



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

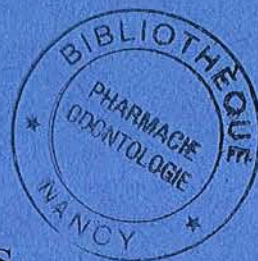


**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1**  
**2007**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de PHARMACIE SPECIALISEE**



soutenu devant le Jury Inter-régional  
le 25 octobre 2007  
par Julien PERRIN  
conformément aux dispositions de l'arrêté  
du 4 octobre 1988 tenant lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

**Inéquivalence et variabilité de profil d'anticoagulation**  
***in vitro* étudié par thrombinographie**  
**de 6 héparines de bas poids moléculaire et du fondaparinux**

Président : Monsieur le Professeur C. VIGNERON

Juges : Madame M. TOUSSAINT-HACQUARD, Assistante hospitalo-universitaire  
Monsieur le Professeur T. LECOMPTE  
Mademoiselle N. COMMUN, Pharmacien hospitalier  
Monsieur le Professeur Y. ARTUR







UNIVERSITE Henri Poincaré, NANCY 1  
FACULTE DE PHARMACIE

**DOYEN**

Chantal FINANCE

**Vice-Doyen**

Francine PAULUS

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Pierre LABRUDE

**Responsable de la Commission de la Recherche**

Jean-Claude BLOCK

**Directeur des Etudes**

Gérald CATAU

**Responsable de la Commission des Relations Internationales**

Janine SCHWARTZBROD

**Responsable de la Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la Commission Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :** Gérald CATAU

**Responsable de la filière Industrie :** Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du CEPH:** Jean-Michel SIMON  
(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

**DOYEN HONORAIRE**

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Roger BONALY

Maurice HOFFMAN

Gérard SIEST

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES  
HONORAIRES**

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU



# ENSEIGNANTS

## PROFESSEURS

Alain ASTIER .....	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON .....	Pharmacologie
Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL .....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE .....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL.....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU.....	Biochimie clinique
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU .....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE .....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à .....domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR .....	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD .....	Pharmacologie
Pierre LEROY .....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT .....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA .....	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS .....	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN .....	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD .....	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON .....	Economie de la santé, législation pharmaceutique
Claude VIGNERON .....	Hématologie, Physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT .....	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS .....	Parasitologie
Mariette BEAUD .....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT .....	Communication et santé
Michel BOISBRUN .....	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX .....	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX .....	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Gérald CATAU .....	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN .....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT .....	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB .....	Parasitologie, organisation animale
Joël COULON .....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique

Bernard DANGIEN .....	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN .....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE .....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU .....	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY .....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS .....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL .....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE .....	Hématologie
Luc FERRARI .....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD .....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN .....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT .....	Chimie organique
Frédéric JORAND .....	Santé et environnement
Francine KEDZIEREWICZ .....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER .....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND .....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI .....	Hématologie biologique
Patrick MENU .....	Physiologie
Christophe MERLIN .....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER .....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS .....	Informatique
Christine PERDICAKIS .....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....	Pharmacologie
Virginie PICHON .....	Biophysique
Anne SAPIN .....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....	Santé publique
Gabriel TROCKLE .....	Pharmacologie
Mohamed ZAIOU .....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....	Pharmacie galénique

## **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER .....Sémiologie

## **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD .....Anglais

## **ASSISTANTS**

Annie PAVIS .....Bactériologie

## **SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)**

Anne-Pascale PARRET ..... Directeur

Jean-Michel THEODORE ..... Responsable de la section Pharmacie-  
Odontologie



## **SERMENT DES APOTHICAIRES**



**J**e jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT  
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR  
AUTEUR ».



### ***À notre Président de Thèse***

Monsieur le Professeur Claude VIGNERON  
Professeur d'hématologie  
Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Nancy

Vous nous avez fait le grand honneur d'encadrer notre internat en Pharmacie Spécialisée, et cette thèse, dont c'est l'aboutissement, ne pouvait trouver meilleur Président.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos enseignements tout au long de notre cursus en Pharmacie. Votre grande pédagogie et votre aisance demeureront pour nous une référence.

Nous vous serons éternellement reconnaissant de nous avoir permis de suivre cette voie, dans cette discipline qui nous passionne, ainsi que pour le soutien et la confiance que vous nous avez témoignés.

*Vous trouverez ici toute l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.*

***À notre Directeur de Thèse***

Madame Marie TOUSSAINT-HACQUARD  
Assistante hospitalo-universitaire  
Service d'hématologie biologique  
CHU – Nancy

Vous êtes à l'origine de ce travail, aussi bien sur leur plan intellectuel que pratique, et vous avez nous avez fait l'honneur de diriger cette thèse.

Vos compétences et votre détermination resteront pour nous des modèles.  
Nous avons apprécié votre disponibilité, votre sincérité et vos grandes qualités humaines.

Puisse notre collaboration perdurer.

*Soyez assurée de toute notre gratitude, notre considération et de notre  
sincère amitié.*



### ***À notre juge***

Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE,  
Professeur d'hématologie  
Chef du service d'hématologie biologique  
CHU – Nancy

Vous nous avez fait l'honneur de juger ce travail.

Vous nous avez accueilli dans votre service et permis d'y effectuer la  
majorité de notre internat.  
Votre rigueur, votre grande connaissance et votre esprit critique seront  
toujours pour nous des exemples.

Nous garderons en mémoire tous ces longs échanges si enrichissants.  
Ces quelques années passées à votre contact nous ont fait énormément  
progresser.

*Vous trouverez ici le témoignage de notre gratitude et de notre profond  
respect.*

***À notre juge***

Mademoiselle Nathalie COMMUN  
Pharmacien-Chef  
Hôpitaux Maringer-Villemin-Fournier  
CHU – Nancy

Vous nous avez fait l'honneur de juger ce travail.

Vous nous avez accueilli dans votre service pour nos débuts en tant  
qu'interne ou plutôt en tant que « Faisant Fonction ».  
Nous avons apprécié vos compétences, votre grande disponibilité et votre  
dynamisme.

*Soyez assurée de toute notre gratitude.*



***À notre juge***

Monsieur le Professeur Yves ARTUR,  
Professeur de biochimie clinique  
Université de Bourgogne

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

*Soyez assuré de toute notre gratitude.*

## ***À mes parents***

*A ma maman adorée,*  
qui me manque tant et qui j'espère, là où elle est, partage avec moi ces  
moments qu'elle aurait tant aimé vivre.

*A mon papa bienveillant,*  
Qui profite maintenant d'un repos bien mérité,  
lui qui m'a toujours soutenu, même si ma voie, un peu compliquée, n'est  
pas toujours facile à suivre !

**À Sophie**

*Tu es le Soleil et l'Amour...*



***À mes grands-parents***

Pour le soutien et leur intérêt permanents.

***Aux « Phan Dinh », « Nouvelle » et bientôt « Wilhelm »***

Pour leur soutien indéfectible dans les moments les plus difficiles.

***À tous mes amis***

Poup' et Emilie, Vivi et Isa, Jaja et Sarah, Matth et Céline, Rémi, JP, Ben',  
Adeline, Ptit bout, et autres « Pinder »

Antoine, Mike et John  
*The fading light of the dying sun* pour une *Starry night*

À tous les Jumping Mushrooms,  
*let the good times roll and Jump*

À tous mes co-internes avec qui nous avons partagés ces années de  
« dur » labeur !!

Je tiens à adresser tous mes remerciements à toutes les personnes ayant permis la réalisation de ce travail.

Et notamment,

Au **Professeur Ph. Maincent**, au **Docteur J. Mardiguan** et à **ROVI SA**  
pour nous avoir gracieusement fourni la bémiparine et le RO-14.

À tous mes **collègues et amis du service d'hématologie biologique**

Et **plus particulièrement au secteur EFC**, Viviane, Yveline, Martine,  
Denis et Frédéric pour leur disponibilité, leurs conseils judicieux et leur  
assistance compétente.

Sans oublier les **donneurs bénévoles** sans qui ce travail n'aurait pu voir  
le jour !

À Madame **Géraldine Reppel**, pour son aide précieuse et efficace ainsi  
que pour son enthousiasme permanent.



