammes groupés en fonction des différentes analyses de dépistage de LA : dRVVt-S, dRVVT-c et APTT-SP comparés entre l'apixaban et le rivaroxaban à différentes concentrations en (représentation en histogramme de la moyenne des mesures de chaque répétabilité obtenue pour chaque concentration) .....	106
Figure 77 : Impact du rivaroxaban et apixaban à différentes concentrations sur la mesure de la PS et PC (%).....	107



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des facteurs de coagulation .....	23
Tableau 2 : Description des héparines. SC : Sous -cutané/ IV : intra-veineux / kDA : Kilo-Dalton (29).....	41
Tableau 3 : Pharmacocinétique. TIH : Thrombopénie Induite à l'héparine (EMC : surveillance des traitements anticoagulants), ATCD = antécédent.....	43
Tableau 4 : Indications des héparinoïdes selon ANSM 2018. MTEV : maladie thromboembolique veineuse, TVP : thrombose veine profonde, EP : embolie pulmonaire, CEC : circulation extracorporelle.....	
Tableau 5 : Pharmacocinétique des AVK (39).....	47
Tableau 6: : Interférence des AOD sur les tests d'hémostase (55).....	55
Tableau 7 : Analyses réalisées et réactifs utilisés pour Atellica ® COAG 360.....	59
Tableau 8 : Analyses réalisées et réactifs utilisés pour l'ACL-TOP ®970 (Werfen) [Figure 23] .....	60
Tableau 9 : Comparaison des résultats répétés pour le TP à deux temps de mesures différents (T1+T2) avant et après charbon pour l'apixaban avec la p-Value<0.05. Test Friedman. m : moyenne, e : écart type .....	66
Tableau 10 : Comparaison du plasma témoin à un plasma avec DOAC-Stop™ (moyenne ± écart-type) **Test Anova à mesure répétées (condition de normalité respectée avec le test Shapiro) .....	68
Tableau 11 : Moyenne ± Écart type des concentrations en AOD avant et après l'ajout d'AC de 25, 50, 100, 250 et 500 ng/ml. Test Anova à mesure répétées. N : Nombre de fois/ LQ : limite de quantification.....	70

## TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Fiche technique DOAC-Stop™ .....	
Annexe 2 : Fiche produit de la poudre apixaban .....	
Annexe 3 : Fiche produit de la poudre rivaroxaban .....	
Annexe 4 : Fiche produit de pool normal de plasma.....	122
Annexe 5 : Résultats sur Atellica® COAG 360 apixaban .....	123
Annexe 6 : Résultats sur Atellica® COAG 360 rivaroxaban .....	124
Annexe 7 : Résultats sur ACL TOP®970 (Werfen) apixaban .....	125
Annexe 8 : : Résultats sur ACL TOP® 970 (Werfen) rivaroxaban .....	
Annexe 9 : : Mesure à conditions différentes en deux temps pour l'apixaban .....	128
Annexe 10 : Résultats des Tests réalisés sur la série Apixaban .....	131
Annexe 11 : Résultats des Tests réalisés sur la série Rivaroxaban .....	135

# 1 INTRODUCTION

Les anticoagulants oraux directs (AOD) sont largement utilisés depuis leur début de commercialisation en 2008. Selon l'HAS 2014, ils représentent 55% des prescriptions.(1)

L'utilisation large des AOD pose un problème d'interférence sur de nombreux paramètres d'hémostase.

Ces examens peuvent concerner des dosages faits en routine (dosage de facteurs) ou bien des dosages plus spécifiques, lors de bilan de thrombophilie par exemple.

Au CHU de Caen, pour l'instant, les dosages de facteurs ne sont pas réalisés quand le patient est traité par un AOD.

En ce qui concerne le bilan biologique de thrombophilie, il doit être réalisé à distance de la dernière prise d'AOD. Ainsi, dans notre pratique, au laboratoire, on préconise un arrêt de traitement de 72 heures. Malheureusement cette fenêtre thérapeutique n'est pas sans risque et peut exposer le patient à un risque thrombo-embolique malgré le fait que ça soit fait à distance de l'épisode aigue.

Le but de cette thèse est d'étudier l'effet des AOD sur les tests standards d'hémostase, puis d'évaluer l'efficacité d'un kit utilisant du charbon actif pour s'affranchir de l'interférence des AOD sur ces mêmes paramètres d'hémostase.

Ce travail basé sur l'utilisation du charbon actif, ajouté in vitro, comporte quatre objectifs.

Le premier est d'évaluer l'impact du rivaroxaban et apixaban sur les tests d'hémostase.

Le second est de mettre en place la méthodologie d'utilisation du charbon actif sur le plasma de patient sous AOD et d'assurer la bonne interprétation des paramètres rendus sous DOAC-Stop™.

Le troisième est de vérifier si le charbon actif peut être saturé par une forte concentration en AOD dans les limites plasmatiques, n'exposant pas le patient à un surdosage important.

Enfin, s'assurer que les tests d'hémostase du bilan de thrombophilie sont réalisables chez les patients sous AOD grâce à l'utilisation du charbon actif, permettant ainsi de s'affranchir de la fenêtre thérapeutique des 72 heures.

## 1.1 Hémostase

L'hémostase est le mécanisme, lors d'une lésion, qui conduit à l'arrêt du saignement. Il s'agit d'un processus qui comporte plusieurs étapes interdépendantes.

### 1.1.1 Hémostase primaire

L'hémostase primaire répond à une lésion vasculaire, par un ensemble d'évènements qui aboutissent à la formation d'un clou plaquettaire. Elle se déroule en deux temps :

#### 1.1.1.1 Temps vasculaire

Lors d'une brèche vasculaire, la couche de cellules endothéliales, non thrombogène, disparaît pour laisser place au sous endothélium qui est thrombogène (2).

Dans un premier temps le vaisseau subit une vasoconstriction réflexe pour assurer un ralentissement du débit sanguin et favoriser la formation de caillot fibrine (3) **[Figure 1]**

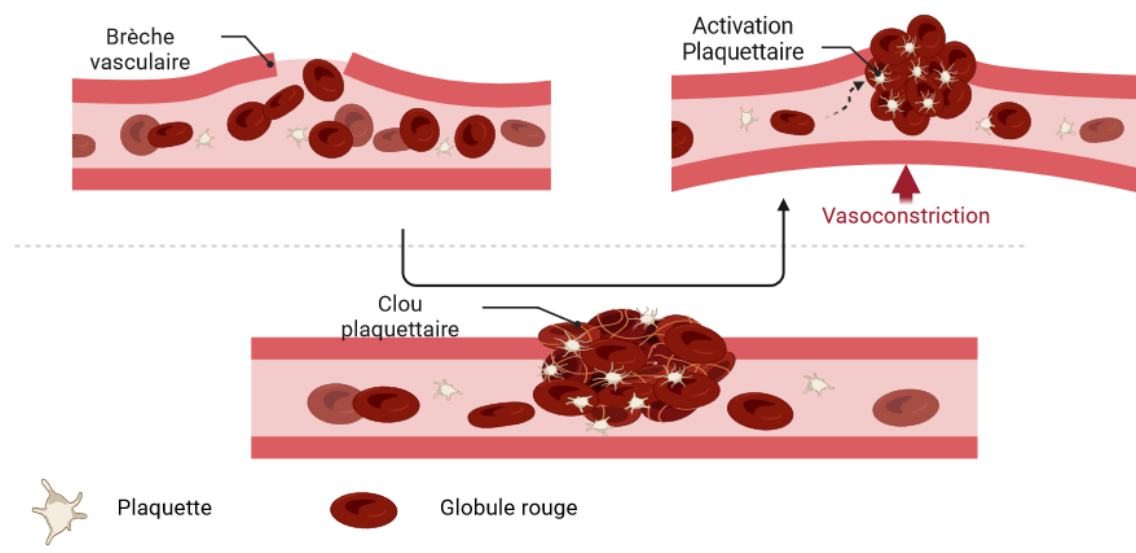


Figure 1 : Illustration du processus hémostatique (image créée sur Biorender) (1)

### 1.1.1.2 Temps plaquettaire

Il fait intervenir les plaquettes, cellules anucléées de 2-4µm, qui sont formées à partir de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes dans la moelle osseuse(4).

La membrane des plaquettes est riche en phospholipides, calcium, cholestérol et glycoprotéines dont l'importance est majeure dans le processus de la coagulation. Les glycoprotéines « GP » les plus importantes sont :

- GP Ib-IIa : permet la fixation du collagène au vaisseau lésé
- GP Ib-IX-V : permet l'adhésion des plaquettes au sous endothélium par le biais du facteur de von Willebrand (VWF)
- GP VI : permet l'adhésion au collagène et l'activation des plaquettes
- GP IIb-IIIa : permet l'agrégation plaquettaire(5) **[Figure 2]**

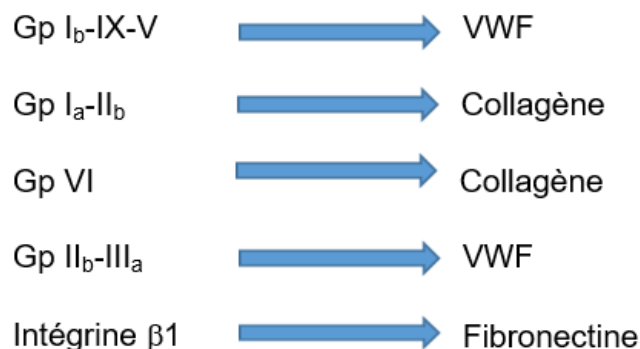


Figure 2 : Interaction Plaquettes et sous-endothélium (3)

Les plaquettes initient le second temps de l'hémostase primaire, dit temps plaquettaire qui se déroule ainsi :

#### 1.1.1.2.1 Adhésion plaquettaire

C'est la liaison entre les glycoprotéines exprimées à la surface de la membrane plaquettaire avec le sous-endothélium : (6)

Chaque liaison joue un rôle précis : la liaison de la GP Ib-IX-V au VWF permet la translocation plaquettaire le long du sous endothélium, assurant ainsi la liaison de la GP VI au collagène, ce qui assure l'adhérence plaquettaire au sous-endothélium.

### **1.1.1.2.2 Activation et sécrétion plaquettaire**

Suit l'adhésion plaquettaire :

Une modification morphologique des plaquettes : passage de la forme discoïde à sphérique avec émission de pseudopodes pour adhérer au sous-endothélium.

Les pseudopodes sont dus à un phénomène d'externalisation des phospholipides « flip-flop » chargés négativement, à la surface plaquettaire. Ils permettent la fixation de facteurs de la coagulation (6).

Également des modifications biochimiques se produisent avec sécrétion granulaire (Adénosine 5'-diphosphate ADP, Thromboxane  $A_2$  «  $TXA_2$  », Calcium «  $Ca^{2+}$  »), synthèse des prostaglandines et expression de surface procoagulante avec l'activation du complexe GP IIb-IIIa en modifiant sa conformation le rendant plus affiné au fibrinogène.

### **1.1.1.2.3 Aggregation plaquettaire**

Les plaquettes adhèrent entre elles grâce à l'activation de la GP IIb-IIIa et de sa liaison au fibrinogène et VWF. Il y a plusieurs moyens pour activer le récepteur de forte affinité pour le fibrinogène.

Soit par la mobilisation du calcium, soit via la signalisation du récepteur à l'ADP, ou en utilisant la voie du  $TXA_2$  (6).

Ce complexe activé permet la génération de ponts inter-plaquettaires consolidant le caillot plaquettaire.

## **1.1.2 Hémostase secondaire (coagulation)**

Le but principal de la coagulation est de renforcer le clou plaquettaire, dont la durée de vie est de seulement 6h.

Les facteurs de coagulation qui participent à la cascade de coagulation sont majoritairement de synthèse hépatique sauf le FVIII qui est synthétisé également par les cellules endothéliales sinusoidale et/ou cellules de Kupffer. La synthèse et la durée de vie des facteurs de coagulation sont résumées dans le **[Tableau 1]**.

Le clou renforcé est issu de la transformation du fibrinogène en fibrine via une activation en cascade de facteurs de coagulation, principalement la thrombine (7) [Figure 3].

Cette étape se déroule *in vitro* via trois voies : la voie d'activation, la voie d'amplification, et la voie commune qui est le point commun et final des deux voies précédemment citées. Un nouveau modèle, plus conforme à la réalité, *in vivo* qui permet une meilleure compréhension des pathologies de la coagulation.

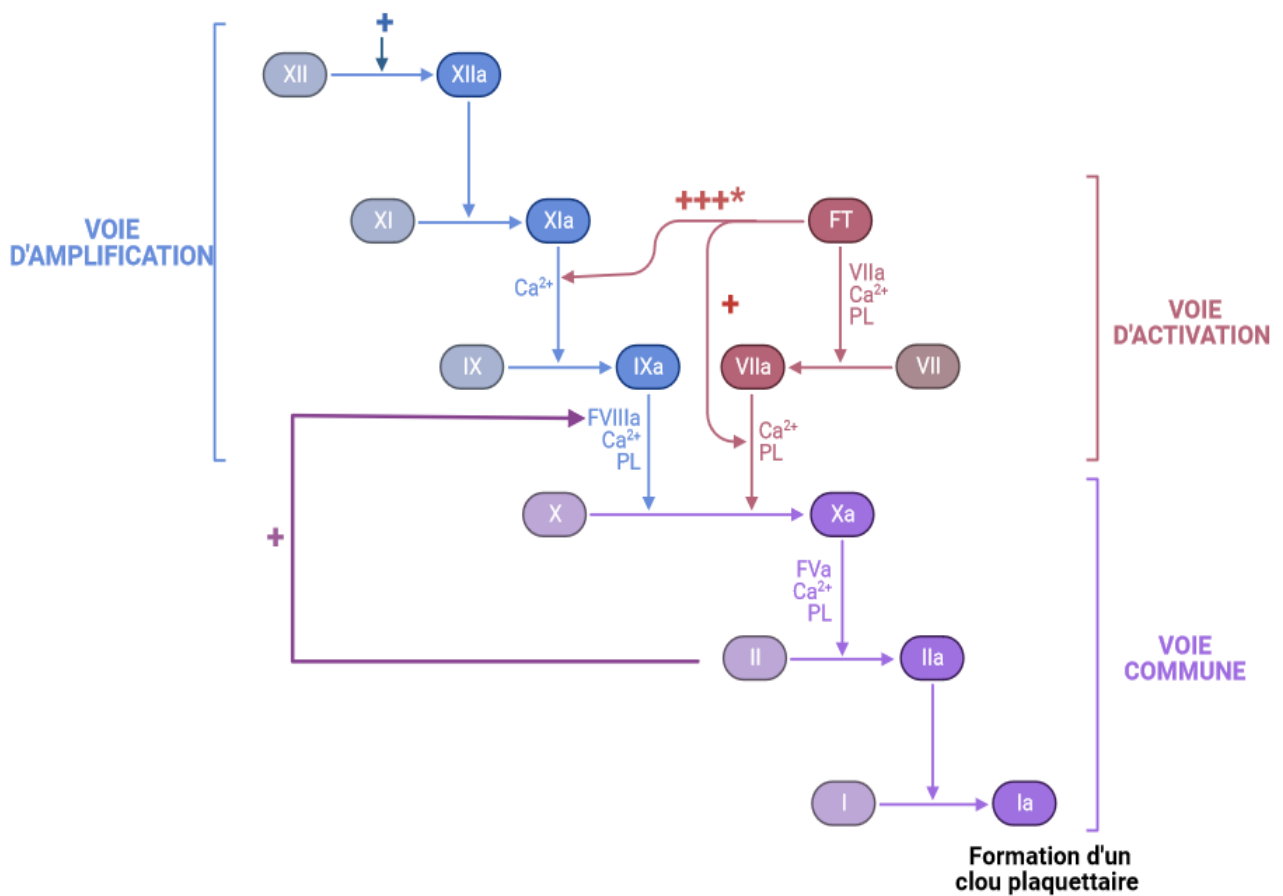


Figure 3 : Voie de coagulation (image créée sur Biorender). + : Activation / \* : A faible concentration

N°	Nom	Vitamine K dépendant	T <sub>1/2</sub>	Fonction
I	Fibrinogène	Non	4-6 J(8)	Forme le réseau de fibrine
II	Prothrombine	Oui	3-4 J(9)	Clive le fibrinogène en fibrine, active le facteur V, FVIII, FXI, FXIII, PC
III	Facteur tissulaire = facteur 3 plaquettaire	Non		Active le FVII
V	Pro-accélélerine	Non	12-36 H(10)	Co-facteur qui active l'activité anti-X <sub>a</sub>
VII	Proconvertine	Oui	4-6 H(11)	Active le facteur IX et X
VIII	Facteur anti-Hémophilique A	Non	2H si lié au VWF : 12-16 H(12)	Co-facteur du IX <sub>a</sub> et augmente son activité
IX	Facteur anti-Hémophilique B	Oui	20-24 H(13)	Active le FX
X	Facteur Stuart Prower	Oui	40-60 H(14)	Active le FII
XI	Rosenthal	Non	1-2 J(15)	Active le facteur XII, IX et pré-Kallicréine
XII	Hageman	Non	50-70 H(16)	Active le pré-Kallicréine
XIII	Facteur stabilisant la fibrine	Non	3-7 J(17)	Introduit les liaisons covalentes pour stabiliser le polymère de fibrine

Tableau 1 : Caractéristiques des facteurs de coagulation



### **1.1.2.1 Coagulation in vitro**

#### **1.1.2.1.1 La voie extrinsèque**

La voie d'activation débute 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 facteur tissulaire FT est une protéine transmembranaire glycosylée, il 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. Physiologiquement non présent, mais lors d'un stimulus inflammatoire ou infectieux, les cellules endothéliales deviennent pro-thrombotiques par sa synthèse. De ce fait lors d'une lésion vasculaire il apparaît et se lie au facteur VII (FVII) circulant, et l'active en facteur VIIa (FVIIa) (19).

Le complexe FT – VIIa formé, à forte concentration et à l'aide du calcium et des phospholipides, active le facteur X, point de commencement de la voie commune. A faible concentration de FT, le complexe FT-FVIIa active préférentiellement le FIX en FIXa **[Figure 3]**.

Cette voie est explorée par le temps de quick « TQ » qui par conversion sur la droite de Thivolle donne le taux de prothrombine (TP) (20) **[Figure 5]**.

#### **1.1.2.1.2 La voie intrinsèque**

La voie d'amplification 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. La voie d'amplification est initiée par l'activation du facteur XII en facteur XIIa qui peut se faire spontanément en contact d'une surface négative, ou bien par l'intervention d'un co-facteur, le Kininogène de Haut Poids Moléculaire (KHPM) et du facteur prékallicroïne (PK) qui va s'activer en Kallicroïne (KK) (21) **[Figure 4]**.

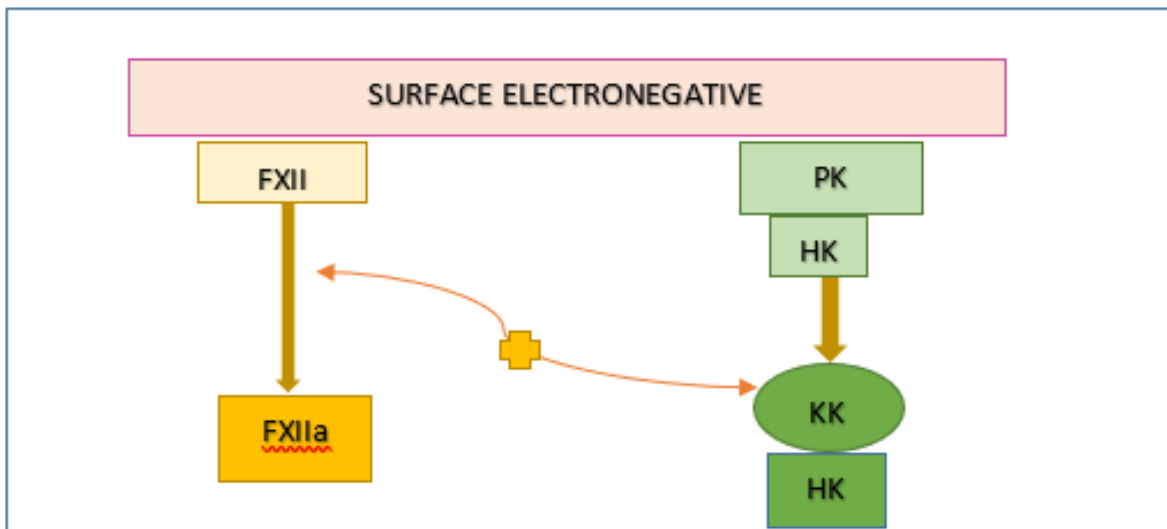


Figure 4: : Phase contact (image créée sur Biorender)

La KK peut à son tour activer le FXII, formant ainsi une boucle d'amplification. Le facteur XIIa active le facteur XI en XIa. Avec un ion calcium, le facteur XIa active le facteur IX. Le facteur IXa active le facteur X qui à son tour active la thrombine (22). Après activation par la thrombine, le FVIII activé (FVIIIa) se complexe au FIX activé (FIXa) et devient le catalyseur de la réaction d'activation du FX par le FIXa **[Figure 3]**. Cette voie est explorée par le Temps de Céphaline avec Activateur « TCA » **[Figure 5]**.

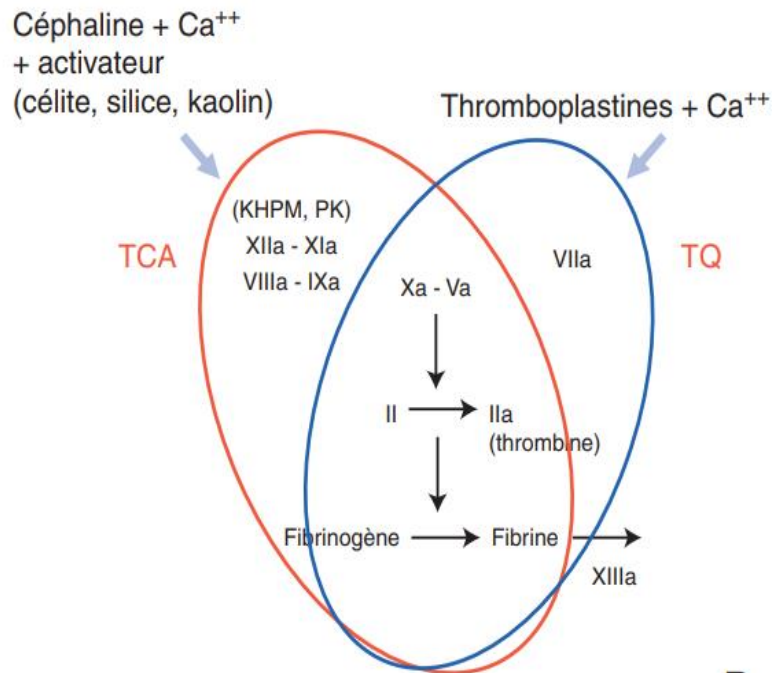


Figure 5: voies de coagulation explorées par le TCA (rouge) et le temps de Quick (en bleu) (TQ) (EMC : exploration de l'hémostase)

### 1.1.2.1.3 La voie commune

La voie commune commence par l'activation du facteur X en facteur Xa comme précédemment décrit, résultant de la voie d'amplification ou d'initiation.

Le premier complexe se forme avec la liaison du facteur Xa à son co-facteur : facteur Va et calcium formant le complexe prothrombinase, ce dernier active alors le facteur II (prothrombine) en facteur IIa (thrombine).

Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène (facteur I) est clivé et transformé en monomères de fibrine (facteur Ia).

Ces monomères de fibrine s'associent en polymères de fibrine instables et encore solubles, l'activation du FXIII en FXIIIa par l'action de la thrombine (FIIa) permet de renforcer les polymères, les rendant stables et insolubles par liaison covalente (pontage  $\gamma$ -glutamyl-e-lysine)(23).

La thrombine amplifie le signal en activant des facteurs V, VIII et IX.

### **1.1.2.2 La coagulation in vivo**

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.(3,24)

#### **1.1.2.2.1 Phase d'initiation**

Dès le début de la brèche vasculaire, les premières traces de FXa sont formées et activent de petites quantités de prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). Ces traces de FIIa permettent d'activer le FV, le FVIII et les plaquettes, ce qui expose les phospholipides anioniques, mais générées en quantité si faible qu'elles sont incapables de transformer le fibrinogène en fibrine. Le complexe FT-FVIIa avec le FXa, est régulé par son inhibiteur naturel, le TFPI, ce qui aide à contrôler le processus de coagulation.

#### **1.1.2.2.2 Phase d'amplification**

Le FIIa initialement formé, active le FVIII, le FV, le FXI et les plaquettes. Le FIX peut être activé 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, aboutit à la thrombino-formation et le phénomène est fortement amplifié quand les premières traces de thrombine formée activant le FVIII.

#### **1.1.2.2.3 Phase de propagation**

Le complexe FVIIIa – FIXa, localisé à la surface des plaquettes activées, augmente considérablement l'activation du FX. Le FXa en association avec le FVa constitue le Complexe Prothrombinase (FVa, FXa, PL, Ca<sup>2+</sup>). Ce complexe prothrombinase induit une génération abondante de thrombine.

#### **1.1.2.2.4 Phase de stabilisation**

La thrombine clive le fibrinogène, ce qui aboutit à la formation du réseau de fibrine instable. Le FXIII activé par la thrombine permet de renforcer les polymères, les rendant stables et insolubles par liaison covalente.

### **1.1.3 Régulation de la cascade de coagulation**

#### ***1.1.3.1 Les inhibiteurs de la coagulation***

Les inhibiteurs de la coagulation interviennent pour réguler et limiter la coagulation au site de la brèche vasculaire, comme la protéine C (PC), la protéine S (PS), l'antithrombine et l'Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) « Tissue factor pathway inhibitor ».

Le TFPI complexé au facteur Xa l'inactive dans un premier temps, et dans un second temps il inhibe la phase contact en inactivant le complexe VIIa-FT. L'antithrombine se complexe de façon irréversible aux facteurs de la coagulation activés en particulier avec la thrombine et le facteur Xa.

La protéine C dont le cofacteur est la protéine S (PC et PS) sont vitamine K dépendantes et ont pour rôle d'inhiber par clivage protéolytique les deux cofacteurs Va et VIIIa (25).

### **1.1.4 Fibrinolyse**

Processus enzymatique médié par la plasmine, permettant la dissolution de la fibrine pour limiter l'extension du caillot et de lyser ce dernier.

La fibrinolyse est régulée par des activateurs (Activateur tissulaire t-PA, Pro-urokinase(scu-PA)) et des inhibiteurs ( $\alpha$ 2-antiplasmine, PAI-1 plasminogen activator inhibitor, TAFI" Thrombin Activatable fibrinolysis inhibitor")

Le processus de dégradation s'effectue en deux étapes :

Dans un premier temps on obtient des petits fragments DD dimère et E ; dans un second temps il y a activation des pro-métalloprotéinases en métalloprotéinases (collagénases) pour dégrader la matrice extra-cellulaire **[Figure 6]** (26).

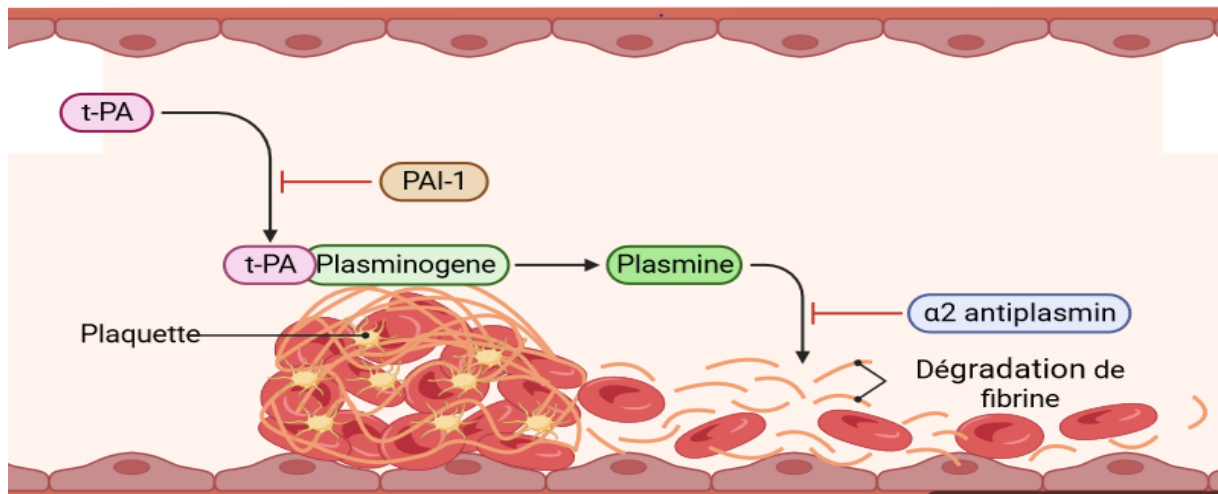


Figure 6 : Fibrinolyse (image créée sur Biorender). t-PA : Activateur tissulaire / PAI-1 : plasminogen activator inhibitor

## 1.2 Exploration de l'hémostase

### 1.2.1 Prélèvement

Avant d'interpréter un bilan d'hémostase, des conditions pré-analytiques sont à respecter pour éviter toute activation artéfactuelle de la coagulation comme décrit par le Groupe Français d'Etude sur l'Hémostase « GFHT »(27).

Type d'échantillon : tube citraté avec respect de l'ordre des tubes, souvent prélevé en premier avec ou sans purge, afin d'éviter la contamination par les anticoagulants présents dans les autres tubes.

Transport : <2h et dans l'heure si traitement héparinique en cours car il y a un risque de sous-estimé la concentration d'héparine (activité anti-Xa).

Remplissage : jusqu'au trait afin de respecter la bonne dilution du citrate (présent dans le tube) (codification européenne 9NC)(28) **[Figure 7]**.

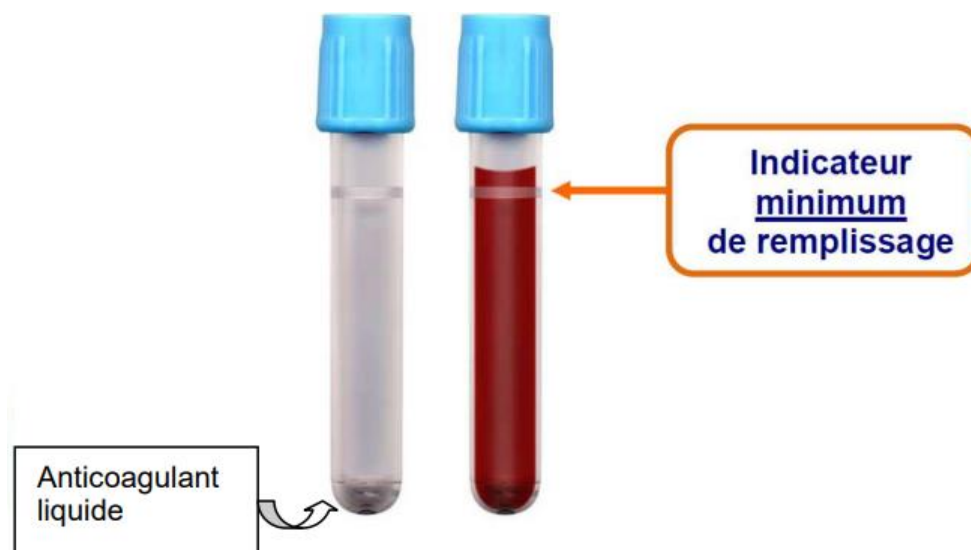


Figure 7: Tube citraté (25)

### 1.2.2 Technique de dosage

L'exploration biologique de l'hémostase est nécessaire, afin de caractériser les déséquilibres de la cascade de coagulation, entraînant des saignements ou des thromboses.

Trois types d'analyses existent : tests chronométriques, enzymatiques et immunologiques.

### 1.2.2.1 Test chronométrique

Il mesure le temps de formation *in vitro* du caillot de fibrine. Deux types de détection existent soit la détection par mesure photo-optique (néphélométrie, turbidimétrie) ou par mesure électromécanique (viscosimétrie).

Exemple d'utilisation : TP/TQ, TCA, dosage de facteurs de coagulation, protéine C et S activité.

Pour le dosage des facteurs de coagulation, on va mesurer un temps de coagulation d'un mélange à volume égal du plasma du malade dilué au 1/10, et du réactif déficient en facteur. Le temps obtenu sera exprimé en pourcentage d'activité en se référant à une courbe de calibration établie à partir d'un plasma témoin ayant 100% d'activité [Figure 8].

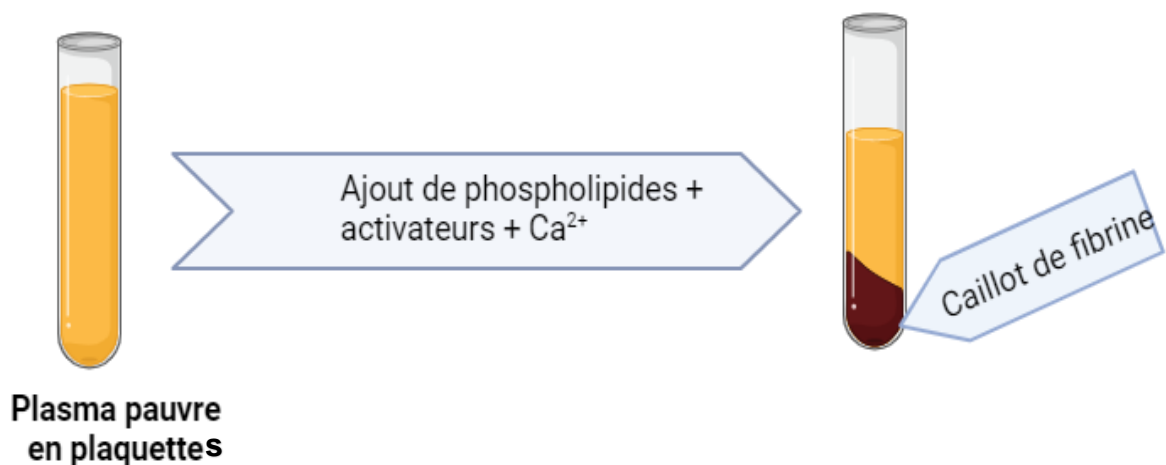


Figure 8 : méthode chronométrique (image créée sur Biorender)



### 1.2.2.2 Test enzymatique avec réaction chromogénique (amidolytique)

Le test utilise un substrat chromogénique spécifique de l'enzyme ou substrat à doser.

Le paranitroaniline (pNA) est le substrat chromogène le plus souvent utilisés, couplé à un oligopeptide synthétique spécifique de l'enzyme à doser [Figure 9]

Lors de la liaison enzyme-peptide, le pNA qui colore le milieu est libéré et la mesure finale se fait par détection photo-optique du pNA (spectrophotométrie).

L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité de l'enzyme.

Exemple d'utilisation : Activité anti-IIa , Activité anti-Xa(calibrant différent en fonction des Héparines ou AOD testés), antithrombine (29) (30).

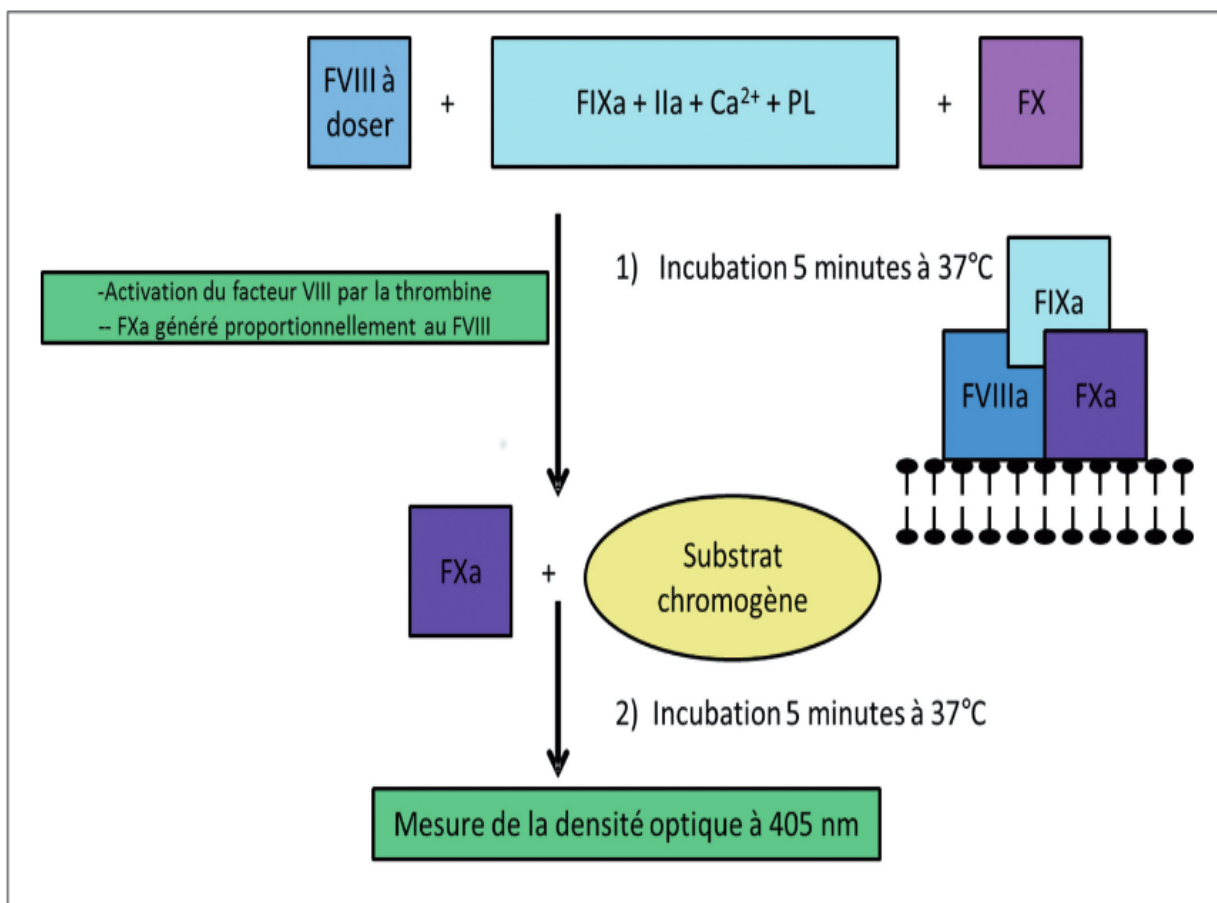


Figure 9: Dosage chromogénique du facteur FVIII (28)

### **1.2.2.3 Test immunologique**

Le principe de ce test repose sur une détection par immunoturbidimétrie de la réaction antigène (Ag)-anticorps (AC). Par exemple le dosage des D-dimères se fait ainsi :

Ajout au plasma à doser d'un réactif contenant des microparticules de latex enduites d'anticorps anti-D-dimère.

Un faisceau de lumière va traverser le mélange, on observera une augmentation de l'absorbance proportionnelle à l'agglutination des particules de latex couplées aux D-dimères. L'absorbance est ainsi, proportionnelle à la quantité de D-dimère présente dans l'échantillon.

Exemple d'utilisation : D-dimère « DD », monomère de fibrine ou facteur Willebrand antigène **[Figure 10]**.

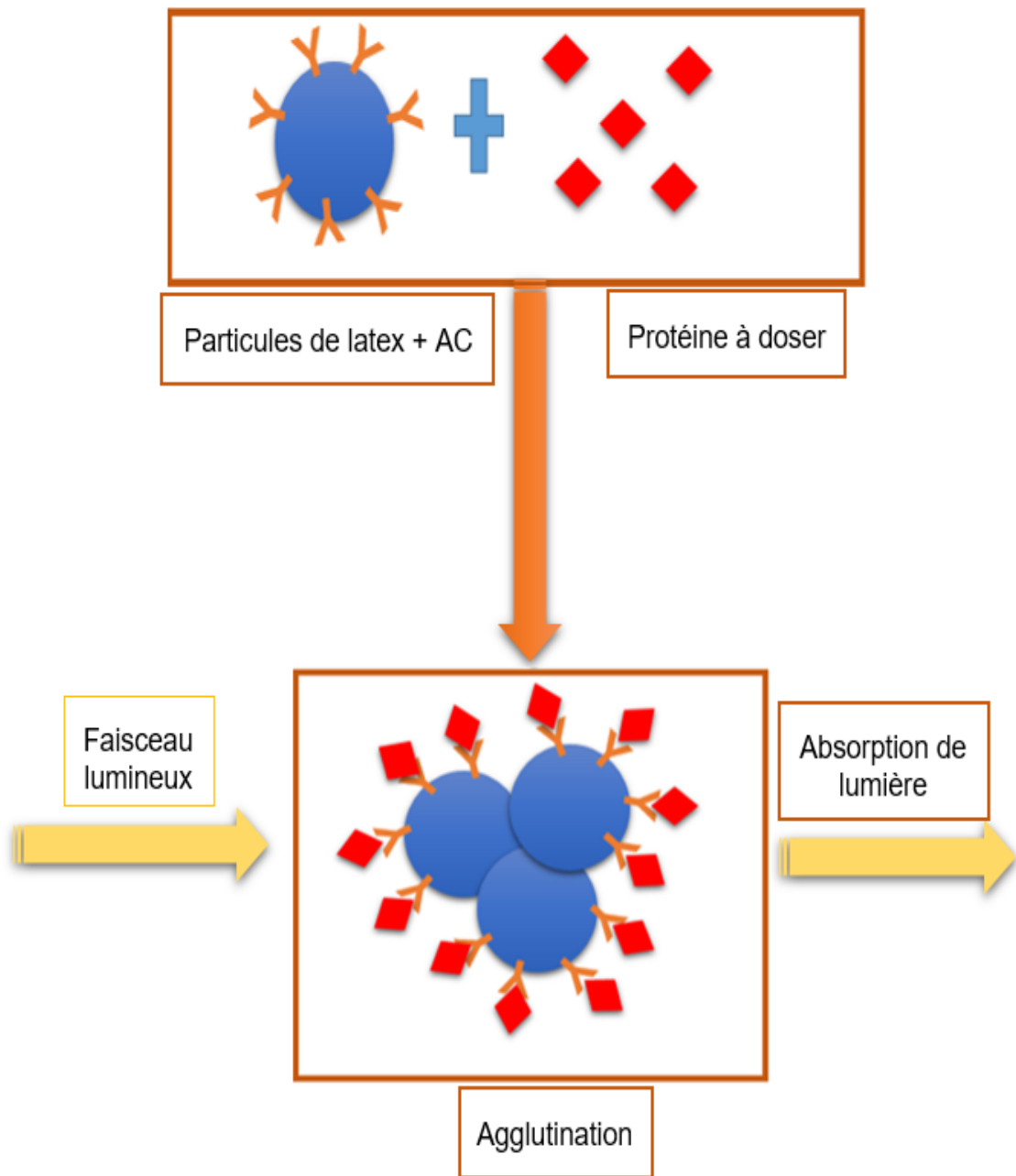


Figure 10: Dosage immunologique (image créée sur biorender)

## **1.3 Bilan de thrombophilie**

### **1.3.1 Définition**

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) est une pathologie complexe avec une incidence en France de 1.57/1000 habitants/an en 2013 et cause parmi les patients hospitalisés pour une EP en France une mortalité hospitalière de 5% (31). Cette dernière s'exprime sous deux formes cliniques : la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP).

Un bilan de thrombophilie est recommandé devant une MTEV et dans certains cas chez les apparentés au premier degré selon les recommandations du GFHT (se référer aux recommandations (31)) .

Le bilan comporte deux parties, l'une explorant la thrombophilie constitutionnelle et l'autre la thrombophilie acquise.

Le bilan constitutionnel comporte :

- Dosages de l'AT, Protéine C et S (activité)
- Recherche de la mutation du Facteur V de Leiden
- Recherche de la mutation du Facteur II (mutation G 20210A du facteur II)

Le bilan de thrombophilie acquise :

Recherche des Anticorps Anti-Phospholipides (APL) :

- Anticoagulant circulant de type lupique (ACC) ou lupus anticoagulant (LA)
- Anticorps antibêta 2 glycoprotéine I
- Anticorps anticardioline

### **1.3.2 Définition d'anticoagulant lupique**

Les anticoagulants lupiques (LA) allongent les tests de coagulation dépendant des phospholipides. Leur recherche est souvent liée à la survenue de thrombose ou de complication obstétricale définissant le syndrome des antiphospholipides « SAPL » (32).

Dans ce chapitre on ne s'intéresse qu'à un type d'anticorps : l'anticoagulant lupique.

### 1.3.3 Recherche d'un anticoagulant lupiques « LA »

#### 1.3.3.1 Le dépistage d'anticoagulant lupique « LA » se fait comme suit

##### 1.3.3.1.1 Temps de céphaline plus activateur « TCA » sensibilisé « APTT-SP »

La mesure de l'APTT-SP est réalisée par une méthode chronométrique détaillée dans 1.2.2.1(33).

Le réactif de APTT-SP utilisé est une céphaline avec une concentration réduite en phospholipides responsable d'une meilleure sensibilité pour la détection de LA, d'où son nom de 'TCA sensibilisé'

Une première étape de dépistage est réalisée par le calcul du ratio APTT-SP Malade /Témoin.

Si ce dernier est >1.2 un test de mélange est indispensable afin d'exclure un éventuel déficit en facteurs. Ce test est réalisé par mélange volume à volume du plasma du malade « M » avec un plasma témoin « T » et le dosage du APTT-SP de ce mélange est alors réalisé pour calculer l'indice de Rosner (Équation 1).

Le test est négatif si cet indice est inférieur à 12.

Cependant si l'indice de Rosner est positif (supérieur à15), ou faiblement positif (12-15) un test de confirmation doit être réalisé.

$$\text{Indice de Rosner} = \frac{('APTT - SP' M + T - 'APTT - SP' T)}{('APTT - SP' M)} * 100$$

*Équation 2 : Calcul de l'indice de Rosner*

### 1.3.3.1.2 Temps de coagulation par le venin de vipère Russel dilué « dRVVT-screening- dRVVT-S »

Le DRVVT est un réactif provenant du venin de vipère Russel. Sa grande particularité est qu'il active directement le facteur X en Xa en présence de phospholipides et de calcium et par conséquent explore uniquement la voie commune de la cascade de la coagulation. Le mesure du DRVVT est réalisée par une méthode chronométrique détaillée dans 1.2.2.1.

Une première étape de dépistage est réalisée, le 'DRVVT Screen' qui est un calcul du ratio DRVVT malade (M)/ DRVVT témoin (T). Si ce ratio est supérieur à 1,20 la présence de LA ne peut être exclue. Au laboratoire d'hématologie du Chu de Caen le ratio a été adapté à la valeur de 1,10.

Ainsi une deuxième étape est réalisée, le 'DRVVT confirm' en utilisant cette fois une forte concentration en phospholipides permettant de saturer le milieu en phospholipides, et de combler les sites d'antigènes disponibles pour l'anticorps anti-phospholipides. Par conséquent, il reste suffisamment de phospholipides non liés à l'anticorps pour accélérer la formation de fibrine, réduisant ainsi le temps de réaction. Enfin le calcul d'un ratio normalisé est réalisé (Equation 3).

Si ce ratio est <1.16, il est négatif, s'il est supérieur à 1,16 on considère qu'il est positif. Cependant si la valeur est entre 1.16-1.2 un contrôle sera nécessaire.

$$\text{Ratio normalisé} = \frac{\text{ratio dRVVT} - S(M/T)}{\text{ratio dRVVT} - c(M/T)}$$

*Équation 3 : Ratio normalisé*

### 1.3.3.2 Test de confirmation : phospholipides dépendants SCT Silica Clotting Time

Le test de confirmation est réalisé si le test de mélange T+M pour l'APTT-SP est non corrigé (Indice de Rosner positif ou faiblement positif) et que le ratio dRVVT-S et dRVVT-C normalisé est négatif.

Le SCT « *Silice Clotting Time* - temps de coagulation avec silice », sa mesure est réalisée par une méthode chronométrique détaillée dans 1.2.2.1.

On va mesurer le ratio SCT Screen M/T, sans ajout de phospholipide, et le SCT - confirm riche en phospholipides pour calculer le ratio normalisé.

$$SCT \text{ normalisé} = \frac{\text{ratio SCT} - S (M/T)}{\text{ratio SCT} - c(M/T)}$$

*Équation 4 : calcul du ratio normalisé pour le SCT*

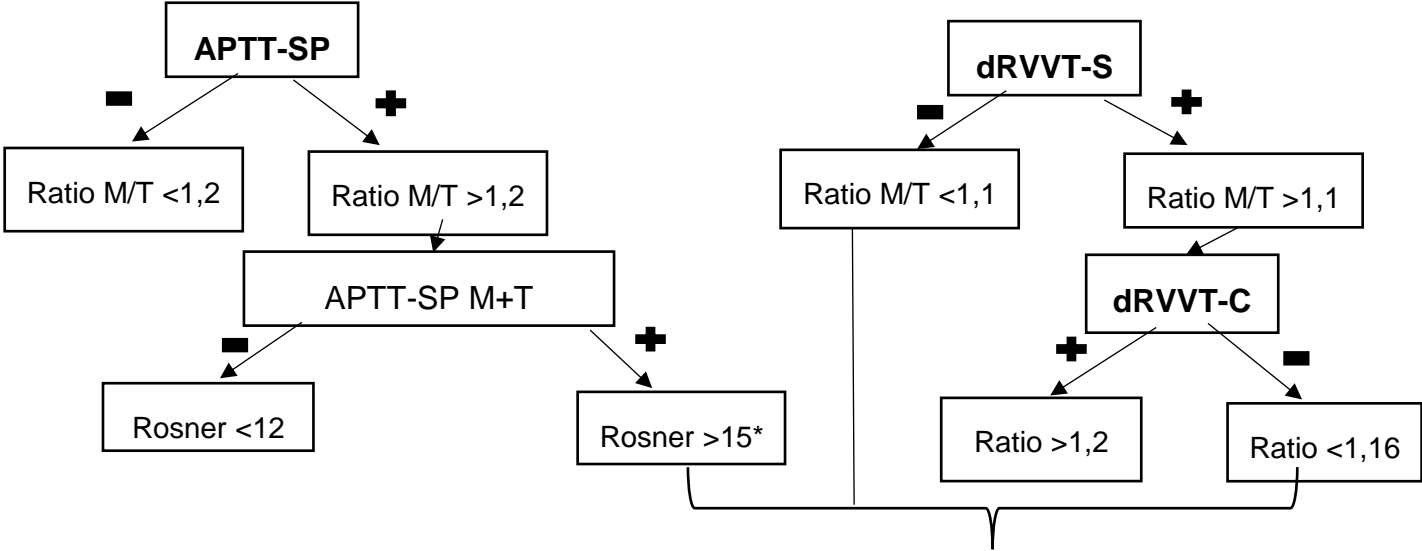
Si le ratio normalisé est >1.2 on estime que la recherche d'ACC est positive, s'il est <1.16 négatif, mais s'il est 1.16-1.2 on doit reconstrôler.

Un contrôle est nécessaire à 12 semaines d'intervalle du premier prélèvement positif pour affirmer le caractère chronique du LA et non sa présence de façon transitoire

**[Figure 11].**

**Recherche Anticoagulant Lupique :**

**Test de Dépistage : Pauvre en PL**



**Test de Confirmation : Riche en PL**

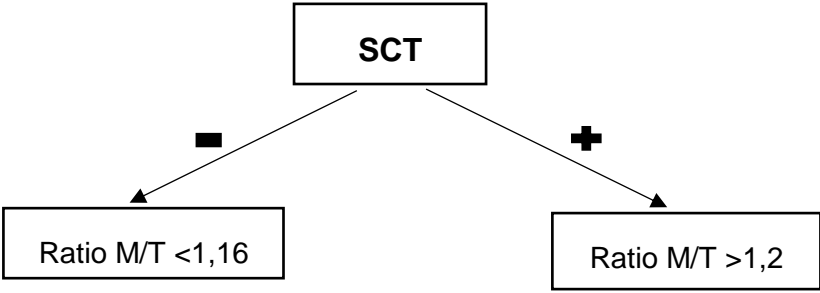


Figure 11 : Arbre décisionnel pour la recherche d'ACC (CHU de Caen) / \* ou faiblement positif



## 1.4 Les anticoagulants

### 1.4.1 Les traitements disponibles

Les traitements anticoagulants jouent un rôle prophylactique et curatif dans les maladies thromboemboliques veineuses (ex : embolie pulmonaire) et artérielles (ex : fibrillation atriale). Ils se divisent en deux catégories, selon la voie d'administration :

- La voie parentérale :
  - Héparine de haut poids moléculaire (HNF)
  - Héparine de bas poids moléculaire (HBPM)
  - Danaparoïde
  - Fondaparinux
  - Argatroban
- La voie orale :
  - Anti-vitamine K
  - Anticoagulants oraux directs : Anti-Xa et Anti-IIa [Figure 12]

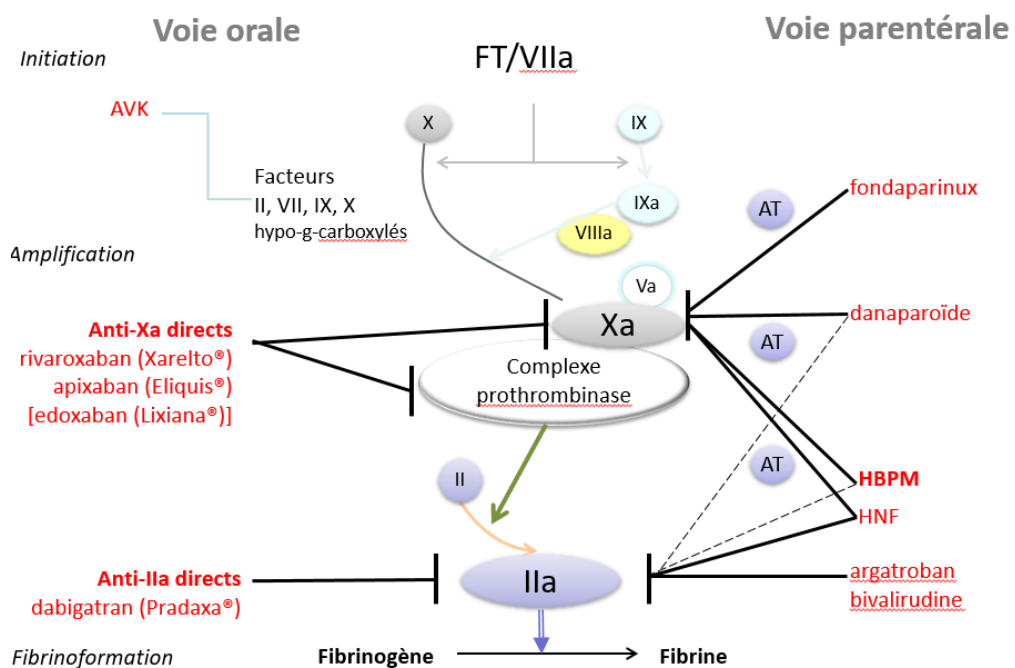


Figure 12: Mode d'action des anticoagulants (EMC)

## 1.4.2 L'héparine

### 1.4.2.1 Définition

L'héparine est le premier anticoagulant mis sur le marché, mucopolysaccharide sulfaté d'action immédiate et de synthèse naturelle, sauf pour le fondaparinux qui est synthétisé chimiquement, d'action immédiate.

La voie d'administration est parentérale, soit en sous cutané soit en intra veineux (34).

Le danaparoïde est un mélange de glycosaminoglycanes sulfatés de bas poids moléculaire, contenant du sulfate d'héparane, de dermatane, et de chondroïtine.

Leurs caractéristiques sont résumées dans le [Tableau 2].

	Poids moléculaire	Activité		Activité anti-IIa UI/ml
<b>Héparine de haut poids moléculaire</b>	5-30 <u>kDA</u>	<i>Anti-IIa et Xa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Héparine calcique SC</i></li> <li>➤ <i>Héparine sodique IV</i></li> </ul>	1/
<b>Héparine de bas poids moléculaire</b>	<8kDA	<i>Anti Xa +++ et anti-IIa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i><u>Daltéparine SC</u></i></li> <li>➤ <i><u>Enoxaparine SC</u></i></li> <li>➤ <i>Nadroparine SC</i></li> <li>➤ <i><u>Tinzaparine SC</u></i></li> </ul>	0,4 0,2 0,28 0,5
<b><u>Danaparoides</u></b>		<i>Anti Xa</i>	SC	>20
<b>Fondaparinux</b>		<i>Anti Xa</i>	SC	0

Tableau 2 : Description des héparines. SC : Sous -cutané/ IV : intra-veineux / kDA : Kilo-Dalton (29)

### 1.4.2.2 Mécanisme d'action

La fixation de l'héparine sur l'antithrombine potentialise son effet (X1000), le site de liaison est présent dans toutes les molécules, et composé d'un enchainement de cinq sucres « pentasaccharide », de ce fait la concentration de son cofacteur « antithrombine » est importante pour assurer l'effet de l'héparine.

L'héparine liée à l'antithrombine inhibe dans un premier temps le facteur Xa, puis en fonction de la longueur de la chaîne d'héparine et de sa concentration, le complexe aura un effet anti-IIa (35).

Comme on peut le voir sur la [Figure 13], l'Héparine Non Fractionnée (HNF) a une chaîne penta saccharidique plus longue lui permettant d'avoir une activité anti-Xa et anti-IIa équivalente.

En revanche l'Héparine de Bas Poids Moléculaire (HBPM) a un rapport anti-Xa/ anti-IIa >1 car sa chaîne pentasaccharidique est courte. En fonction de l'HBPM le rapport n'est pas le même, par exemple pour la tinzaparine (Innohep ®) la biodisponibilité et l'action sont proches de celle des HNF (36).

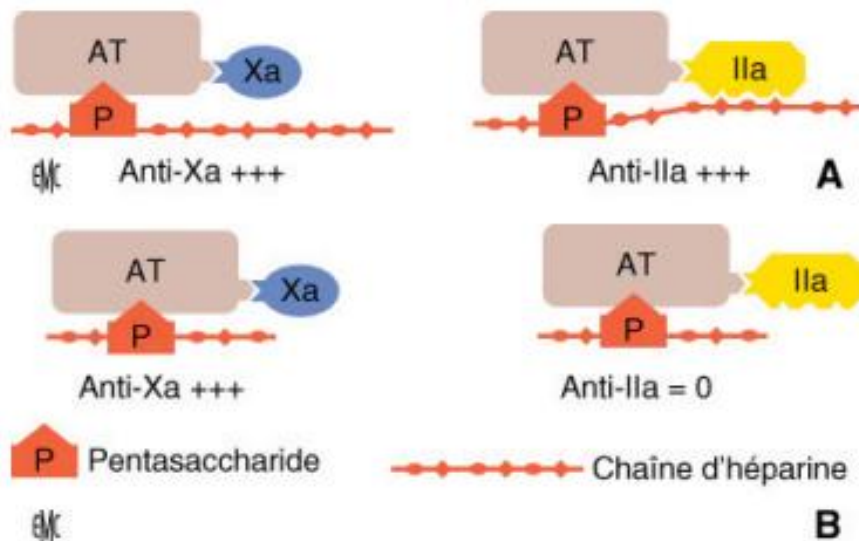


Figure 13 : Activité des chaînes d'héparine A : pour l'HNF et B pour HBPM (EMC : surveillance des traitements anticoagulants). AT : Antithrombine

### 1.4.2.3 Pharmacocinétique :

L'utilisation au cours de la grossesse et de l'allaitement sont possibles.  
Toutes les propriétés pharmacocinétiques sont résumées dans le [Tableau 3].

	HNF	HBPM	Danaparoiide	Fondaparinux
<b>Élimination</b>	Système réticulo- endothélial Rénale	Rénale	Rénale	Rénale
<b>T<sub>1/2</sub></b>	1-2h	3-6h	25h	15h
<b>Liaison aux protéines plasmatiques</b>	+++	+	-	-
<b>Prescription</b>	Hospitalière	Ambulatoire	Hospitalière	Hospitalière
<b>Biodisponibilité</b>	30-50%	90%	95%	100%
<b>Surveillance</b>	Quotidienne Activité anti-Xa Numération plaquettaire	Si insuffisant rénale sévère : anti-Xa	Si insuffisant rénale sévère : anti- Xa	Aucune
<b>Contre-indication</b>	ATCD de TIH	Insuffisant rénale	Insuffisant rénale	
<b>Effets indésirables</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hémorragie</li> <li>➤ TIH +++</li> <li>➤ Ostéoporose</li> </ul>	TIH	Pas de TIH	Pas de TIH
<b>Antidote</b>	Oui	Oui	-	-

Tableau 3 : Pharmacocinétique. TIH : Thrombopénie Induite à l'héparine (EMC : surveillance des traitements anticoagulants), ATCD = antécédent

### 1.4.2.4 Réversion :

Lors d'un surdosage en héparine avec signes d'hémorragies on utilise du sulfate de protamine : 1000 UAH neutralisent environ 1000 unités d'héparine, utilisation efficace sur les HNF (37).

### 1.4.2.5 Indication :

Les indications sont résumées dans le [Tableau 4]

	Héparine sodique	CALCIPARINE® Héparine calcique	LOVENOX® Enoxaparine	INNOHEP® Tinzaparine	FRAXIPARINE® Nadroparine	FRAGMINE® Daltéparine	ARIXTRA® Fondaparinux
MTEV milieu chirurgical		X					X
MTEV		X					X
CEC	X						
TVP, phase aiguë	X	X	X	X	X		X
TVP, traitement prolongé			X	X	X		
EP, phase aiguë	X	X	X	X			X
EP, traitement prolongé			X	X			
TV superficielle							X
Syndrome coronarien aigu	X	X	X		X		X
Fibrillation atriale	X						

Le danaparoiïde et l'argatroban sont indiqués, dans le cadre de leurs AMM, en alternative thérapeutique lors de survenue de thrombopénie induite à l'héparine aiguë.

*Tableau 4 : Indications des héparinoïdes selon ANSM 2018. MTEV : maladie thromboembolique veineuse, TVP : thrombose veine profonde, EP : embolie pulmonaire, CEC : circulation extracorporelle*

### **1.4.3 Anti-vitamines K**

#### **1.4.3.1 Définition**

Les antivitamines-K (AVK) sont des anticoagulants à marge thérapeutique étroite avec une grande variabilité inter et intra-individuelle de la réponse au traitement.

En France deux dérivés sont commercialisés :

➤ Les dérivés coumariniques :

Warfarine (Coumadine®), la molécule référence des essais cliniques internationaux) et l'acénocoumarol (Sintrom® et Minisintrom®),

➤ Les dérivés de l'indanedione

La fluindione (Préviscan®)

Les AVK représentent la première cause iatrogène, responsables de 17 000 hospitalisations/an et de plus de 4 000 décès en 2006-2007(38).

Afin de limiter les accidents iatrogènes la surveillance de l'International normalized ratio (INR) est nécessaire et l'identification de facteurs responsables de la variabilité de la réponse au traitement sont à maîtriser par les prescripteurs et les patients.

#### **1.4.3.2 Mécanisme d'action**

La vitamine K est une vitamine liposoluble apportée par l'alimentation d'une part, et synthétisée par notre système digestif d'autre part, sous une forme oxydée en forme d'époxyde. Elle intervient au stade post-translationnelle dans la synthèse des facteurs de la coagulation vitamine-K dépendants, les facteurs II, VII, IX et X et les inhibiteurs, la protéine C et la protéine S. Cette étape est indispensable à leur activité. La forme réduite de la vitamine K, sous sa forme hydroquinone, agit comme cofacteur dans la gamma carboxylation d'acide glutamique « Glu » de l'extrémité N-terminale de la chaîne glycoprotéique, en acide gammacarboxyglutamique « Gla », et permet ainsi la fixation des facteurs de coagulation sur la surface anionique des phospholipidiques via l'ion calcique.

De ce fait l'absence de vitamine K, comme dans les carences vitaminiques par défaut d'apport, engendre un ralentissement de la cascade de coagulation

Son rôle n'est possible que sous une forme réduite, obtenue par réduction de la vitamine K à l'aide de deux enzymes : la vitamine K oxydo-réductase « VKORC1 » et la vitamine K réductase « VKOR ».

Les AVK inhibent le cycle de régénération de la vitamine K en inhibant l'activité des deux enzymes hépatiques, permettant de recycler la vitamine K en vitamine K quinone grâce à la sous-unité C1 de VKOR (VKORC1) puis en vitamine K réduite sous l'action VKOR [Figure 14].

La cible pharmacologique des antivitamine-K est VKORC1, et cette inhibition induit une hypocoagulabilité (39).

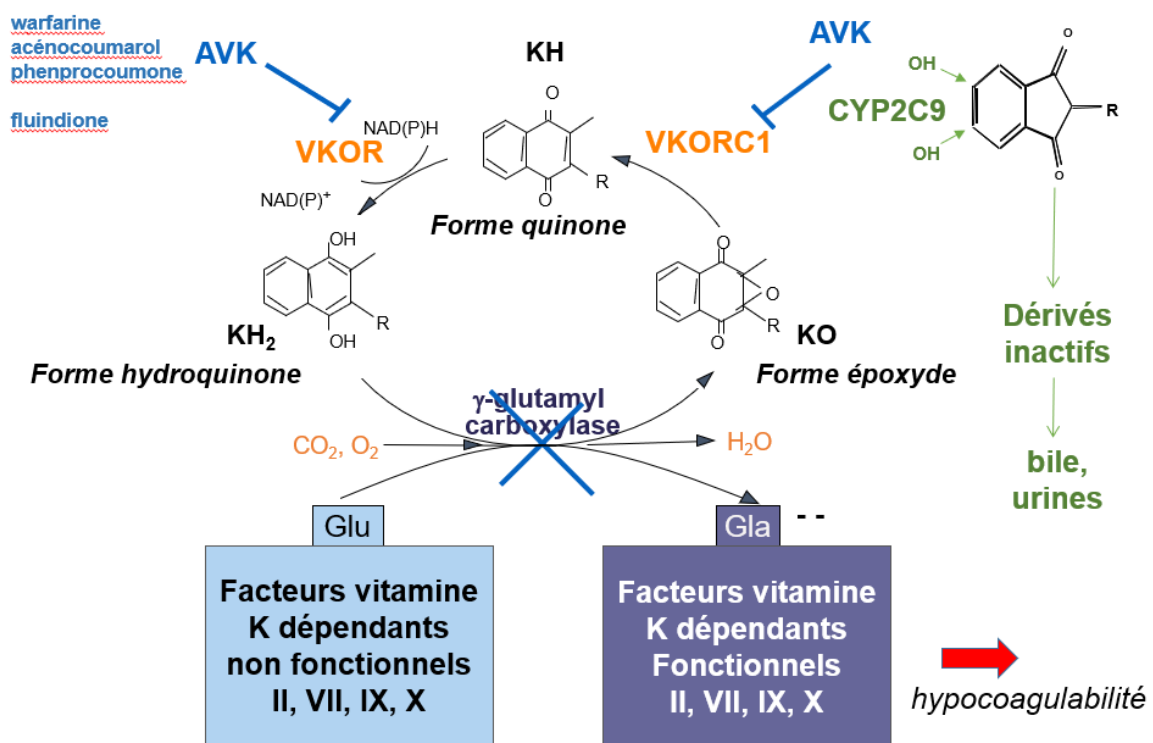


Figure 14: Mécanisme d'action des AVK(39)

### 1.4.3.3 Pharmacocinétique

Les AVK sont fortement liés aux protéines plasmatiques mais seule la forme libre est active, quand la concentration de la forme libre baisse, une partie de la forme liée aux protéines plasmatiques s'en dissocie et devient active d'où la variabilité inter-individuelle et l'effet prolongé des AVK (40) [Tableau 5].

	<b>Warfarine, Coumadine®</b>	<b>Fluindione, Préviscan®</b>	<b>AcénocoumarolSI NTROM®</b>
<b>T ½</b>	➤ 35-45 h	➤ 31 h	➤ 9 h
<b>Métabolisme hépatique</b>	➤ CYP2C9 +++	➤ CYP2C9 + ➤ CYP1A2 ++ ➤ CYP3A4 +++	➤ CYP2C9 +++
Durée d'action après arrêt d'AVK	➤ 4 J	➤ 2-4 J	➤ 2-3 J
Liaison aux pp	95-97%		
Antidote	Vitamine K per OS ou IM		
Élimination	Rénale et hépatique		

Tableau 5 : Pharmacocinétique des AVK (39)

Parmi les variabilités modifiant la concentration en AVK il est retrouvé :

- L'albuminémie abaissée (personnes dénutris),
- Les médicaments déplaçant la liaison à l'albumine « effet potentialisateur »
- Les médicaments inhibant la conjugaison des AVK : CYP 2C9 ou les métaboliseurs lents
- Les facteurs génétiques SNP -1639G>A affectants les gènes codants VKORC1



L'INR « rapport normalisé international » permet de déterminer l'efficacité de l'anticoagulation par AVK, sa surveillance s'effectue d'abord à l'instauration du traitement avec un contrôle toutes les 48 à 72H jusqu'à obtention de l'INR dans la zone thérapeutique confirmé à deux reprises à 24H d'intervalle (41) **[Figure 15]**.

$$\text{INR} = \frac{\text{Temps de Quick du malade}}{\text{Temps de Quick du témoin}} \text{ ISI}$$

Figure 15: Calcul de l'INR

ISI= Index de sensibilité Internationale

Temps de Quick témoin+ moyenne géométrique de 20 sujets normaux (CLSI)

Une fois à l'équilibre et en l'absence de changement posologique, la mesure de l'INR sera espacée jusqu'à un minimum d'une fois par mois (42) **[Figure 16]**.

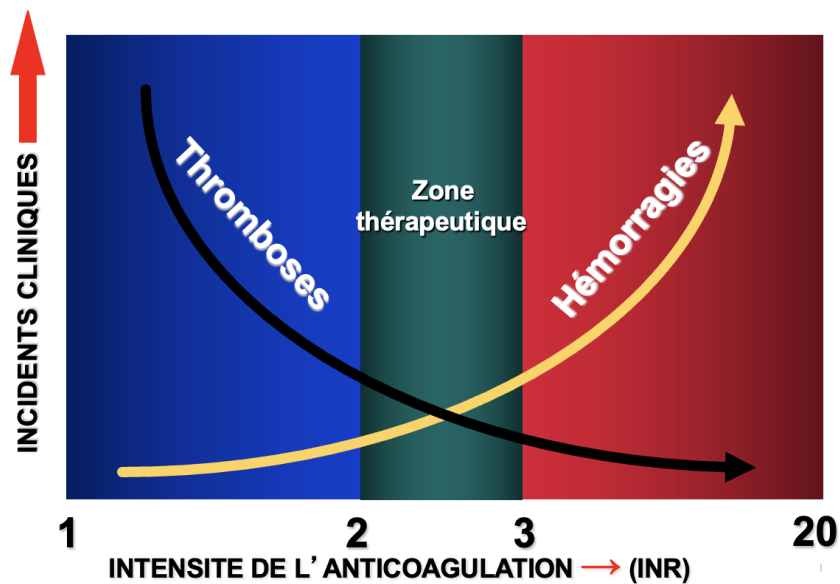


Figure 16: Interprétation de l'INR sous AVK

#### **1.4.3.4 Indication**

Plus de la moitié des indications relèvent de la cardiologie :

- Cardiopathies emboligènes (fibrillation atriale, flutter)
- Prothèses valvulaires et mécaniques
- Infarctus du myocarde compliqués (thrombus mural, dysfonction VG sévère, dyskinésie emboligène) (en relais de l'héparine)
- Traitement des thromboses veineuses profondes et de l'embolie pulmonaire ainsi que la prévention de leurs récives (en relais de l'héparine)
- Traitement des évènements thrombotiques chez les patients ayant un syndrome des antiphospholipides (SAPL)

Le traitement est souvent de longue durée voir à vie.

Depuis 2018, leur utilisation est moindre avec une part de marché croissante des AOD (43).

### **1.4.4 Anticoagulants oraux directs**

#### **1.4.4.1 Définition**

Pendant plus de 60 ans le schéma de référence d'une prévention thromboembolique veineuse fut l'héparine suivie d'un relais par AVK, mais cette pratique a montré beaucoup de limites dans : Les complication hémorragiques, les interférences médicamenteuses et le contrôle biologique.

Ceci a conduit au développement de molécules ciblant directement des facteurs de coagulations activés : les anticoagulants oraux. Quatre AOD ont l'AMM en Europe pour leur action directe et sélective :

- Anti-IIa les « gatrans » : Dabigatran Etextilate (Pradaxa®)
- Anti-Xa: les « xabans » : Rivaroxaban ( Xarelto®) , Apixaban (Eliquis®) et Edoxaban (Lixiana®)

L'intérêt de leur utilisation réside dans leurs :

- Rapidité d'action
- Efficacité équivalente aux autres thérapeutiques déjà introduites
- La prise orale

- Pas d'ajustement posologique
- Marge thérapeutique large
- Bonne prédictibilité d'effet
- Absence de contrôle biologique (sauf situation particulière).
- Réductions des hémorragies intracrâniennes par rapport aux AVK(44)

#### **1.4.4.2 Mécanisme d'action**

Les AOD sont synthétisés chimiquement et présentent un faible poids moléculaire. Le Dabigatran etexilate, prodrogue est hydrolysée en dabigatran actif, sous l'action d'estérases et de carboxyl-estérases. Il exerce une activité inhibitrice directe, compétitive et puissante sur facteur IIa libre ou lié au caillot.

Les xabans, ne nécessitent pas de métabolisme hépatique pour leur activation, ce sont des inhibiteurs directs et puissants du facteur Xa libre ou lié au sein du complexe prothrombinase.

### 1.4.4.3 Pharmacocinétique

Les AOD sont rapidement absorbés et la concentration maximale est obtenue en 1 à 4h, ils sont tous substrats des P-gp et donc soumis à de probables interactions médicamenteuses (45) [Figure 17].

	Dabigatran Etexilate (Pradaxa®)	Rivaroxaban (Xarelto®)	Apixaban (Eliquis®)	Edoxaban (Lixiana®)
Prodrogue	Oui	Non	Non	Non
Cible	Anti-IIa direct et sélectif	Anti-Xa direct et sélectif	Anti-Xa direct et sélectif	Anti-Xa direct et sélectif
Biodisponibilité	6,5%	80%	50%	62%
Pic	1-3 h	0,5-4 h	1-3 h	1-2 h
T <sub>1/2</sub>	7-17 h	7-11 h	8-15 h	10-14 h
Liaison aux PP	35%	90%	85%	55%
Métabolisme	NON	CYP3A4 ET CYP2J2	CYP3A4 ET CYP1A1/2	CYP3A4 ET CYP1A1/2
Transport	P-gP	P-gP	P-gP	P-gP
Élimination	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 80% rénale inchangée</li> <li>➤ 20 % glucoronoconjuguée dans les fèces</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 1/3rénale inchangée</li> <li>➤ 1/3rénale métabolisé</li> <li>➤ 1/3 fèces</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 25% rénale inchangée</li> <li>➤ 75 % fèces inchangée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 33 % rénale inchangée</li> <li>➤ 66 % excrétion biliaire le métabolisé</li> </ul>
Antidote	➤ <b>Idarucizumab</b>	Oui	Oui	Oui

Figure 17 : Pharmacocinétique des AOD (ANSM 2016)

#### 1.4.4.4 Réversion

L'utilisation des antidotes est requise pour une urgence chirurgicale ou en cas de saignement menaçant le pronostic vital ou incontrôlé. L'antidote des anti-Xa est l'Andexanet Alfa (Protola), c'est un Facteur Xa recombinant muté [Figure 18], non fonctionnel dépourvu du domaine-Gla et de l'activité catalytique (mutation de la serine protéase). Il a une affinité élevée pour l'anti-Xa directs (46).

Administré en bolus IV suivi d'une perfusion, l'un des effets indésirables est dû à sa liaison au TFPI entraînant un risque thrombotique élevé (47).

Cet antidote a reçu l'AMM aux USA et l'EMA en 2019. Cependant à ce jour il n'est toujours pas autorisé en France. A sa place on utilise hors AMM, des concentrés de complexes prothrombiniques activés ou non (48).