## Liste des abréviations

---

$\alpha$ 2M :  $\alpha$ 2-macroglobuline

AT : antithrombine

BSA : bovine serum albumine

CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium

COMEDIMS : commission du médicament et des dispositifs médicaux stériles

Da : Dalton

DCI : dénomination internationale commune

ETP : endogenous thrombin potential

F4P : facteur 4 plaquettaire

FDA : food and drug administration

FII : facteur II ou prothrombine

FIIa : facteur II activé ou thrombine

FIX : facteur IX

FIXa : facteur IX activé

FT : facteur tissulaire

FV : facteur V

FVa : facteur V activé

FVi : facteur V inactivé

FVIIa : facteur VII activé

FVIIIa : facteur VIII activé

FVIIIi : facteur VIII inactivé

FvW : facteur von Willebrand

FX : facteur X

FXa : facteur X activé

GAG : glycosaminoglycanes

HBPM : héparine de bas poids moléculaire

HCII : second cofacteur de l'héparine

HNF : héparine non fractionnée

IV : intra-veineuse

LMWH : low molecular weight heparin

OMS : organisation mondiale de la santé

PC : protéine C

PCa : protéine C activée

PPP : plasma pauvre en plaquettes

PRP : plasma riche en plaquettes

PS : protéine S

SC : sous-cutané

SD : standard deviation

TC+A : temps de céphaline + activateur

TFPI : tissue factor pathway inhibitor

TM : thrombomoduline

UFH : unfractionnated heparin

# Table des matières



<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>2</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>- 7 -</b>
2.1	LA COAGULATION [1,2,3] .....	- 8 -
2.2	REGULATION DE LA COAGULATION .....	- 10 -
2.2.1	L'antithrombine (AT) .....	- 11 -
2.2.2	Le système de la protéine C / protéine S / thrombomoduline [5,6] .....	- 12 -
2.2.3	Le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) [8] .....	- 12 -
2.2.4	Autres inhibiteurs de la coagulation [4,6] .....	- 13 -
2.2.4.1	L' $\alpha$ 2-macroglobuline ( $\alpha$ 2M) .....	- 13 -
2.2.4.2	Le second cofacteur de l'héparine (HCII) .....	- 13 -
2.2.4.3	L' $\alpha$ 1-antitrypsine [6] .....	- 13 -
2.3	HEPARINES DE BAS POIDS MOLECULAIRE ET FONDAPARINUX .....	- 14 -
2.3.1	L'héparine non fractionnée (HNF) : brefs rappels [9,10] .....	- 14 -
2.3.1.1	Structure et mécanisme d'action .....	- 14 -
2.3.1.2	Activité sur le TFPI [8] .....	- 16 -
2.3.1.3	Pharmacocinétique .....	- 16 -
2.3.1.4	Surveillance biologique de l'activité anticoagulante .....	- 17 -
2.3.2	Héparines de bas poids moléculaire (HBPM) [13,14] .....	- 17 -
2.3.2.1	Structure et mécanisme d'action .....	- 17 -
2.3.2.2	Pharmacocinétique .....	- 19 -
2.3.2.3	Surveillance biologique de l'activité anticoagulante .....	- 19 -
2.3.3	Fondaparinux (ARIXTRA®) [15,16] .....	- 20 -
2.3.3.1	Structure et mécanisme d'action .....	- 20 -
2.3.3.2	Pharmacocinétique .....	- 21 -
2.3.3.3	Surveillance biologique de l'activité anticoagulante .....	- 22 -
2.4	(IN)EQUIVALENCE DES HBPM ? .....	- 22 -
<b>3</b>	<b>TRAVAIL EXPERIMENTAL .....</b>	<b>- 27 -</b>
3.1	MATERIELS ET METHODES .....	- 28 -
3.1.1	La thrombinographie [32,33,34] .....	- 28 -
3.1.2	Réactifs .....	- 30 -
3.1.2.1	Molécules étudiées .....	- 30 -
3.1.2.2	Thrombinographie .....	- 31 -
3.1.3	Méthode .....	- 31 -
3.2	RESULTATS .....	- 34 -
3.2.1	Population et valeurs de référence .....	- 34 -
3.2.2	Profil général de réponse en fonction des différentes HBPM et du fondaparinux .....	- 34 -
3.2.3	Variabilité inter-héparine .....	- 35 -
3.2.4	Profils de réponse inter-individuels .....	- 39 -
<b>4</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>- 43 -</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>- 54 -</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>7</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>- 64 -</b>



# Index des tableaux

---

Tableau I : Activité anti-Xa attendue en prophylaxie.....	- 25 -
Tableau II : Caractéristiques des molécules testées. ....	- 31 -
Tableau III : Variation de l'ETP après surcharge avec du fondaparinux chez le sujet 4.....	- 52 -



# Index des figures



Figure 1 : Modèle cellulaire de la coagulation.	- 8 -
Figure 2 : Principaux inhibiteurs de la coagulation.	- 11 -
Figure 3 : Répartition en poids moléculaire des chaînes d'héparines standard (heparin) et d'HBPM (LMWH).	- 14 -
Figure 4 : Mécanisme d'action anti-IIa et anti-Xa des chaînes d'héparine, <i>via</i> l'antithrombine.	- 15 -
Figure 5 : Principe de préparation des HBPM (LMWH) à partir de l'héparine standard.	- 18 -
Figure 6 : Pentasaccharide naturel et dérivé alpha-méthylé (fondaparinux, ARIXTRA®).	- 21 -
Figure 7 : Doses recommandées pour un traitement curatif de thrombose veineuse et héparinémies générées 3 à 5 heures après l'administration des HBPM disponibles en France.	- 25 -
Figure 8 : Courbe de génération de thrombine obtenue en PPP, en présence de facteur tissulaire 5 pM et de phospholipides.	- 29 -
Figure 9 : Profil de réponse de chaque HBPM pour un sujet donné.	- 36 -
Figure 10 : Comparaison de l'ETP résiduel moyen en fonction de la concentration et du type d'HBPM	- 37 -
Figure 11 : Profil type de réponse au fondaparinux.	- 38 -
Figure 12 : ETP résiduel moyen en fonction de la concentration en fondaparinux.	- 38 -
Figure 13 : Profils de réponse de 2 volontaires sains à 3 HBPM pour 2 concentrations.	- 40 -
Figure 14 : Variation de l'ETP et du temps de latence en fonction de l'anti-Xa plasmatique.	- 41 -
Figure 15 : variabilité inter-individuelle de réponse au fondaparinux.	- 42 -
Figure 16 : Hypothèse du mécanisme d'action d'un inhibiteur spécifique du FXa médié par l'AT, dans nos conditions expérimentales.	- 48 -
Figure 17 : Hypothèse du mécanisme d'action d'un inhibiteur du FXa avec activité anti-IIa résiduelle médié par l'AT, dans nos conditions expérimentales.	- 49 -
Figure 18 : Profil de réponse après surcharge en fondaparinux chez le sujet 4.	- 52 -
Figure 19 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 1 avec les 6 HBPM.	- 65 -
Figure 20 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 2 avec les 6 HBPM.	- 66 -
Figure 21 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 3 avec les 6 HBPM.	- 67 -
Figure 22 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 4 avec les 6 HBPM.	- 68 -

<b>Figure 23 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 5 avec les 6 HBPM.</b>	<b>- 69 -</b>
<b>Figure 24 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 6 avec les 6 HBPM.</b>	<b>- 70 -</b>
<b>Figure 25 : Thrombinogrammes obtenus chez les 6 sujets avec le fondaparinux.</b>	<b>- 71 -</b>



# 1

## **INTRODUCTION**

Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) sont des molécules antithrombotiques, qui s'opposent à la survenue ou à l'extension d'une thrombose (formation d'un caillot dans le système vasculaire). En dépit de leur usage largement répandu, il existe certaines « idées reçues » à leur sujet. En effet, il est classique d'évoquer les HBPM comme des produits équivalents au sein d'une même classe thérapeutique, et ce en dépit de différences biochimiques bien établies, et probablement de différences pharmacodynamiques. Aussi, le *monitoring* d'un traitement par HBPM n'est pas obligatoire, suggérant un effet concentration-réponse prédictible et bien homogène. En outre, quand cette surveillance biologique s'avère nécessaire, elle repose sur la mesure de l'activité anti-Xa plasmatique qui ne reflète qu'une concentration plasmatique et non le retentissement du principe actif sur la coagulation.

L'objet de notre étude est de caractériser le profil d'anticoagulation et le retentissement global sur la coagulation, de plusieurs HBPM (bémiparine, dalteparine, énoxaparine, nadroparine, RO-14, tinzaparine), en comparaison avec celui obtenu avec le fondaparinux (pentasaccharide synthétique), dans une population de volontaires sains et à l'aide d'une méthode intégrative globale de la coagulation, la thrombinographie.