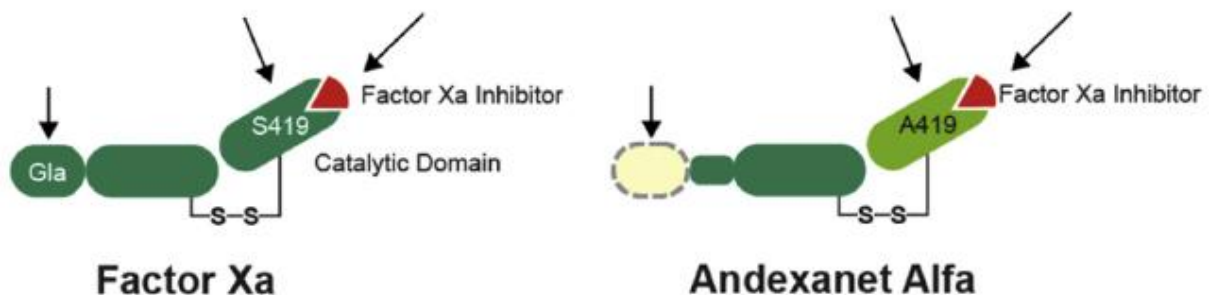


Figure 18 : Andexanate (40)

- L'antidote des anti-IIa :

Le Praxbind est l'agent de réversion spécifique du dabigatran, administré par voie IV et ayant reçu l'AMM en France. C'est un fragment d'anticorps monoclonal humanisé ayant une forte affinité au dabigatran, en cas d'indisponibilité, des concentrés de complexes prothrombiniques activés ou non peuvent être utilisés (49) [Figure 19]

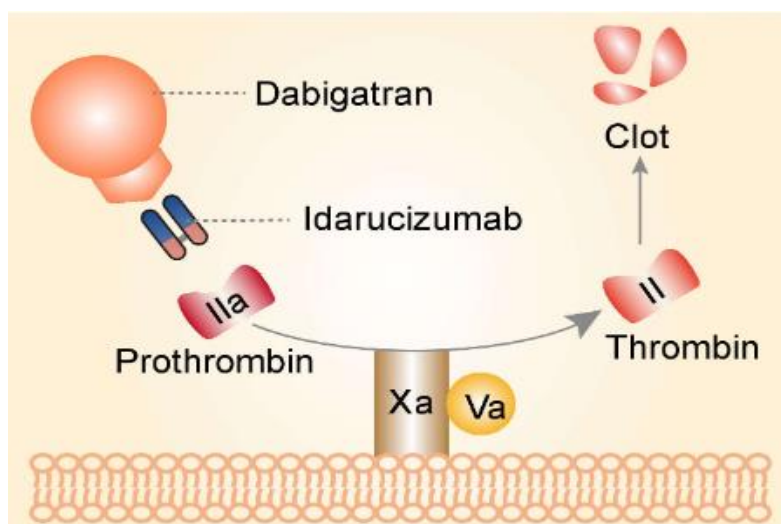


Figure 19: Mécanisme d'action de l'idarucizumab (42)

#### 1.4.4.5 Indication

Les AOD possèdent une AMM pour :

- La prévention de la maladie thromboembolique veineuse (MTEV) en chirurgie orthopédique (prothèse totale de hanche ou de genou) (50).
- La prévention de l'accident vasculaire cérébral (AVC) et de l'embolie systémique chez les patients avec FA non valvulaire (51).
- Le traitement de la MTEV (thromboses veineuses profondes et embolie pulmonaire) (52).
- Le Rivaroxaban possède une AMM pour la prévention des événements thrombotiques post-syndrôme coronarien aigu pour une durée de 1-2ans.
- Prévention secondaire des événements athérothrombotiques

Hors AMM en France :

- Prévention des événements athérothrombotiques suite à un SCA
- Maladie coronarienne ou vasculaire périphérique stable

#### **1.4.4.6 Interférences des anticoagulants oraux directs avec les tests d'hémostase**

##### **1.4.4.6.1 Examens de routine et spécialisés**

L'utilisation des AOD affectent la plupart des tests/dosages d'hémostase. En fonction de la nature de l'AOD, de sa posologie, et du délai par rapport à sa dernière prise, le degré de l'interférence diffère et du réactif utilisé.

Tous les tests chromométriques sont impactés.

➤ L'anti-IIa :

Allonge le TCA majoritairement ainsi que le TQ. Contrairement aux Xabans il allonge le temps de thrombine et quand ce temps est normal la prise de dabigatran est exclue (53).

Le taux de fibrinogène peut être, à forte posologie, sous-estimé selon le réactif utilisé.

➤ Les anti-Xa :

L'allongement du TQ est plus important que celui du TCA, et le retentissement diffère en fonction des l'anti-Xa utilisés.

Le temps de Thrombine et le dosage fibrinogène par méthode de Clauss ne sont pas impactés (54) **[Tableau 6]** .

Pour la recherche d'ACC (qui est une mesure chromométrique) les AOD rendent un résultat faussement positif. Néanmoins les recherches faites en immunologie pour les anticorps anticardiolipine et anti-bêta2GPI sont interprétables avec la prise d'AOD, ainsi que les tests PC chromogéniques et PS libre (55).

Les tests génétiques ne sont pas modifiés par la prise d'AOD.

Test	Sensibilité à l'apixaban	Sensibilité au rivaroxaban	Dabigatran
TP	= ou ↓ <sup>*a</sup>	↓ ++ ou +++ <sup>*a</sup>	↓ ++ ou +++ <sup>*a</sup>
TCA	= ou ↑ <sup>a</sup>	↑+ à +++ <sup>a</sup>	↑+ à +++ <sup>a</sup>
TT et/fibrinogène	Généralement non affecté		↑+++ /= ou ↓ <sup>*a</sup>
Dosages des facteurs	Les tests de facteurs basés sur le TCA, tels que le FVIII et le FIX, ont montré une sous-estimation croissante des résultats à mesure que les niveaux de médicaments augmentaient, en particulier avec le rivaroxaban**		= ou ↓ <sup>*a</sup>
dRVVT	Montré un prolongement presque linéaire en fonction de la concentration d'apixaban ou de rivaroxaban. Anticoagulant Lupique (LA) faussement positif.		
PC et PS activité	↑+ à +++ <sup>a</sup>		
AT***	Les tests basés sur les anti-Xa sont affectés, mais les tests basés sur les anti-IIa ne sont pas affectés par l'apixaban ou le rivaroxaban.		Les tests basés sur les anti-IIa sont affectés, mais les tests basés sur les anti-Xa ne sont pas affectés par l'apixaban ou le rivaroxaban.
Activité FXIII	Généralement non affecté		↓
<p>AT : antithrombine ; TCA : temps de céphaline activée ; dRVVT : Temps de venin de vipère Russell dilué ; PC : protéine C ; PS : protéine S ; PT : temps de Quick ; TT : temps de thrombine.</p> <p>*TP normal ne peut pas exclure la prise d'AOD</p> <p>**Une dilution croissante du plasma a entraîné une réduction de l'effet, ce qui correspond à un effet « inhibiteur » non spécifique.</p> <p>*** Au laboratoire du CHU de Caen dosage chromogénique basé sur la quantification de l'activité Anti-Xa. ↑ : allongement/ ↓ : diminution/ = : pas d'influence <sup>a</sup> : en fonction des réactifs utilisés et concentrations en anticoagulant</p>			

Tableau 6 : Interférence des AOD sur les tests d'hémostase (55)



## 1.5 Intérêt du charbon

Les AOD interfèrent dans de nombreux tests d'hémostase (voir ci-dessus) rendant leur interprétation difficile.

Le bilan biologique de thrombose doit être réalisé à distance des AOD, mais cela n'écarte pas le risque de survenue de thrombose, donc le choix de la méthodologie de diagnostic est à définir en fonction du rapport bénéfice risque lié au patient.

Les moyens pour s'affranchir de l'effets des AOD sont :

- Un arrêt des AOD au moins 72h.
- Une dilution importante, pour lever l'interférence de l'AOD sur la mesure des facteurs, mais interférence résiduelle potentielle de l'AOD malgré la dilution.
- Une élimination in vitro par charbon actif, qui est électronégatif, des AOD qui sont eux électropositifs (56).

### 1.5.1 Définition

Le charbon actif est un produit carboné avec une surface interne importante et de structure poreuse. Cet agent électronégatif a comme principale propriété l'adsorption [Figure 20].

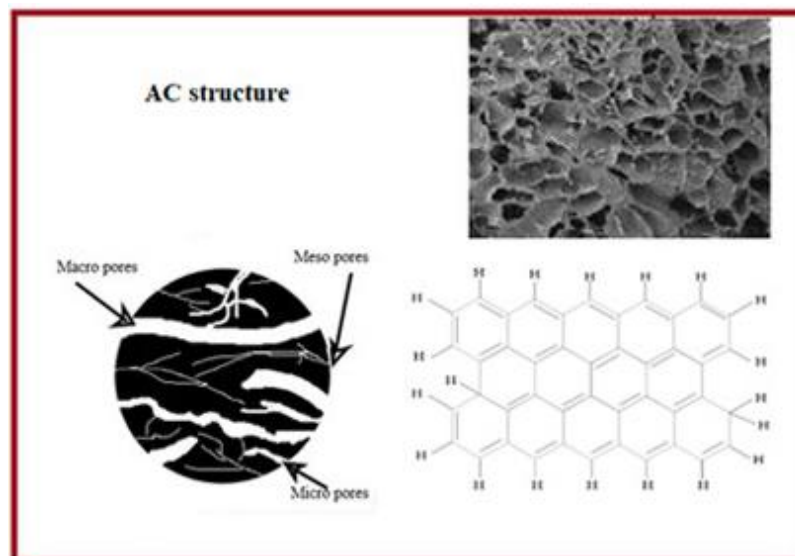


Figure 20 : structure du charbon activé .(37)

Ce phénomène d'adsorption permet de piéger des molécules liquides ou gazeuses via les pores à sa surface dans plusieurs situations :

- Lors d'intoxication médicamenteuse
- Pour les maux d'estomac
- Assainir des eaux.

### 1.5.2 Choix des pastilles de charbon

Dans la littérature on retrouve trois types d'agents neutralisants les AOD :

#### 1.5.2.1 DOAC Stop™: (DS, Haematex Research, Hornsby, Australia)

DOAC Stop™ est fabriqué en France [Annexe 1 : Fiche technique DOAC-Stop™]

Forme de mini-comprimés destinés à adsorber les AOD (AC : Activated Carbon : Charbon activé)(57) [Figure 21] .



Figure 21 : DOAC-Stop™ (57)

#### Protocole traitement par DOAC-Stop™

Un mini-comprimé de DOAC-Stop™ (5 mg) est ajouté à un volume de 1 ml de plasma d'essai dans des tubes microfuges en polyéthylène.

Les tubes sont homogénéisés doucement sur une plate-forme à bascule pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 5 000 g dans une centrifugeuse Sigma Laborzentrifugen™ 1-15R Sigma™.

Le surnageant est décanté dans un autre tube pour le dosage des paramètres de coagulation.

### 1.5.2.2 DOAC Remove

Du même fabricant basée en Suisse. Le DOAC Remove (DR, 5-Diagnostics, Heuberg, Switzerland) est présenté sous forme de mini-comprimés. Le protocole et les résultats sont significativement comparables au DOAC Stop™ (58).

### 1.5.2.3 DP-Filter®

Le DP-filtre® est un dispositif de filtration des plasmas citratés. Il a pour rôle d'éliminer les anticoagulants oraux directs (AOD) à des concentrations de 0 à 1 000 ng / ml. Ce dernier n'est pas utilisé en routine mais uniquement à des fins de recherche [Figure 22] (59).

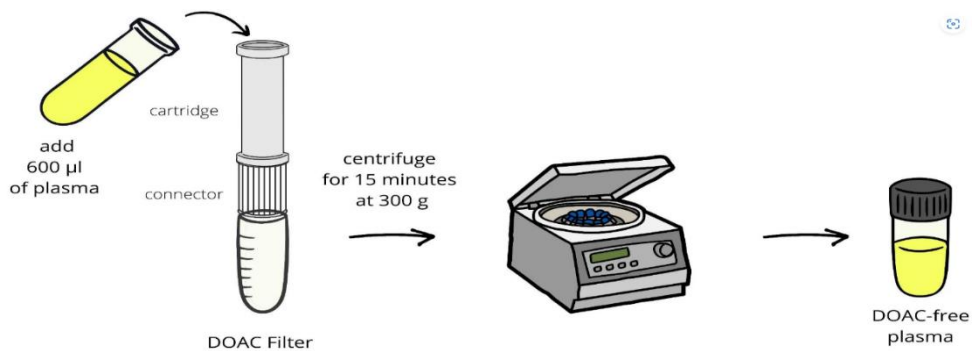


Figure 22 : Procédure d'utilisation du DP-filter®(40)

## 2 MATERIELS ET METHODES

### 2.1 Automates/outils de dosage

#### 2.1.1 Hémostase de routine

L'hémostase de routine, au CHU de Caen, est réalisé sur l'Atellica® COAG 360 (Siemens) [Tableau 7] (60).

<b>Automate</b>	Atellica ® COAG 360 (Siemens) [Figure 23]
<b>Analyses réalisées</b>	TP/INR, TCA, Fibrinogène, Facteurs : V, VIII, Antithrombine
<b>Réactifs utilisés</b>	Innovin (TP), Actin FS (TCA), FV Deficient, FVIII Deficient, INNOVANCE Heparin, INNOVANCE Antithrombine

Tableau 7 : Analyses réalisées et réactifs utilisés pour Atellica ® COAG 360



Figure 23: Atellica ® COAG 360 (siemens) (59)

#### 2.1.2 Hémostase spécialisée

L'hémostase spécialisée, au CHU de Caen, est réalisée principalement sur l'ACL-TOP® 970 (Werfen).

<b>Automate</b>	<b>ACL-TOP® 970 (Werfen)</b>
<b>Analyses réalisées :</b>	ACC : APTT-SP, dRVVT-S, dRVVT-C PC Activité PS Activité
<b>Réactifs utilisés :</b>	APTT-SP HemosIL® dRVVT-Screen HemosIL® dRVVT Confirm HemosIL® ProClot HemosIL® Protein S Activity HemosIL®

*Tableau 8 : Analyses réalisées et réactifs utilisés pour l'ACL-TOP®970 (Werfen) [Figure 23]*



*Figure 24 : ACL-TOP® 970 (Werfen) (image prise au laboratoire du CHU de Caen)*

## 2.2 Méthodologie de dosage

### 2.2.1 Préparation des solutions de travail

Les matières premières de l'apixaban et de rivaroxaban ont été achetées auprès d'AlsaChim (Illkirch Graffenstaden) sous forme de poudre à diluer. Les solutions mères à la concentration de 1mg/ml d'apixaban et de rivaroxaban ont été obtenues par dissolution dans du diméthylsulfoxyde « DMSO ».

Les solutions mères ont été aliquotées dans des microtubes à eppendorf avec un volume total de 100µl et congelées à -80°C. 10µl de DMSO seul ont été congelées dans les mêmes conditions.

Au début des tests, la solution mère obtenue avec chaque principe actif d'AOD a été décongelée, diluée successivement avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) sans Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, pour obtenir des solutions intermédiaires à 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml et 2.5 µg/ml.

Un volume de 10µl des solutions intermédiaires a été dilué dans le pool de plasma normal (CRYOcheck™) pour obtenir nos solutions de travail concentrées à 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml et 500 ng/ml **[Figure 25]**.

Le même lot de pool de plasma normal a été décongelé, chauffés à 37 ° C au bain-marie (PROLABO, STABBITHERM) pendant 10 min avant utilisation.

La concentration de DMSO dans le plasma était ≤ 0,01 % (v/v) dans les solutions finales de PNP (Pool Normal de Plasma).

### 2.2.2 Protocole

Un volume 100µl de DMSO seul a été congelé dans les mêmes conditions que les solutions mères.

Au début des tests la solution de DMSO a été décongelée puis ajoutée, volume de 10µL, à un plasma sans AOD pour s'affranchir d'une possible interférence du DMSO sur nos tests.

Un plasma normal traité qu'avec du charbon a été utilisé pour interpréter l'influence du charbon seul sur les paramètres d'hémostase.

Un plasma normal sans traitement par AOD a été dosé parallèlement et qui servira de témoin pour les différents tests [Figure 26].

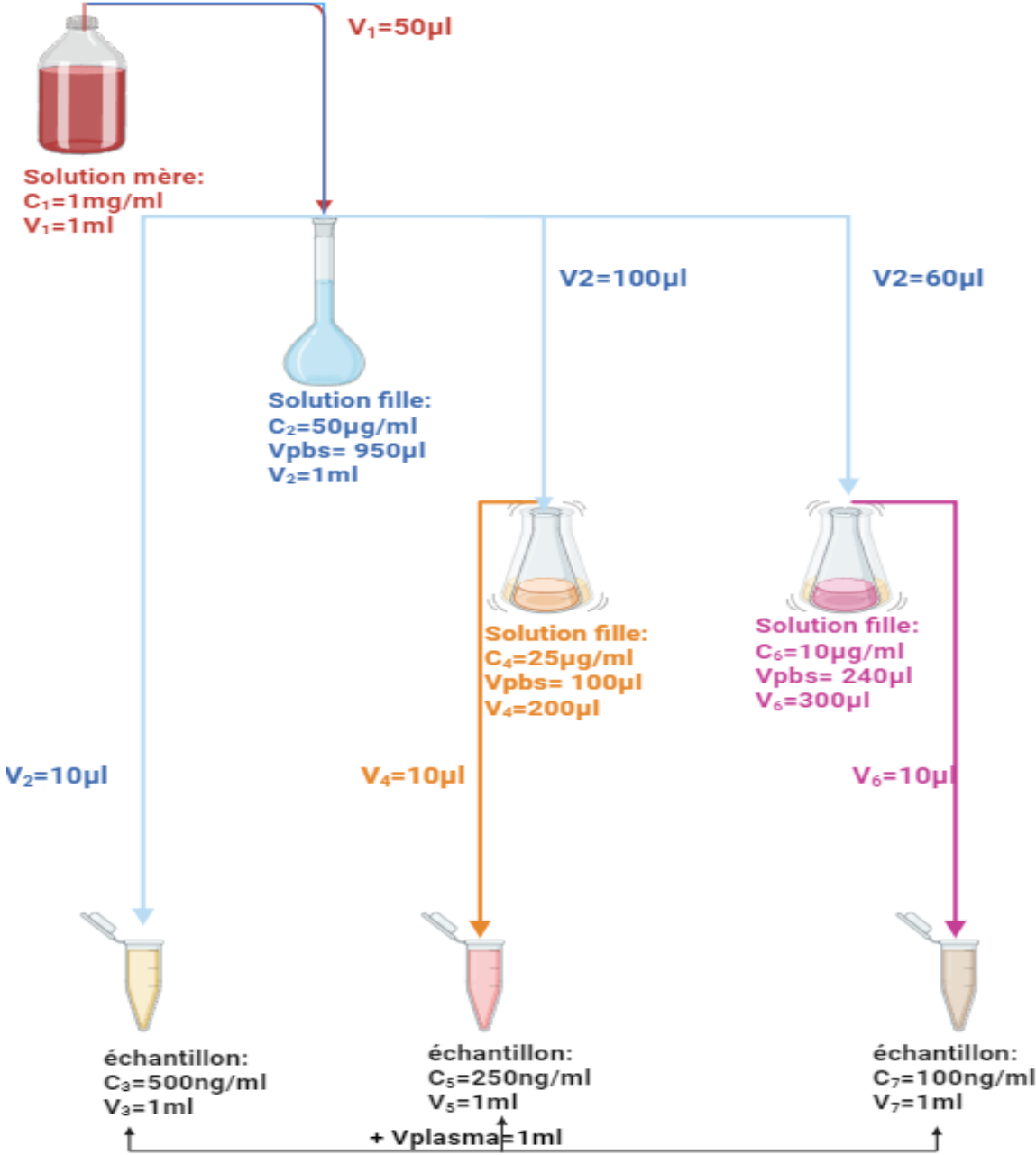


Figure 25 : Dilution à partir de la solution mère et préparation de solution de travail à : 500, 250, 100 ng/ml. V : volume / C : concentration

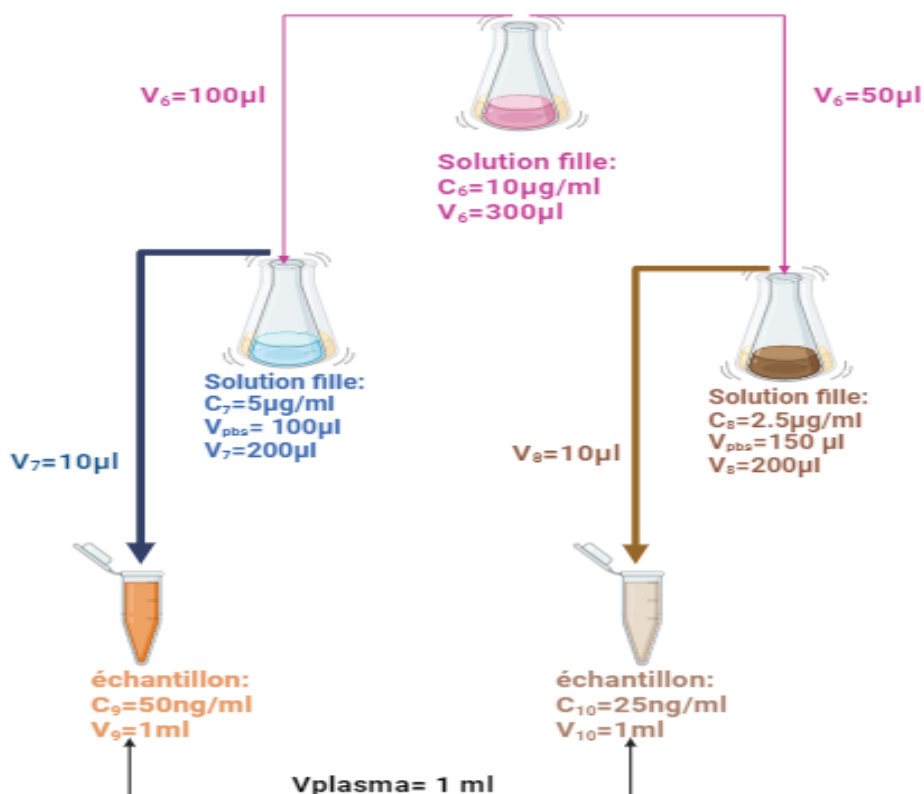


Figure 26 : Préparation de solution de travail à : 50, 25 ng/ml

### 2.2.3 Préparation des échantillons

Un total de deux séries de 26 échantillons de plasma a été utilisé. Dans chaque série une moitié a été traitée avec l'AOD et l'autre moitié avec à la fois l'AOD et du DOAC-Stop™.

Les échantillons sans DOAC-Stop™ étaient préparés de la façon suivante :

- 6 échantillons de plasma normaux préparés avec des concentrations de 500, 250, 100, 50, 25 ng/ml de rivaroxaban et un dernier échantillon avec seulement du DMSO.
- 6 échantillons de plasma normaux préparés avec des concentrations de 500, 250, 100, 50, 25 ng/ml d'apixaban et un dernier échantillon avec seulement du DMSO.
- Un échantillon témoin.

Ces échantillons étaient testés directement après préparation sur les tests d'hémostases définis dans le paragraphe suivant.

Les échantillons avec DOAC-Stop™ étaient préparés de la façon suivante :



- 6 échantillons de plasma normaux préparés avec des concentrations de 500, 250, 100, 50, 25 ng/ml de rivaroxaban et avec du DOAC-Stop™ et un dernier échantillon avec du DMSO et avec DOAC-Stop™.
- 6 échantillons de plasma normaux préparés avec des concentrations de 500, 250, 100, 50, 25 ng/ml d'apixaban et un dernier échantillon avec du DMSO et DOAC-Stop™.
- Un échantillon témoin + DOAC-Stop™.

Les échantillons étaient testés directement après préparations pour s'assurer de leur bonne concentration en AOD et sont conformes aux lignes directrices publiées qui recommandent désormais les tests anti-Xa aux fins de mesure des médicaments(61). Puis le DOAC-Stop™ y était ajouté selon le protocole défini au chapitre 0. Pour les concentrations supérieures à 350 ng/ml (qui correspond à la limite supérieure de la courbe standard de calibration) une étape de pré-dilution de l'échantillon au 1/3 a permis de fournir une valeur précise de la concentration de l'échantillon pour l'AOD correspondant. Une limite de quantification était également présente à de faibles concentrations de médicaments (<20 ng/ml).

L'ensemble des tests d'hémostase définis dans le paragraphe suivant étaient alors réalisés

L'ensemble de ses préparations a été réalisé une seconde fois sur une nouvelle série de 26 échantillons à quelques jours d'écart pour s'assurer de la reproductibilité de la manipulation.

Afin d'assurer une bonne reproductibilité et répétabilité, un objectif de 6 mesures par paramètre d'hémostase et par type d'échantillon a été défini. Ces mesures étaient effectuées par 3 fois pour chaque échantillon lors de la première série puis répétées à nouveau par 3 fois pour chaque échantillon lors du passage de la deuxième série.

#### **2.2.4 Tests d'hémostase de routine**

Les paramètres mesurés pour interpréter l'effet de l'AOD sur les tests d'hémostase sont : TP, TCA, FV, FVIII.

#### **2.2.5 Tests d'hémostase spécialisée**

Pour les tests d'hémostase spécialisée, seul les paramètres du bilan de thrombophilie ont été étudiés.

L'activité antithrombine (dosage réalisé sur l'Atellica® COAG 360), l'activité de la protéine C et S et la recherche d'ACC (dRVVT-S, dRVVT-C, APTT-SP, Indice de Rosner : dosages faits sur ACL TOP® 970 (Werfen)).

#### **2.2.6 Tests statistiques**

Les tests statistiques et les présentations graphiques ont été effectués à l'aide de XL-Stat version 2023.1.6.

Les répétabilités en deux temps différents ont été comparées à l'aide d'un test non paramétrique de Friedman afin de déterminer s'il était possible de les regrouper en un seul groupe de répétabilités.

L'étude des paramètres testés avant et après le traitement à l'AC de plus de deux groupes, s'est faite par analyse de variance à mesures répétées (ANOVA à mesures répétées) où les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances ont été remplies par le test Shapiro. Un test non paramétrique de l'analyse de variance avec mesures répétées de Friedman a été utilisé quand les conditions de normalités n'étaient pas remplies. Tous les tests d'hypothèses étaient basés sur un seuil de significativité statistique de 0,05.

### 3 RESULTAT

#### 3.1 Mesure à conditions différentes

Afin de constituer un groupe homogène de 6 répétabilités. Les répétabilités à trois mesures obtenues à deux temps différents ont été comparées.

Aucune différence significative, entre les deux conditions de mesures, n'a été trouvée que ce soit pour les différents tests liés à l'apixaban ou au rivaroxaban. Les résultats ci-dessous concernent la mesure du TP pour l'apixaban **[Tableau 9]**. Le reste des résultats sont présentés en **[Annexe 5]**(TCA, FV, FVIII). Les mêmes tests ont été réalisés sur le Rivaroxaban pour le TP (p-Value=0.5), TCA (p-Value=0.4), FV (p-Value=0.08) et FVIII (p-Value=0.5) **[Annexe 6]**.

TP (%) Echantillon	T1 m±e	T2 m±e	p- Value*	T1 Ac m±e	T2 Ac m±e	p- Value*
Plasma témoin	107.9±1.3	109.4±0.91	0.08	107.2±1.1	108±2.9	0.56
Apixaban 25 ng/ml	103.1±1.95	106.9±1.0	0.564	106.9±2.03	105.5±0.3	0.56
Apixaban 50 ng/ml	101.4±2.10	106.5±0.10	0.08	105.8±1.01	105.6±1.4	0.56
Apixaban 100 ng/ml	101.3±1.29	103±0.85	0.08	103.7±0.8	103.9±0.9	0.56
Apixaban 250 ng/ml	93.13±1.85	95.9±1.4	0.08	102.7±2.7	104.7±1.4	0.56
Apixaban 500 ng/ml	80.5±1.50	83±21.3	0.08	104.7 ±1.8	104.9±1.4	0.56

*Tableau 9 : Comparaison des résultats répétés pour le TP à deux temps de mesures différents (T1+T2) avant et après charbon pour l'apixaban avec la p-Value<0.05. Test Friedman. m : moyenne, e : écart type*

### 3.2 Influence du DMSO

Il n'a pas été observé de différence significative sur les paramètres testés, entre les échantillons de plasma témoin et ceux composés de plasma avec DMSO que ce soit pour les séries testant le rivaroxaban et celles testant l'apixaban.

Il peut être ainsi considéré que le DMSO n'interfère pas avec la mesure des différents paramètres d'hémostase au risque  $\alpha=0.05$  [Figure 27].

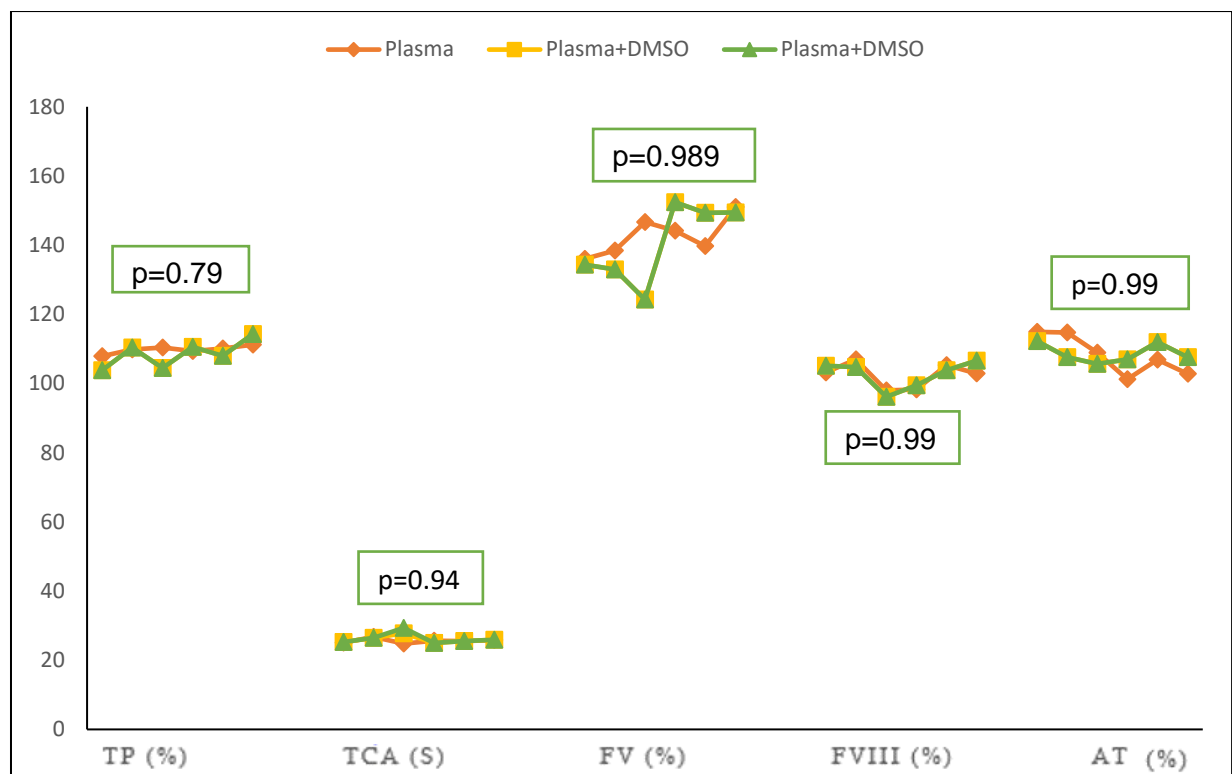


Figure 27 : Comparaison des différents paramètres d'hémostase de routine entre plasma témoin et plasma traité avec du DMSO pour la série apixaban (jaune) et rivaroxaban (vert).  
Test Anova à mesure répétées p :p-Value

### 3.3 Influence du charbon

Lors de la comparaison d'un plasma témoin avec un plasma traité avec du charbon, il n'a pas été observé de différence significative sur le TCA, FV, FVIII et AT [Tableau 10].

Toutefois, sur la mesure du TP il a été observé une sous-estimation, significative (p-Value =0.046) [Figure 28].

	Plasma témoin	Plasma avec AC
Test	Moyenne ±Écart type	Moyenne ± Écarttype
TP	109,8±1.1	107,7±2.0
TCA	25.6±0.7	25.9±0.6
FVIII	102.5±3.7	103.0±3.3
FV	142.7±5.6	142.0±6.7
AT	108.2±5.3	107.04±3.5

Tableau 10 : Comparaison du plasma témoin à un plasma avec DOAC-Stop™ (moyenne ± écart-type) \*\*Test Anova à mesure répétées (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

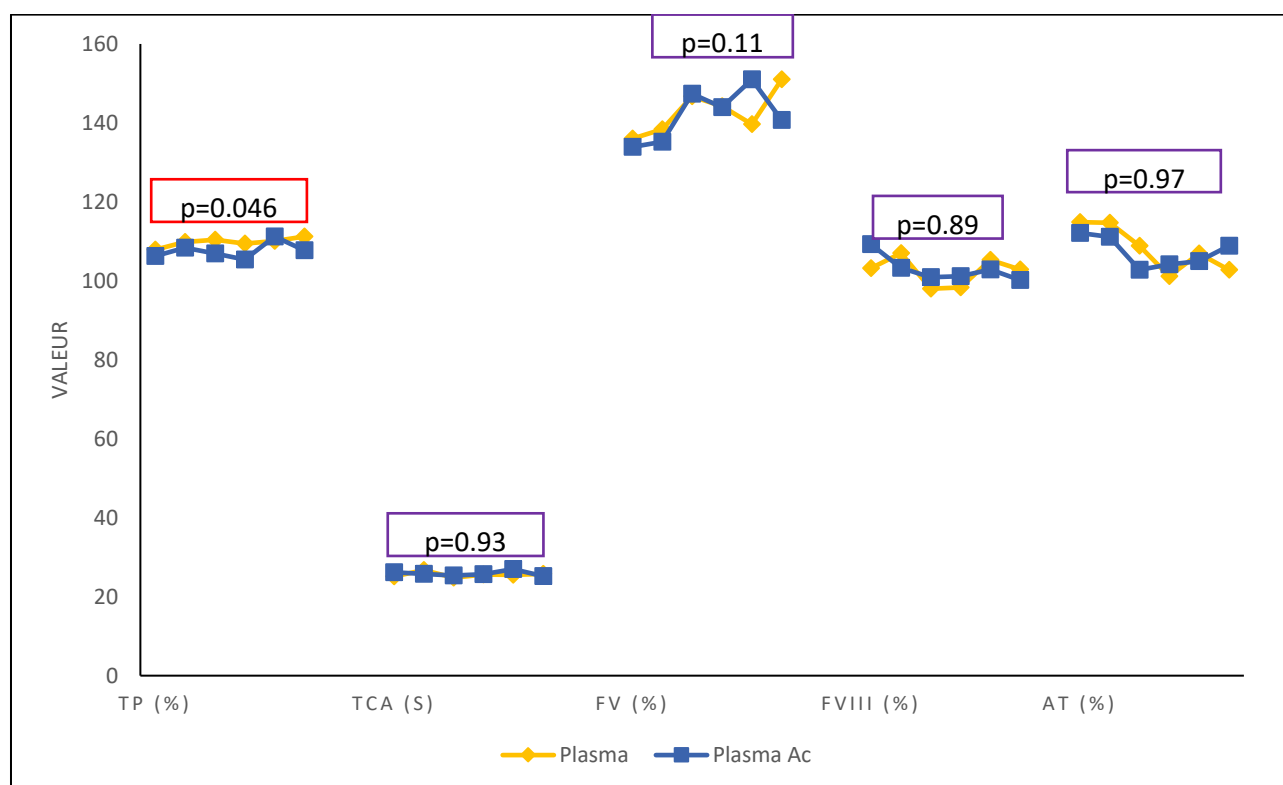


Figure 28 : Comparaison des différents paramètres d'hémostase de routine entre plasma témoin (bleu) et le plasma traité avec du charbon actif (orange) : p-Value

### 3.4 Effet du charbon sur les concentrations mesurées en apixaban et rivaroxaban

Des tests anti-Xa spécifiques ont montré une bonne corrélation entre les concentrations de médicament attendus et les résultats obtenus avec l'utilisation de calibrateurs spécifiques d'apixaban et de rivaroxaban.

Les concentrations moyennes mesurées avant l'ajout d'AC étaient de 578, 274.86, 104.7, 49.14 et 27.8 ng/ml pour l'apixaban et de 536.5, 259.5, 110.3, 50.83, 26.7 ng/ml pour le rivaroxaban [Annexe 4-Annexe 5].

Après addition d'AC les concentrations mesurées étaient inférieures à la limite de quantification (<20ng/ml) dans 100 % des cas. Les résultats ont été présentés avec les moyennes et écarts types ci-dessous [Figure 29-Tableau 11].

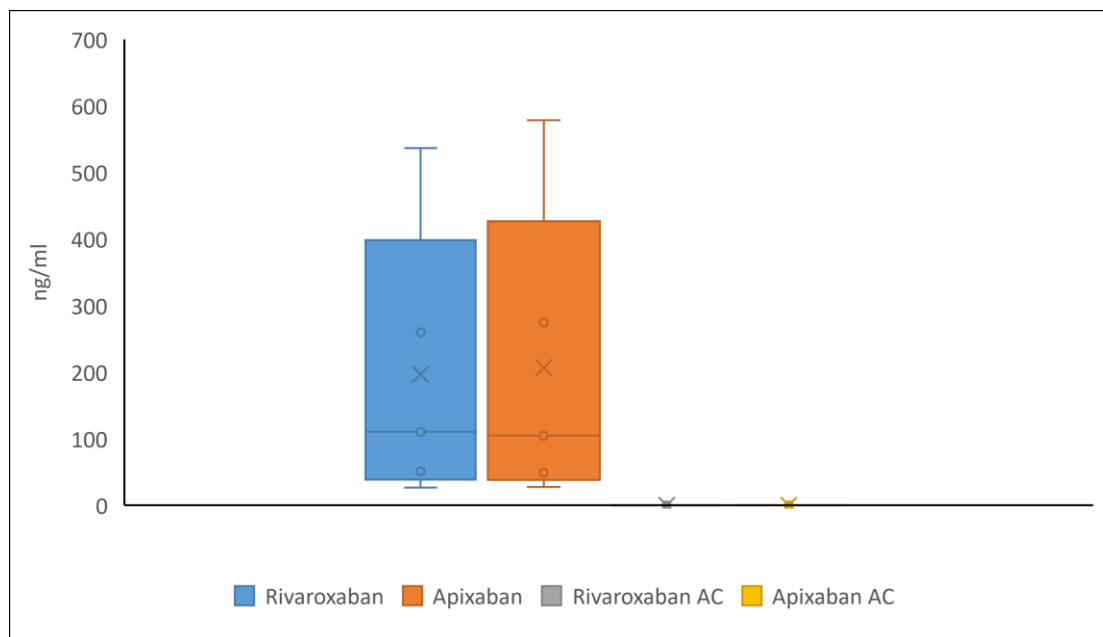


Figure 29 : Impact de DOAC-Stop™ sur différentes concentrations en apixaban et rivaroxaban avant et après AC

Concentration (ng/ml, moyenne $\pm$ ET)				
	N*	LQ (ng/ml)	Pas de charbon actif	+ charbon actif
Apixaban	6	20	27,86 $\pm$ 1,21	< LQ
Rivaroxaban	6	20	26,7 $\pm$ 2,34	< LQ
Apixaban	6	20	49,14 $\pm$ 5,2	< LQ
Rivaroxaban	6	20	50,83 $\pm$ 7,55	< LQ
Apixaban	6	20	104,71 $\pm$ 3,9	< LQ
Rivaroxaban	6	20	110,33 $\pm$ 6,34	< LQ
Apixaban	6	20	274,86 $\pm$ 13,37	< LQ
Rivaroxaban	6	20	259,5 $\pm$ 6,47	< LQ
Apixaban	6	20	578,5 $\pm$ 22,56	< LQ
Rivaroxaban	6	20	536,5 $\pm$ 20,38	< LQ

Tableau 11 : Moyenne  $\pm$  Écart type des concentrations en AOD avant et après l'ajout d'AC de 25, 50, 100, 250 et 500 ng/ml. Test Anova à mesure répétées. N : Nombre de fois/ LQ : limite de quantification

### 3.5 Influence de l'apixaban sur les tests d'hémostase

Les résultats sont exprimés en concentrations mesurées et non en concentrations souhaitées de 25, 50, 100, 250 et 500 ng/ml en apixaban.

#### 3.5.1 TP

Une différence significative du TP a été observée à partir de la concentration la plus basse en apixaban (concentration souhaitée de 25 ng/ml mesurée à 27.8 ng/ml) par rapport à un plasma témoin (p-Value=0.007) [Annexe 5].

Une corrélation inverse du TP avec les concentrations en apixaban ( $R^2=0,94$ ) a été retrouvée, néanmoins sans atteindre des taux <65% [Figure 30].

L'apixaban sous-estime la valeur du TP.

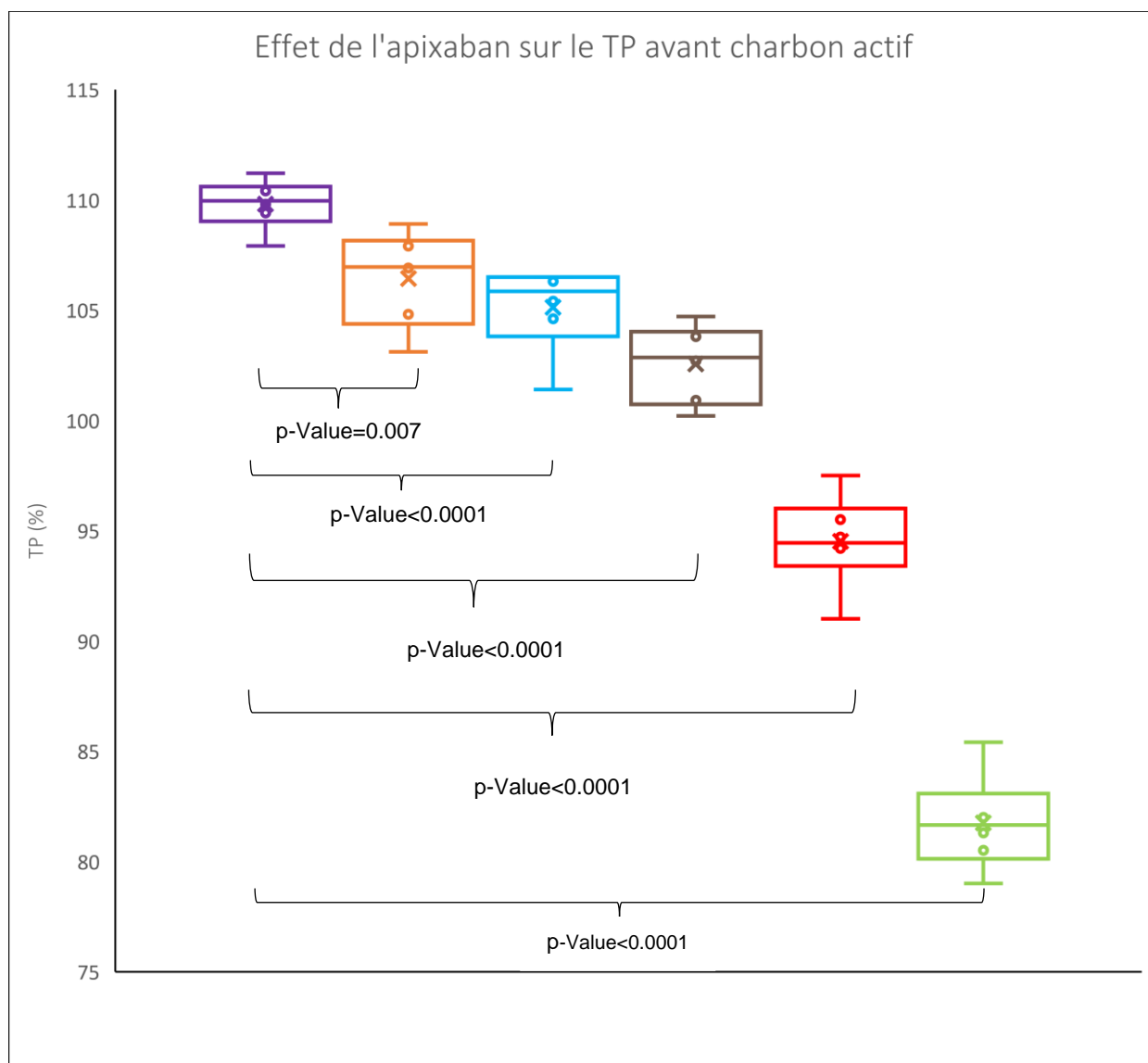


Figure 30 : Représentation en Box-plots de différentes concentration d'apixaban sur le TP en l'absence de charbon \*p-value <0.05

Étant donné l'interférence du charbon sur le TP et à cela s'ajoute des résultats des tests statistiques de significativité aléatoire en fonction des concentrations en apixaban [Annexe 5], il n'a pas été possible d'interpréter les données obtenues après traitement par le charbon. Cependant on peut observer que le TP tend à se normaliser après traitement par charbon actif [Figure 31].



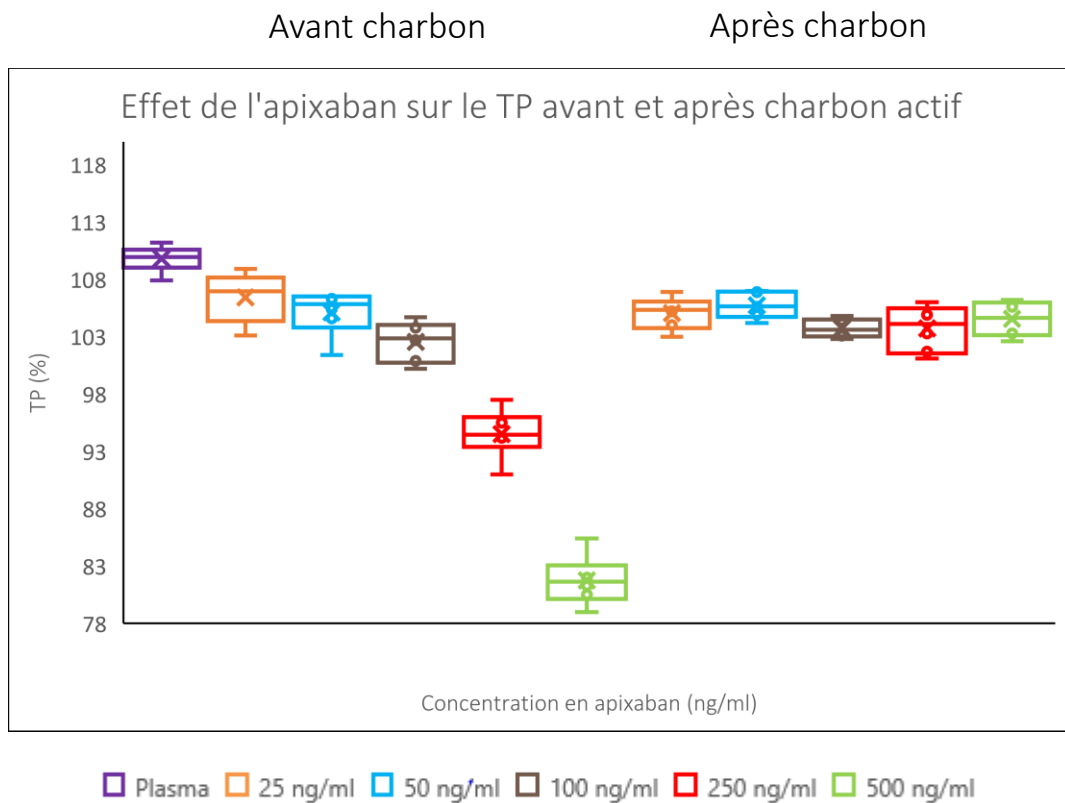


Figure 31 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur la mesure du TP avant et après ajout de charbon actif (AC)

### 3.5.2 TCA

Il n'a pas été observé de différence significative de la mesure du TCA jusqu'à une concentration mesurée de 27.8 ng/ml en apixaban par rapport à un plasma témoin [Annexe 5]. Au-delà, l'apixaban allonge le TCA de façon proportionnelle à sa concentration ( $R^2=0.95$ ).



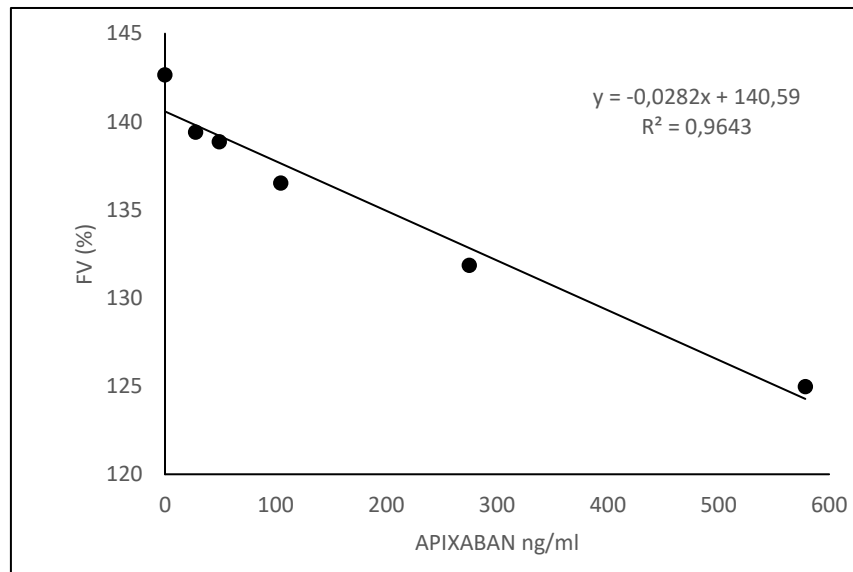


Figure 33 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétibilités du Facteur V pour chaque concentration en concentration en Apixaban

Après ajout du charbon, pour toutes concentrations en apixaban, il n'a été observé aucune différence significative de taux de facteur V par rapport au plasma témoin [Annexe 5][Figure 34].

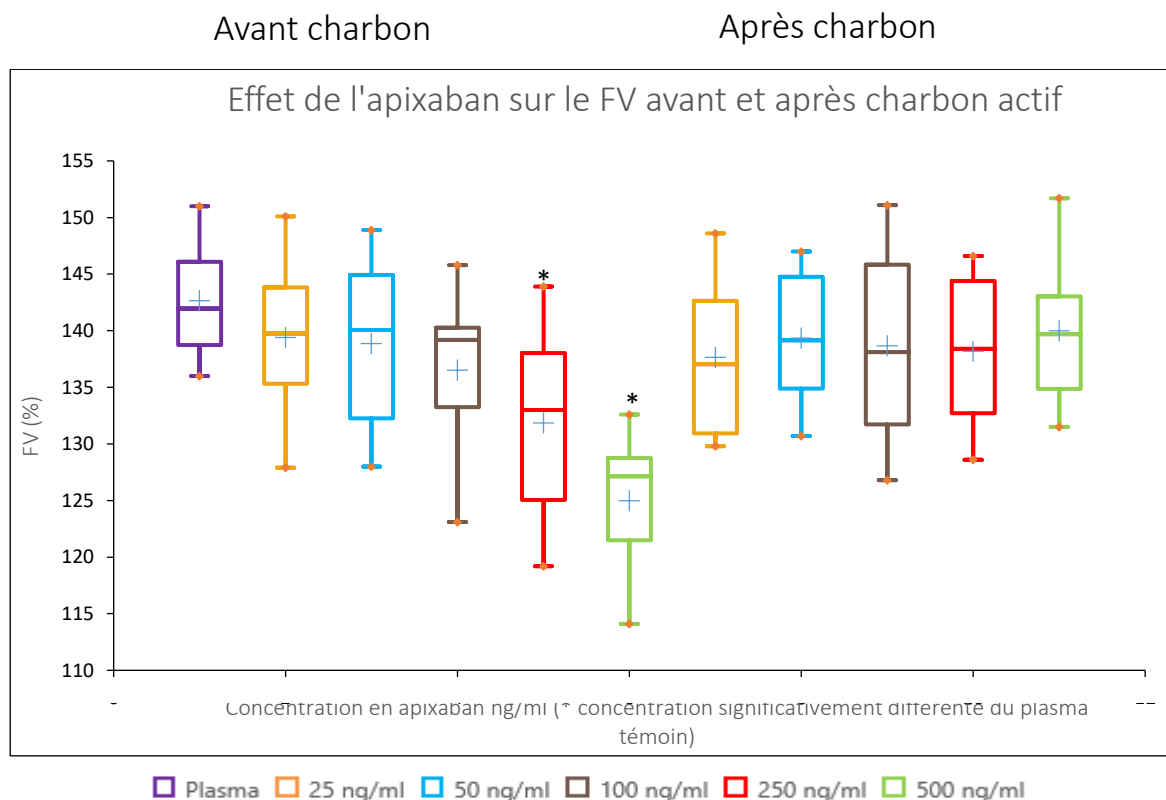


Figure 34 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur la mesure du Facteur V avant et après ajout de charbon actif (AC)

### 3.5.4 Facteurs VIII

Il n'a pas été observé de différence significative du taux de facteur VIII jusqu'à une concentration mesurée d'apixaban de 27.8 ng/ml par rapport à un plasma témoin [Annexe 5]. Une corrélation inverse du dosage de facteur VIII avec les concentrations en apixaban a été observée ( $R^2 = 0.94$ ) [Figure 35].

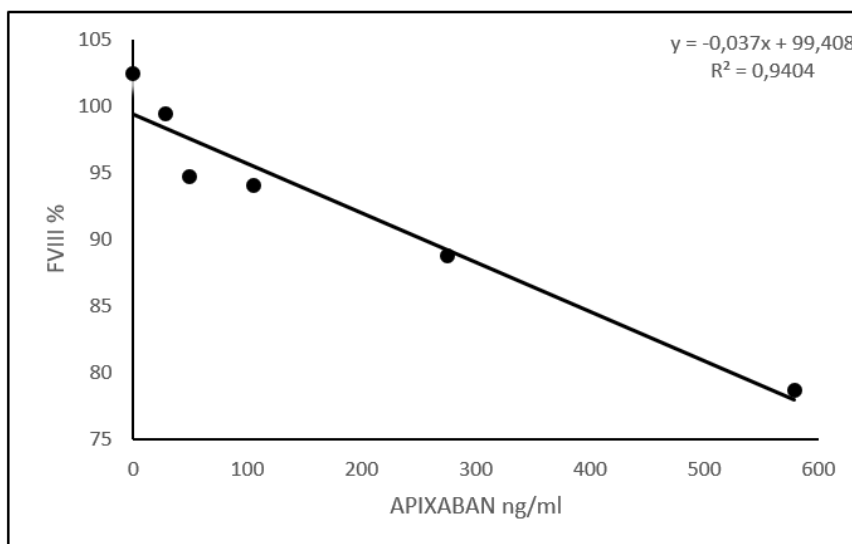


Figure 35 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétibilités du Facteur VIII pour chaque concentration en concentration en Apixaban avant charbon

Après ajout du charbon on retrouve des taux de FVIII significativement non différents de ceux du plasma témoin [Figure 36] [Annexe 10].

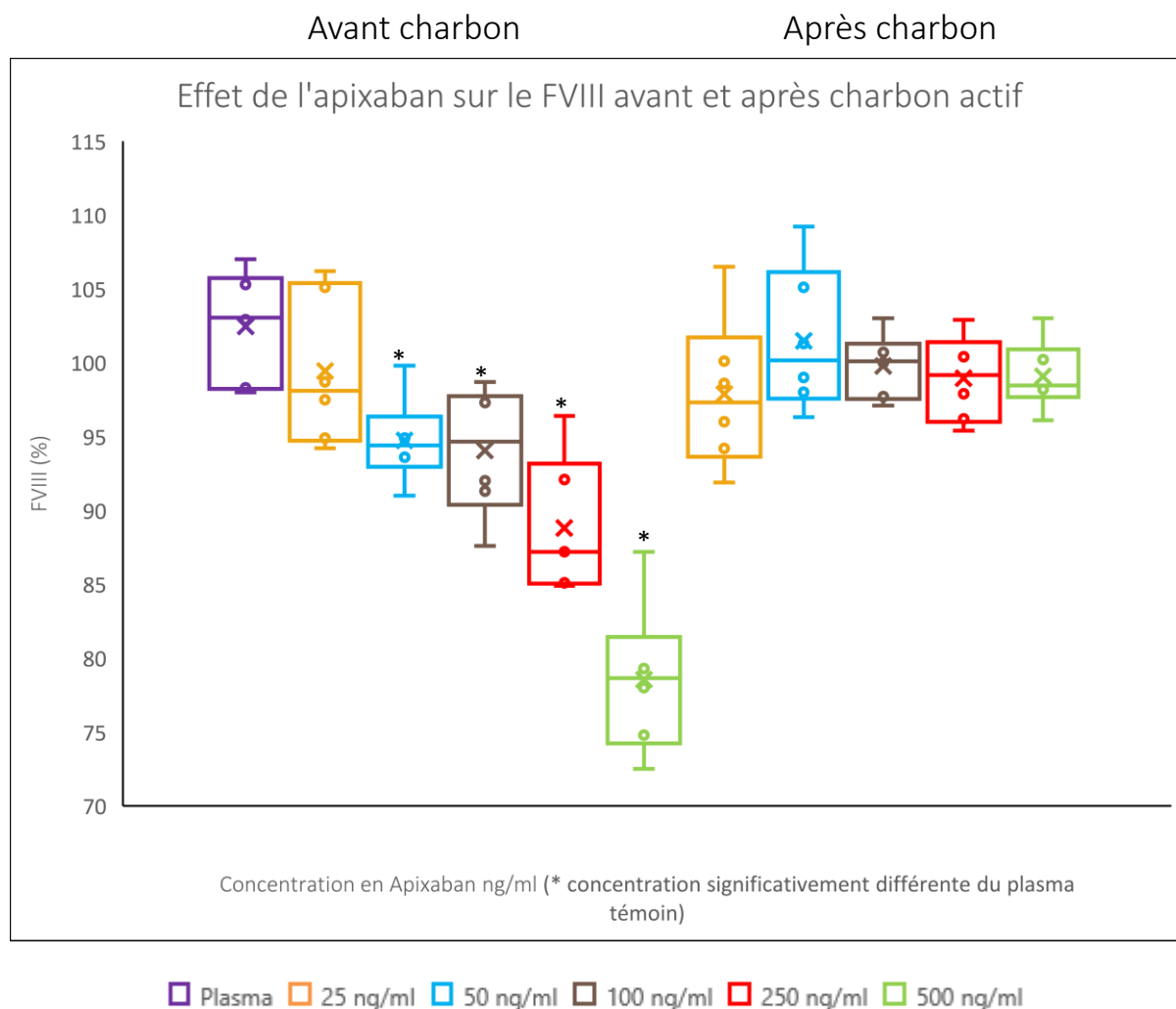


Figure 36 : Représentation en dot-plot de l'effet de l'apixaban sur la mesure du facteur VIII avant et après ajout de charbon actif (AC)

### 3.6 Influence du rivaroxaban sur les tests d'hémostase

Les résultats sont exprimés en concentrations mesurées et non en concentrations souhaitées de 25, 50, 100, 250 et 500 ng/ml en rivaroxaban.

#### 3.6.1 TP

Une différence significative a été observée de la valeur du TP à partir d'une concentration souhaitée de 25 ng/ml et mesurée à 26.7 ng/ml par rapport à un plasma témoin [Annexe 6]. Une corrélation inverse entre la valeur du TP et les concentrations

en rivaroxaban a été observée ( $R^2=0,91$ ,  $p=0,003$ ) [Figure 37]. Le rivaroxaban sous-estime le TP.

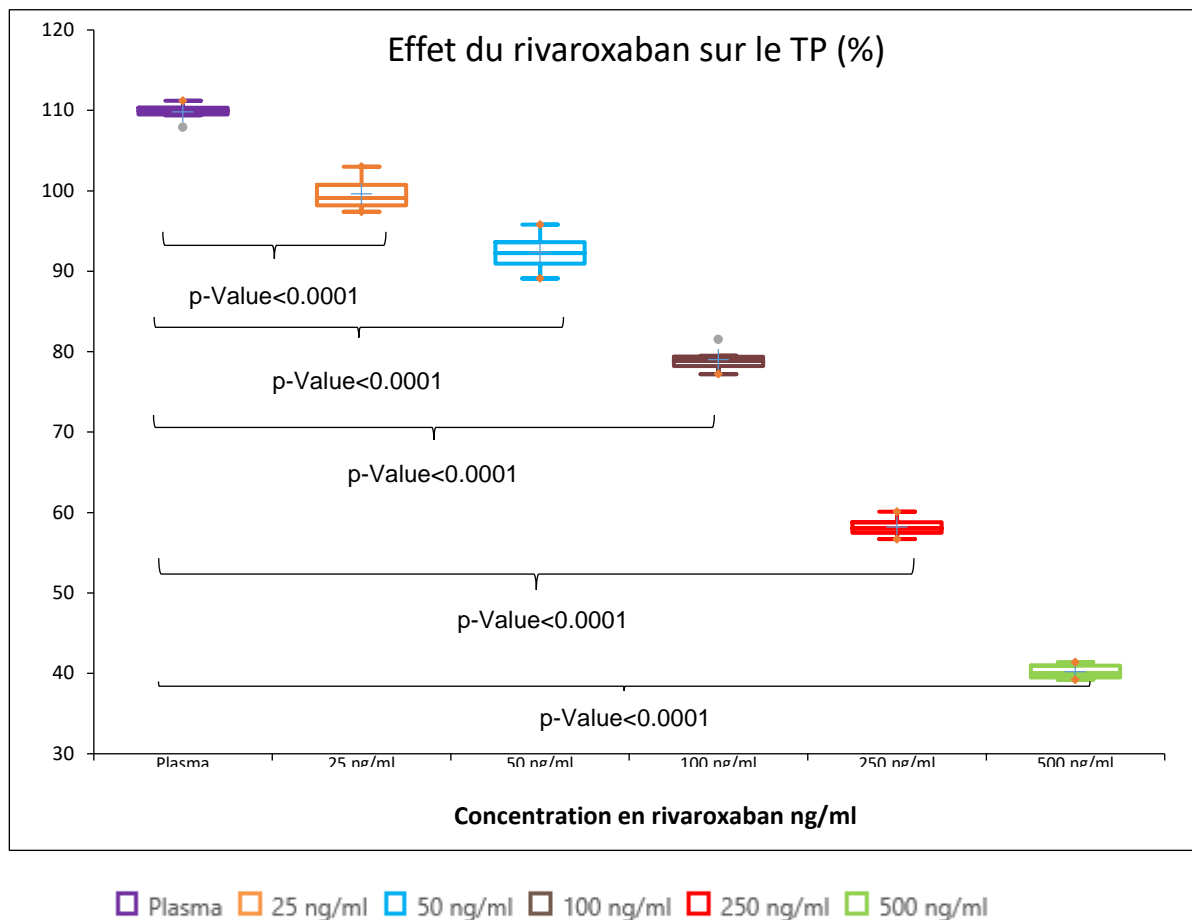


Figure 37 : Représentation en Box-plots de différentes concentrations de rivaroxaban sur le TP en l'absence de charbon \*p-value < 0.05

Étant donné l'interférence du charbon sur le TP et à cela s'ajoute des tests statistiques de significativité aléatoire en fonction des concentrations en rivaroxaban, il n'a pas été possible d'interpréter les données obtenues après traitement par le charbon. Cependant on peut observer que le TP tend à se normaliser [Annexe 6] [Figure 38].

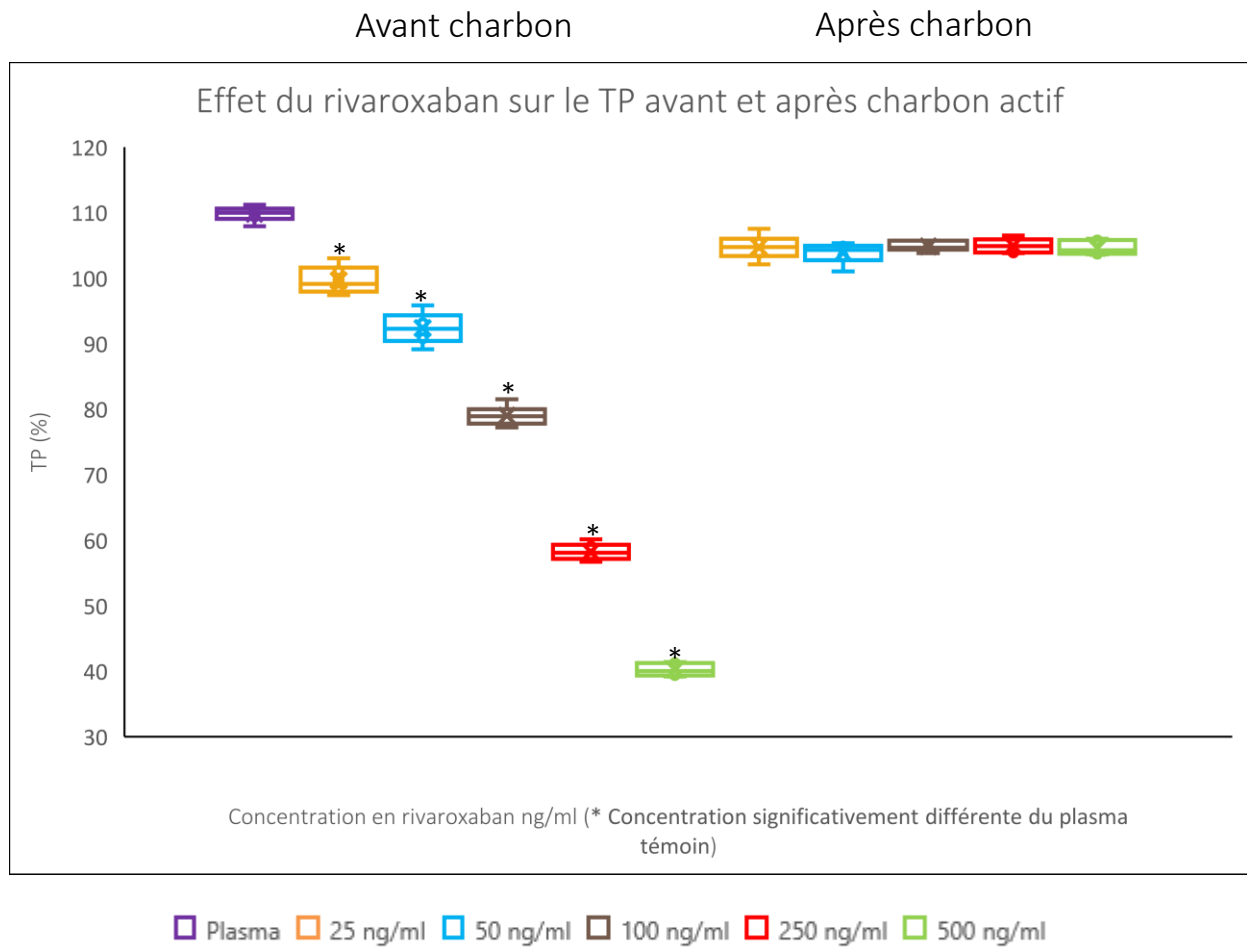


Figure 38 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du TP avant et après ajout de charbon actif (AC)

### 3.6.2 TCA

Aucune différence significative de la mesure du TCA n'a été observée jusqu'à une concentration mesurée en rivaroxaban à 26.7 ng/ml par rapport à un plasma témoin [Annexe 6]. Le rivaroxaban allonge le TCA de façon proportionnelle à sa concentration ( $R^2=0.98$ ).

Après ajout du charbon, les TCA obtenus sont significativement non différents du plasma témoin pour toutes les concentrations [Figure 39].

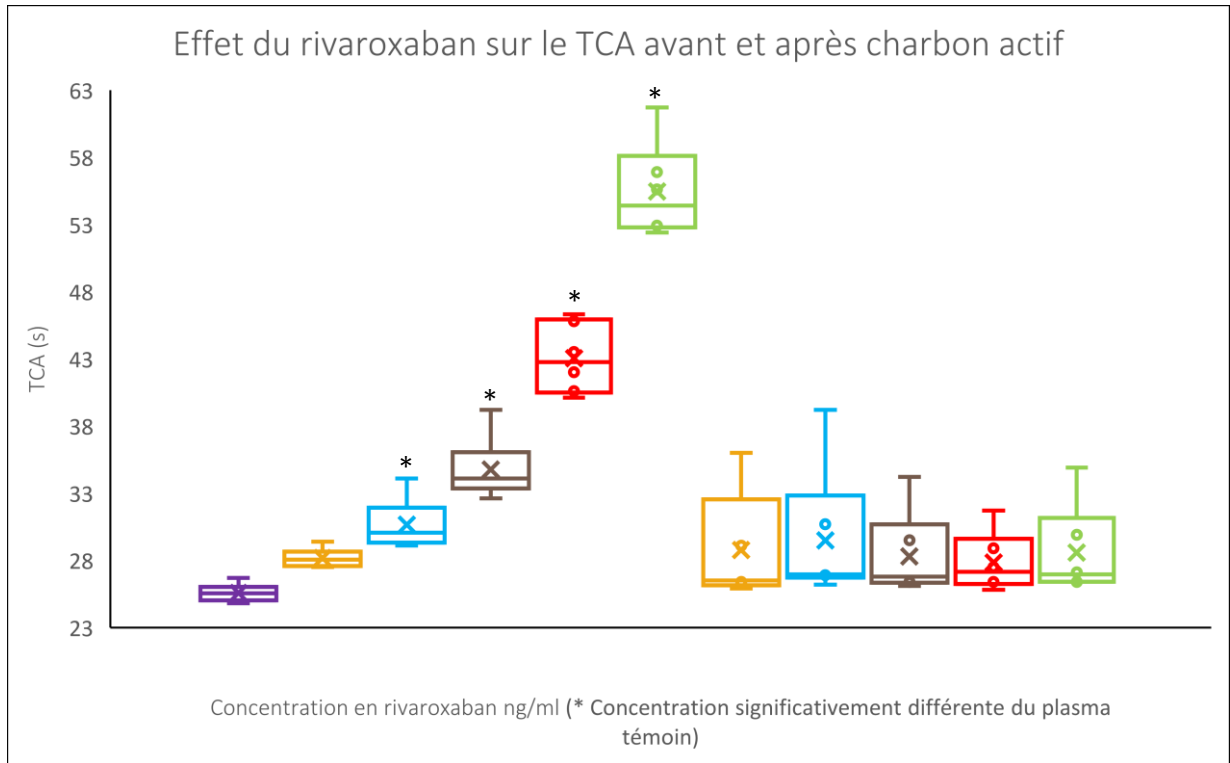


Figure 39 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du TCA avant et après ajout de charbon actif (AC)

■ Plasma 
 ■ 25 ng/ml 
 ■ 50 ng/ml 
 ■ 100 ng/ml 
 ■ 250 ng/ml 
 ■ 500 ng/ml

### 3.6.3 Facteur V

Il n'a pas été observé de différence significative du taux de facteur V jusqu'à une concentration mesurée en rivaroxaban de 26,7 ng/ml par rapport à un plasma témoin [Annexe 6-Figure 40].

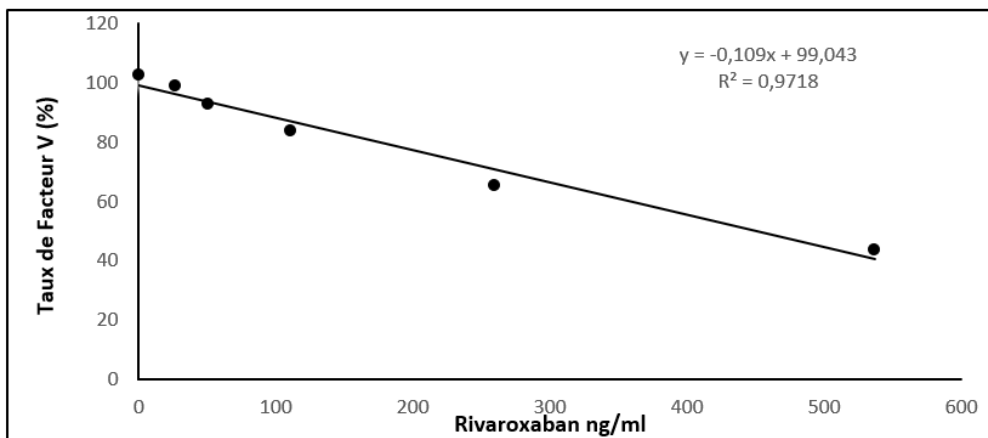


Figure 40 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilité du Facteur V pour chaque concentration en concentration en rivaroxaban



Une corrélation inverse du taux de FV avec les concentrations en rivaroxaban ( $R^2=0.97$ ) a été observée.

Après ajout du charbon, pour toutes concentrations en rivaroxaban il n'a été observé aucune différence significative de taux de facteur V par rapport au plasma témoin [Figure 41].

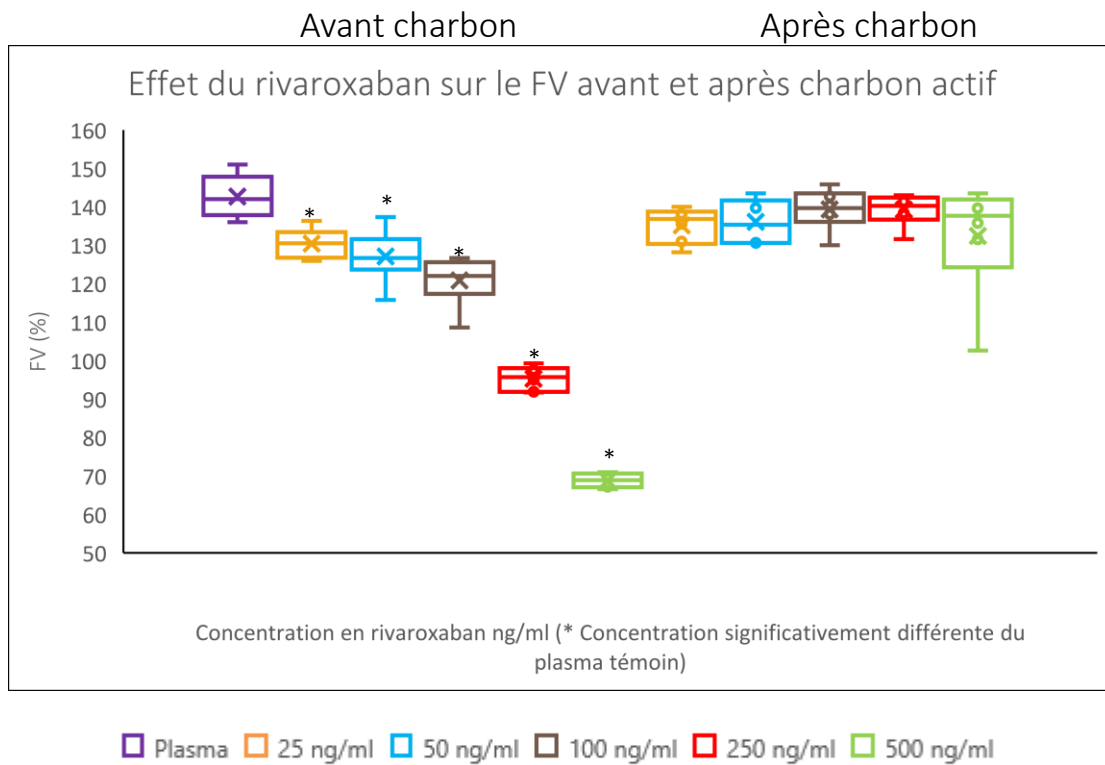


Figure 41 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du FV avant et après ajout de charbon actif (AC)

### 3.6.4 Facteur VIII

Il n'a pas été observé de différence significative du taux de facteur VIII, jusqu'à une concentration rivaroxaban de 26.7 ng/ml par rapport à un plasma témoin [Annexe 6]. Une corrélation inverse du taux de facteur VIII avec les concentrations en rivaroxaban a été observée ( $R^2 =0.94$ ) [Figure 42].

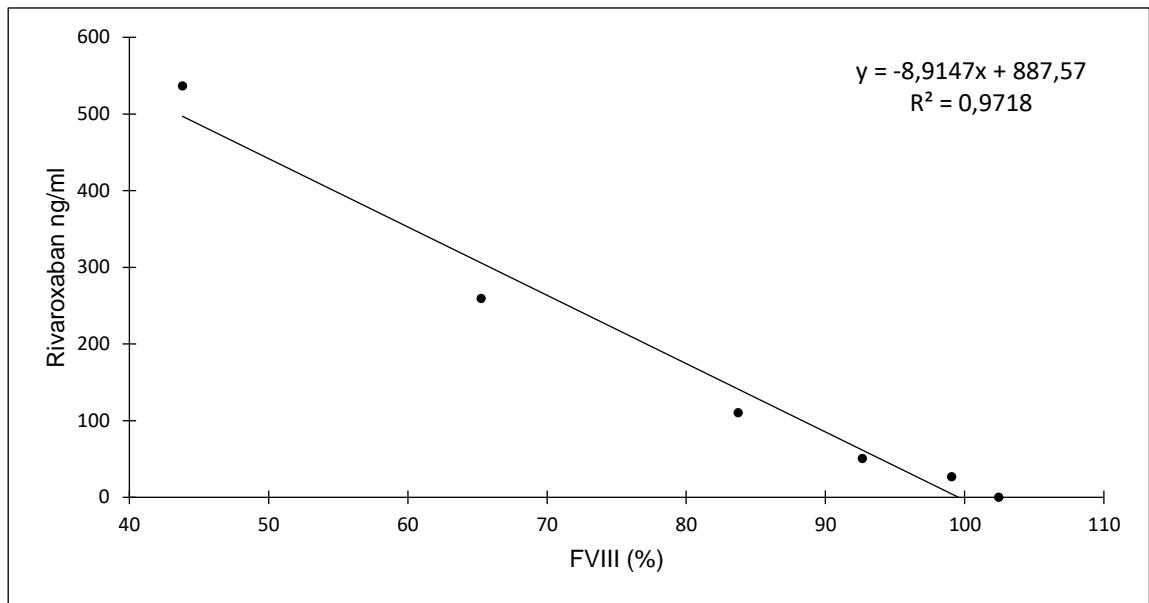


Figure 42 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilités du Facteur VIII pour chaque concentration en concentration en rivaroxaban

Après ajout du charbon on retrouve des concentrations significativement non différentes des concentrations du plasma témoin [Figure 43]

Avant charbon

Après charbon

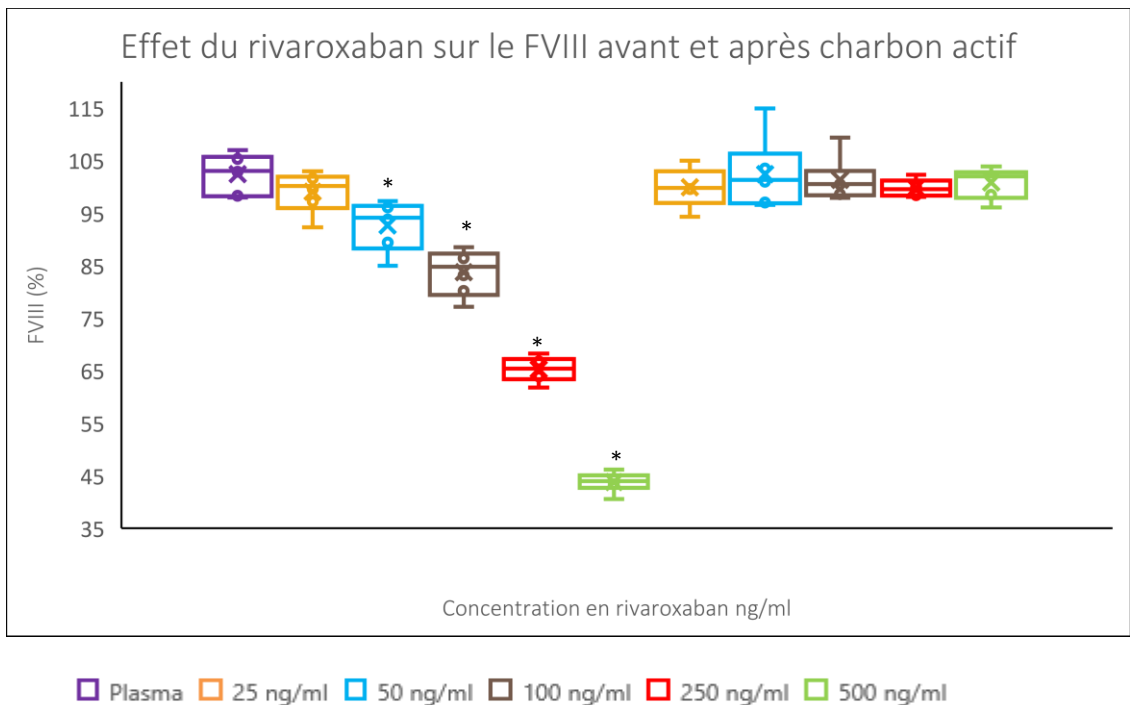


Figure 43 : Représentation en Box-plots de l'effet du rivaroxaban sur la mesure du FVIII avant et après ajout de charbon actif (AC)

### 3.7 Effet de l'apixaban sur l'hémostase spécialisée

Les résultats sont exprimés en concentrations mesurées et non en concentrations souhaitées de 25, 50, 100, 250 et 500 ng/ml en apixaban.