Afin de caractériser au mieux l'effet propre à chacune des molécules testées sur la coagulation, nous avons choisi de nous placer dans un système *in vitro* acellulaire, limitant ainsi au maximum les facteurs de variabilité comme par exemple l'interaction avec les plaquettes (en particulier, avec le facteur 4 plaquettaire) et les variabilités, même minimales, liées aux caractéristiques pharmacocinétiques (absorption et fixation protéique non spécifique).



# 2

## **BIBLIOGRAPHIE**

## 2.1 La coagulation [1,2,3]

La coagulation protège contre le saignement en évitant qu'une trop importante quantité de sang quitte le lit vasculaire après survenue d'une brèche. Elle a pour expression le passage du sang de l'état liquide à l'état de gel, par transformation d'une protéine plasmatique soluble, le fibrinogène, en une protéine insoluble, la fibrine, qui s'organise en réseau pour former un caillot. Elle survient en réponse à un dommage vasculaire (coupure...) ou à une activation de l'endothélium (par des cytokines ou des stimuli inflammatoires). C'est un phénomène localisé et non extensif, de par la présence de systèmes de régulation extrêmement fins. Elle consiste en une suite de réactions enzymatiques aboutissant à la génération de thrombine, enzyme-clé du système, permettant la conversion du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Elle nécessite la présence de surfaces cellulaires et se déroule en plusieurs étapes (figure 1) :

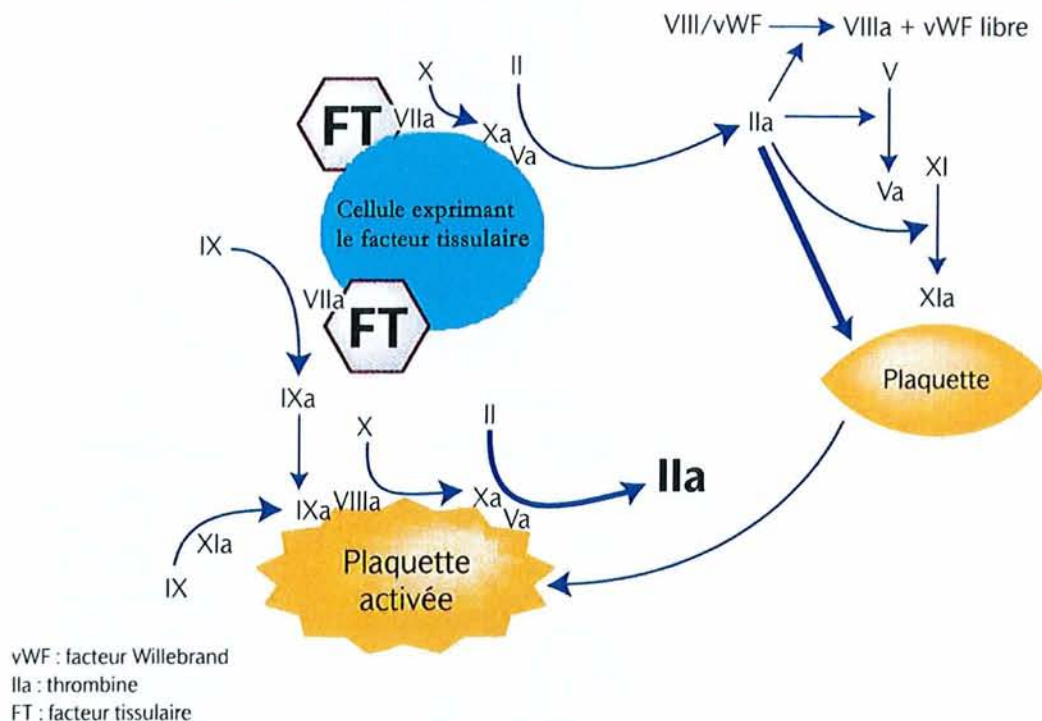


Figure 1: Modèle cellulaire de la coagulation (d'après [1]).



### **a) Initiation**

La coagulation est initiée par le contact du facteur tissulaire (FT) (glycoprotéine exprimée par les cellules du sous-endothélium) avec le sang circulant. Le FT va se lier à une sérine-protéase, le FVIIa, présent en très faible quantité dans le plasma (inférieure au nM), pour former un complexe nommé tenase extrinsèque. Ce complexe va catalyser la conversion du facteur X en Xa et du facteur IX en IXa. Le facteur Xa va ensuite s'associer, à la surface des cellules exposant le FT, au facteur Va (notamment libéré par les plaquettes suite à leur adhésion au collagène sous-endothélial). Ce complexe Xa-Va en présence de phospholipides anioniques (fournis par les surfaces cellulaires) et de  $\text{Ca}^{2+}$  va former la prothrombinase, capable de cliver la prothrombine (facteur II) en thrombine active (facteur IIa).

### **b) Amplification**

Les premières traces de thrombine (de l'ordre de quelques pM) générées à la surface des cellules portant le FT vont avoir plusieurs fonctions. La principale est d'activer les plaquettes, aboutissant à l'exposition membranaire de phospholipides procoagulants et à la libération entre autres de facteur V. La thrombine générée va également activer les facteurs V, VIII et XI à la surface des plaquettes. La thrombine va donc amplifier sa propre génération.

### **c) Propagation**

A la surface des plaquettes activées et en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , le facteur IXa va s'associer au FVIIIa pour former la tenase intrinsèque, également capable de cliver le facteur X en Xa, facteur Xa qui va immédiatement se complexer au facteur Va pour former le complexe prothrombinase provoquant une génération explosive de thrombine. La thrombine va cliver le fibrinogène en fibrine. Le facteur IXa peut être produit soit par la tenase extrinsèque à la surface des cellules portant le FT (auquel cas, il devra migrer en phase fluide vers la surface

plaquettaire), soit par le facteur XIa directement à la surface des plaquettes. Cette boucle d'amplification de la formation du Xa est nommée « Boucle de Josso ». Enfin, la fibrine, dans un premier temps, sera stabilisée par le facteur XIII, préalablement activé par la thrombine, pour former un caillot de fibrine insoluble.

Il faut noter que la gélification du plasma survient pour des concentrations de 10 à 20 nM en thrombine, ce qui correspond à la transition entre phase d'amplification et de propagation. Ainsi, plus de 95% de la thrombine totale est générée après la formation du caillot et, à l'heure actuelle, il reste beaucoup de questions en suspens quant au(x) autre(s) rôle(s) de celle-ci. Parmi ceux-ci sont évoqués l'activation du TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, protégeant ainsi le caillot de la fibrinolyse) ou encore une participation au remodelage du caillot [2].

En outre, certains auteurs mentionnent une quatrième phase dite de terminaison, correspondant à l'extinction du complexe prothrombinase ou à l'épuisement de la prothrombine.

## **2.2 Régulation de la coagulation**

Afin d'éviter l'extension et la propagation du caillot à distance du site lésé, le système de la coagulation est finement régulé par des inhibiteurs. Les facteurs activés *in situ* sont ainsi rapidement inactivés dans la circulation sanguine par des inhibiteurs. L'antithrombine et le TFPI sont les principaux inhibiteurs dits « stoechiométriques » et le système PC/PS/TM est un inhibiteur dynamique de la génération de thrombine (figure 2).

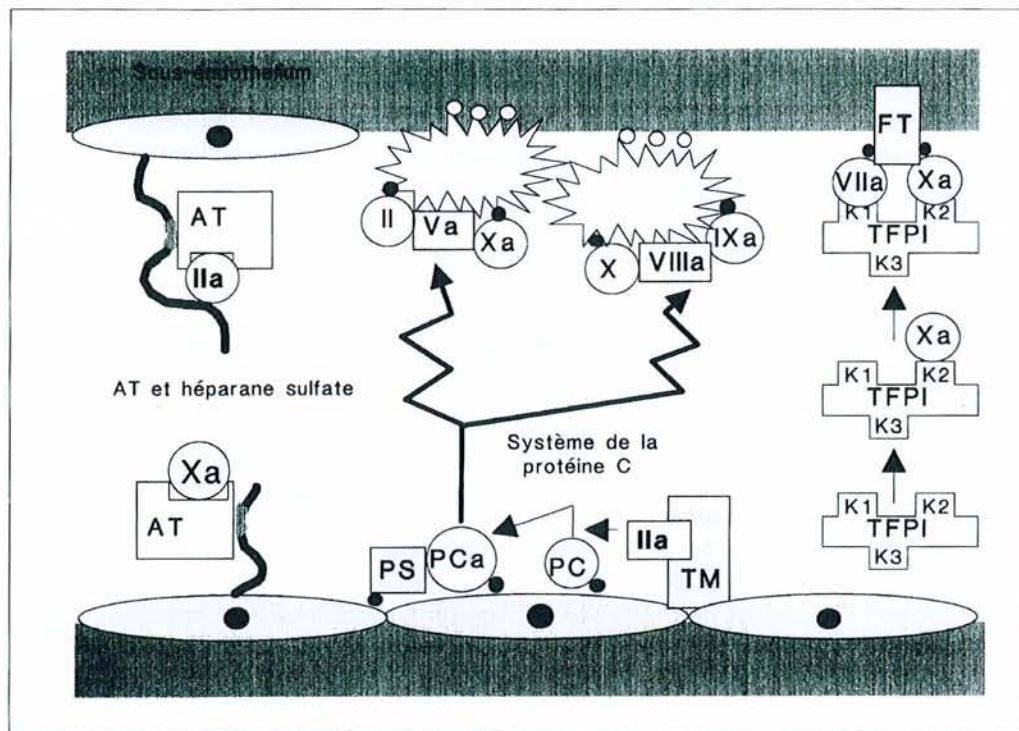


Figure 2 : Principaux inhibiteurs de la coagulation (d'après [6]).