#### 3.7.1 Antithrombine

A des concentrations d'apixaban inférieures à une concentration mesurée à 49.1 ng/ml il n'a pas été retrouvé de différence significative de l'apixaban sur l'activité de l'antithrombine par rapport à un plasma témoin [Annexe 7].

Une corrélation proportionnelle de l'activité de l'antithrombine avec les concentrations en apixaban a été observée ( $R^2 = 0.88$ ) [Figure 44]. L'apixaban a pour effet de surestimé l'activité de l'antithrombine.

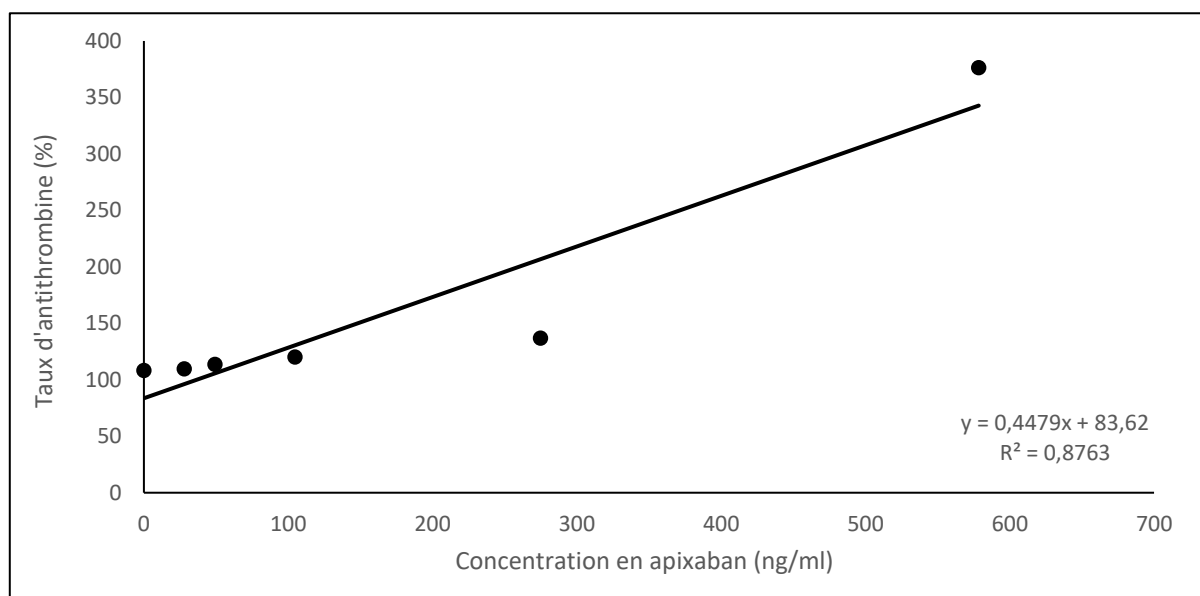


Figure 44 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétabilités de l'AT pour chaque concentration en apixaban

Après ajout du charbon, des taux significativement non différents de ceux du plasma témoin ont été trouvés pour l'activité de l'antithrombine. [Figure 45] [Annexe 7].



### 3.7.2 APTT-SP

A des concentrations mesurées d'apixaban inférieures à 24 ng/ml il n'a pas été retrouvé de différence significative de l'apixaban sur l'allongement du APTT-SP, sur un total de 6 répétabilités, par rapport à un plasma témoin. Néanmoins l'allongement de ce temps est interprété sur le ratio APTT-SP M (plasma avec apixaban) /T, s'il est supérieur à 1.2 il est positif 1.3.3.1.1.

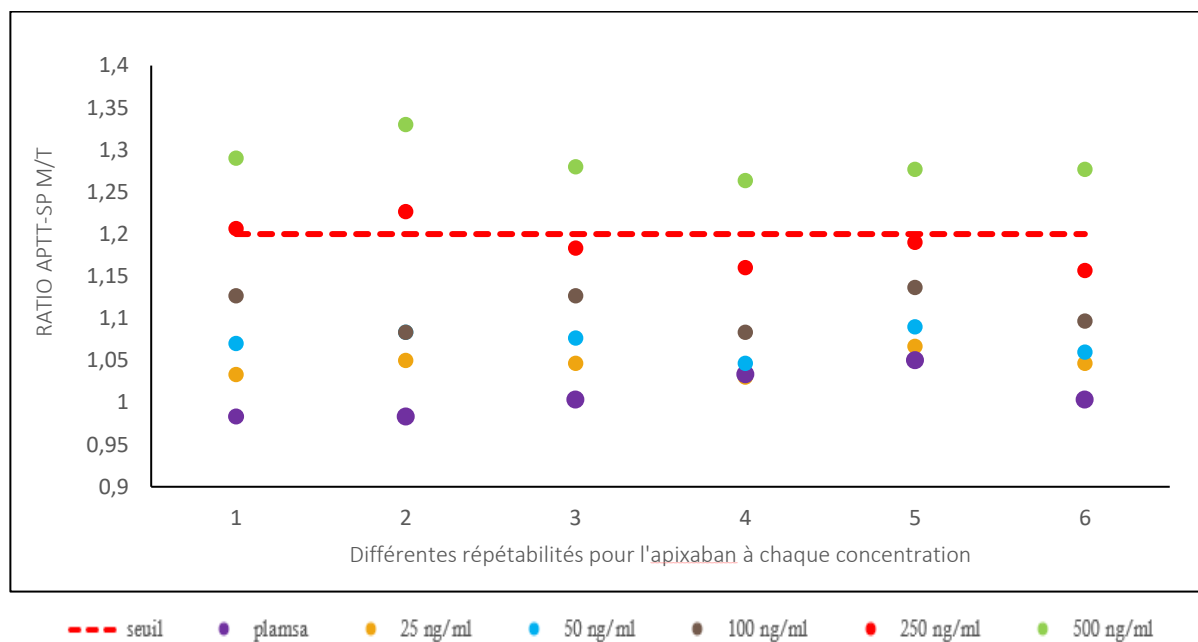


Figure 46 : Dispersion de points des différents ratio APTT-SP M/T obtenues à différentes concentrations en Apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC

Sur la moitié des répétabilités obtenues le ratio positif a été observé à des concentrations mesurées en apixaban de 293.6 à 550 ng/ml [Figure 46].

Pour les valeurs ayant un ratio positif ou faiblement positif (12-15), on poursuit les investigations en mesurant le APTT-SP du mélange plasma témoin (pool plasma normal) + plasma malade (nos plasmas avec apixaban) pour le calcul de l'indice de Rosner comme expliqué dans le paragraphe 1.3.3.1.

Après le mélange, l'indice de Rosner reste positif pour les concentrations strictement supérieures à 293.6ng/ml. Ainsi le mélange ne permet pas de s'affranchir de l'effet de l'apixaban à des concentrations supérieures à 293.6 ng/ml sur le APTT-SP [Figure 47].

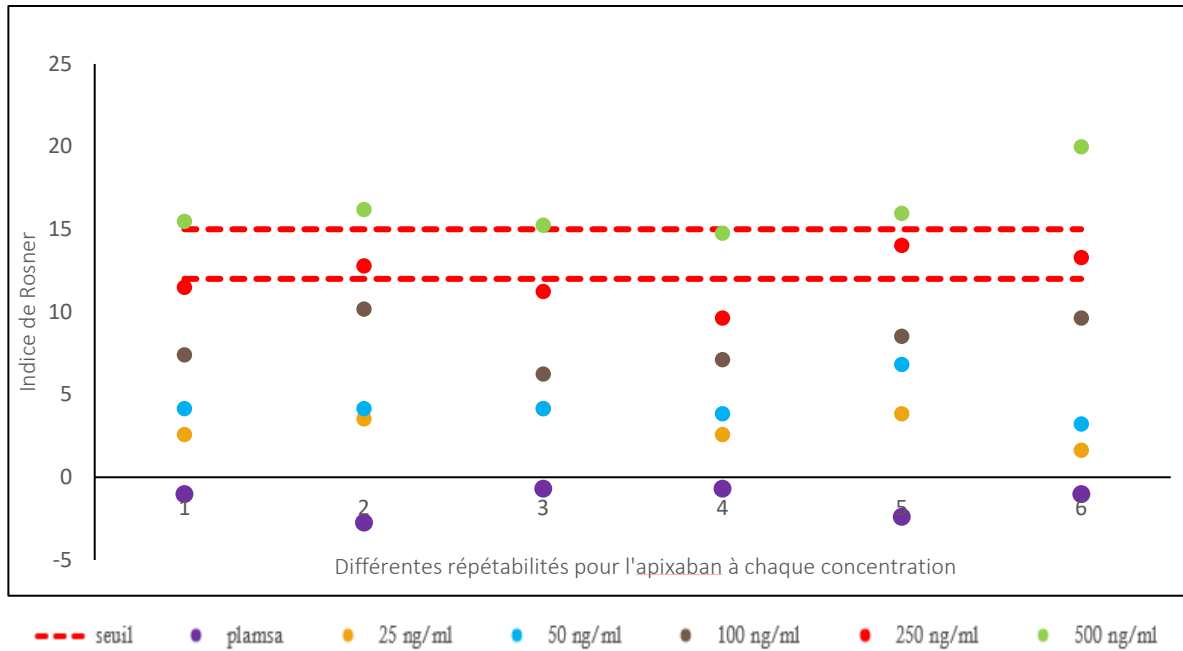


Figure 47 : Dispersion de points des différents indices de Rosner obtenues à différentes concentrations en Apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité de l'indice de Rosner 15 et faiblement positif 12 Avant AC

Après Ajout de charbon actif, il a été retrouvé des temps de APTT-SP significativement non différents du plasma témoin, sur un total de 5 répétabilités. Ainsi comme le ratio M/T est dans tous les cas  $< 1.2$ , l'indice de Rosner n'a pas été calculé [Annexe 7][Figure 48].

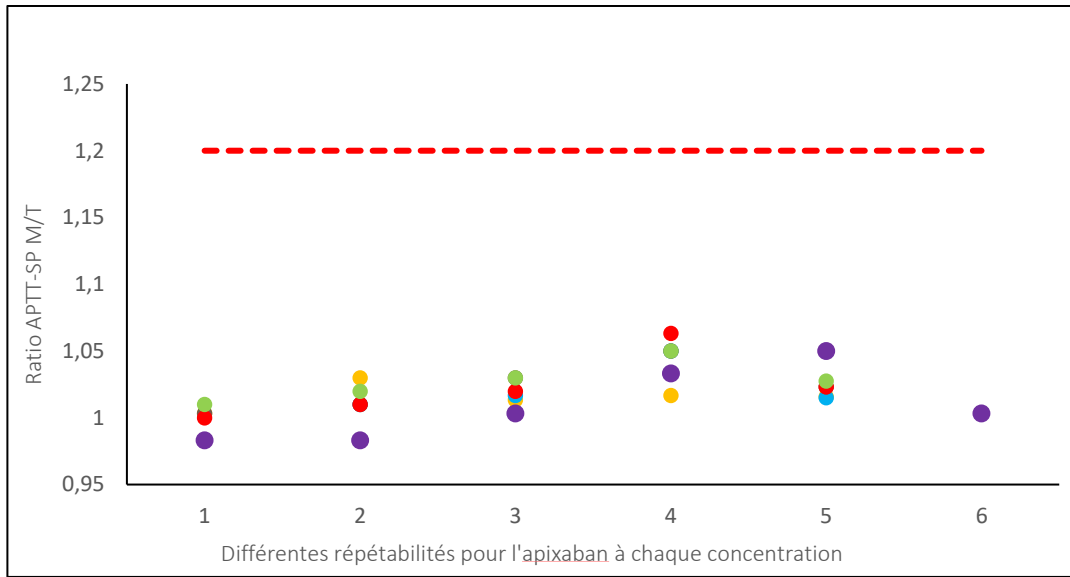


Figure 48 : Dispersion de points des différents ratio M/T obtenues à différentes concentrations en Apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 Après AC

### 3.7.3 dRVVT-S

A des concentrations d'apixaban inférieures à une concentration mesurée à 99 ng/ml il n'a pas été démontré de différence significative de l'apixaban sur l'allongement

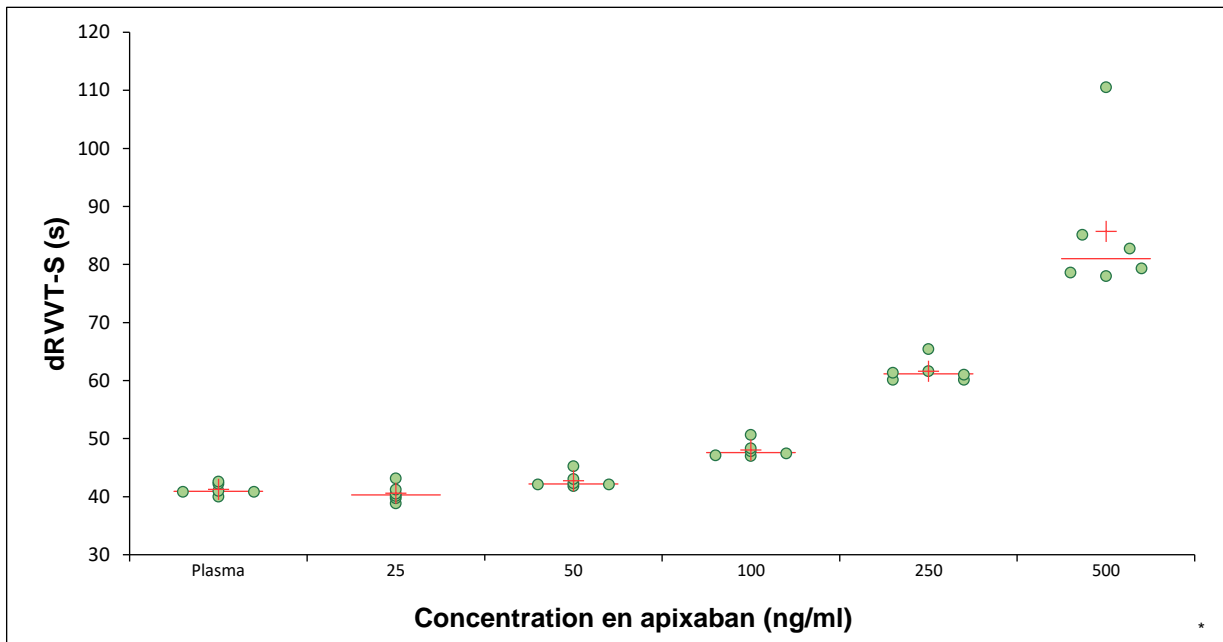


Figure 49: Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-S pour chaque répétabilité avant charbon

du dRVVT-S par rapport à un plasma témoin, sur un total de 6 répétibilités [Figure 49].

Néanmoins l'allongement de ce temps est interprété sur le ratio dRVVT-S M (plasma avec apixaban) /T, s'il est supérieur à 1.10 il est positif 1.3.3.2 Il a été relevé que ce test est positif à partir d'une concentration mesurée à 45 ng/ml d'apixaban [ Figure 50]

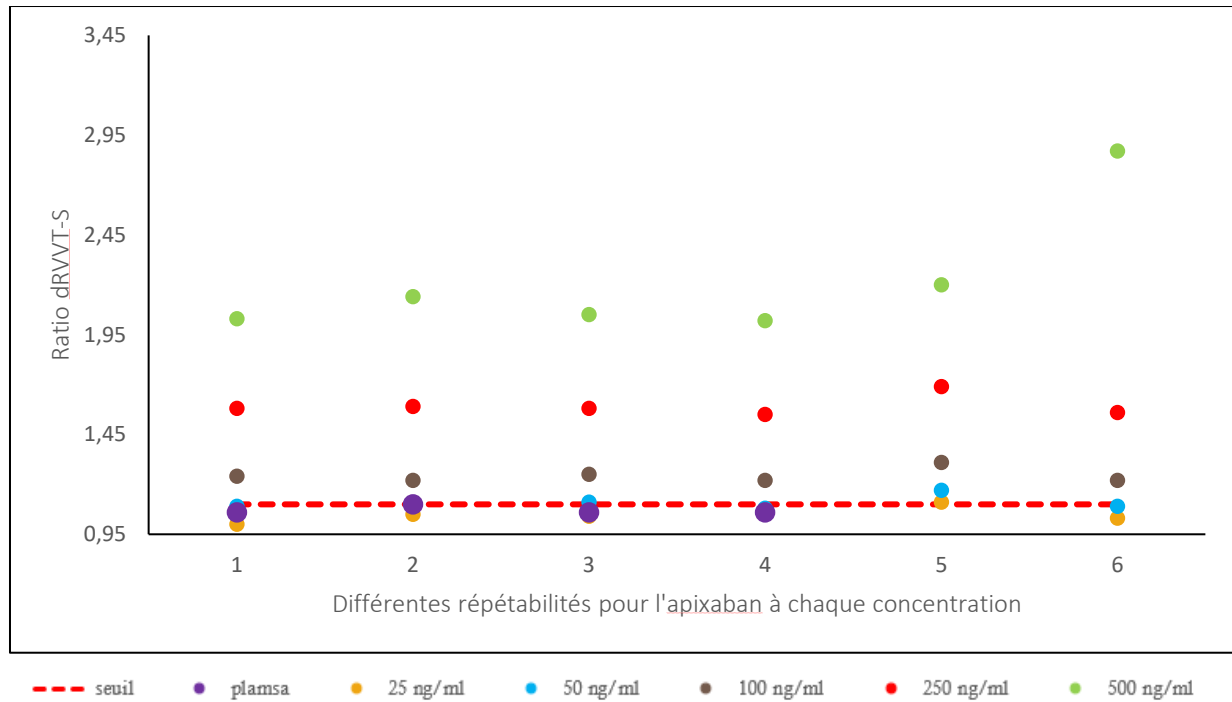


Figure 50 : Dispersion de points des différents ratios de dRVVT-S M/T obtenues à différentes concentrations en apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 avant AC



Après ajout de charbon actif, il a été observé des temps de dRVVT-S significativement non différents du plasma témoin et le ratio négatif, sur un total de 3-4 répétabilités [Annexe 7][Figure 51][Figure 52].

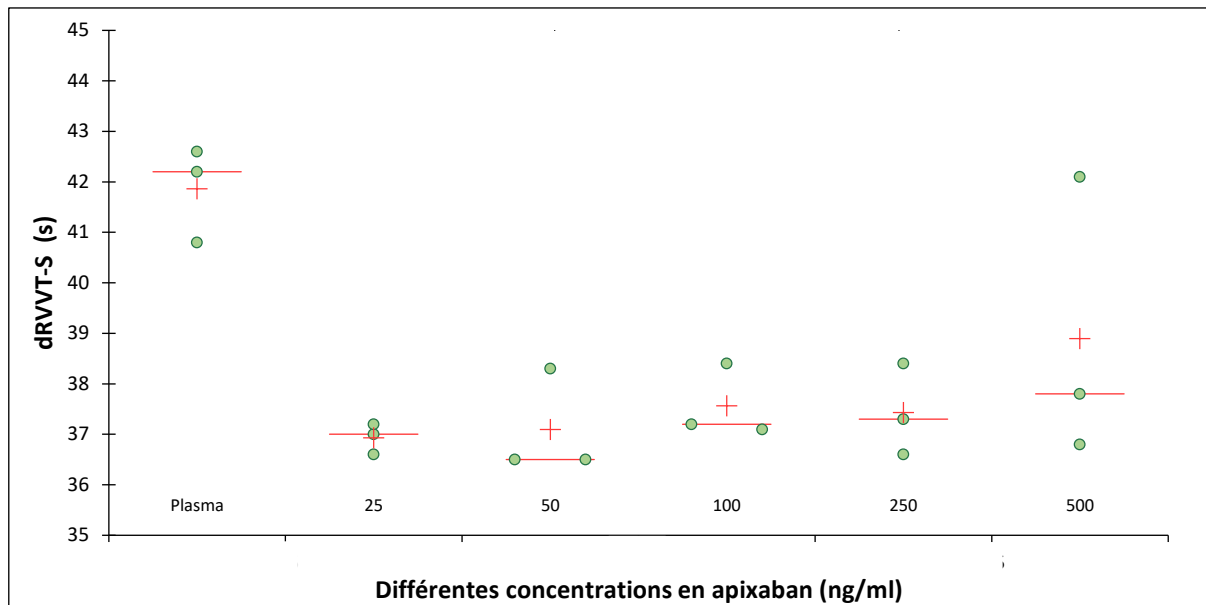


Figure 51 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-S pour chaque répétabilité après charbon

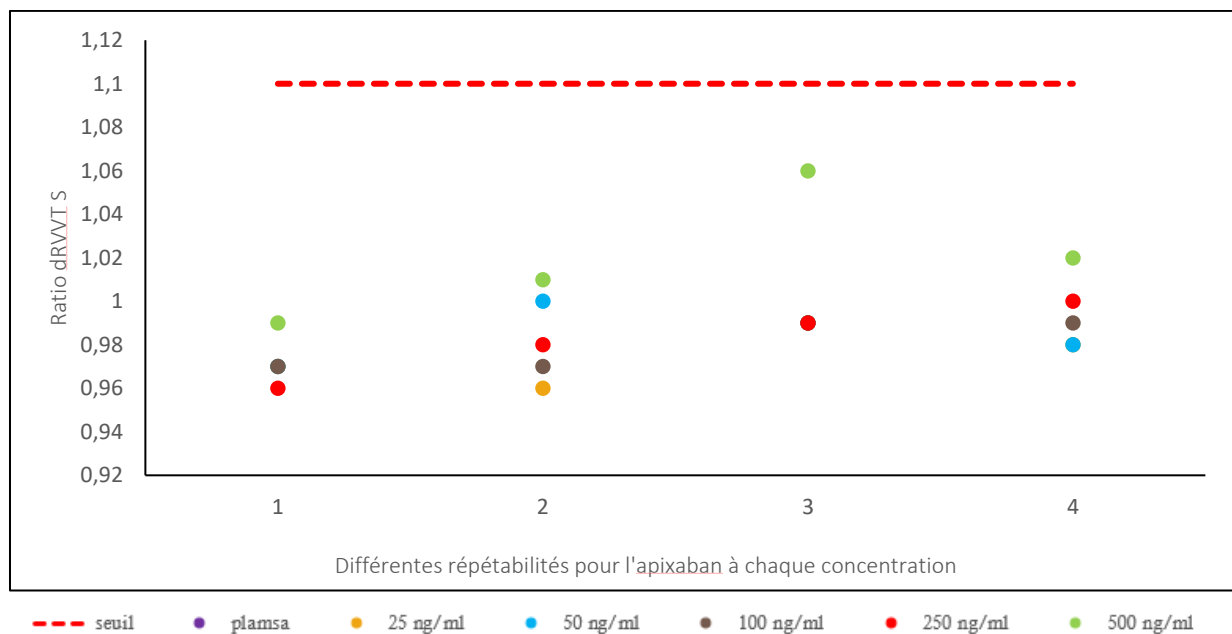


Figure 52 : Dispersion des différents ratios de dRVVT-S M/T, en nuage de points, obtenues à différentes concentrations en apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 après AC

### 3.7.4 dRVVT-c

A des concentrations d'apixaban inférieures à une concentration mesurée à 99 ng/ml il n'a pas été trouvé de différence significative de l'apixaban sur l'allongement du dRVVT-c par rapport à un plasma témoin [Figure 53].

Néanmoins le ratio normalisé (ratio dRVVT-S/ratio dRVVT-c) est positif dès 45 ng/ml en apixaban.

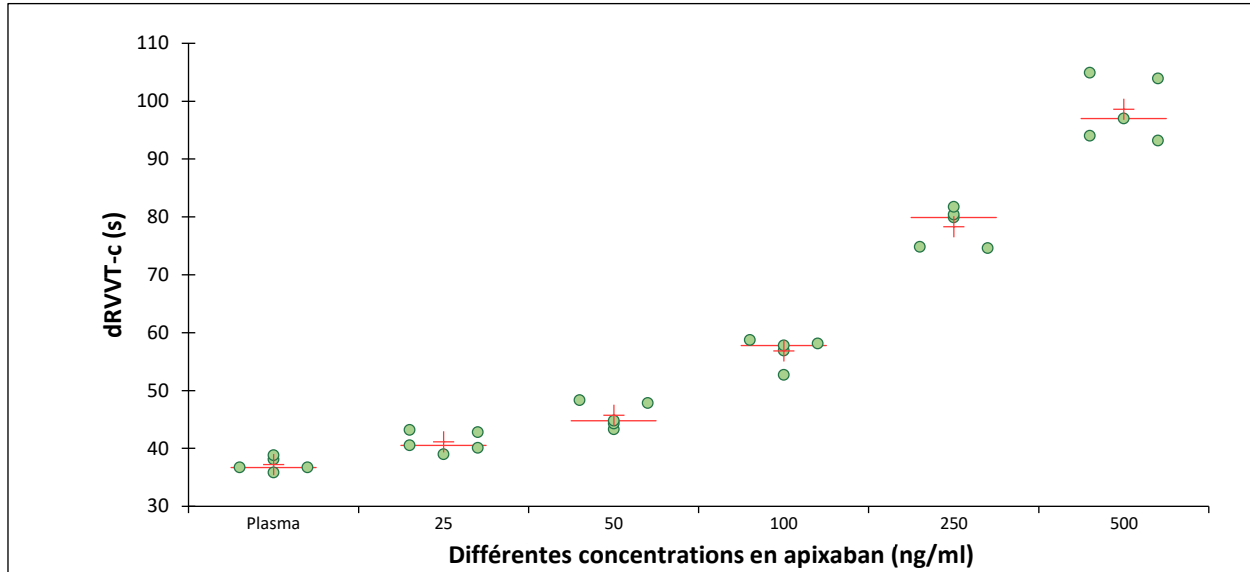


Figure 53 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité avant charbon

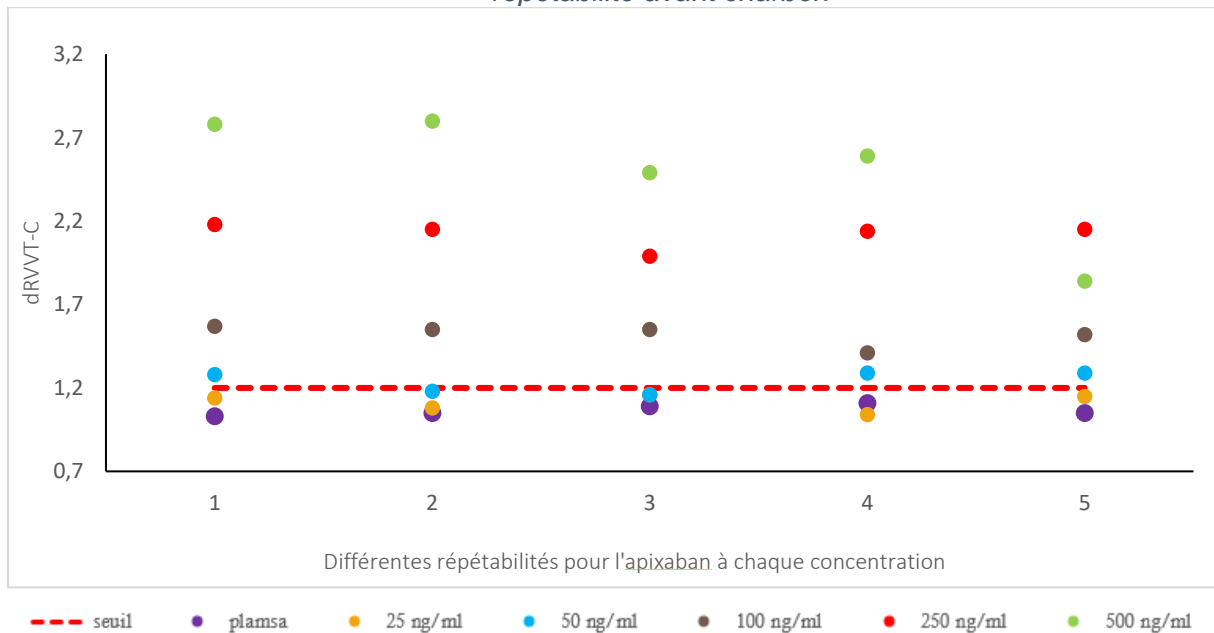


Figure 54 : Dispersion de points des différents ratios de dRVVT-c M/T obtenues à différentes concentrations en apixaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC

Après Ajout de charbon actif, les temps dRVVT-c mesurés sont significativement non différents par rapport à un plasma témoin et les ratios normalisés négatifs, pour un total de 3 répétabilités [Annexe 7][Figure 55].

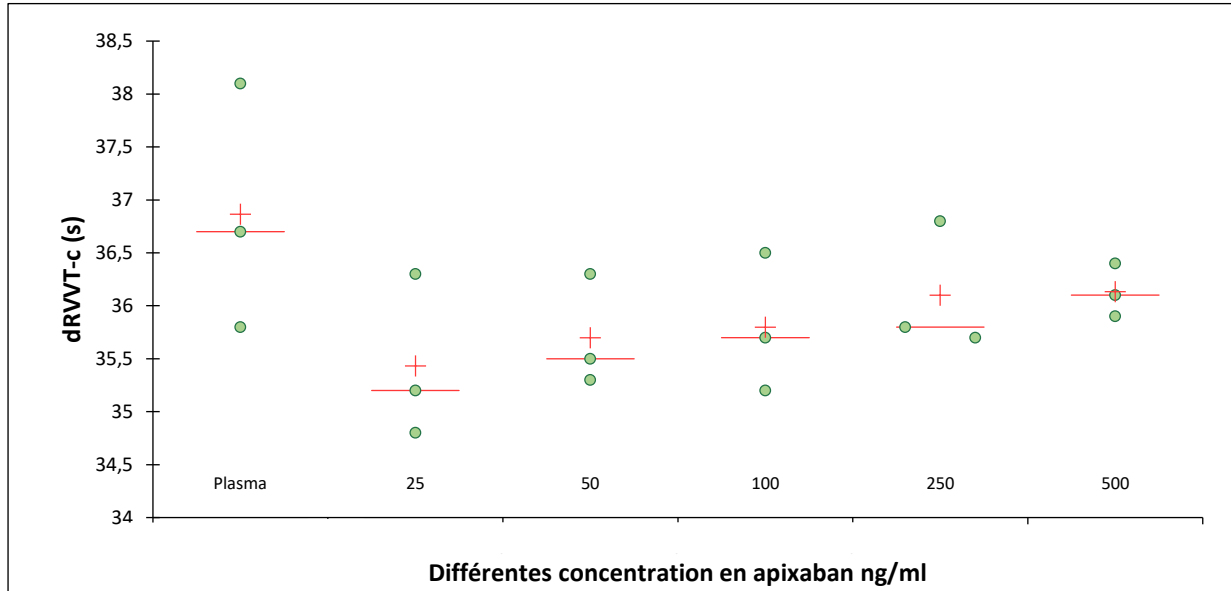


Figure 55 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité après charbon

### 3.7.5 Protéine S

A des concentrations d'apixaban inférieures à une concentration mesurée à 99 ng/ml il n'a pas été démontré de différence significative de l'apixaban sur l'activité de la protéine S par rapport à un plasma témoin. L'apixaban a pour effet de surestimer la protéine S [Figure 56].

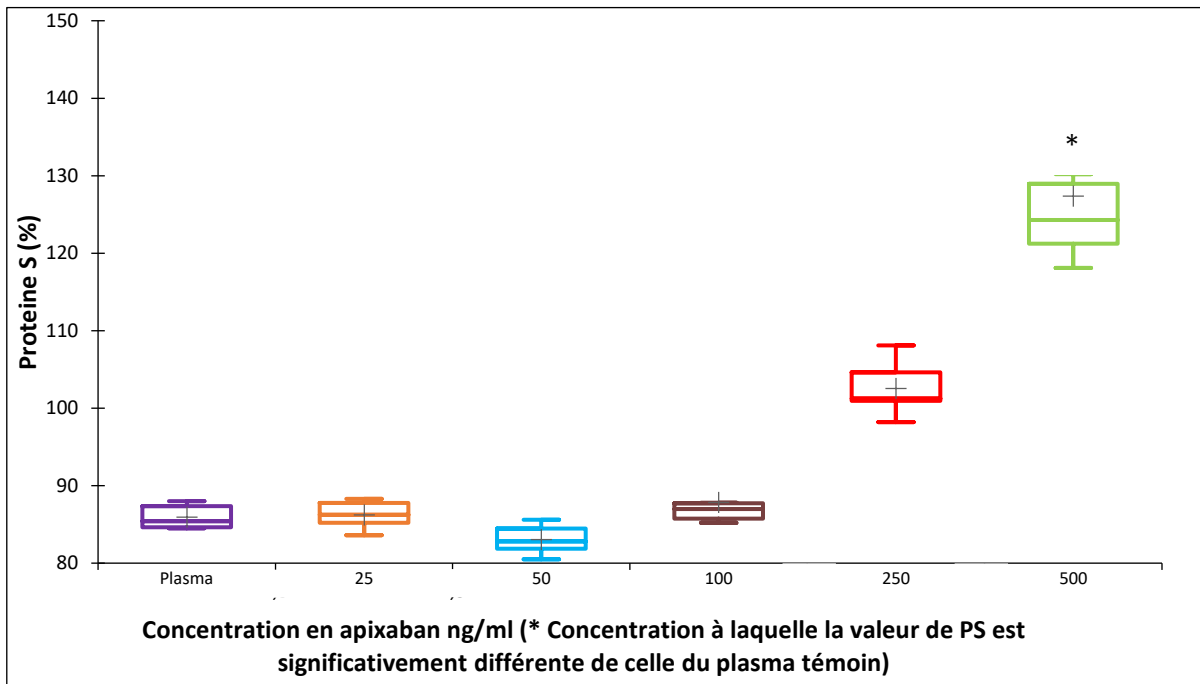


Figure 56 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine S avant ajout de charbon actif (AC)

Après ajout du charbon, il n'a été observé aucune différence significative de taux de PS par rapport au plasma témoin sur un total de 3 répétabilités [Annexe 7] [Figure 57].

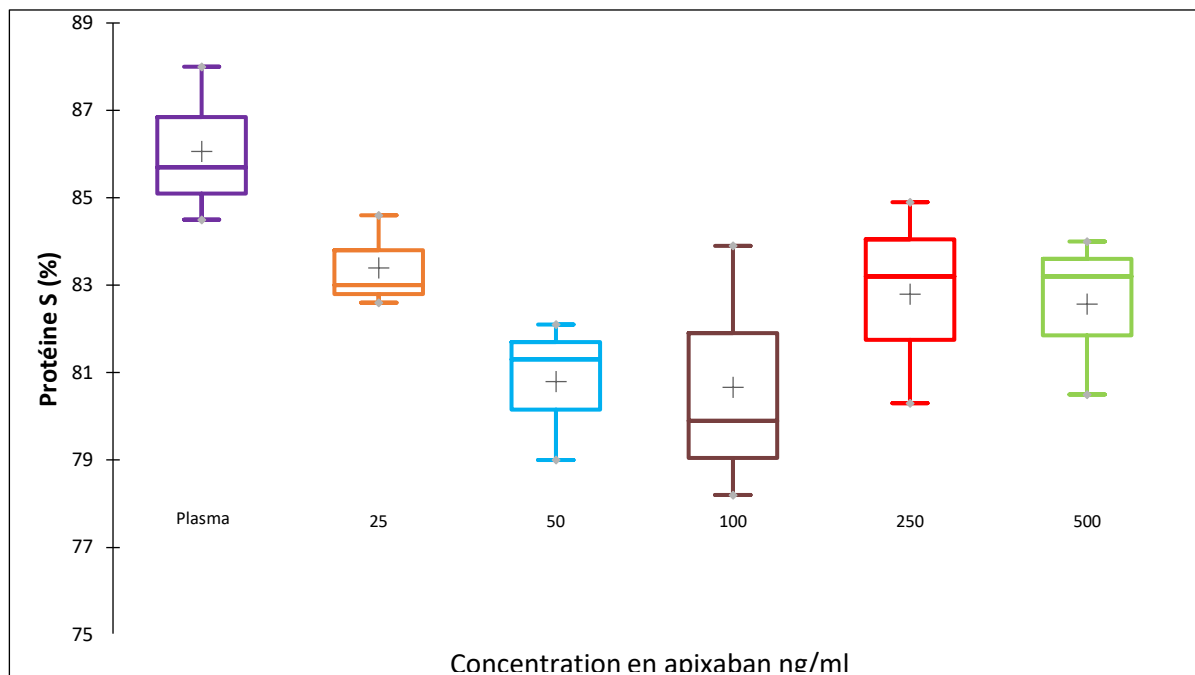


Figure 57 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine S après ajout de charbon actif (AC)

### 3.7.6 Protéine C

A des concentrations d'apixaban inférieures à une concentration mesurée à 293.6 ng/ml il n'a pas été démontré de différence significative de l'apixaban sur l'activité de la protéine C par rapport à un plasma témoin. L'apixaban surestime l'activité de la protéine C sur un total de 4 répétabilités [Figure 58]

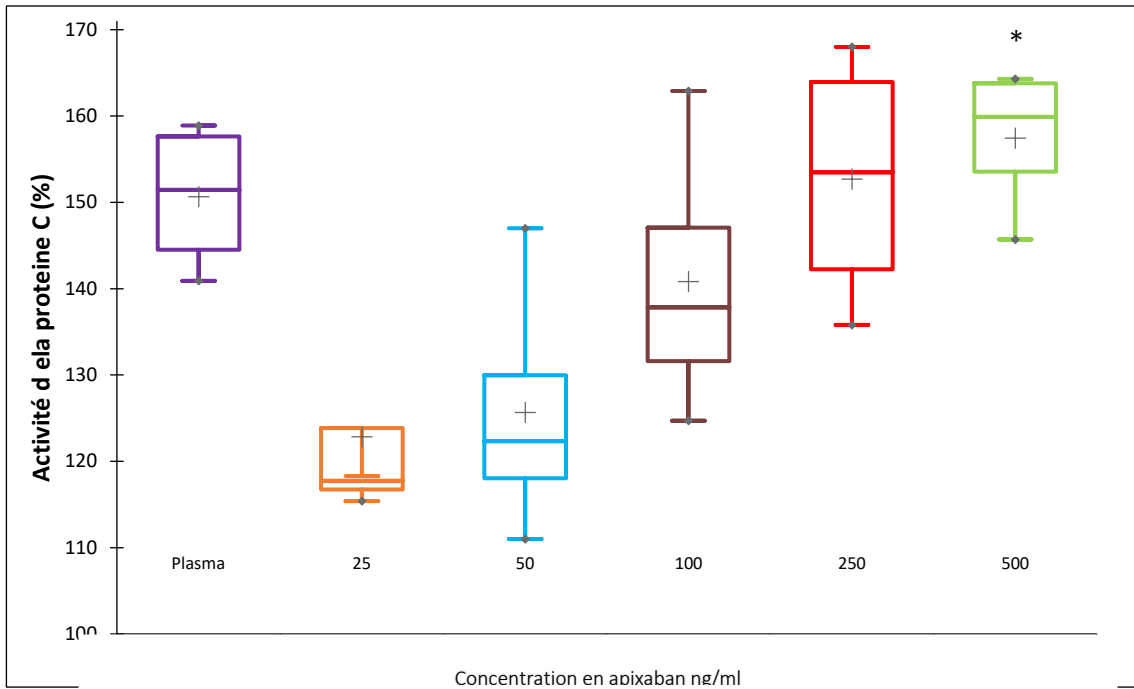


Figure 58 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine C avant ajout de charbon actif (AC)

Après ajout du charbon, il n'a été observé aucune différence significative de taux de PC par rapport au plasma témoin sur un total de 4 répétabilités [Figure 59] [Annexe 7].