### 2.2.1 L'antithrombine (AT)

C'est une serpine monocaténaire synthétisée par le foie possédant un site réactif et un site permettant de fixer des glycosaminoglycanes. Sa concentration plasmatique est d'environ 150 µg/mL et sa demi-vie plasmatique de 3 jours [4]. L'AT est le principal inhibiteur de la thrombine (75%), mais elle est également capable d'inhiber les facteurs Xa et dans une moindre mesure les facteurs IXa, XIa et XIIa. L'AT forme un complexe équimoléculaire irréversible avec ces facteurs, complexe dans lequel ceux-ci n'ont plus d'activité. Cette activité inhibitrice, initialement lente, est considérablement accélérée par la présence de glycosaminoglycanes (comme l'héparane sulfate présent sur la paroi vasculaire ou encore les dérivés hépariniques - cf figure 2 et chapitre suivant). Il faut enfin noter que l'AT n'a pas d'activité sur la thrombine liée à la fibrine [4].



L'AT est la cible de certains anticoagulants comme l'héparine (standard ou non fractionnée), les héparines de bas poids moléculaires ou le fondaparinux.

### **2.2.2 Le système de la protéine C / protéine S / thrombomoduline [5,6]**

La protéine C (PC) et la protéine S (PS) sont des protéines dont la synthèse hépatique dépend de la vitamine K (au même titre que les facteurs II, VII, IX et X). La thrombomoduline (TM) est une protéine transmembranaire, localisée à la surface des cellules endothéliales.

La thrombine va former un complexe équimoléculaire de très haute affinité avec la TM endothéliale, au sein duquel elle va perdre sa capacité à cliver le fibrinogène, à activer les plaquettes et les facteurs V et VIII. Ce complexe va pouvoir cliver la PC, inactive, en PCa après fixation de celle-ci sur son récepteur cellulaire EPCR [7]. Ainsi, en présence de PS libre, la PCa pourra inhiber les facteurs Va et VIIIa (en facteur Vi et VIIIi respectivement) à la surface des plaquettes activées, diminuant la vitesse de génération de thrombine.

### **2.2.3 Le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) [8]**

C'est un inhibiteur de type Kunitz, sécrété dans le plasma par les cellules endothéliales et circulant en partie lié aux lipoprotéines. Pour exercer son activité, il doit se former un complexe quaternaire Xa-TFPI-VIIa-FT, dans lequel les facteurs Xa, VIIa et FT n'ont plus d'activité. L'inhibition du complexe FT-VIIa par le TFPI n'est possible qu'à partir du moment où des traces de facteur Xa ont été générées. Le TFPI est en conséquence un inhibiteur majeur de la phase d'initiation alors que l'AT et le système PC/PS/TM ont des actions inhibitrices majoritairement sur la phase de propagation.



## **2.2.4 Autres inhibiteurs de la coagulation [4,6]**

### **2.2.4.1 L' $\alpha$ 2-macroglobuline ( $\alpha$ 2M)**

L' $\alpha$ 2-macroglobuline est une glycoprotéine synthétisée par la cellule endothéliale, et présente dans le plasma. Elle forme des complexes avec les endopeptidases (telles que trypsine, chymotrypsine, pepsine...) de toutes les classes catalytiques connues ; les enzymes complexées sont englobées par l'inhibiteur et deviennent incapables d'exercer leur action vis-à-vis de leur(s) substrat(s) macromoléculaire(s). Parmi les protéases de la coagulation, l' $\alpha$ 2-macroglobuline inhibe la thrombine et la kallicréine. Elle représente 25% de la capacité inhibitrice du plasma vis-à-vis de la thrombine.

### **2.2.4.2 Le second cofacteur de l'héparine (HCII)**

Comme l'antithrombine, il appartient à la famille de serpins et forme un complexe équimoléculaire avec l'enzyme à inhiber. Sa synthèse est hépatique. Le HCII est un inhibiteur lent de la thrombine, dont l'activité est augmentée en présence d'héparine ou de dermatane sulfate (GAG présent dans la matrice extracellulaire). Contrairement à l'AT, le HCII est capable d'inhiber la thrombine en phase fluide ainsi que la thrombine liée au caillot. Son retentissement sur la coagulation *in vivo* apparaît comme faible, puisqu'un déficit ne constitue pas un risque de thrombose.

### **2.2.4.3 L' $\alpha$ 1-antitrypsine [6]**

C'est une autre serpine plasmatique à large spectre, agissant surtout au niveau tissulaire en inhibant des protéases leucocytaires, des enzymes pancréatiques, la collagénase... concernant les protéines de la coagulation, elle est capable d'inactiver la thrombine, la kallicréine et le facteur XIa, mais de façon très lente, pour un retentissement *in vivo* non significatif.

## 2.3 Héparines de bas poids moléculaire et fondaparinux

Les HBPM et le fondaparinux sont des molécules anticoagulantes dont la structure dérive de l'héparine standard (ou non fractionnée), et développées dans un souci d'amélioration des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de celle-ci.

### 2.3.1 L'héparine non fractionnée (HNF) : brefs rappels [9,10]

#### 2.3.1.1 Structure et mécanisme d'action

L'héparine a été isolée du foie de chien en 1916 par McLean. Actuellement elle est extraite de la muqueuse intestinale de porc ou du poumon de bœuf (ce dernier mode de préparation n'étant quasiment plus utilisé). Elle est composée d'un mélange hétérogène de chaînes de sucres, formé de la répétition d'un motif de base associant un acide hyaluronique et une glucosamine (glycosaminoglycanes). Le poids moléculaire est variable, compris entre 3000 et 30000 Da (figure 3). La longueur des chaînes varie entre 10 et 100 sucres, avec une moyenne aux alentours de 45, ce qui correspond à un poids moléculaire voisin de 15000 Da.

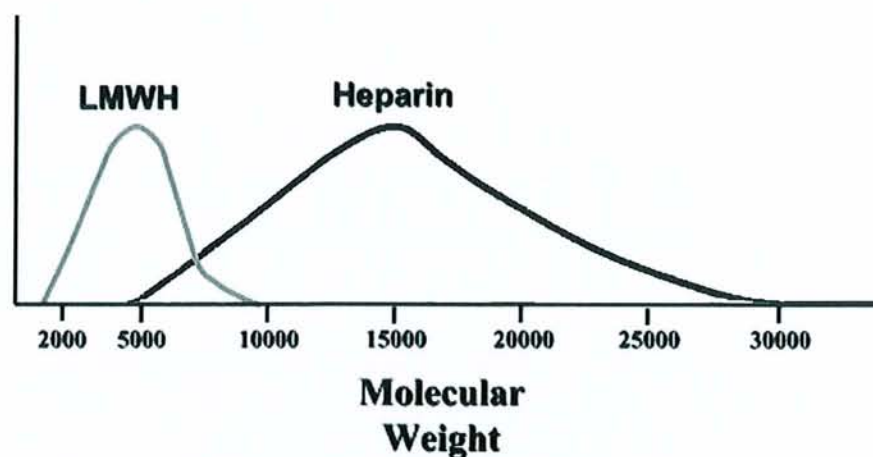


Figure 3 : Répartition en poids moléculaire des chaînes d'héparines standard (heparin) et d'HBPM (LMWH). D'après [9].

L'activité anticoagulante de l'héparine est indirecte car elle nécessite la présence d'antithrombine. En se fixant sur l'AT par l'intermédiaire d'un site spécifique, l'héparine modifie la conformation de cette serpine et accélère la vitesse d'interaction entre l'enzyme à inhiber (facteurs IIa et Xa principalement) et l'inhibiteur (AT).

L'héparine se lie à l'AT par une séquence spécifique de 5 sucres, qui n'est présente seulement que sur un tiers des chaînes. Les deux tiers restant sont donc dépourvus d'activité anticoagulante antithrombine-médiée significative [9]. Bien que la séquence pentasaccharidique soit nécessaire pour inhiber la thrombine, elle n'est pas suffisante. En effet, la longueur des chaînes polysaccharidiques contribue à l'activité et il faut une longueur critique minimale de 18 sucres (soit un poids moléculaire d'environ 5400 Da) pour que puisse se créer une liaison non spécifique entre la thrombine et l'AT (figure 4).

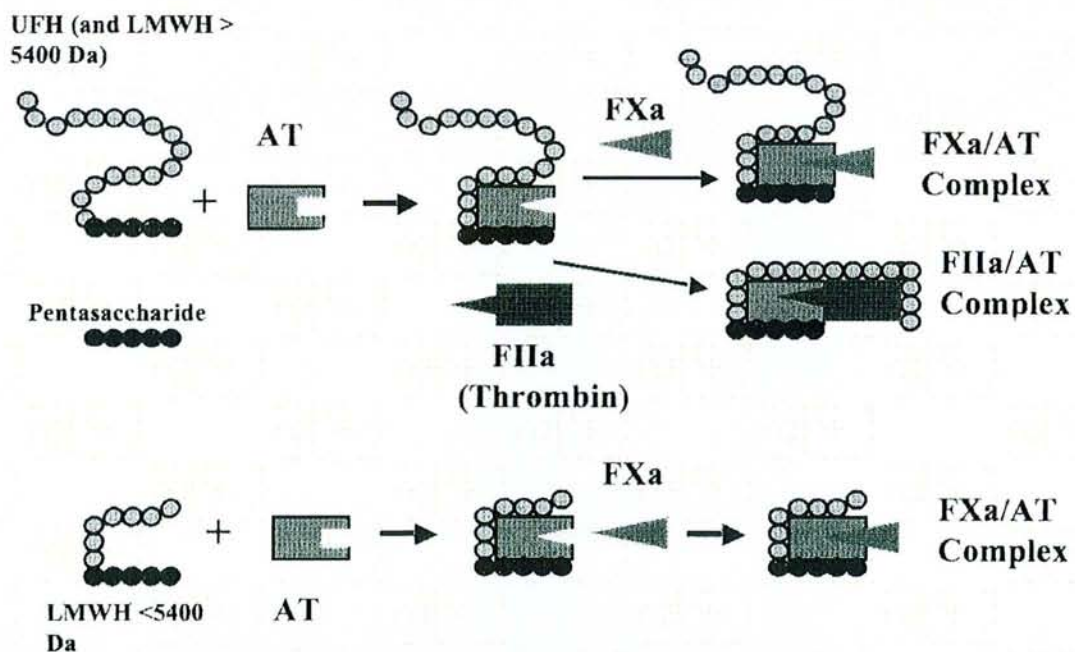


Figure 4 : Mécanisme d'action anti-IIa et anti-Xa des chaînes d'héparine, *via* l'antithrombine. D'après [9].



De ce fait les chaînes les plus courtes, en dessous de la longueur critique, ne peuvent pas permettre ce rapprochement entre AT et IIa et seront incapables d'inhiber la thrombine. En revanche, l'inhibition du facteur Xa ne nécessite que la présence de la séquence pentasaccharidique. En conséquence, les chaînes de moins de 18 sucres n'ont qu'une activité anti-Xa, alors que les chaînes plus longues possèdent à la fois une activité anti-Xa et anti-IIa.

### **2.3.1.2      Activité sur le TFPI [8]**

Les propriétés antithrombotiques de l'héparine sont également liées à une action sur le TFPI, de découverte plus récente. Ces effets sur l'activité du TFPI sont doubles. *In vitro*, l'héparine augmente l'activité anticoagulante du TFPI ainsi que son affinité pour le Xa et accélère l'interaction initiale rapide des deux molécules. *In vivo*, l'héparine déplace le TFPI de son site de fixation sur l'endothélium. C'est Sandset en 1988 [11] qui a montré que l'injection d'héparine entraînait l'augmentation du taux du TFPI plasmatique par libération de la molécule à partir de l'endothélium. Le TFPI libéré par l'héparine est sous forme intacte et libre, c'est-à-dire sous la forme la plus efficace pour inhiber la coagulation.

### **2.3.1.3      Pharmacocinétique**

L'héparine n'est pas absorbée par voie orale. L'administration ne peut se faire actuellement que par voie parentérale (sous-cutanée ou intraveineuse). La biodisponibilité est variable selon la dose et la voie d'administration. Aussi, l'héparine se fixe à des nombreuses protéines plasmatiques (facteur 4 plaquettaire, lipoprotéines, fibronectine, vitronectine,...) [12] et interagit avec plusieurs types cellulaires (endothélium, phagocytes mononucléés...) [9], contribuant à une variabilité de réponse selon les individus. Son élimination est fonction de la taille des chaînes. Les plus longues sont captées et dégradées par l'endothélium et les macrophages, par un mécanisme rapide mais saturable. Les plus courtes sont éliminées par le rein, par un mécanisme lent et non saturable.



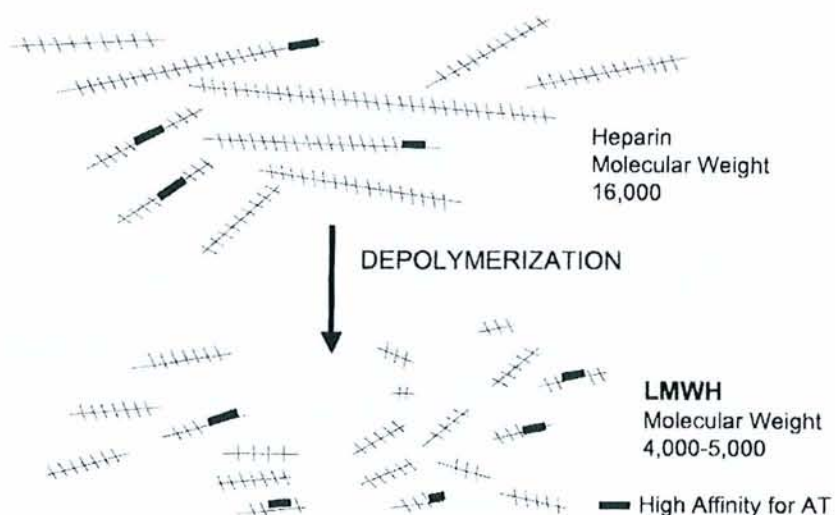
#### **2.3.1.4 Surveillance biologique de l'activité anticoagulante**

Du fait de la variabilité de réponse importante, la surveillance usuelle d'un traitement par HNF est indispensable à dose thérapeutique, et peut s'avérer nécessaire en prophylaxie. Elle se fait par l'intermédiaire du temps de céphaline avec activateur (TC+A), qui correspond au temps de coagulation d'un plasma après déclenchement de la coagulation par une surface étrangère (électronégative) et recalcification.

### **2.3.2 Héparines de bas poids moléculaire (HBPM) [13,14]**

#### **2.3.2.1 Structure et mécanisme d'action**

Les HBPM sont obtenues par dépolymérisation chimique ou enzymatique de l'héparine standard (figure 5), pour obtenir des GAG d'un poids moléculaire moyen de 4000 à 5000 Da (mais pouvant s'étendre de 2000 à 9000 Da), poids qui correspond à 15 unités monosaccharidiques par molécule (figure 3). Leur développement en thérapeutique dans les années 1980 a été motivé par plusieurs observations : 1) de poids moléculaire inférieur, elle ont une activité anti-IIa réduite par rapport à l'activité anti-Xa ; 2) les études chez l'animal ont montré, par rapport à l'HNF, moins de saignement pour un effet antithrombotique équivalent ; 3) les HBPM ont des propriétés pharmacocinétiques supérieures à l'HNF.