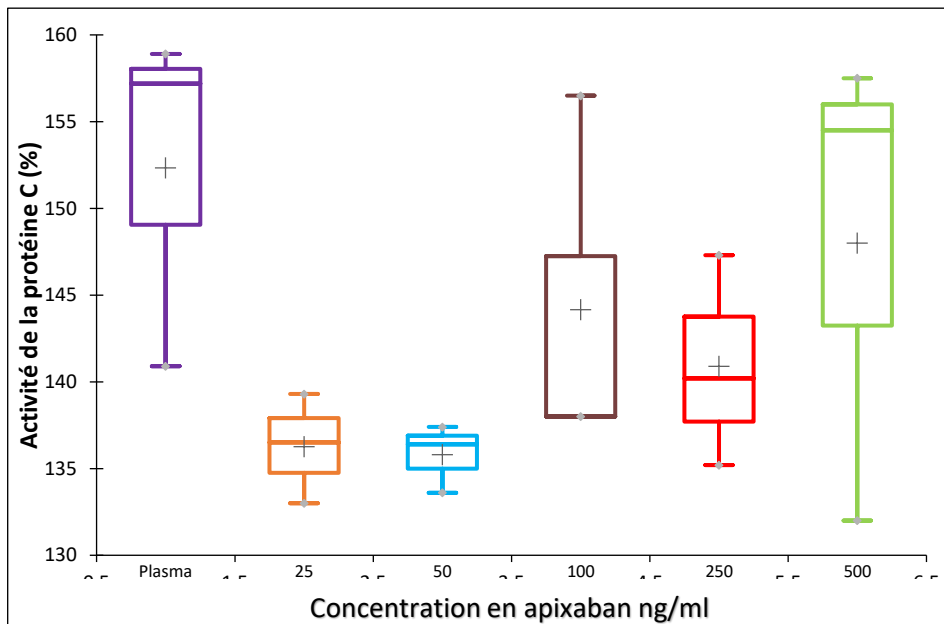


Figure 59 : Représentation en Box-plots de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine C après ajout de charbon actif (AC)

### 3.8 Effet du rivaroxaban sur l'hémostase spécialisé

#### 3.8.1 Antithrombine

A des concentrations en rivaroxaban inférieures à une concentration mesurée à 50.8 ng/ml on ne démontre pas de différence significative du rivaroxaban sur l'activité de l'antithrombine par rapport à un plasma témoin [Annexe 8].

Une corrélation proportionnelle de l'activité de l'antithrombine a été observée avec les concentrations en rivaroxaban ( $R^2 = 0.90$ ). Le rivaroxaban a pour effet de surestimé le taux de l'antithrombine [Figure 60]

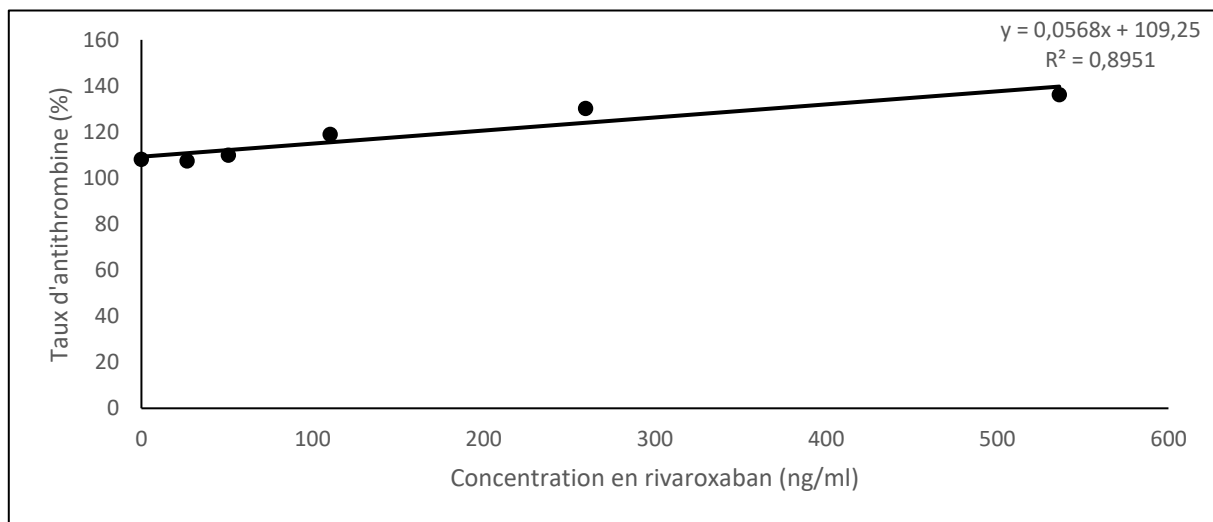


Figure 60 : Courbe de corrélation des moyennes des 6 répétibilités de l'AT pour chaque concentration en concentration en rivaroxaban

Après ajout du charbon on retrouve des taux significativement non différents des taux du plasma témoin pour l'activité de l'antithrombine [Figure 61] [Annexe 8].

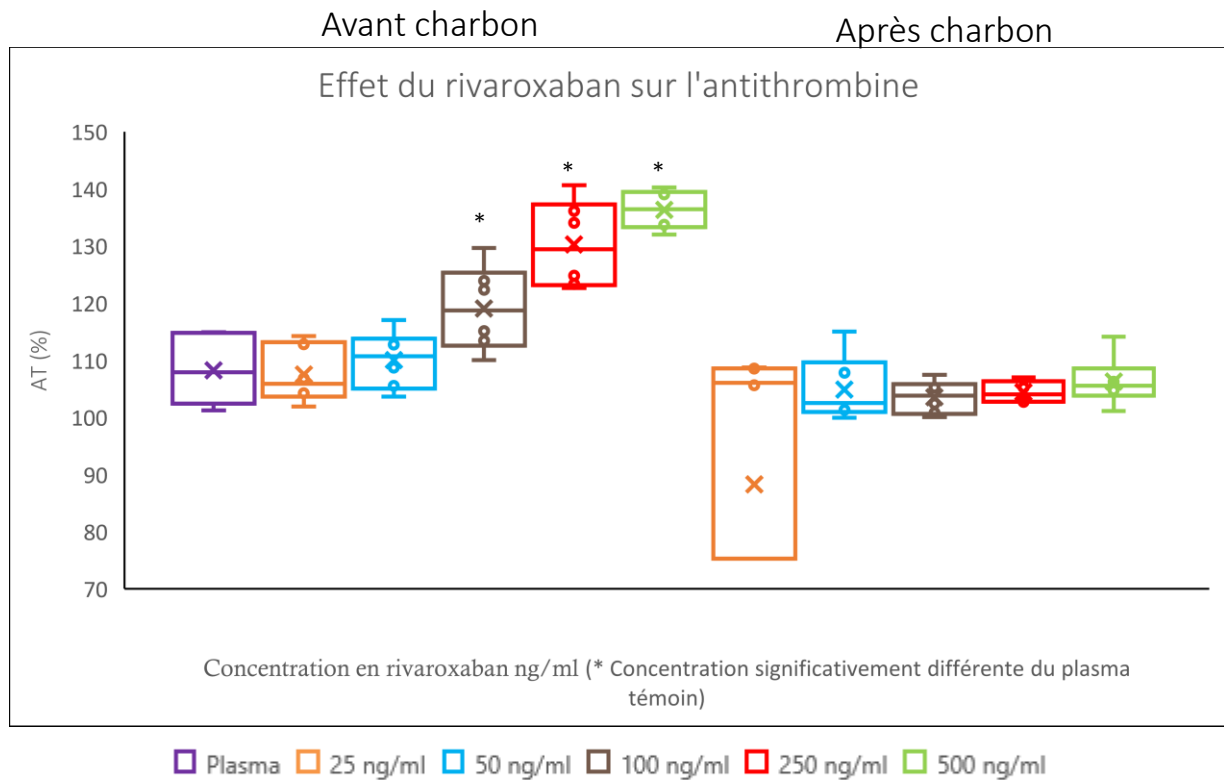


Figure 61 : Représentation en Box-plots de l'effet de le rivaroxaban sur la mesure de l'AT avant et après ajout de charbon actif (AC)

### 3.8.2 APTT-SP

A des concentrations de rivaroxaban inférieures à une concentration mesurée 24 ng/ml il n'a pas été démontré de différence significative du rivaroxaban sur l'allongement du APTT-SP par rapport à un plasma témoin, sur un total de 6 répétabilités.

Néanmoins la positivité de ce test est interprétée par le ratio APTT-SP (M (plasma avec rivaroxaban) /T) s'il est supérieur à 1.2 il est donc positif.

Le ratio est positif sur la moitié (50%) des répétabilités obtenues à des concentrations en rivaroxaban de 102 à 550 ng/ml (tous les points au-dessus de la ligne rouge représentant le seuil) [Figure 62] [Annexe 8].



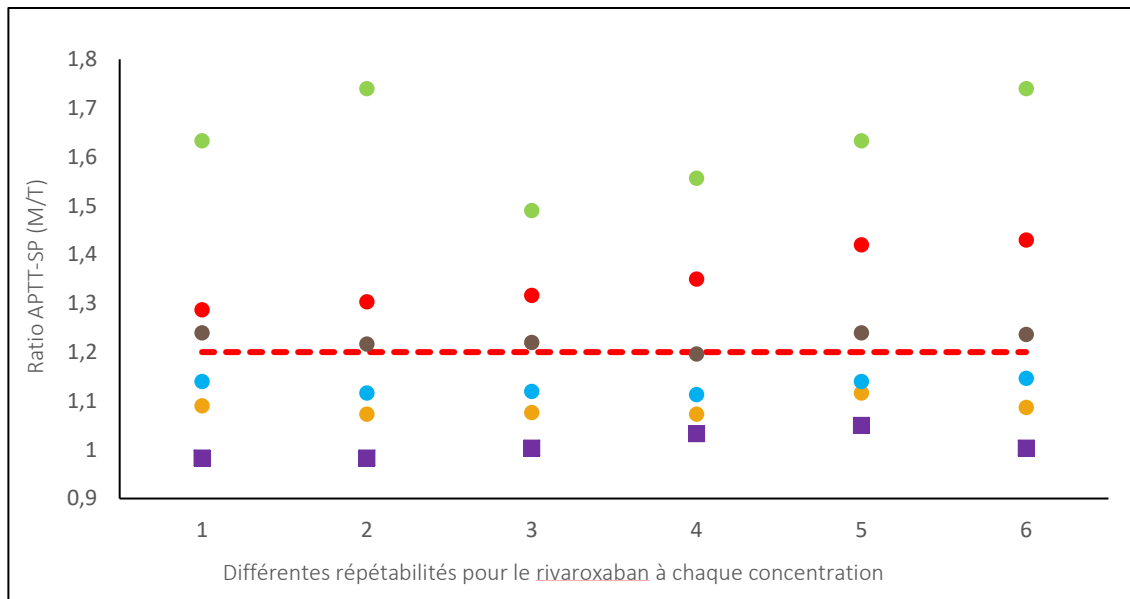


Figure 62 : Dispersion des points des différents ratio du APTT-SP (M/T) obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC

Pour les valeurs ayant un ratio positif ou faiblement positif, on poursuit les investigations en mesurant le APTT-SP du mélange plasma témoin + plasma malade comme vu précédemment.

Après le mélange (M+T), l'indice de Rosner reste positif que pour les concentrations de 293.6ng/ml à 550ng/ml (points bleu et vert au-dessus du seuil). Donc le mélange (M+T) ne permet pas de s'affranchir de l'effet du rivaroxaban sur le APTT-SP **[Figure 63]**.

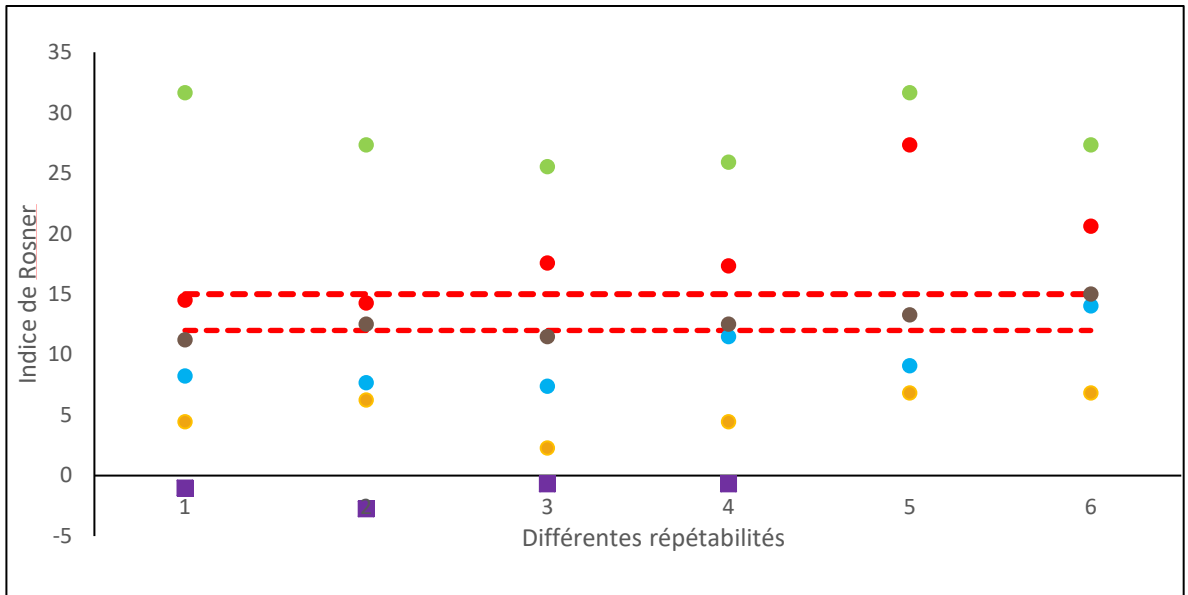


Figure 63 : Dispersion de points des différents indices de Rosner obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité de l'indice de Rosner 15 avant AC

Après Ajout de charbon actif, il a été retrouvé des temps de APTT-SP significativement non différents du plasma témoin sur un total de 4 répétabilités. Ainsi comme le ratio M/T est dans tous les cas <1.2, l'indice de Rosner n'a pas été calculé [Figure 64].

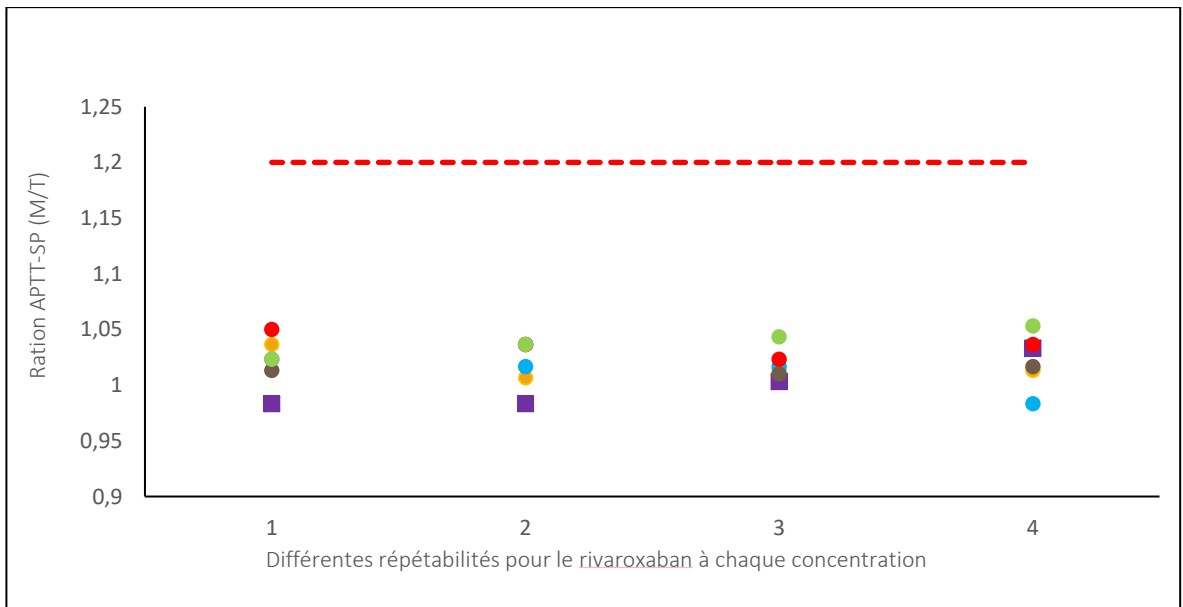
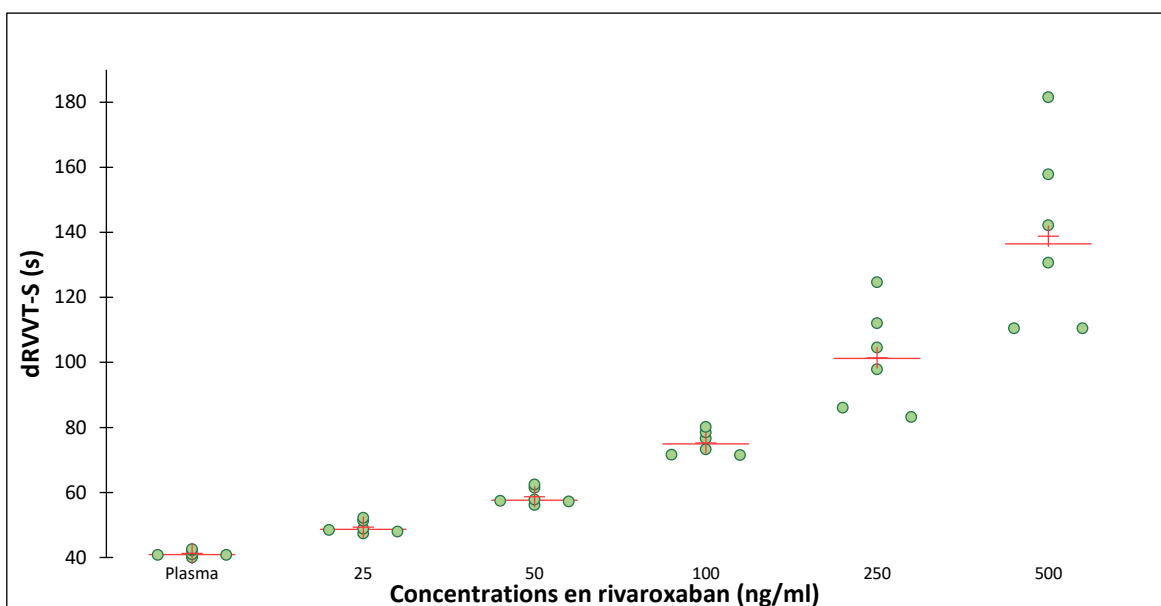


Figure 64: Dispersion de points des différents ratios du APTT-SP M/T obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.2 avant AC

### 3.8.3 dRVVT-S

A des concentrations de rivaroxaban inférieures à une concentration mesurée 43 ng/ml il n'a pas été retrouvé de différence significative du rivaroxaban sur l'allongement du dRVVT-S par rapport à un plasma témoin sur un total de 6 répétabilités. **[Figure 65].**



*Figure 65: Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité avant charbon*

Le ratio dRVVT-S M/T est positif (1.3.3.1.2.), dès la plus faible concentration en rivaroxaban (24 ng/ml) **[Figure 65] [Annexe 8].**

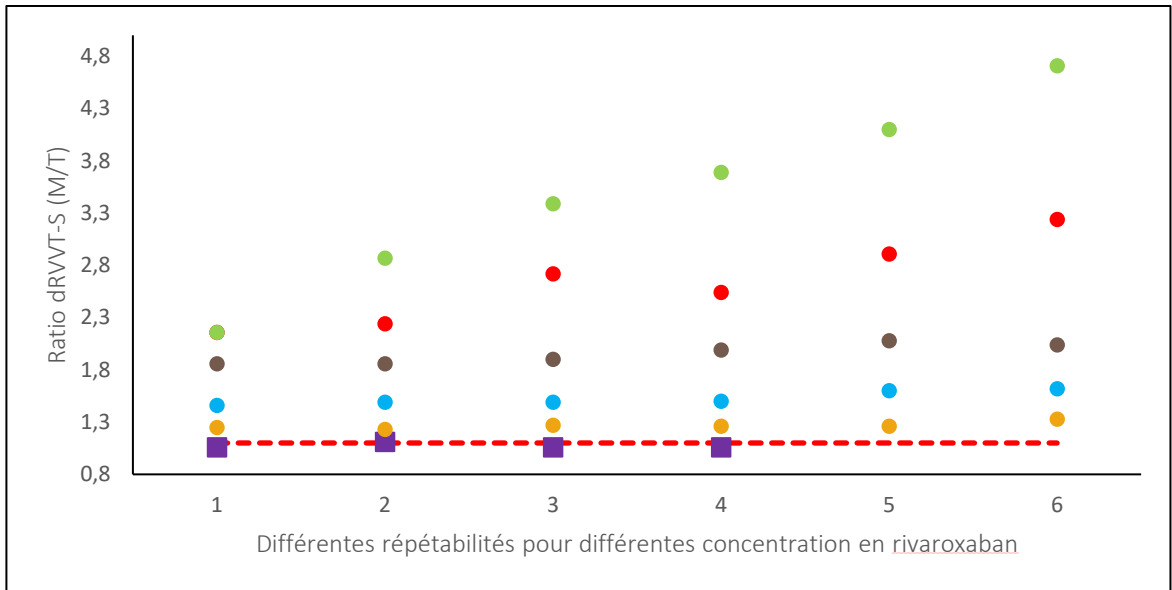


Figure 66 : : Dispersion des points des différents ratios de dRVVT-S M/T obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 avant AC

Après Ajout de charbon actif il a été retrouvé des temps de APTT-SP significativement non différents du plasma témoin et le ratio est négatif, sur un total de 4 répétibilités[Figure 67] [Annexe 8]. [Annexe 8].

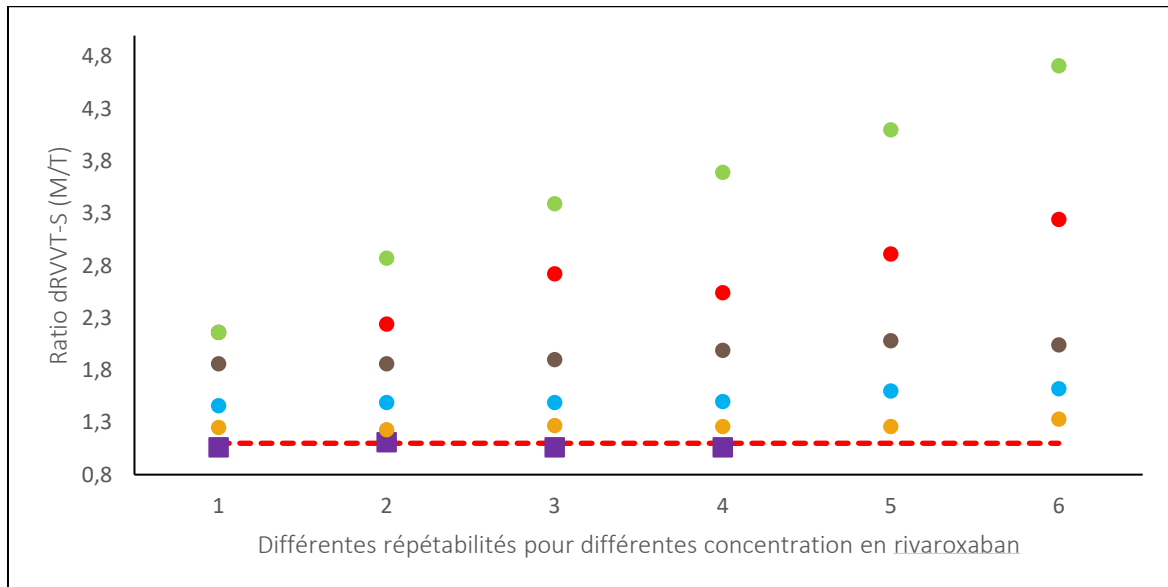


Figure 66 : : Dispersion des points des différents ratios de dRVVT-S M/T obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 avant AC

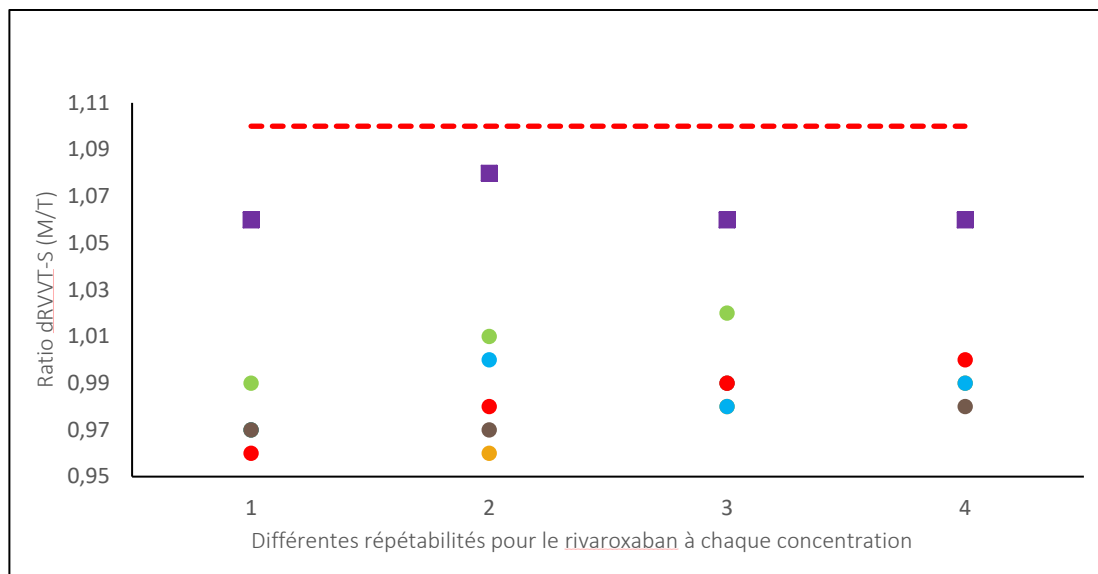


Figure 67 : Dispersion en nuage de points des différents ratios de dRVVT-S M/T obtenues à différentes concentrations en rivaroxaban par rapport à la droite (en rouge) représentant le seuil de positivité à 1.10 après AC

### 3.8.4 dRVVT-c

A des concentrations mesurées en rivaroxaban inférieures à 102 ng/ml il n'a pas été démontré de différence significative du rivaroxaban sur l'allongement du dRVVT-c par rapport à un plasma témoin sur un total de 6 répétibilités [Figure 68].

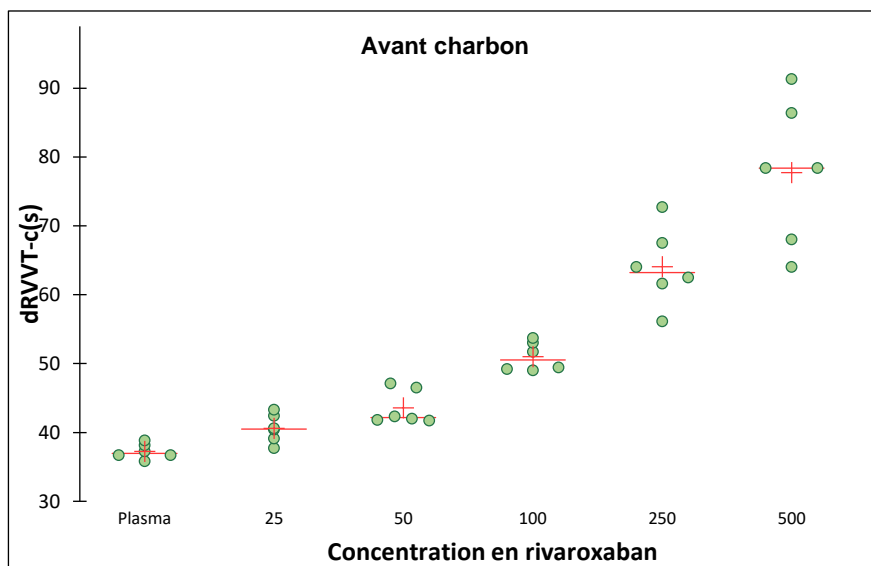


Figure 68 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité avant charbon

Néanmoins le ratio normalisé (ratio dRVVT-S/ratio dRVVT-c) est positif dès 43 ng/ml en rivaroxaban.

Après Ajout de charbon actif il a été retrouvé des temps dRVVT-c significativement non différents par rapport à un plasma témoin et les ratios normalisés sont négatifs sur un total de 4 répétabilités **[Figure 69**Erreur ! Source du renvoi

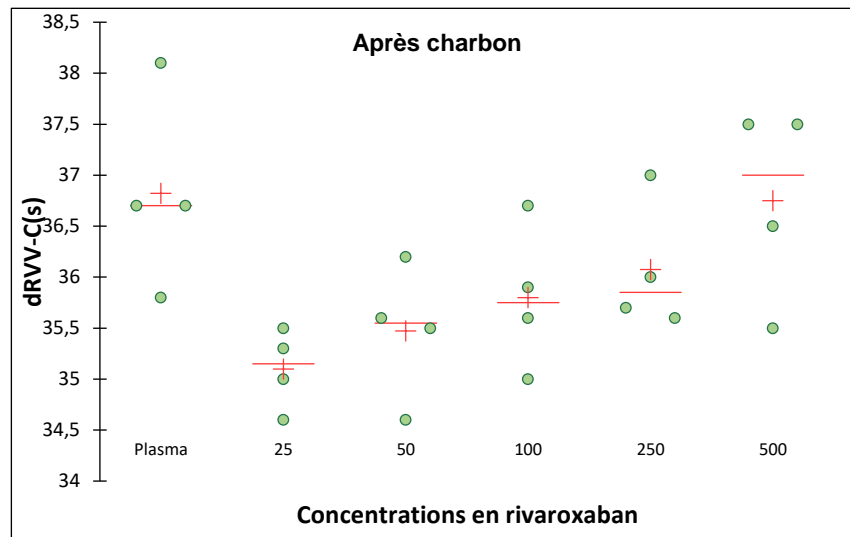


Figure 69 : Distribution des points selon la moyenne obtenue du dRVVT-c pour chaque répétabilité après charbon

introuvable.] **[Annexe 8].**

### 3.8.5 Protéine S

A des concentrations de rivaroxaban inférieures à une concentration mesurée 102 ng/ml il n'a pas été démontré de différence significative de rivaroxaban sur l'activité de la protéine S par rapport à un plasma témoin sur un total de 6 répétabilités.

Le rivaroxaban a pour effet de surestimer la protéine S **[Figure 70]**

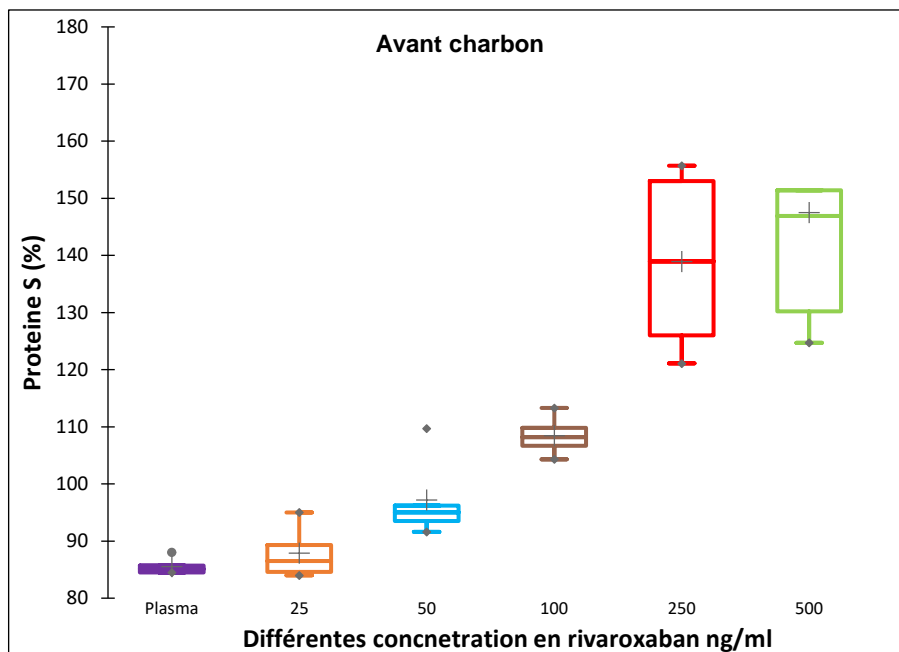


Figure 70 : Représentation en box-plot de l'effet du rivaroxaban sur l'activité de la protéine S avant ajout de charbon actif (AC)

Après ajout du charbon il a été retrouvé des concentrations significativement non différentes des concentrations du plasma témoin pour l'activité de la protéine S sur un total de 3 répétabilités [Figure 71][Annexe 8].

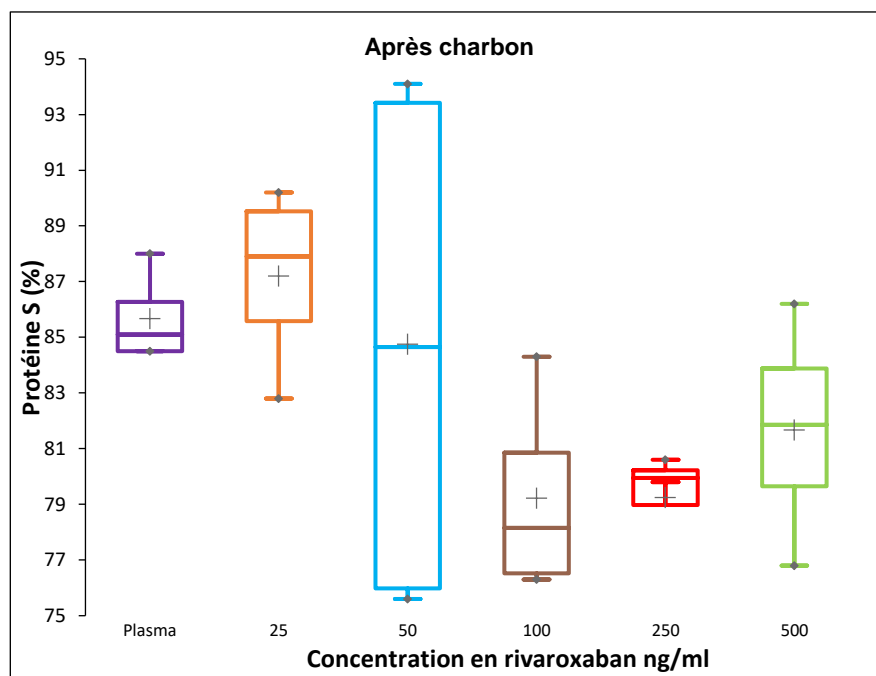


Figure 71 : Représentation en box-plot de l'effet du rivaroxaban sur l'activité de la protéine S après ajout de charbon actif (AC)

### 3.8.6 Protéine C

A des concentrations de rivaroxaban inférieures à une concentration mesurée à 200.25 ng/ml il n'a pas été démontré de différence significative du rivaroxaban sur l'activité de la protéine C par rapport à un plasma témoin sur un total de 6 répétabilités **[Figure 72]**.

Le rivaroxaban a pour effet de surestimer la protéine C.

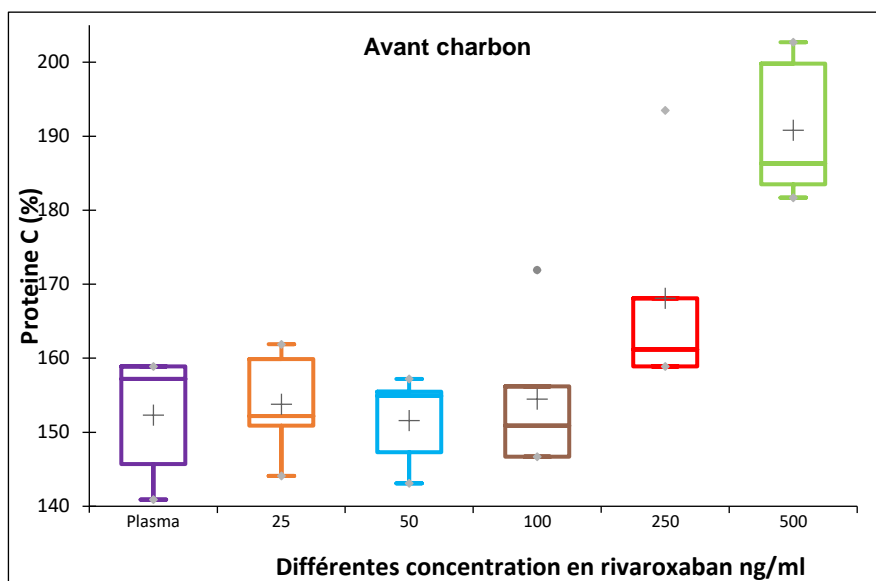


Figure 72 : Représentation en box-plot de l'effet de l'apixaban sur l'activité de la protéine C avant ajout de charbon actif (AC)

Après ajout du charbon il a été retrouvé des concentrations significativement non différentes des concentrations du plasma témoin sur un total de 4 répétabilités **[Figure 73] [Annexe 8]**.