**Figure 5 : Principe de préparation des HBPM (LMWH) à partir de l'héparine standard. D'après [9].**

Les HBPM exercent leurs propriétés anticoagulantes par fixation sur l'AT, par l'intermédiaire de la séquence pentasaccharidique. Mais par rapport à l'HNF, les HBPM ont une capacité réduite à inactiver la thrombine, car les chaînes polysaccharidiques étant majoritairement plus courtes, elles ne peuvent pas simultanément se lier à l'AT et à la thrombine (figure 4). Selon le poids moléculaire moyen des préparations d'HBPM, entre 25 et 50% des molécules ont une activité anti-IIa, alors que toutes les chaînes possédant la séquence pentasaccharidique ont une activité anti-Xa. Ainsi les HBPM ont une activité anticoagulante principalement ciblée sur l'inhibition du facteur Xa tout en conservant une capacité résiduelle à inhiber le facteur IIa, capacité qui est propre à chaque spécialité pharmaceutique, du fait de son mode de préparation. Par conséquent, chaque préparation d'HBPM possède un ratio d'inhibition anti-Xa / anti-IIa qui lui est caractéristique.

Il faut également noter que les HBPM ont les mêmes propriétés que l'HNF vis-à-vis du TFPI, donc leur activité antithrombotique ne peut se résumer qu'à l'interaction avec l'AT.

Plusieurs HBPM sont disponibles actuellement sur le marché français, mais leur méthode de préparation diffère l'une par rapport à l'autre [13] : dépolymérisation par l'acide nitreux (nadroparine, FRAXIPARINE®, FRAXODI® ; daltéparine, FRAGMINE®), benzylation et dépolymérisation alcaline (énoxaparine, LOVENOX®) ou encore dépolymérisation enzymatique par une héparanase (tinzaparine, INNOHEP®).

#### **2.3.2.2 Pharmacocinétique**

Les HBPM ont montré de meilleures propriétés pharmacocinétiques par rapport à l'HNF, dont la variabilité de réponse inter-individuelle peut poser problème en thérapeutique. En effet, les HBPM ont une pharmacocinétique « plus prédictible » : elles ont une biodisponibilité meilleure par voie SC (proche de 100%), et de par leur plus petite taille de chaîne, une fixation protéique non spécifique diminuée par rapport à l'HNF, ce qui contribue à réduire considérablement la variabilité inter-individuelle. Elles ont une réponse généralement plus prédictible aux doses utilisées et enfin une demi-vie plus longue. Leur élimination est principalement rénale et non dose-dépendante (contrairement à l'HNF), du fait de la présence majoritaire de petites chaînes.

#### **2.3.2.3 Surveillance biologique de l'activité anticoagulante**

L'administration d'HBPM se fait en doses fixes en prophylaxie, et en doses adaptées au poids en thérapeutique. Du fait de propriétés pharmacocinétiques bien établies, la surveillance biologique de l'efficacité antithrombotique n'est généralement pas nécessaire. Certaines situations nécessitent toutefois de surveiller biologiquement le traitement, par exemple chez les patients obèses ou en cas d'insuffisance rénale sévère, afin de détecter une éventuelle accumulation.

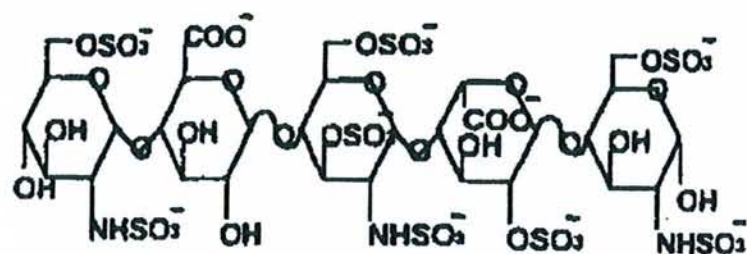


Contrairement à l'HNF, le TC+A n'est pas utilisable pour surveiller un traitement par HBPM. En effet, ce test étant plus sensible à l'activité anti-IIa, les HBPM auront un impact variable selon les produits, en fonction de leur ratio anti-Xa / anti-IIa. Ainsi, lorsque la surveillance s'avère nécessaire, on utilisera la mesure de l'activité anti-Xa plasmatique, le plus souvent à l'aide d'une méthode chromogénique.

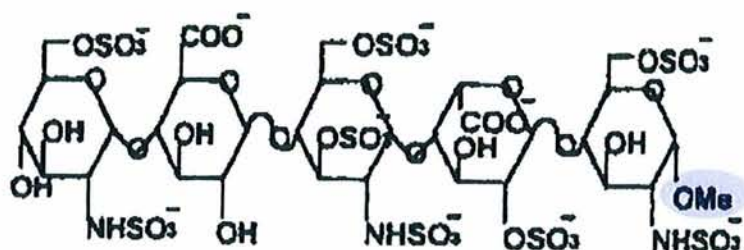
### **2.3.3 Fondaparinux (ARIXTRA®) [15,16]**

#### **2.3.3.1 Structure et mécanisme d'action**

Le fondaparinux est le premier inhibiteur de synthèse spécifique du facteur Xa utilisé en thérapeutique. Sa structure est basée sur le pentasaccharide naturel retrouvé dans les chaînes d'héparines et qui correspond à la séquence de haute affinité pour l'AT. La séquence pentasaccharidique originale a été identifiée à partir de l'héparine naturelle grâce à des procédures de fractionnement, dès 1981 par l'équipe de Jean Choay. Cette séquence a ensuite été reproduite par synthèse totale. Les études de « relation structure-activité » ont montré que plusieurs groupes sulfatés sont critiques pour la liaison à l'AT. Ceci a permis le développement de plusieurs analogues synthétiques. Ainsi un dérivé alpha-méthylé a d'abord été obtenu (figure 6), et a montré des propriétés totalement similaires au pentasaccharide original, mais avec l'avantage d'avoir un rendement de production supérieur. Ce dérivé alpha-méthylé est maintenant commercialisé comme molécule anti-thrombotique, sous la DCI « fondaparinux » (ARIXTRA®).



**Original Pentasaccharide**



**SR 90107A / ORG 31540 - Natural Pentasaccharide**

Figure 6 : Pentasaccharide naturel et dérivé alpha-méthylé (fondaparinux, ARIXTRA®). D'après [16].

Le fondaparinux est un inhibiteur sélectif et réversible du facteur Xa, *via* sa fixation à l'AT dont il potentialise l'activité. Il n'est cependant actif que sur le FXa libre, car le FXa présent dans la prothrombinase formée sur les surfaces cellulaires n'est pas inhibé efficacement par celui-ci. De plus, il n'inhibe pas la thrombine et n'entraîne pas la libération de TFPI.

### 2.3.3.2 Pharmacocinétique

La biodisponibilité après injection SC d'une dose prophylactique ou thérapeutique de fondaparinux est proche de 100%. L'élimination se fait principalement sous forme inchangée dans les urines. Le fondaparinux est lié à plus de 94% à l'AT et il paraît très peu probable qu'il se lie à d'autres protéines de façon significative. Des travaux spécifiques ont à ce propos



montré que le fondaparinux n'interagit pas avec le facteur 4 plaquettaire, contrairement à l'HNF et aux HBPM [16].

### **2.3.3.3 Surveillance biologique de l'activité anticoagulante**

En thérapeutique, l'administration de fondaparinux se fait à dose unique, sans adaptation au poids (contrairement à l'HNF et aux HBPM) et ne nécessite aucune surveillance de l'efficacité du traitement.

## **2.4 (In)équivalence des HBPM ?**

Le développement des HBPM a été entre autres motivé par la variabilité inter-individuelle importante de réponse à l'héparine standard. Les HBPM ont montré des propriétés pharmacocinétiques supérieures. Ainsi, une surveillance de l'efficacité du traitement, indispensable avec l'HNF, n'est que facultative avec les HBPM.

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ou encore la FDA (United States Food and Drug Administration) ont référencé chaque HBPM comme des principes actifs différents [17] ; en dépit de cela, il est classique de les considérer comme des membres équivalents au sein d'une même classe thérapeutique, comme le font certains auteurs dans diverses publications ou ouvrages en mentionnant simplement « Héparines de bas poids moléculaire ». À titre d'exemple particulièrement marquant, l'« American College of Chest Physicians consensus conference » ne fournit de recommandations quant à l'usage de ces produits qu'en mentionnant le terme générique « HBPM » et non, pour chacune des différentes molécules [18], dont est tiré l'extrait ci-dessous.

*" The most reasonable time to perform the anti-Xa assay is 4 h after the SC administration of a weight-adjusted dose of LMWH.*

*For twice-daily administration, a conservative therapeutic range is 0.6 to 1.0 IU/mL. The target range is less clear in patients treated with LMWH once a day, but a level between 1.0 IU/mL and 2.0 IU/mL seems to be reasonable.* “ (Buller CHEST 2004, [18])

Comme mentionné dans la citation précédente, les recommandations vont même jusqu'à proposer des mesures d'anti-Xa cible sans préciser à quelle HBPM se rapporter, sous-entendant que la zone cible est identique pour toutes, alors que l'activité anti-Xa attendue au pic est propre à chaque HBPM ; par exemple, à dose curative, les valeurs s'étendent de 0,6 à 1,3 UI/mL (*vide infra* figure 7).