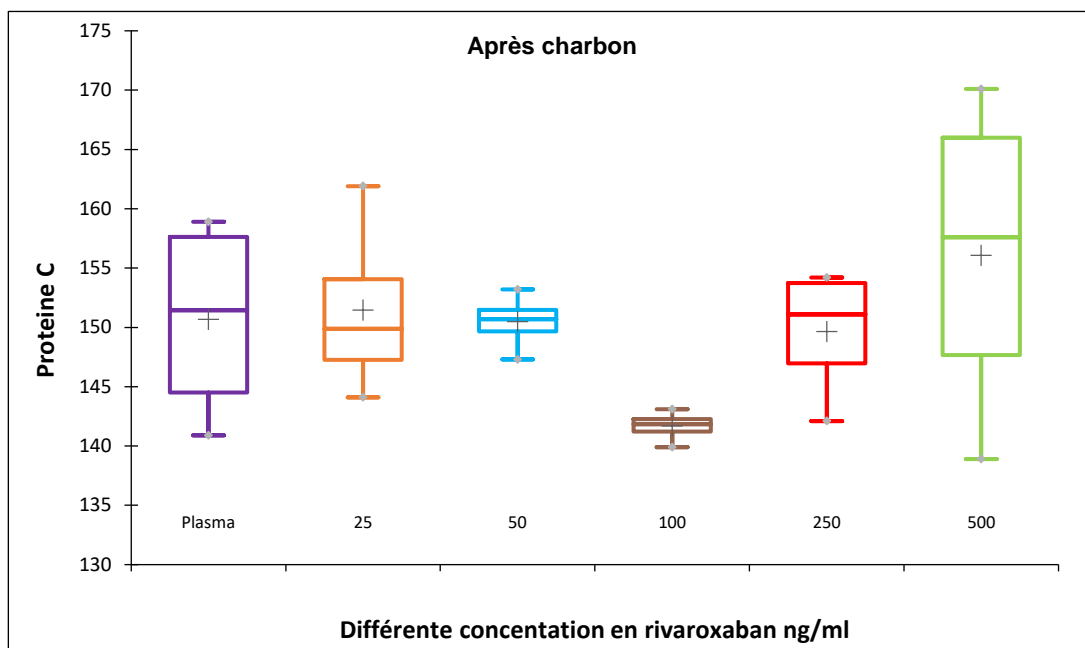


Figure 73 : Représentation en box-plot de l'effet du rivaroxaban sur l'activité de la protéine C après ajout de charbon actif (AC)

### 3.9 Comparaison de l'effet apixaban versus rivaroxaban

#### 3.9.1 Test réalisé sur l'Atellica® COAG 360 :

L'impact des interférences induites aux différents tests d'hémostase réalisés sur l'Atellica® COAG 360 s'est révélé plus marqué pour le rivaroxaban que pour l'apixaban, et il est proportionnel aux concentrations d'anticoagulants oraux directs (AOD) [ Figure 74- Figure 75 ].

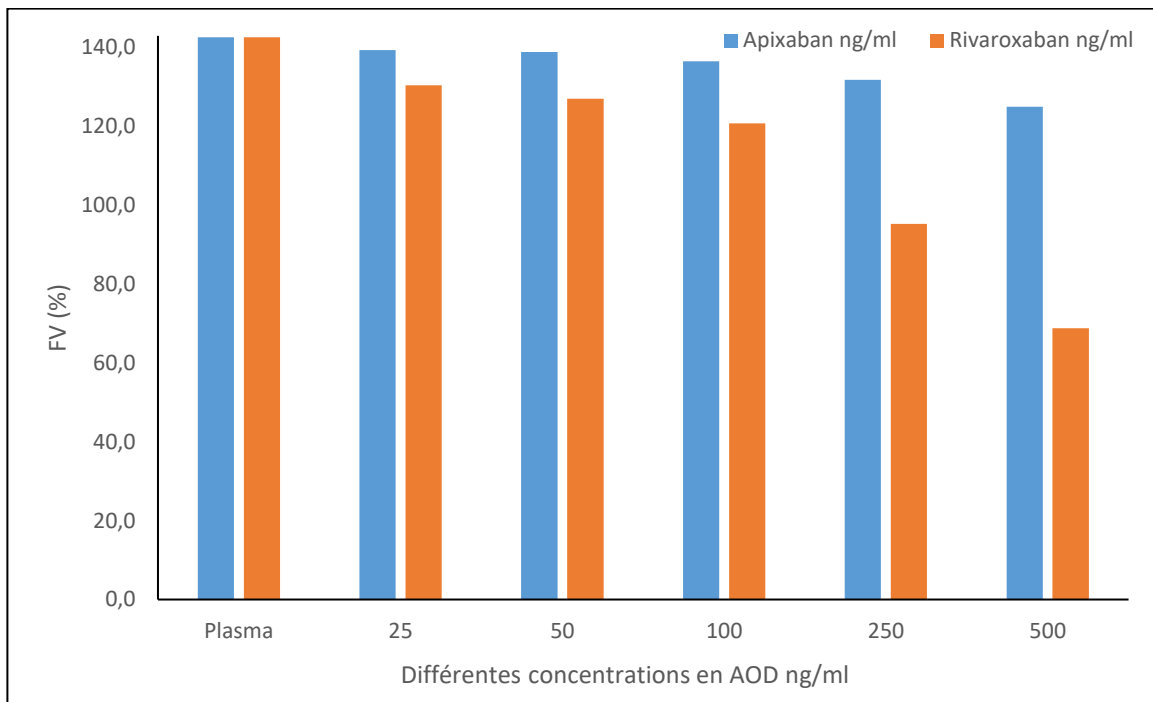


Figure 74 : Impact du rivaroxaban et apixaban à différentes concentrations sur la mesure du taux de FV (%)

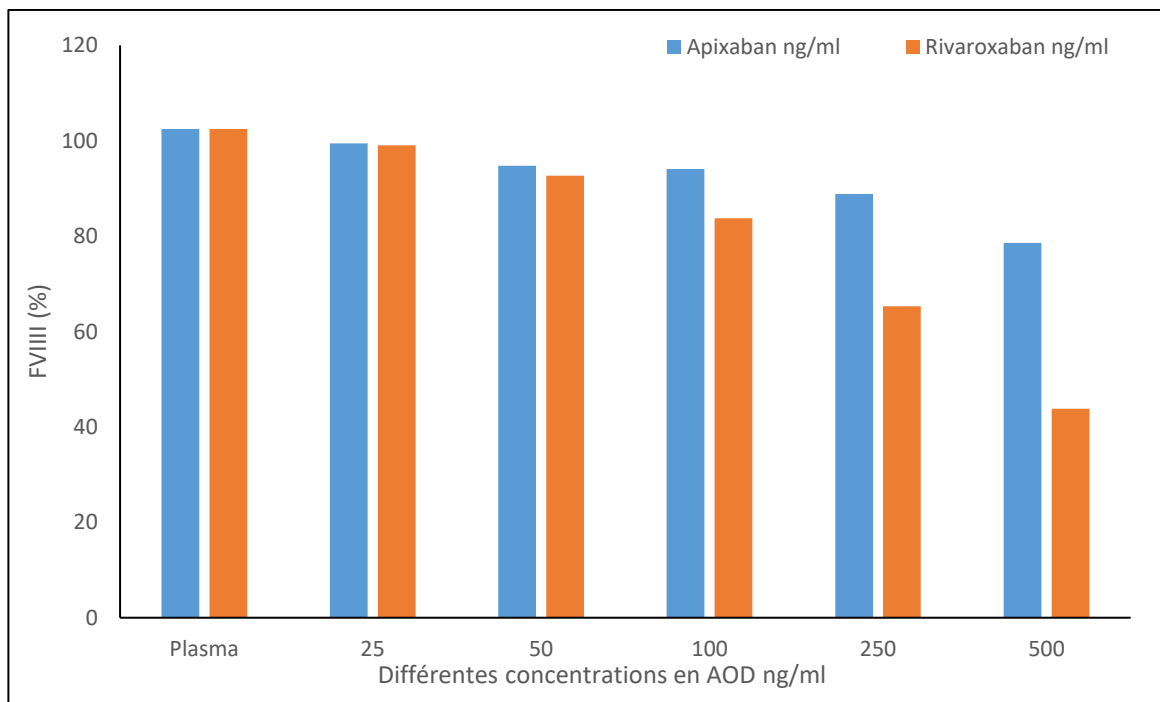


Figure 75 : Impact du rivaroxaban et apixaban à différentes concentrations sur la mesure du taux de facteur FVIII (%)

### 3.9.2 Test réalisé sur ACL-TOP® 970 :

En ce qui concerne les tests effectués pour détecter la présence de l'anticoagulant lupique (LA), l'interférence est plus marquée avec le rivaroxaban qu'avec l'apixaban.

Il a été observé des résultats faussement positifs (c'est-à-dire des valeurs dépassant le seuil de positivité) dans tous les tests de recherche de LA, pour l'apixaban ou rivaroxaban [Figure 76].

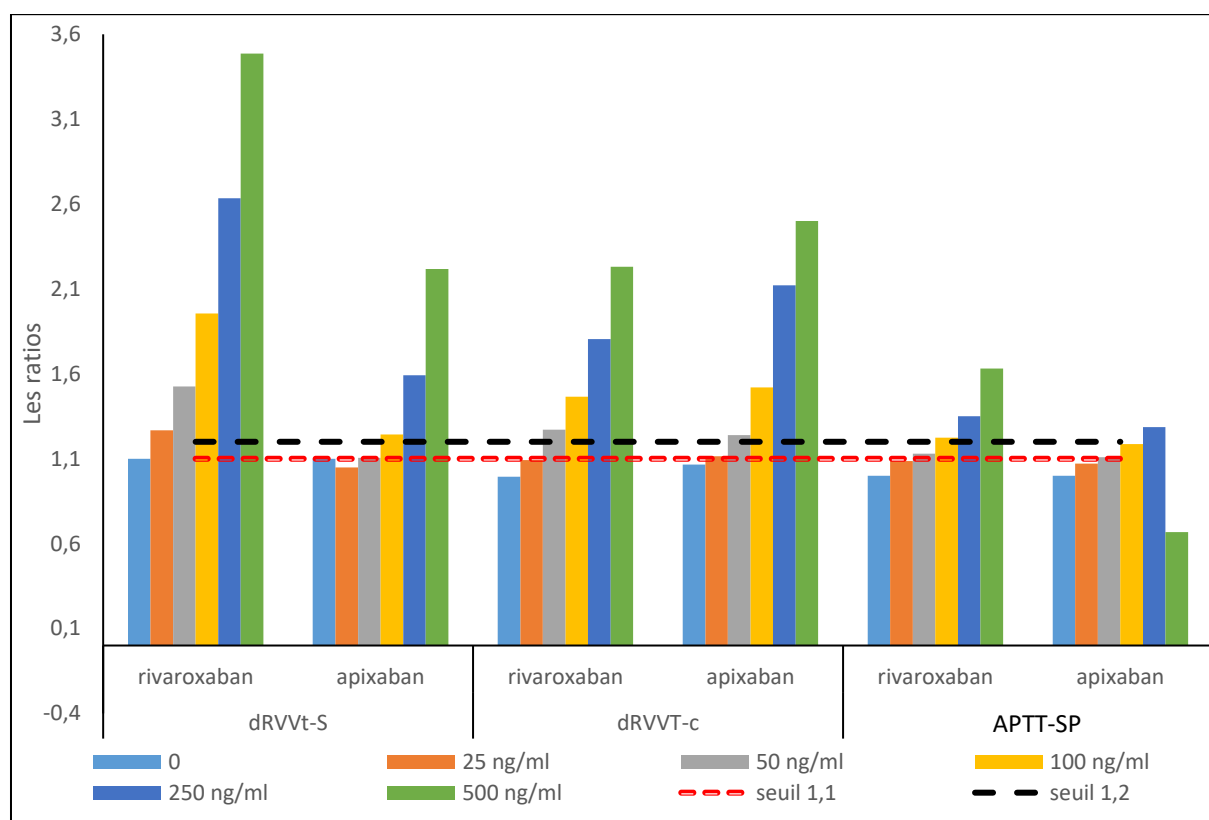


Figure 76 : Histogrammes groupés en fonction des différentes analyses de dépistage de LA : dRVVt-S, dRVVt-c et APTT-SP comparés entre l'apixaban et le rivaroxaban à différentes concentrations en (représentation en histogramme de la moyenne des mesures de chaque répétabilité obtenue pour chaque concentration)

Les taux d'activité des protéines C et S, mesurés par le biais du test de coagulation, étaient influencés par les concentrations de rivaroxaban et d'apixaban et présentaient une corrélation proportionnelle significative [Figure 77].

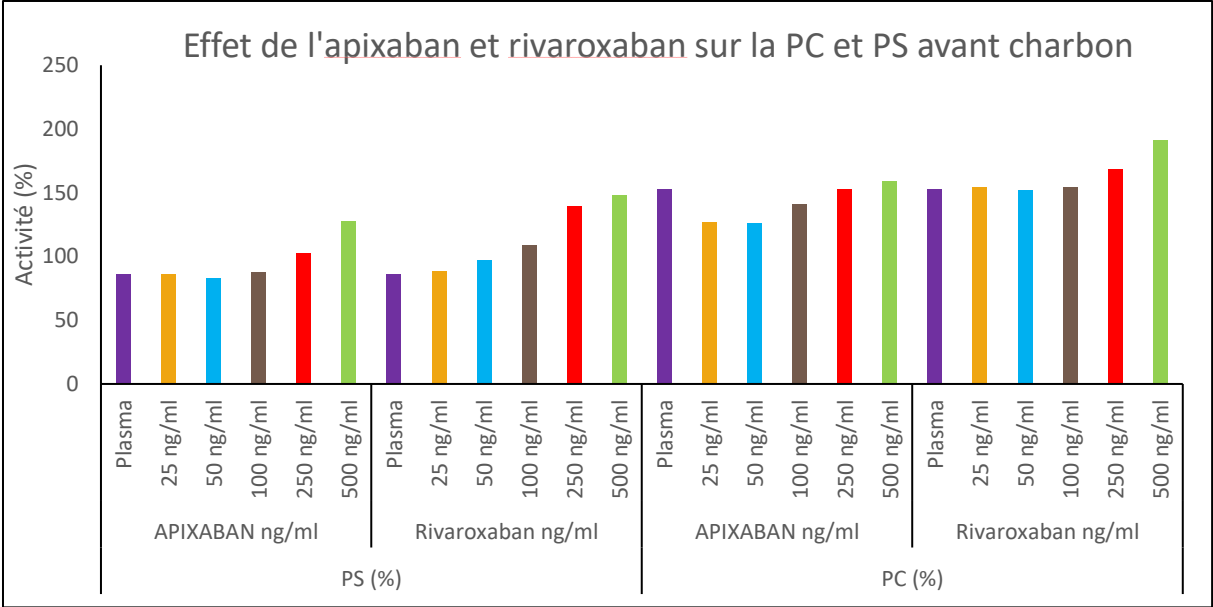


Figure 77 : Impact du rivaroxaban et apixaban à différentes concentrations sur la mesure de la PS et PC (%)

## 4 DISCUSSION ET PERSPECTIVE

Cette étude a révélé plusieurs résultats significatifs. Tout d'abord, conformément aux conclusions précédemment rapportées dans la littérature (54), il a été constaté un allongement du temps de céphaline activée (TCA) ainsi qu'une sous-estimation des taux de facteur V (FV), facteur VIII (FVIII) et prothrombine (TP) lors des tests d'hémostase de routine. L'impact de cette interférence s'est révélé plus marqué pour le rivaroxaban que pour l'apixaban, et il est proportionnel aux concentrations d'anticoagulants oraux directs (AOD).

De plus, d'autres études antérieures ont également signalé une interférence des AOD avec différents réactifs, y compris ceux utilisés au laboratoire du CHU de Caen, pour mesurer le TP et le TCA dans des échantillons de plasma contenant diverses concentrations d'apixaban et de rivaroxaban (50).

En ce qui concerne le rivaroxaban une baisse significative a été observée dès la plus faible concentration (25ng/ml), à noter que le facteur VIII baisse à des taux <50%.

Néanmoins, il est important de noter que, même avec la concentration la plus élevée d'apixaban (550 ng/ml), nous n'avons pas observé de taux de facteurs (V et VIII) inférieurs à 50%. Cette constatation suggère que nous pouvons établir le taux de facteur V si la concentration en apixaban est inférieure à 100 ng/ml (concentration à laquelle aucune différence significative n'a été observée par rapport à un plasma témoin est de  $p=0.39$ ) (63).

Deuxièmement en ce qui concerne l'hémostase spécialisé, l'antithrombine (AT) dont le réactif Innovance® utilisé au CHU de Caen, est un test basés sur l'anti-Xa. En conséquence, comme attendu il est affecté par l'apixaban et le rivaroxaban de manière proportionnelle à leur concentration plasmatique en particulier lorsque ces derniers dépassent les 100 ng/mL. En revanche, il est important de souligner qu'il existe d'autres tests pour quantifier l'AT qui eux sont basés sur les anti-IIa chez Stago Stachrom et Siemens Berichrom, et selon la littérature ces tests ne sont pas affectés par le rivaroxaban et l'apixaban (64).

L'activité de la protéine C et protéine S mesurée à l'aide du test de coagulation dépendait des concentrations de rivaroxaban et d'apixaban et présentait une corrélation proportionnellement significative (65). Cependant, là encore, l'apixaban a

montré une interférence moins importante par rapport au rivaroxaban. Dans les études de Bonar et al et Gosselin R et al, les inhibiteurs du FXa induisaient une activité PS et PC faussement élevée (54,66). Dans les résultats de cette thèse, quelques valeurs aberrantes ont été identifiées. Elles ont été exclues, notamment pour les dosages des protéines S et C, en raison de la faible stabilité dans le temps des réactifs utilisés (2 heures). La simultanéité des dosages pour plusieurs échantillons de la série d'hémostase spécialisée n'a pas permis de respecter le temps de stabilité requis pour chaque réactif.

Néanmoins il existe d'autres méthodes de mesure pour la PC et PS : méthode chromogénique et antigénique, selon la littérature ces méthodes ne sont pas perturbées par les AOD (66,67).

Concernant les tests effectués pour le dépistage de LA, on remarque toujours une interférence plus marquée pour le rivaroxaban que pour l'apixaban. Des résultats faussement positifs pour tous les tests de recherche de LA (APTT-SP, dRVVT-S, dRVVT-c et rapport normalisé dRVVT-c) ont été observés quel que soit l'AOD (apixaban ou rivaroxaban) (32).

Les résultats de ce travail ont montré que les xabans avaient un impact plus élevé sur le test de dépistage dRVVT par rapport au ratio APTT-SP. Le nombre de valeurs faussement positives était obtenu à des concentrations plus faibles pour le dépistage dRVVT que pour le ratio APTT-SP et ceci quel que soit l'AOD pris en compte (68).

Ces observations concordent avec les publications récentes montrant que le dépistage dRVVT est le test le plus sensible à la présence des AOD (54,69).

La troisième partie traite des résultats utilisant un neutralisant commercial d'AOD, DOAC Stop™, utilisé conformément aux recommandations du fabricant. Les résultats obtenus sans ce travail montrent que l'agent adsorbant DOAC Stop™ est très efficace pour rendre les AOD indétectables dans les différents plasmas testés même à des concentrations élevées 536.5, 578.5 ng/ml respectivement pour le rivaroxaban et apixaban.

Le DOAC-Stop™ a pu neutraliser significativement la fausse réduction induite par le rivaroxaban et l'apixaban permettant ainsi d'interpréter le FV et le FVIII et le faux allongement du TCA.

Toutefois il a été retrouvé une interférence aléatoire significative, du charbon sur la mesure du TP dans un plasma sans AOD avant et après AC et cela n'a pas été trouvé dans d'autres études. Cependant un effet secondaire procoagulant de l'AC, dont le mécanisme n'a pas été encore décrit, dans un plasma dépourvu d'AOD a déjà été décrit (67,70). L'explication avancée est une diminution du niveau d'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), ce mécanisme serait plus important quand le volume de plasma utilisé est faible (<1,0 ml), ce qui a été le cas dans nos tests.

DOAC-Stop™ a raccourci les temps de mesures pour l'APTT-SP, dRVVt-S et dRVVt-c rendant les temps proches du plasma témoin et les ratios négatifs.

L'efficacité du DOAC Stop™ a été plus documentée dans la littérature pour l'utilisation dans les bilans de thrombophilie que pour l'hémostase de routine (67,71–76). Un étude a également montré sa supériorité comparativement à l'andexanet alfa (63).

Les principales limites de ce travail comprennent le faible nombre d'échantillons testés. De plus, les résultats ne peuvent pas être généralisés à d'autres tests ou couples automate-réactifs.

Bien que l'utilisation d'un pool de plasma normal ne permette pas d'observer des différences interindividuelles dans la réponse aux agents adsorbants de l'AOD, c'est un modèle intéressant pour évaluer et comparer le profil des différentes concentrations d'anticoagulants.

Il peut être noté comme limite à cette étude l'utilisation de poudres d'AODs. En effet, les principes actifs purs du rivaroxaban et de l'apixaban peuvent avoir un comportement différent lors qu'ils sont ajoutés au plasma témoin comparativement à ce que l'on pourrait observer sur des plasmas de patients ayant consommés ces molécules per os. Cette différence pourrait s'observer aussi bien au niveau des tests d'hémostase qu'au niveau de l'interaction avec le CA. Cependant les études réalisées sur des plasmas de patients traités par AODs sont concordantes avec les résultats obtenus ici (67,71–76).

Ainsi au vu de ces premiers résultats, pour valider pleinement l'utilisation du charbon actif au CHU de Caen une étude utilisant des plasmas de patients traités par rivaroxaban ou apixaban paraît nécessaire.

À l'avenir, il serait pertinent d'envisager une évaluation visant à déterminer si les résultats sont influencés par le groupe sanguin des patients (77).

L'utilisation d'un neutralisant des AOD tel que DOAC-Stop™ est peu coûteuse et fournit une solution au laboratoire pour permettre une évaluation sûre des paramètres de routine (à l'exception du TP qui nécessite plus de données) et des paramètres du bilan de thrombophilie PC, PS et le LA. Cela permettrait de s'affranchir d'une fenêtre thérapeutique de 72 heures sans AOD pour la réalisation du bilan sans interférences en particulier dans le cadre des bilans de thrombophilie.



## 5 CONCLUSION

Ce travail a confirmé que le rivaroxaban et l'apixaban provoquent des interférences sur les tests chronométriques (TP, TCA, FV, FVIII, ACC). L'impact de l'AOD est dépendant de la molécule concernée, de sa concentration et du test de coagulation demandé.

Cette étude a permis de se rendre compte du faible impact de l'apixaban sur le FV, ce qui permettrait, à l'avenir, au laboratoire du CHU de Caen de communiquer le taux de facteur V si la concentration en apixaban est <100ng/ml (La concentration à laquelle aucune différence significative n'a été observée par rapport à un plasma témoin).

Cette interférence des AOD sur les paramètres de coagulation si elle n'est pas prise en compte peut conduire à des erreurs d'interprétation des bilans avec de possibles conséquences sur la prise en charge des patients

La procédure avec un adsorbant telle que le DOAC-Stop™ est apparue comme un moyen efficace et simple pour surmonter l'interférence des AOD sur les tests de coagulation dont la significativité statistique a été démontrée.

Ces résultats prouvent que le DOAC-Stop™ neutralise efficacement l'interférence induite par le rivaroxaban et l'apixaban même à des concentrations supra-thérapeutiques.

L'utilisation du charbon actif permet de réaliser un bilan de thrombophilie chez les patients traités par du rivaroxaban ou de l'apixaban sans nécessité de fenêtre thérapeutique. Cela offre une plus grande souplesse pour la réalisation de ce bilan et cela n'expose pas le patient au risque d'un arrêt de traitement.

Ces premiers résultats encourageants doivent être consolidés par la réalisation de tests sur des plasmas de patients traités par AOD avant une utilisation en routine.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

1. Legagneux R. Anticoagulants oraux directs (AOD): enquête sur la perception et l'usage des AOD auprès d'un échantillon de médecins généralistes français en 2014.
2. Cunningham GraemeM, Mcnicol GeorgeP, Douglas AS. EFFECT OF ANTICOAGULANT DRUGS ON PLATELET AGGREGATION IN THE CHANDLER'S TUBE. *The Lancet*. 3 avr 1965;285(7388):729-30.
3. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev*. 1 sept 2003;17:S1-5.
4. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. mars 2019;16(3):166-79.
5. Thieme E-Journals - Seminars in Thrombosis and Hemostasis / Abstract [Internet]. [cité 22 août 2023]. Disponible sur: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0035-1564835>
6. Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK, Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol*. 2009;147(4):415-30.
7. Kamikubo Y, Mendolicchio GL, Zampolli A, Marchese P, Rothmeier AS, Orje JN, et al. Selective factor VIII activation by the tissue factor–factor VIIa–factor Xa complex. *Blood*. 5 oct 2017;130(14):1661-70.
8. Kamath S, Lip GYH. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM Int J Med*. 1 oct 2003;96(10):711-29.
9. Masson E. EM-Consulte. [cité 22 août 2023]. Facteur II : prothrombine. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/678867/figures/facteur-ii-prothrombine>
10. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood*. 1 janv 2003;101(1):20-30.
11. Masson E. EM-Consulte. 2012 [cité 22 août 2023]. Facteur VII : proconvertine. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/678866/figures/facteur-vii-proconvertine>
12. Gritsch H, Schrenk G, Weinhappl N, Mellgård B, Ewenstein B, Turecek PL. Structure and Function of Recombinant versus Plasma-Derived von Willebrand Factor and Impact on Multimer Pharmacokinetics in von Willebrand Disease. *J Blood Med*. 14 nov 2022;13:649-62.
13. Gailani D, Geng Y, Verhamme I, Sun M fu, Bajaj SP, Messer A, et al. The mechanism underlying activation of factor IX by factor XIa. *Thromb Res*. 1 mai 2014;133:S48-51.
14. Henneuse A. Facteur X : Stuart-Prower. *Biol Médicale*.

15. Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency. *Haemophilia*. 2008;14(6):1183-9.
16. Shamanaev A, Litvak M, Gailani D. Recent advances in factor XII structure and function. *Curr Opin Hematol*. sept 2022;29(5):233-43.
17. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood Coagulation Factor XIII: Structure and Function. *Thromb Res*. 1 juin 1999;94(5):271-305.
18. Defendi F, Charignon D, Ghannam A, Ponard D, Drouet C. Exploration biologique des angioœdèmes à kinines. *Ann Dermatol Vénéréologie*. 1 mars 2015;142(3):163-9.
19. Giansily-Blaizot M, Aguilar-Martinez P, Briquel ME, d'Oiron R, De Maistre E, Epelbaum S, et al. Two novel cases of cerebral haemorrhages at the neonatal period associated with inherited factor VII deficiency, one of them revealing a new nonsense mutation (Ser52Stop). *Blood Coagul Fibrinolysis*. févr 2003;14(2):217.
20. Masson E. EM-Consulte. [cité 10 sept 2023]. Exploration de l'hémostase primaire. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1147989/exploration-de-l-hemostase-primaire>
21. Hofman ZLM, Relan A, Zeerleder S, Drouet C, Zuraw B, Hack CE. Angioedema attacks in patients with hereditary angioedema: Local manifestations of a systemic activation process. *J Allergy Clin Immunol*. 1 août 2016;138(2):359-66.
22. Kenne E, Nickel KF, Long AT, Fuchs TA, Stavrou EX, Stahl FR, et al. Factor XII: a novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *J Intern Med*. 2015;278(6):571-85.
23. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 1 août 2005;3(8):1894-904.
24. Hoffman M, Iii DMM. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958-65.
25. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol*. avr 2012;95(4):333-45.
26. Alessi MC. Le système fibrinolytique : activation et inhibition. Ses modifications en cas de CIVD. *Réanimation*. 1 déc 2002;11(8):591-8.
27. Boissier E, Calmette L, Delahousse B, Flaujac C, Françoise M, Mauge L. Recommandations préanalytiques en hémostase : Stabilité des paramètres d'hémostase générale et délais de réalisation des examens. 2017;
28. 555\_PRA-FI-PVT-004 V1 Plaquette\_aide\_prelevement.pdf [Internet]. [cité 12 sept 2023]. Disponible sur: [https://biologiepathologie.chu-lille.fr/fichiers/555\\_PRA-FI-PVT-004%20V1%20Plaquette\\_aide\\_prelevement.pdf](https://biologiepathologie.chu-lille.fr/fichiers/555_PRA-FI-PVT-004%20V1%20Plaquette_aide_prelevement.pdf)
29. Poret E, Mourey G. Mise en place de la mesure de l'activité du facteur VIII par méthode chromogénique au laboratoire d'hémostase de l'Établissement Français

du Sang de Besançon. Comparaison avec la méthode chronométrique en un temps. 2014;

30. bs3128473.pdf [Internet]. [cité 23 août 2023]. Disponible sur: <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/bs3128473>
31. Sanchez O, Benhamou Y, Bertoletti L, Constant J, Couturaud F, Delluc A, et al. Recommandations de bonne pratique pour la prise en charge de la maladie veineuse thromboembolique chez l'adulte. Version courte. Rev Mal Respir. févr 2019;36(2):249-83.
32. Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A, Pengo V. Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants. Autoimmun Rev. févr 2017;16(2):173-8.
33. The Varied Sensitivity of Partial Thromboplastin and Prothrombin Time Reagents in the Demonstration of the Lupus-Like Anticoagulant - Mannucci - 1979 - Scandinavian Journal of Haematology - Wiley Online Library [Internet]. [cité 7 sept 2023]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0609.1979.tb00440.x>
34. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral Anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 1 févr 2012;141(2, Supplement):e24S-e43S.
35. Lee GM, Arepally GM. Diagnosis and Management of Heparin-Induced Thrombocytopenia. Hematol Oncol Clin North Am. juin 2013;27(3):541-63.
36. Gerotziafas GT, Petropoulou AD, Verdy E, Samama MM, Elalamy I. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. J Thromb Haemost. 1 mai 2007;5(5):955-62.
37. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral Anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 1 févr 2012;141(2, Supplement):e24S-e43S.
38. Bénard-Larivière A, Miremont-Salamé G, Pérault-Pochat MC, Noize P, Haramburu F, Centres the ESG on behalf of the F network of pharmacovigilance. Incidence of hospital admissions due to adverse drug reactions in France: the EMIR study. Fundam Clin Pharmacol. 2015;29(1):106-11.
39. Tie JK, Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. J Thromb Haemost JTH. févr 2016;14(2):236-47.
40. Masson E. EM-Consulte. [cité 12 sept 2023]. Antivitamines K : pharmacologie et pharmacogénétique. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/273291/antivitamines-k-pharmacologie-et-pharmacogenetiquee-portail>

41. Rockson SG, Albers GW. Comparing the guidelines: anticoagulation therapy to optimize stroke prevention in patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 17 mars 2004;43(6):929-35.
42. Laoudy A, Marnia C, Anne PN, Siguret V, Curis E, Nicolis I. Vérification de méthode: exemple de la mesure du TQ/TP/INR au laboratoire d'hématologie de Lariboisière sur deux analyseurs STAGO `` STAR ' ' : l'INR est-il un paramètre robuste? 2016;1.
43. Sanchez O, Benhamou Y, Bertoletti L, Constant J, Couturaud F, Delluc A, et al. Recommandations de bonne pratique pour la prise en charge de la maladie veineuse thromboembolique chez l'adulte. Version courte. *Rev Mal Respir.* févr 2019;36(2):249-83.
44. van Es N, Coppens M, Schulman S, Middeldorp S, Büller HR. Direct oral anticoagulants compared with vitamin K antagonists for acute venous thromboembolism: evidence from phase 3 trials. *Blood.* 18 sept 2014;124(12):1968-75.
45. Mutte FA. Anticoagulants oraux directs: quels facteurs de risque d'une concentration plasmatique élevée?
46. Lu G, DeGuzman FR, Hollenbach SJ, Karbarz MJ, Abe K, Lee G, et al. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nat Med.* avr 2013;19(4):446-51.
47. Connolly SJ, Milling TJ, Eikelboom JW, Gibson CM, Curnutte JT, Gold A, et al. Andexanet Alfa for Acute Major Bleeding Associated with Factor Xa Inhibitors. *N Engl J Med.* 22 sept 2016;375(12):1131-41.
48. Honickel M, Braunschweig T, Rossaint R, Stoppe C, ten Cate H, Grottke O. Reversing Dabigatran Anticoagulation with Prothrombin Complex Concentrate versus Idarucizumab as Part of Multimodal Hemostatic Intervention in an Animal Model of Polytrauma. *Anesthesiology.* 1 nov 2017;127(5):852-61.
49. Pollack CV, Reilly PA, van Ryn J, Eikelboom JW, Glund S, Bernstein RA, et al. Idarucizumab for Dabigatran Reversal — Full Cohort Analysis. *N Engl J Med.* 3 août 2017;377(5):431-41.
50. Samama MM, Meddahi S, Samama CM. Pharmacology and laboratory testing of the oral Xa inhibitors. *Clin Lab Med.* sept 2014;34(3):503-17.
51. Oertel LB, Fogerty AE. Use of direct oral anticoagulants for stroke prevention in elderly patients with nonvalvular atrial fibrillation. *J Am Assoc Nurse Pract.* sept 2017;29(9):551-61.
52. Li A, Garcia DA, Lyman GH, Carrier M. Direct Oral Anticoagulant (DOAC) versus Low-Molecular-Weight Heparin (LMWH) for Treatment of Cancer Associated Thrombosis (CAT): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thromb Res.* janv 2019;173:158-63.

53. Bonar R, Favalaro EJ, Mohammed S, pasalic leonardo, Sioufi J, Marsden K. The effect of dabigatran on haemostasis tests: a comprehensive assessment using in vitro and ex vivo samples. *Pathology (Phila)*. 1 juin 2015;47(4):355-64.
54. Bonar R, Favalaro EJ, Mohammed S, Ahuja M, Pasalic L, Sioufi J, et al. The effect of the direct factor Xa inhibitors apixaban and rivaroxaban on haemostasis tests: a comprehensive assessment using in vitro and ex vivo samples. *Pathology (Phila)*. 1 janv 2016;48(1):60-71.
55. Exner T, Ellwood L, Rubie J, Barancewicz A. Testing for new oral anticoagulants with LA-resistant Russells viper venom reagents. An in vitro study. *Thromb Haemost*. avr 2013;109(4):762-5.
56. Moosavi S, Lai CW, Gan S, Zamiri G, Akbarzadeh Pivehzhani O, Johan MR. Application of Efficient Magnetic Particles and Activated Carbon for Dye Removal from Wastewater. *ACS Omega*. 10 août 2020;5(33):20684-97.
57. DOAC-Stop™ - Haematex Products [Internet]. [cité 27 août 2023]. Disponible sur: <https://www.haematex.com/haematex-products/doac-stop>
58. Monteyne T, De Kesel P, Devreese KMJ. Interference of DOAC stop and DOAC remove in the thrombin generation assay and coagulation assays. *Thromb Res*. 1 août 2020;192:96-9.
59. Frackiewicz A, Kalaska B, Miklosz J, Mogielnicki A. The methods for removal of direct oral anticoagulants and heparins to improve the monitoring of hemostasis: a narrative literature review. *Thromb J*. 19 mai 2023;21(1):58.
60. Système Atellica® COAG 360 [Internet]. [cité 13 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.siemens-healthineers.com/fr/hemostasis/systems/atellica-coag-360-system>
61. Adcock DM, Gosselin R. Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. *Thromb Res*. 1 juill 2015;136(1):7-12.
62. Hillarp A, Gustafsson KM, Faxälv L, Strandberg K, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor apixaban on routine coagulation assays and anti-FXa assays. *J Thromb Haemost*. 1 sept 2014;12(9):1545-53.
63. Favalaro EJ, Gilmore G, Bonar R, Dean E, Arunachalam S, Mohammed S, et al. Reducing the effect of DOAC interference in laboratory testing for factor VIII and factor IX: A comparative study using DOAC Stop and andexanet alfa to neutralize rivaroxaban effects. *Haemophilia*. 2020;26(2):354-62.
64. Rühl H, Reda S, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. Activated Factor X-Based versus Thrombin-Based Antithrombin Testing in Thrombophilia Workup in the DOAC Era. *Thromb Haemost*. 2018;118(02):381-7.
65. Effect on Plasma Protein S Activity in Patients Receiving the Factor Xa Inhibitors [Internet]. [cité 9 sept 2023]. Disponible sur: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/29/7/29\\_62951/\\_html/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/29/7/29_62951/_html/-char/en)

66. Gosselin R, Grant RP, Adcock DM. Comparison of the effect of the anti-Xa direct oral anticoagulants apixaban, edoxaban, and rivaroxaban on coagulation assays. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(5):505-13.
67. Favresse J, Lardinois B, Sabor L, Devalet B, Vandepapeliere J, Braibant M, et al. Evaluation of the DOAC-Stop® Procedure to Overcome the Effect of DOACs on Several Thrombophilia Screening Tests. *TH Open.* avr 2018;02(02):e202-9.
68. Antovic AN Eva Marie; Berndtsson, Maria; Rasmuson, Agnes; Malmström, Rickard E; Skeppholm, Mika; Antovic, Jovan. Effects of direct oral anticoagulants on lupus anticoagulant assays in a real-life setting. *Thromb Haemost.* 8 nov 2017;117(09):1700-4.
69. Favalaro EJ, Mohammed S, Curnow J, Pasalic L. Laboratory testing for lupus anticoagulant (LA) in patients taking direct oral anticoagulants (DOACs): potential for false positives and false negatives. *Pathology (Phila).* 1 avr 2019;51(3):292-300.
70. Kopatz WF, Brinkman HJM, Meijers JCM. Use of DOAC Stop for elimination of anticoagulants in the thrombin generation assay. *Thromb Res.* 1 oct 2018;170:97-101.
71. Influence of DOAC Stop on coagulation assays in samples from patients on rivaroxaban or apixaban - Platton - 2019 - International Journal of Laboratory Hematology - Wiley Online Library [Internet]. [cité 9 sept 2023]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12950>
72. Exner T, Michalopoulos N, Pearce J, Xavier R, Ahuja M. Simple method for removing DOACs from plasma samples. *Thromb Res.* 1 mars 2018;163:117-22.
73. Jacquemin M, Toelen J, Feyen L, Schoeters J, Van Horenbeeck I, Vanlinthout I, et al. The adsorption of dabigatran is as efficient as addition of idarucizumab to neutralize the drug in routine coagulation assays. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(4):442-7.
74. Kopatz WF, Brinkman HJM, Meijers JCM. Use of DOAC Stop for elimination of anticoagulants in the thrombin generation assay. *Thromb Res.* 1 oct 2018;170:97-101.
75. Riva N, Vella K, Hickey K, Gatt P, Grima C, Zammit D, et al. The effect of DOAC-Stop® on several oral and parenteral anticoagulants. *Int J Lab Hematol.* 2021;43(4):O171-5.
76. Linskens EA, De Kesel P, Devreese KMJ. Direct Oral Anticoagulant removal by a DOAC filter: Impact on lupus anticoagulant testing – Evaluation on spiked and patient samples. *Res Pract Thromb Haemost.* 1 févr 2022;6(2):e12633.
77. Favalaro EJ, Soltani S, McDonald J, Grezchnik E, Easton L. Cross-laboratory audit of normal reference ranges and assessment of ABO blood group, gender and age on detected levels of plasma coagulation factors. *Blood Coagul Fibrinolysis.* nov 2005;16(8):597.

# 7 ANNEXES

## ANNEXE 1

### RÉACTIFS AUXILIAIRES NEUTRALISANTS NEUTRALISATION NOAC

### RÉACTIFS AUXILIAIRES DOAC-Stop™






Neutralisant





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

**Supprime tous les types de NOAC, y compris le dabigatran, l'apixaban, le rivaroxaban et l'edoxaban, avec un effet minimal sur les variables de coagulation actuellement connues.**

#### Informations

Les utilisations thérapeutiques des NOAC sont en augmentation. Les NOAC sont connus pour interférer avec presque tous les tests de coagulation à des degrés divers et parfois les patients qui doivent être testés pour des défauts de coagulation sous-jacents peuvent également être sous NOAC.

DOAC-Stop™ est le premier agent général disponible pour résoudre les problèmes de diagnostic associés aux NOAC. Après le traitement avec DOAC-Stop™, les échantillons de plasma peuvent être analysés pour les défauts de coagulation sous-jacents tels que les déficits en facteurs, l'héparine, le lupus anticoagulant ou d'autres anticorps interférents.

#### Points forts

DOAC-Stop™ est conçu pour usage sur plasma citraté.

Les tablettes sont à dissoudre dans le plasma citraté, puis après une centrifugation, le surnageant ne contenant plus de DOAC est prêt pour être utilisé.

#### Composants du coffret

- 1 flacon de 50 ou 100 tablettes





Téli.: +33(0)4 67 10 71 20 - Fax: +33(0)4 67 10 71 21 - CRYOPEP, 83 rue Yves Montand, 34 080 Montpellier, FRANCE - [www.cryopep.fr](http://www.cryopep.fr)  
Edition du 2023-05-28 17:05:19

Annexe 1 : Fiche technique DOAC-Stop™



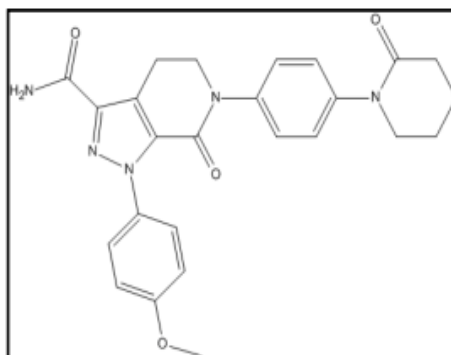
## ANNEXE 2

# ALSACHIM

a Shimadzu Group Company

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

**Product Name:** Apixaban  
**Molecular Formula:** C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
**Molecular Weight:** 459.50 g/mol  
**Structure:**



<b>Batch Number:</b>	SVI-ALS-14-084	
<b>Product Number:</b>	C2109	
<b>CAS Number:</b>	503612-47-3	
<b>Storage:</b>	For a prolonged period, keep at -20°C (±5°C) in a closed container, away from light and moisture	
<b>Stability:</b>	Stable (36 months) (*)	
<b>Expiring date:</b>	Wednesday May 6, 2026	
<b>Solvent solubility:</b>	Slightly soluble in Acetonitrile or Methanol. Soluble in Dimethyl sulfoxide, in Methanol with 0.5% formic acid or in Acetonitrile/HCl 1N (1/1),	
<b>Appearance:</b>	Off-white solid	<b>Results:</b> Off-white solid
<b>Chemical Purity (HPLC):</b>	≥ 98.0%	99.7%
<b><sup>1</sup>H NMR:</b>	Conform to structure	Conforms
<b><sup>13</sup>C NMR:</b>	Conform to structure	Conforms
<b>Mass Spectrometry:</b>	Conform to structure	Conforms
<b>Manufacturing date:</b>	Monday March 17, 2014	
<b>Analysis date:</b>	Saturday May 6, 2023	
<b>Note:</b>	For research and development use only, not for use in humans. q-NMR purity (1 sample, 08MAY2023) : 98.2%.	

#### Quality Review & Approval

Francis ROESSLINGER, Quality Manager  
Date : Wednesday, May 10, 2023



Annexe 2 : Fiche produit de la poudre apixaban

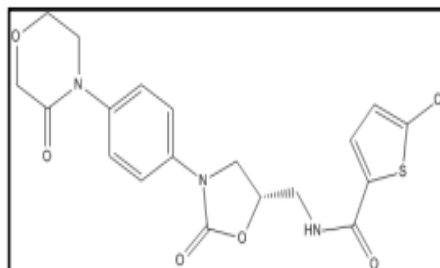
## ANNEXE 3

# ALSA CHIM

a Shimadzu Group Company

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**Product Name:** Rivaroxaban  
**Molecular Formula:**  $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$   
**Molecular Weight:** 435.88 g/mol  
**Structure:**



**Batch Number:** TF-ALS-10-098  
**Product Number:** C2138  
**CAS Number:** 366789-02-8  
**Storage:** For a prolonged period, keep at  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) in a closed container, away from light and moisture  
**Stability:** Stable (36 months) (\*)  
**Expiring date:** Wednesday May 6, 2026  
**Solvent solubility:** Soluble in Dimethyl sulfoxide, in Acetonitrile, in a mixture of Acetonitrile and Hydrochloric acid 1N or in a mixture of Acetonitrile and Water

	<b>Specification:</b>	<b>Results:</b>
<b>Appearance:</b>	White solid	White solid
<b>Chemical Purity (HPLC):</b>	$\geq 98.0\%$	99.5%
<b><math>^1\text{H}</math> NMR:</b>	Conform to structure	Conforms
<b><math>^{13}\text{C}</math> NMR:</b>	Conform to structure	Conforms
<b>Mass Spectrometry:</b>	Conform to structure	Conforms
<b>Manufacturing date:</b>	Friday May 7, 2010	
<b>Analysis date:</b>	Saturday May 6, 2023	
<b>Note:</b>	For research and development use only, not for use in humans. q-NMR purity (1 sample, 05MAY2023) : 99.0%	

### Quality Review & Approval

Francis ROESSLINGER, Quality Manager  
Date : Wednesday, May 10, 2023



Annexe 3 : Fiche produit de la poudre rivaroxaban

# ANNEXE 4



Tél : +33 (0)4 67 10 71 20 - Fax : +33 (0)4 67 10 71 21  
 83 rue Yves Montand - 34080 Montpellier, France  
 contact@cryopep.com  
 www.cryopep.fr - www.cryopep.com

## CERTIFICAT D'ANALYSES

### CRYOcheck™ Pooled Normal Plasma

Référence **CNN-10** Lot **...** Péremption **...**

**EXCLUSIVEMENT réservé au Diagnostic In Vitro**  
**Ne pas utiliser en Tant que Calibrateur**



Les résultats ont été obtenus dans les conditions opératoires suivantes :

- Instrument : STAR®, CS24000

Tous les plasmas utilisés pour la fabrication ont été testés et présentent les résultats suivants :

- Tests anti-coagulant Lupus : Négatif
- Test HIV 1 & 2, HCV, HbsAg : Négatif
- Test syphilis : Négatif
- Risque CJD/mvCJD : Satisfaisant

Tous les donneurs sélectionnés ont été testés et présentent des niveaux normaux pour tous les facteurs de coagulation et le fibrinogène. Le procédé de fabrication du plasma est constamment vérifié en conformité pour un faible dosage en plaquettes avant congélation.

Pour utiliser le pool en tant que contrôle, chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs à partir d'au moins 20 essais en séries indépendantes (Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989).

Les résultats ci-dessous sont calculés à partir de données spécifiques obtenues à partir d'une combinaison de réactifs et d'instruments utilisés pour des tests de contrôle de qualité interne. Ils peuvent varier selon l'instrument, la méthode et la technique utilisés.

TQ		TP			INR	
Werfen Hemocul RecombiPlus Tin 2G	12,2 s <sup>1</sup>	Stago Neoplasma	Siemens Innovin	Stago STA-R Neoplasma	Siemens Innovin	1,03 <sup>2</sup>
		96,5 % <sup>2</sup>	83,7 % <sup>2</sup>	1,00 <sup>2</sup>		
TCA						
Werfen APTT-SP	31,6 s <sup>1</sup>	Stago STA PTTA	Stago PTT-LA	Stago STA CK Prest	TCoga Trinklot APTT	Siemens Actin FS / Siemens Actin FSL
		33,3 s <sup>2</sup>	33,2 s <sup>2</sup>	30,4 s <sup>2</sup>	30,4 s <sup>2</sup>	23,4 s <sup>2</sup> / 23,4 s <sup>2</sup>
dRVVT						
Staclot Screen	39,4 s <sup>2</sup>	Stago Staclot Confirm	Rapport	LA 1	Siemens LA 2	Rapport
		39,3 s <sup>2</sup>	1,00 <sup>2</sup>	39,4 s <sup>2</sup>	37,1 s <sup>2</sup>	1,06 <sup>2</sup>
Test	Résultat	Test	Résultat			
Fibrinogène	3,34 g/L <sup>1</sup>	Anticorps : Anti-cardiolipine (IgG)	Négatif <sup>4</sup>			
Facteur II	105 % <sup>1</sup>	Anti-cardiolipine (IgM)	Négatif <sup>4</sup>			
Facteur V	101 % <sup>1</sup>	Anti-B <sub>2</sub> glycoprotéine 1 (B2GP1/IgG)	Négatif <sup>4</sup>			
Facteur VII	100 % <sup>1</sup>	Anti-B <sub>2</sub> glycoprotéine 1 (B2GP1/IgM)	Négatif <sup>4</sup>			
Facteur VIII	102 % <sup>1</sup>	Anti-phosphatidyl sérine (IgG)	Négatif <sup>4</sup>			
Facteur IX	116 % <sup>1</sup>	Inhibiteur : Facteur VIII	Négatif <sup>4</sup>			
Facteur X	107 % <sup>1</sup>	Facteur IX	Négatif <sup>4</sup>			
Facteur XI	98 % <sup>1</sup>					
Facteur XII	116 % <sup>1</sup>					

Les résultats peuvent varier en fonction des équipements et des méthodes utilisés.

#### Contrôle Qualité

- <sup>1</sup> Déterminé par le fabricant
- <sup>2</sup> Déterminé par CryoPep sur STA-R, Stago
- <sup>3</sup> Déterminé par CryoPep sur CS2400, Siemens
- <sup>4</sup> Déterminé par CryoPep

#### Fiche de sécurité

Disponible sur simple demande auprès de notre service commercial



**Precision Biologic Inc.**  
 140 Eileen Stubbs Avenue  
 Dartmouth B3B 0A9, Nova Scotia, Canada



**Ergo Europe**  
 Prinsesgracht 20  
 2514 AP The Hague, Pays-Bas



**CRYOPEP**  
 83, rue Yves Montand  
 34080 MONTPELLIER







# ANNEXE7

	Avant Charbon					Après Charbon					Avant Charbon RATIO					Après Charbon								
	APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml								
Plasma	25	50	100	250	500	Plasma	25	50	100	250	500	seuil	plasma	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	
29.5	31	32.1	33.8	36.2	38.7	29.5	30.1	29.5	30.9	30.3	30.3	1.2	1.03333333	1.07	1.106667	1.206667	1.29	0.9833333	1.0033333	0.9833333	1.0033333	1.0033333	1.1	1.01
29.5	31.5	32.5	32.5	36.8	39.9	29.5	30.9	30.3	30.3	30.3	30.6	1.2	1.05	1.0833333	1.0833333	1.286667	1.33	0.9833333	1.03	1.01	1.01	1.01	1.01	1.02
APT-SP (s)	30.1	31.4	32.3	33.8	35.5	38.4	30.1	30.4	30.5	30.9	30.6	1.2	1.04666667	1.0766667	1.1266667	1.1833333	1.28	1.0033333	1.0133333	1.016667	1.03	1.01	1.02	1.03
31	30.9	31.4	32.5	34.8	37.9	31	30.5	31.5	31.5	31.9	31.5	1.2	1.03	1.0466667	1.0833333	1.16	1.2633333	1.0333333	1.016667	1.05	1.05	1.0633333	1.05	
31.5	32	32.7	34.1	35.7	38.3	31.5	30.475	30.45	30.7	31.9	32.1	1.2	1.06666667	1.09	1.1366667	1.19	1.2766667	1.05	1.0183333	1.015	1.0233333	1.0233333	1.0275	
30.1	31.4	31.8	32.9	34.7	38.3	30.1				30.7	30.825	1.2	1.04666667	1.06	1.1066667	1.156667	1.276667	1.0333333						
	Avant Charbon					Après Charbon					Avant Charbon					Après Charbon								
	APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml								
Plasma	25	50	100	250	500	Plasma	25	50	100	250	500	seuil	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500		
40.8	38.8	42.1	47.8	61.3	78.6	40.8	36.6	36.5	37.2	37.3	37.8	1.1	1	1.09	1.24	1.58	2.03	0.97	0.97	0.97	0.96	0.99		
42.6	40.5	42.3	47.4	61.6	82.7	42.6	37	36.5	37.1	36.6	36.8	1.1	1.05	1.09	1.22	1.59	2.14	0.96	1	0.97	0.98	1.01		
WTS-RATIO	42.2	40.1	43	48.3	61	78	42.2	37.2	38.3	38.4	38.4	1.1	1.04	1.11	1.25	1.58	2.05	0.99	0.99	0.99	1.06			
40.8	41.2	41.8	47.1	60.1	79.3	41.2	36.9	37.1	37.6	37.4	38.9	1.1	1.06	1.08	1.22	1.55	2.02	0.98	0.98	0.99	1	1.02		
40	43.1	45.2	50.6	65.4	85.1							1.1	1.11	1.17	1.31	1.69	2.2							
41	39.7	42.1	47	60.1	110.5							1.1	1.03	1.09	1.22	1.56	2.87							
	Avant Charbon					Après Charbon					Avant Charbon					Après Charbon								
	APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml								
Plasma	25	50	100	250	500	Plasma	25	50	100	250	500	Plasma	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500		
1.03	1.14	1.28	1.57	2.18	2.78	1	1	1.01	1.01	1.03	1.03	35.8	42.8	47.8	58.7	81.7	103.9	35.8	34.8	35.3	35.2	35.7		
1.05	1.08	1.18	1.55	2.15	2.8	1	1.04	1.02	1.03	1.03	1.05	36.7	40.5	44.3	57.8	80.4	104.9	36.7	36.3	35.5	35.7	35.8		
1.09	1.16	1.16	1.55	1.99	2.49	1.01	1.02	1.04	1.05	1.06	1.04	38.1	43.2	48.3	58.1	74.6	93.2	38.1	35.2	36.3	36.5	36.8		
1.11	1.04	1.29	1.41	2.14	2.59	0.98		1.07	1.07			38.8	39	48.3	52.7	79.9	97	38.8	35.43	35.7	35.8	36.1		
1.05	1.15	1.29	1.52	2.15	1.84	1						36.7	40.1	44.8	56.9	74.8	94	36.7						
	Avant Charbon					Après Charbon					Avant Charbon					Après Charbon								
	APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml								
Plasma	25	50	100	250	500	Plasma	25	50	100	250	500	Avant Charbon indice de Rosier	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml							
29.7	30.8	31.3	32.4	33.9	35.5	30.4	30.1	29.6	30	29.6	29.6	plasma	2.59/40.6	4.15335468	7.4074074	11.504425	15.492958							
29.2	31.1	31.3	33.4	34.4	35.8	30.4	29.4	29.6	29.7	29.8	29.8	-2.739726	3.5389775	4.15335468	10.179641	12.790698	16.201117							
M+T SP	29.8	31.3	31.3	32	33.8	35.4	30.1	31	30.2	30.8	30.3	-0.6711409	4.15335468	6.25	11.242604	15.254237								
	30.8	31.2	32.3	33.2	35.2	30.2	30.6	30.8	30.3	30.3	-0.6711409	2.59/40.6	3.84615385	7.120743	9.6385542	14.772727								
	31.2	32.2	32.8	34.9	35.7	30.8	30.8	30.8	27.5	30.8		3.8461538	6.83229814	8.5365854	14.040115	15.966387								
	30.5	31	33.2	37.5		30.8						1.6392443	3.22580645	9.6385542	#DIV/0!	20								
	Avant Charbon					Après Charbon					Avant Charbon					Après Charbon								
	APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml								
Plasma	25	50	100	250	500	Plasma	25	50	100	250	500													
88	88.2	82.7	87.5	101.4	120.5	88	82.6	79	79.9	80.3	80.5													
85.7	86.1	85.6	86.5	101.1	125.2	85.7	84.6	82.1	83.9	84.9	84													
PS	84.5	84.9	82.9	108.1	123.4	84.5	83	81.3	78.2	83.2	83.2													
84.5	86.4	85	94.5	100.9	118.1	84.5	81.6	79.4	82.5															
85.1	88.3	81.6	87.8	105.7	130.2	85.1																		
87.9	83.6	80.5	85.5	99.2	146.9	87.9																		
	Avant Charbon					Après Charbon					Avant Charbon					Après Charbon								
	APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml					APIXABAN ng/ml								
Plasma	25	50	100	250	500	Plasma	25	50	100	250	500													
157.2	140.5	111	133.9	144.4	163.6	157.2	133	136.4	138	140.2	132													
153.9	117.2	124.3	141.8	162.6	158.9	153.9	133.6	138	135.2	154.5														
PC (%)	140.9	115.4	120.4	124.7	135.8	145.7	136.5	137.4	156.5	147.3	157.5													
145.7	118.3	147	162.9	168	164.3	145.7	158.2	135.8	164.3															
153.9	143.7		162.9	162.9	153.9	153.9																		

Annexe 7 : Résultats sur ACL TOP®970 (Werfen) apixaban

# ANNEXE 8

	Avant Charbon										Après charbon										Avant Charbon RATIO APTT-SP										Après charbon RATIO APTT-SP														
	Rivaroxaban ng/ml					seuil					Rivaroxaban ng/ml					seuil					Rivaroxaban ng/ml					seuil					Rivaroxaban ng/ml					seuil									
M+T-SP	Plasma	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
	29.7	31.4	32.7	33.8	35.1	43.9	31	30.3	30.5	30.7	30.7	-1.010101	4.4585987	8.2568807	11.242604	14.529915	31.66287	15																											
	29.2	32	32.5	34.3	35	41.3	30.8	30.3	30.8	31.5	31	-2.789726	6.25	7.6923077	12.536443	14.285714	27.360775	15																											
	29.8	30.7	32.4	33.9	36.4	40.3	30.3	30.5	30.6	30.8	30.8	-0.6711409	2.2801303	7.4074074	11.504425	17.582418	25.55813	15																											
	29.8	31.4	33.9	34.3	36.3	40.5	30.6	30.8	30.3	30.8	31.1	-0.6711409	4.4585987	11.504425	12.536443	17.555372	25.92526	15																											
DNVT-S	Plasma	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
	40.8	48	56.1	71.6	83.2	110.5	40.8	37.8	37.8	37.3	37.1	38.2	1.25	1.46	1.86	2.16	2.16	0.97	0.97																										
	42.6	47.4	57.2	71.5	86.1	110.5	42.6	38	38	37.3	37.7	38.7	1.23	1.49	1.86	2.24	2.87	0.96	1																										
	42.2	48.9	57.4	76.6	97.9	130.7	42.2	37.2	37.5	38	38.5	39.2	1.27	1.49	1.9	2.72	3.39	0.99	0.99																										
	40.8	48.5	57.8	73.3	104.6	142.2	40.8	37.1	38.5	38.1	38.3	40.9	1.26	1.5	1.99	2.54	3.69	0.98	0.98																										
DNVT-C	Plasma	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
	35.8	39.1	42.3	49.4	56.1	68	35.8	35.3	35.6	35.9	35.7	35.5	1	1.11	1.22	1.42	1.61	1.95	1																										
	36.7	37.7	42	49.2	64	64	36.7	35	36.2	35.6	35.6	36.5	1	1.08	1.23	1.41	1.62	1.84	1																										
	38.1	40.4	47.7	57.7	67.6	78.4	38.1	34.6	35.5	35	36	37.5	1.01	1.09	1.24	1.49	1.77	2.25	1.01																										
	38.8	40.6	47.8	49	62.5	78.4	36.7	35.5	34.6	36.7	37	37.5	0.98	1.09	1.25	1.41	1.8	2.25	0.98	0.98																									
PC (%)	Plasma	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
	157.2	161.9	143.1	150.9	193.5	181.7	157.2	161.9	147.3	143.1	142.1	150.6																																	
	158.9	159.9	157.2	171.9	158.9	199.8	158.9	144.1	153.2	139.9	133.6	138.9																																	
	140.9	150.9	155.5	156.2	168.1	183.5	140.9	148.3	150.9	142	148.6	164.6																																	
	145.7	152.2	154.9	146.7	158.9	202.7	145.7	145.7	145.7	145.7	145.7	170.1																																	
PS	Plasma	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	plasma	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml
	88	84.6	91.6	104.3	126	146.9	88	86.5	93.2	79.7	79.8	86.2																																	
	85.7	89.3	93.5	106.7	121.1	124.7	85.7	89.3	94.1	76.3	80.6	83.1																																	
	84.5	84	95	113.3	155.7	184.4	84.5	82.8	75.6	84.3	80.1	80.6																																	
	84.5	95	96.2	109.8	133	130.2	84.5	90.2	76.1	76.6	76.5	76.8																																	

Annexe 8 : : Résultats sur ACL TOP® 970 (Werfen) rivaroxaban

## ANNEXE 9

TCA (s) Echantillon	T1 m±e	T2 m±e	p-Value*	T1 AC m±e	T2 AC m±e	p-Value*
Plasma témoin	25.33±1.02	25.63±0.15	0.56	26.2±0.4	25.97±0.9	0.56
Apixaban 25 ng/ml	26.9±1.3	26.47±0.57	0.564	29.3±3.3	26.6±0.5	0.08
Apixaban 50 ng/ml	27.7±1.53	27.07±0.7	0.08	31.2±5.0	26.6±0.4	0.08
Apixaban 100 ng/ml	28.8±1.8	27.8±0.67	0.08	26.5±0.4	29.7±3.7	0.08
Apixaban 250 ng/ml	30.3±1.8	29.3±0.4	0.16	26.5±0.4	29.7±3.7	0.08
Apixaban 500 ng/ml	33.3±2.5	31.9±0.6	0.16	30.2 ±4.2	27.4±0.2	0.56

Tableau de Comparaison des résultats répétés pour le TCA à deux temps de mesures différents (T1+T2) avant et après charbon pour l'apixaban avec la p-Value<0.05. Test Friedman. m : moyenne, e : écart type

FV (%) Echantillon	T1 m±e	T2 m±e	p-Value*	T1 AC m±e	T2 AC m±e	p-Value*
Plasma témoin	140.4±5.6	144.9±5.7	0.08	138.8±7.4	145.2±5.2	0.56
Apixaban 25 ng/ml	145.9±3.7	133.0±4.4	0.08	131.0±1.8	144.3±3.9	0.08
Apixaban 50 ng/ml	145.7±3.2	132±4.9	0.08	133.8±2.8	144.9±2.5	0.08
Apixaban 100 ng/ml	141.6±3.8	131.6±4.1	0.56	130.4±3.1	146.9±3.7	0.08
Apixaban 250 ng/ml	139.9±3.4	123.8±4.5	0.08	131.5±2.6	144.9±1.7	0.08
Apixaban 500 ng/ml	129.8±2.5	120.2±6.2	0.08	143.7±7.0	136.3±6.7	0.56

Tableau de comparaison des résultats répétés pour le FV à deux temps de mesures différents (T1+T2) avant et après charbon pour l'apixaban avec la p-Value<0.05. Test Friedman. m : moyenne, e : écart type



<b>FVIII (%)</b>	<b>T1 m±e</b>	<b>T2 m±e</b>	<b>p-Value*</b>	<b>T1 AC m±e</b>	<b>T2 AC m±e</b>	<b>p- Value*</b>
<b>Echantillon</b>						
<b>Plasma témoin</b>	102.7±4.5	102.2±3.6	0.08	104.5±4.3	101.4±1.4	0.56
<b>Apixaban 25 ng/ml</b>	97.0±1.9	101.8±3.6	0.08	94.0±2.1	97.8±1.4	0.08
<b>Apixaban 50 ng/ml</b>	92.8±1.6	96.6±2.7	0.08	105.2±4.0	100.5±2.7	0.08
<b>Apixaban 100 ng/ml</b>	92.3±4.9	95.8±3.9	0.56	100.5±2.7	99.1±1.7	0.08
<b>Apixaban 250 ng/ml</b>	85.7±1.3	91.9±4.6	0.08	101.4±1.2	96.5±1.2	0.08
<b>Apixaban 500 ng/ml</b>	77.4±2.3	79.7±5.3	0.08	100.0±2.6	98.2±2.1	0.56

Tableau de comparaison des résultats répétés pour le FVIII à deux temps de mesures différents (T1+T2) avant et après charbon pour l'apixaban avec la p-Value<0.05. \*Test Friedman. m : moyenne, e : écart type

*Annexe 9 : : Mesure à conditions différentes en deux temps pour l'apixaban*

## ANNEXE 10

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur la mesure du TP par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

Comparaison	P-Value* avant AC	P-value* après AC
Plasma témoin vs Apixaban 578.5 ng/ml	<0,0001	0.3
Plasma témoin vs Apixaban 274.8 ng/ml	<0,0001	0.03
Plasma témoin vs Apixaban 104.7 ng/ml	<0,0001	0.001
Plasma témoin vs Apixaban 49.14 ng/ml	<0,0001	0.52
Plasma témoin vs Apixaban 27.8 ng/ml	0,007	0.6

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur la mesure du TCA par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

Comparaison	P-Value* avant AC	P-value* après AC
Plasma témoin vs Apixaban 578.5 ng/ml	<0,0001	0.341
Plasma témoin vs Apixaban 274.8 ng/ml	<0,0001	0.648
Plasma témoin vs Apixaban 104.7 ng/ml	<0,0001	0.304
Plasma témoin vs Apixaban 49.14 ng/ml	0,002	0.341
Plasma témoin vs Apixaban 27.8 ng/ml	0,134	0.513

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur le taux de Facteur V par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

Comparaison	P-Value* avant AC	P-value* après AC
Plasma témoin vs Apixaban 578.5 ng/ml	<0,0001	0.99
Plasma témoin vs Apixaban 274.8 ng/ml	0.015	0.97
Plasma témoin vs Apixaban 104.7 ng/ml	0.392	0.92
Plasma témoin vs Apixaban 49.14 ng/ml	0.853	0.87
Plasma témoin vs Apixaban 27.8 ng/ml	0.923	0.79

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur le taux de Facteur VIII par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

<b>Comparaison</b>	<b>P-Value* avant AC</b>	<b>P-value* après AC</b>
<b>Plasma témoin vs Apixaban 578.5 ng/ml</b>	<0,0001	0,295
<b>Plasma témoin vs Apixaban 274.8 ng/ml</b>	<0,0001	0,580
<b>Plasma témoin vs Apixaban 104.7 ng/ml</b>	<0,0001	0,809
<b>Plasma témoin vs Apixaban 49.14 ng/ml</b>	0.0002	0,997
<b>Plasma témoin vs Apixaban 27.8 ng/ml</b>	0.37	0,295

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur le taux d'antithrombine par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

<b>Comparaison</b>	<b>P-Value* avant AC</b>	<b>P-value* après AC</b>
<b>Plasma témoin vs Apixaban 578.5 ng/ml</b>	<0,0001	0,295
<b>Plasma témoin vs Apixaban 274.8 ng/ml</b>	<0,0001	0,580
<b>Plasma témoin vs Apixaban 104.7 ng/ml</b>	<0,0001	0,809
<b>Plasma témoin vs Apixaban 49.14 ng/ml</b>	0.0002	0,997
<b>Plasma témoin vs Apixaban 27.8 ng/ml</b>	0.993	0,295

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur la mesure du APTT-SP par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

<b>Comparaison</b>	<b>P-Value* avant AC</b>	<b>P-value* après AC</b>
<b>Plasma témoin vs Apixaban 550 ng/ml</b>	<0,0001	0,787
<b>Plasma témoin vs Apixaban 293.6 ng/ml</b>	<0,0001	0,812
<b>Plasma témoin vs Apixaban 99 ng/ml</b>	<0,0001	0,536
<b>Plasma témoin vs Apixaban 45 ng/ml</b>	0.0003	0,812
<b>Plasma témoin vs Apixaban 24 ng/ml</b>	0.06	0,787

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur la mesure du dRVVT-S par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05

Comparaison	P-Value* avant	P-value* après
	AC	AC
Plasma témoin vs Apixaban 550 ng/ml	0.002	0.89
Plasma témoin vs Apixaban 293.6 ng/ml	0.042	0.43
Plasma témoin vs Apixaban 99 ng/ml	0.342	0.72
Plasma témoin vs Apixaban 45 ng/ml	0.94	0.3
Plasma témoin vs Apixaban 24 ng/ml	0.997	0.16

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur la mesure du dRVVT-c par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05

Comparaison	P-Value* avant	P-value* après
	AC	AC
Plasma témoin vs Apixaban 550 ng/ml	0.0005	0.86
Plasma témoin vs Apixaban 293.6 ng/ml	0.011	0.75
Plasma témoin vs Apixaban 99 ng/ml	0.118	0.82
Plasma témoin vs Apixaban 45 ng/ml	0.54	0.90
Plasma témoin vs Apixaban 24 ng/ml	0.959	0.94

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur la mesure de la protéine S par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05

Comparaison	P-Value* avant	P-value* après
	AC	AC
Plasma témoin vs Apixaban 550 ng/ml	0.019	0.716
Plasma témoin vs Apixaban 293.6 ng/ml	0.138	0.83
Plasma témoin vs Apixaban 99 ng/ml	0.94	0.06
Plasma témoin vs Apixaban 45 ng/ml	0.889	0.06
Plasma témoin vs Apixaban 24 ng/ml	0.972	0.78

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations d'apixaban sur la mesure de la protéine c par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05

Comparaison	P-Value*	P-value*
	avant AC	après AC
Plasma témoin vs Apixaban 550 ng/ml	0.019	0.99
Plasma témoin vs Apixaban 293.6 ng/ml	0.143	0.53
Plasma témoin vs Apixaban 99 ng/ml	0.876	0.87
Plasma témoin vs Apixaban 45 ng/ml	0.984	0.87
Plasma témoin vs Apixaban 24 ng/ml	0.806	0.5

*Annexe 10 : Résultats des Tests réalisés sur la série Apixaban*

## ANNEXE 11

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure du TP par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

Contraste	P-Value*	P-Value*
	Avant charbon	Après charbon
Plasma témoin vs rivaroxaban 536.5 ng/ml	<0,0001	0.05
Plasma vs témoin rivaroxaban 259.5 ng/ml	<0,0001	0.6
Plasma vs témoin rivaroxaban 110.3 ng/ml	<0,0001	0.7
Plasma vs témoin rivaroxaban 50.8 ng/ml	<0,0001	0.03
Plasma vs témoin rivaroxaban 26.7 ng/ml	<0,0001	0.8

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure du TCA par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

Comparaison	P-Value* avant	P-value* après
	AC	AC
Plasma témoin vs Rivaroxaban 536.5 ng/ml	<0,0001	0.082
Plasma témoin vs Rivaroxaban 259.5 ng/ml	<0,0001	0.295
Plasma témoin vs Rivaroxaban 110.3 ng/ml	<0,0001	0.140
Plasma témoin vs Rivaroxaban 50.8 ng/ml	0,0001	0.012
Plasma témoin vs Rivaroxaban 26.7 ng/ml	0,1000	0.085

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure du FV par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

Concentration en AOD	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
	p-Value**	p-Value**
Plasma témoin vs Rivaroxaban 536.5 ng/ml	<0.0001	0.22
Plasma témoin vs Rivaroxaban 259.5 ng/ml	<0.0001	0.97
Plasma témoin vs Rivaroxaban 110.3 ng/ml	<0.0001	0.97
Plasma témoin vs Rivaroxaban 50.8 ng/ml	<0.0001	0.66
Plasma témoin vs Rivaroxaban 26.7 ng/ml	0.001	0.54

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure du FVIII par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
<b>Concentration en AOD</b>	<b>p-Value**</b>	<b>p-Value**</b>
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 536.5 ng/ml</b>	<0.0001	0.984
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 259.5 ng/ml</b>	<0.0001	0.883
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 110.3 ng/ml</b>	<0.0001	0.997
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 50.8 ng/ml</b>	<0.0001	0.999
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 26.7 ng/ml</b>	0.132	0.897

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure de l'antithrombine par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
<b>Concentration en AOD</b>	<b>p-Value**</b>	<b>p-Value**</b>
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 536.5 ng/ml</b>	<0.0001	0.938
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 259.5 ng/ml</b>	<0.0001	0.495
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 110.3 ng/ml</b>	<0.0001	0.273
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 50.8 ng/ml</b>	0.909	0.614
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 26.7 ng/ml</b>	0.99	0.800

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure du APTT-SP par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. Test Anova à mesure répétées \*P-value<0.05 (condition de normalité respectée avec le test Shapiro)

	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
<b>Concentration en AOD</b>	<b>p-Value**</b>	<b>p-Value**</b>
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 536.5 ng/ml</b>	<0.0001	0.78
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 259.5 ng/ml</b>	<0.0001	0.82
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 110.3 ng/ml</b>	<0.0001	0.99
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 50.8 ng/ml</b>	0.002	0.214
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 26.7 ng/ml</b>	0.079	0.11

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure du dRVVT-S par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05

	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
Concentration en AOD	p-Value**	p-Value**
Plasma témoin vs Rivaroxaban 550 ng/ml	<0.0001	0.99
Plasma témoin vs Rivaroxaban 200.25 ng/ml	0.004	0.21
Plasma témoin vs Rivaroxaban 102 ng/ml	0.065	0.09
Plasma témoin vs Rivaroxaban 43 ng/ml	0.43	0.21
Plasma témoin vs Rivaroxaban 24 ng/ml	0.94	0.09

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure du dRVVT-c par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05

	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
Concentration en AOD	p-Value**	p-Value**
Plasma témoin vs Rivaroxaban 550 ng/ml	<0.0001	0.93
Plasma témoin vs Rivaroxaban 200.25 ng/ml	0.004	0.93
Plasma témoin vs Rivaroxaban 102 ng/ml	0.065	0.82
Plasma témoin vs Rivaroxaban 43 ng/ml	0.44	0.47
Plasma témoin vs Rivaroxaban 24 ng/ml	0.94	0.05

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure de la protéine S par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05

	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
Concentration en AOD	p-Value**	p-Value**
Plasma témoin vs Rivaroxaban 550 ng/ml	0.003	0.77
Plasma témoin vs Rivaroxaban 200.25 ng/ml	0.019	0.21
Plasma témoin vs Rivaroxaban 102 ng/ml	0.32	0.41
Plasma témoin vs Rivaroxaban 43 ng/ml	0.65	0.21
Plasma témoin vs Rivaroxaban 24 ng/ml	0.97	0.77

p-Value obtenue par comparaison de différentes concentrations de rivaroxaban sur la mesure de la protéine C par rapport à un plasma témoin avant et après ajout d'AC. \*Test de Friedman P-value < 0.05.

	<u>Avant AC</u>	<u>Après AC</u>
<b>Concentration en AOD</b>	<b>p-Value**</b>	<b>p-Value**</b>
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 550 ng/ml</b>	0.04	0.99
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 200.25 ng/ml</b>	0.43	0.99
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 102 ng/ml</b>	0.99	0.77
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 43 ng/ml</b>	0.99	0.99
<b>Plasma témoin vs Rivaroxaban 24 ng/ml</b>	0.97	0.99

*Annexe 11 : Résultats des Tests réalisés sur la série Rivaroxaban*



**VU, LE PRESIDENT DU JURY**

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.



---

## TITRE

EVALUATION ET MISE EN PLACE D'UN AGENT NEUTRALISANT LES ANTICOAGULANT ORAUX DIRECTS AU LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DU CHU DE CAEN

---

## Résumé

Les anticoagulants oraux directs (AOD) interfèrent avec les tests d'hémostase causant de faux diagnostics. Dans cette étude des pools de plasmas normaux ont été enrichis avec du rivaroxaban et apixaban avec cinq concentrations différentes et comparés à un plasma témoin. Dans un premier temps, le but est d'évaluer l'interférence des AOD sur les différents tests d'hémostases. Et dans un second temps la capacité à surmonter cette interférence par le DOAC-Stop™ pour revenir à un état comparable à un plasma témoin.

Les résultats ont révélé des facteurs faussement abaissés (FV, FVIII,) des TCA, AT, PS, PC faussement allongés et une recherche d'ACC faussement positive à partir de faibles concentrations d'AOD, à l'exception de l'apixaban et il a été également identifié des problèmes de stabilité spécifiques aux réactifs pour la PC et PS. DOAC-Stop™, a efficacement neutralisé l'effet des AOD, toutes les concentrations d'AOD étaient en dessous du seuil de détection. Les facteurs et protéines étaient significativement comparables à un plasma témoin.

La mise en place au laboratoire d'hématologie du CHU de Caen, de ce prétraitement permettra de répondre aux demandes urgentes pour un dosage de facteur, et de réaliser un bilan de thrombophilie pour les patients sous AOD.

---

## TITLE

EVALUATION AND IMPLEMENTATION OF NEUTRALIZING AGENT TO OVERCOME THE EFFECT OF DIRECT ORAL ANTICOAGULANTS (DOACS) AT HEMATOLOGY LABORATORY OF CAEN HOSPITAL

---

## Summary

Direct oral anticoagulants (DOACs) interfere with many coagulation assays, causing false diagnoses. In this study, normal pools of plasma were spiked with rivaroxaban and apixaban at five different concentrations and compared with control plasma. The aim was firstly to assess the interference of AODs on the various haemostasis tests. Secondly, to assess the ability of DOAC-Stop™ to overcome this interference and return to a state comparable to control plasma.

Results revealed falsely lowered factors (FV, FVIII,) falsely prolonged aPTT, AT, PS, PC and falsely positive ACC from low concentrations of AODs, with the exception of apixaban, and we also identified reagent stability specific problems for PC and PS. DOAC-Stop™, a pre-analytical alternative, effectively neutralized the effect of DOACs, with all DOACs concentrations below the lower quantification limit. factors and proteins were significantly comparable to control plasma.

The implementation of this pre-treatment in the haematology laboratory at Caen University Hospital might help to respond to urgent requests for factor assays, and to perform thrombophilia assessments under AOD.

---

## Mots-clés

DOAC-STOP™, AOD, charbon actif, ACC, FV, FVIII

---

Nom et Prénom de l'auteur : ARIOUAT Iman