De plus, dans un souci de limitations des stocks et des coûts, les établissements des soins peuvent être amenés à choisir, par l'intermédiaire d'une COMEDIMS (Commission du médicament et des dispositifs médicaux stériles) ou affilié, parmi toutes les HBPM disponibles afin de ne retenir que quelques voire une seule d'entre-elles.

Ces constatations amènent à penser que les différentes héparines de bas poids moléculaire sont thérapeutiquement équivalentes et, par conséquent, interchangeables. L'interchangeabilité des HBPM est un débat de longue date [19,20,21,22,23,24] alors que tous les experts s'accordent sur le fait que les différentes HBPM ne sont pas équivalentes, en s'appuyant sur de nombreuses données. Il convient d'abord de citer leur mode préparation : toutes les HBPM dérivent de l'héparine standard, mais les méthodes de dépolymérisation mises en œuvre pour diminuer la taille des chaînes polysaccharidiques diffèrent significativement, ce qui a pour conséquence d'affecter les caractéristiques du produit fini. Par exemple, la dépolymérisation chimique aboutit à une désulfatation partielle, une réduction de la densité de charge et du nombre de sites de liaison à l'AT.



En outre, les HBPM diffèrent de par leurs caractéristiques chimiques et structurales [25,26]. En chromatographie sur gel perméable, elles ont toutes montré des profils d'élution distincts, malgré une distribution en masse moléculaire assez similaire. Le contenu en GAG varie selon les produits. Aussi la neutralisation par la protamine (antidote de l'HNF, du fait de sa structure très électropositive) est très variable selon les produits : dans un modèle équigravidique, le profil de neutralisation semble dépendre non seulement du type de molécule, mais aussi du test utilisé pour la détection (activité anti-Xa ou anti-IIa) [25].

Mais le cœur du débat sur l'interchangeabilité des HBPM est l'implication clinique de ces différences, en terme d'efficacité et de sécurité. Malgré les différences intrinsèques de chaque produit, il n'y a pas de preuves irréfutables qu'au niveau clinique, elles soient significativement distinctes les unes des autres. En effet, les données comparant, directement et à grande échelle, plusieurs HBPM sont rares. En prophylaxie du risque thromboembolique veineux après prothèse totale de hanche, deux études ont comparé soit la tinzaparine soit la réviparine, à l'énoxaparine. Les résultats n'ont montré aucune différence en terme d'efficacité [23]. Dans le cadre de traitement de l'épisode constitué d'événement thromboembolique veineux ou de syndrome coronaire aigu, ne sont disponibles que des comparaisons « indirectes », dans chaque cas le groupe « HBPM » étant comparé avec un groupe contrôle traité par HNF. En outre, il apparaît peu probable que de tels essais comparant 2 HBPM en tête à tête soient mis en place dans un futur plus ou moins proche. Enfin, la mesure de l'activité anti-Xa n'est pas corrélée à l'efficacité clinique [27,28]. Ainsi, aux doses standard recommandées ajustées au poids, l'activité anti-Xa au pic (4h après injection SC) diffère significativement selon les HBPM (tableau I et figure 7).

**Tableau I : Activité anti-Xa attendue en prophylaxie. D'après [29].**

HBPM	Indication	Activité anti-Xa plasmatique attendue (UI anti-Xa/mL)
Enoxaparine	Prévention du risque modéré en chirurgie	0,18 ± 0,04
	Prévention du risque élevé en chirurgie ou prévention en médecine	0,43 ± 0,11
Daltéparine	Prévention du risque modéré en chirurgie	0,15 à 0,25
	Prévention du risque élevé en chirurgie	0,30 à 0,45
Nadroparine	Prévention du risque modéré en chirurgie	0,25 à 0,35
	Prévention du risque élevé en chirurgie	0,25 à 0,35
Tinzaparine	Prévention du risque modéré en chirurgie	0,10 à 0,15
	Prévention du risque modéré majoré en chirurgie	0,15 à 0,20
	Prévention du risque élevé en chirurgie	0,35 à 0,45

HBPM	Rapport anti-Xa/ anti-IIa	Dose (anti-Xa en UI/kg)	Héparinémie (anti-Xa en UI/kg)	Allongement TCA*
Innohep®	1,8	175/24 h	0,87 ± 0,15	+++
Fragmine®	2,5	100/12 h	0,59 ± 0,25	++
			0,69 ± 0,26**	
Fraxiparine®	2,5 à 4,0	83/12 h	1,01 ± 0,18	+
Fraxodi®	2,5 à 4,0	166/24 h	1,34 ± 0,15	++
Lovenox®	3,6	100/12 h	1,20 ± 0,17	+
Clivarine®	3,2	71/12 h	ND	+

\*+++ : allongement compris entre 2 et 3 fois le temps du témoin, ++ : environ 1,5 fois, + : environ 1,2 fois.

\*\* ces deux valeurs correspondent à celles observées au premier et au dixième jour de traitement.

ND : données non disponibles.

**Figure 7 : Doses recommandées pour un traitement curatif de thrombose veineuse et héparinémies générées 3 à 5 heures après l'administration des HBPM disponibles en France. D'après [30]**



La variabilité de réponse au fondaparinux, quant à elle, est considérée comme très faible [31], car il n'y a pas d'interaction protéique non spécifique significative (en particulier avec le F4P ou avec l'albumine) ; également car le fondaparinux n'est pas métabolisé et est excrété sous forme inchangée par voie rénale.

3

# **TRAVAIL EXPERIMENTAL**

## 3.1 Matériels et méthodes

### 3.1.1 La thrombinographie [32,33,34]

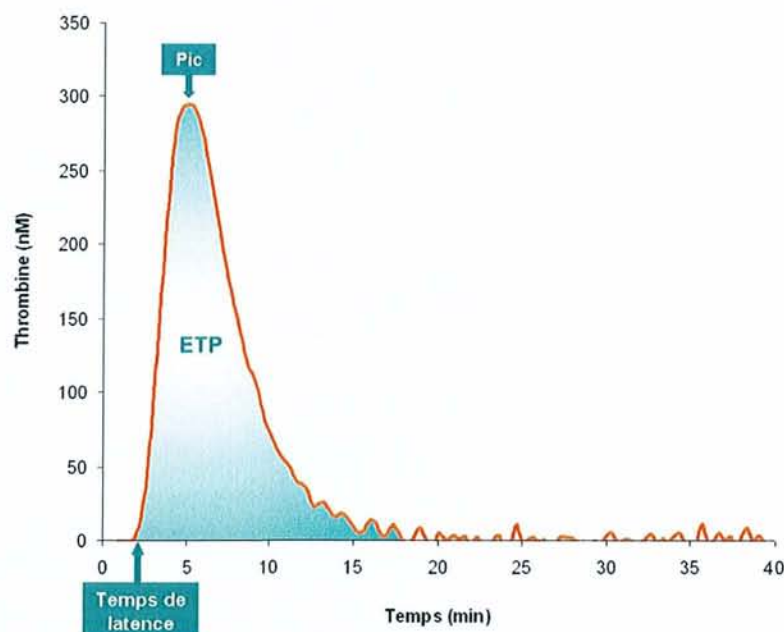
La thrombinographie est une méthode d'étude *in vitro* de la génération de thrombine au cours du temps après déclenchement de la coagulation par une faible quantité de facteur tissulaire (de l'ordre de quelques pM). Elle ne doit pas être confondue avec les méthodes d'études de génération de thrombine *in vivo*, basées sur la mesure des concentrations plasmatiques de certains marqueurs d'activation de la coagulation (fragments 1+2 de la prothrombine, D-dimères, ...).

La thrombine est l'enzyme-clé de la coagulation (*vide supra*) permettant la transformation du fibrinogène en fibrine insoluble, à la fois amplifiant et limitant sa propre génération. Le travail thrombinique étant généré à plus de 95% après la gélification du plasma, la très grande majorité des tests de coagulation usuels sont pris en défaut et sont donc insuffisants pour obtenir une vision globale du processus de coagulation et du travail thrombinique. Cette méthode permet non seulement une étude globale et presque complète du déroulement de la coagulation, mais aussi la plus proche à ce jour des conditions *in vivo* (en revanche tout le système hémostatique n'est pas exploré puisque l'hémostase primaire et la fibrinolyse ne sont pas prises en compte).

La détermination est réalisée dans des échantillons plasmatiques, en présence ou en absence de plaquettes. La détection se fait par mesure de la fluorescence générée après clivage, par la thrombine néoformée, d'un substrat spécifique (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), choisi pour ces caractéristiques favorables en terme de  $K_m$  et  $K_{cat}$ . La conversion du niveau de fluorescence mesuré en concentration en thrombine est obtenue grâce à l'utilisation d'un calibrant (un complexe thrombine -  $\alpha 2M$ , à l'activité stable et bien déterminée, auquel sont ajoutées de l'héparine et de l'antithrombine pour éviter toute coagulation), permettant ainsi de déduire la

part non physiologique de thrombine liée à l' $\alpha_2$ M et également, de corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que les facteurs de variabilité liés aux échantillons plasmatiques (couleur), à l'âge de la lampe etc.

La courbe de génération obtenue par cette méthode est appelée « thrombinogramme ». De celle-ci, plusieurs informations peuvent être extraites (figure 8) : la principale, l'aire sous la courbe permet de quantifier le travail thrombinique total au cours du temps, et est nommée potentiel thrombinique endogène (ou en anglais, ETP, endogenous thrombin potential) ; l'ETP reflète le potentiel coagulant global d'un individu, son augmentation signe une hypercoagulabilité de même qu'une diminution, une hypocoagulabilité. Il est également possible de mesurer le temps de latence avant la génération explosive de thrombine, le pic maximal de thrombine générée ou encore le temps écoulé pour atteindre ce pic.



**Figure 8 : Courbe de génération de thrombine obtenue en PPP, en présence de facteur tissulaire 5 pM et de phospholipides.**



Nous avons choisi de travailler en milieu pauvre en plaquettes (PPP), afin de s'affranchir de l'effet inhibiteur des plaquettes (qui représentent un facteur de variabilité majeur) sur les molécules testées, et également sans ajout de PCa ou de thrombomoduline. Ainsi dans le système étudié, l'inhibition de la génération de thrombine dépend essentiellement de l'activité de l'antithrombine.

### **3.1.2 Réactifs**

#### **3.1.2.1 Molécules étudiées**

L'énoxaparine, la nadroparine, la tinzaparine et la daltéparine ont été utilisées à travers les spécialités pharmaceutiques commercialisées sur le marché français, respectivement LOVENOX® (Sanofi-Aventis, France), FRAXIPARINE® (GSK, France), INNOHEP® (Léo Pharma, France) et FRAGMINE® (Pfizer, France). La Bémiparine, une HBPM de 3600 Da et dont le rapport anti-Xa / anti-IIa est élevé (environ 8:1) et le RO-14, un oligosaccharide synthétique composé de 14 monosaccharides et dépourvu d'activité anti-IIa, ont été fournis gracieusement par ROVI S.A. (Espagne). Le fondaparinux a été étudié à travers la spécialité pharmaceutique correspondante ARIXTRA® (GSK, France).

Le tableau II résume les caractéristiques des molécules utilisées.

**Tableau II : Caractéristiques des molécules testées. D'après [9, 30,35].**

<b>DCI</b>	<b>Mode de préparation</b>	<b>Poids moléculaire moyen (Da)</b>	<b>Ratio anti-Xa /anti-IIa</b>
Bémiparine	Dépolymérisation chimique ( $\beta$ -élimination)	3600	8
Daltéparine	Dépolymérisation par l'acide nitreux	6000	2,5
Enoxaparine	Benzylation et dépolymérisation alcaline	4200	3,6
Nadroparine	Dépolymérisation par l'acide nitreux	4500	2,5 à 4
RO-14	?	2500	$\infty$
Tinzaparine	Dépolymérisation enzymatique par héparinase	4500	1,8
Fondaparinux	Synthèse totale	1728	$\infty$

### **3.1.2.2 Thrombinographie**

Les réactifs PPP reagent® (mélange de phospholipides et de facteur tissulaire) et Thrombin calibrator® ont été fournis par BIODIS (France) ; le substrat fluorogénique Z-Gly-Gly-Arg-AMC par BACHEM (Suisse). Le tampon Fluo-Buffer a été préparé extemporanément (Hepes 20 mM, BSA 60 g/L, CaCl<sub>2</sub> 102 mM, eau distillée, pH 7,5).

### **3.1.3 Méthode**

L'étude est réalisée chez des volontaires sains (N=6) ayant donné leur consentement éclairé et n'ayant pas pris de médicaments interférant avec la coagulation. Chez chacun d'entre eux, les 6 HBPM ainsi que le fondaparinux ont été testés après surcharge du plasma à différentes concentrations en principe actif.

Afin d'obtenir du plasma pauvre en plaquettes (PPP), 15 mL de sang total ont été prélevés chez les volontaires par ponction veineuse antécubitale à l'aide de tubes MONOVETTE® (Sarstedt, Allemagne) et anticoagulés par du citrate 0,106 M (1 vol:9 vol). Le prélèvement est centrifugé à 2000g, le surnageant ainsi obtenu est ensuite centrifugé à 13000g, pendant 30 minutes à 4°C, afin d'éliminer autant que possible les microvésicules plaquettaires (source de phospholipides procoagulants).

Pour chacune des substances testées et pour chaque donneur, une gamme de concentration a été réalisée par dilutions successives dans du plasma autologue de chaque donneur :

☒ Gamme « bémiparine, daltéparine, énoxaparine, nadroparine, RO-14, tinzaparine » :

⇒ 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1 UI anti-Xa/mL

☒ Gamme « fondaparinux » :

⇒ 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1 ; 1,4 ; 1,6 ; 1,8 et 2 µg/mL

La génération de thrombine est étudiée conformément à la méthode CAT® (Calibrated Automated Thrombography, d'après Hemker [32]). Dans une plaque 96 puits (Immulon, 2HB clear U-bottom, Thermo Electron, Etats-unis) sont mélangés 20 µL de PPP reagent® avec 80 µL d'échantillons plasmatiques. La génération de thrombine est initiée par l'ajout 20 µL de Fluo-Buffer, contenant le substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg-AMC 2,4 mM). Les concentrations finales en facteur tissulaire et en phospholipides procoagulants dans les puits sont respectivement de 5 pM et 4 µM. Le signal de fluorescence est corrigé par un puit « calibrant » (20 µL Thrombin Calibrator® + 80 µL plasma), dans lequel la génération de thrombine est déclenchée comme précédemment. Chaque échantillon est testé en triple. La

fluorescence est mesurée par le fluorimètre Ascent Fluoroskan® (ThermoLabsystems, Helsinki, Finlande),  $\lambda$  excitation = 390 nm ;  $\lambda$  émission = 460 nm.

Les données sont ensuite traitées par le logiciel Thrombinoscope® (Thrombinoscope BV, Pays-Bas).

L'ETP est calculé pour chaque échantillon et les résultats sont comparés à l'aide de l'ETP résiduel pour chaque donneur et chaque molécule, à toutes les concentrations, déterminé comme suit :

$$\text{ETP résiduel} = \text{ETP}_x / \text{ETP}_{\text{base}} \times 100$$

$\text{ETP}_{\text{base}}$  = ETP de base, avant surcharge

$\text{ETP}_x$  = ETP obtenu pour la concentration « x »

De même pour le temps de latence :

$$\text{Temps de latence (TL) résiduel} = \text{TL}_x / \text{TL}_{\text{base}} \times 100$$

$\text{TL}_{\text{base}}$  = temps de latence avant surcharge

$\text{TL}_x$  = temps de latence obtenu pour la concentration « x »



## 3.2 Résultats

### 3.2.1 Population et valeurs de référence

La population de sujets donneurs, recrutés parmi le personnel du service d'hématologie biologique du CHU de Nancy, regroupe 4 femmes et 2 hommes pour un âge moyen de 41 ans (27 - 58 ans). Ces sujets sont en bonne santé apparente et ne prennent aucun traitement ayant des interactions significatives avec l'hémostase ou la coagulation plus particulièrement.

Les paramètres moyens mesurés avant surcharge sont les suivants :

$$\text{ETP} = 1810 \pm 246 \text{ nM.min}$$

$$\text{Temps de latence} = 2,6 \pm 0,3 \text{ min}$$

$$\text{Pic de thrombine} = 330 \pm 60 \text{ nM}$$

Ces paramètres sont cohérents avec le référentiel local obtenu avec une population de donneurs au sein du laboratoire, et également avec ceux de la littérature [32].

### 3.2.2 Profil général de réponse en fonction des différentes HBPM et du fondaparinux

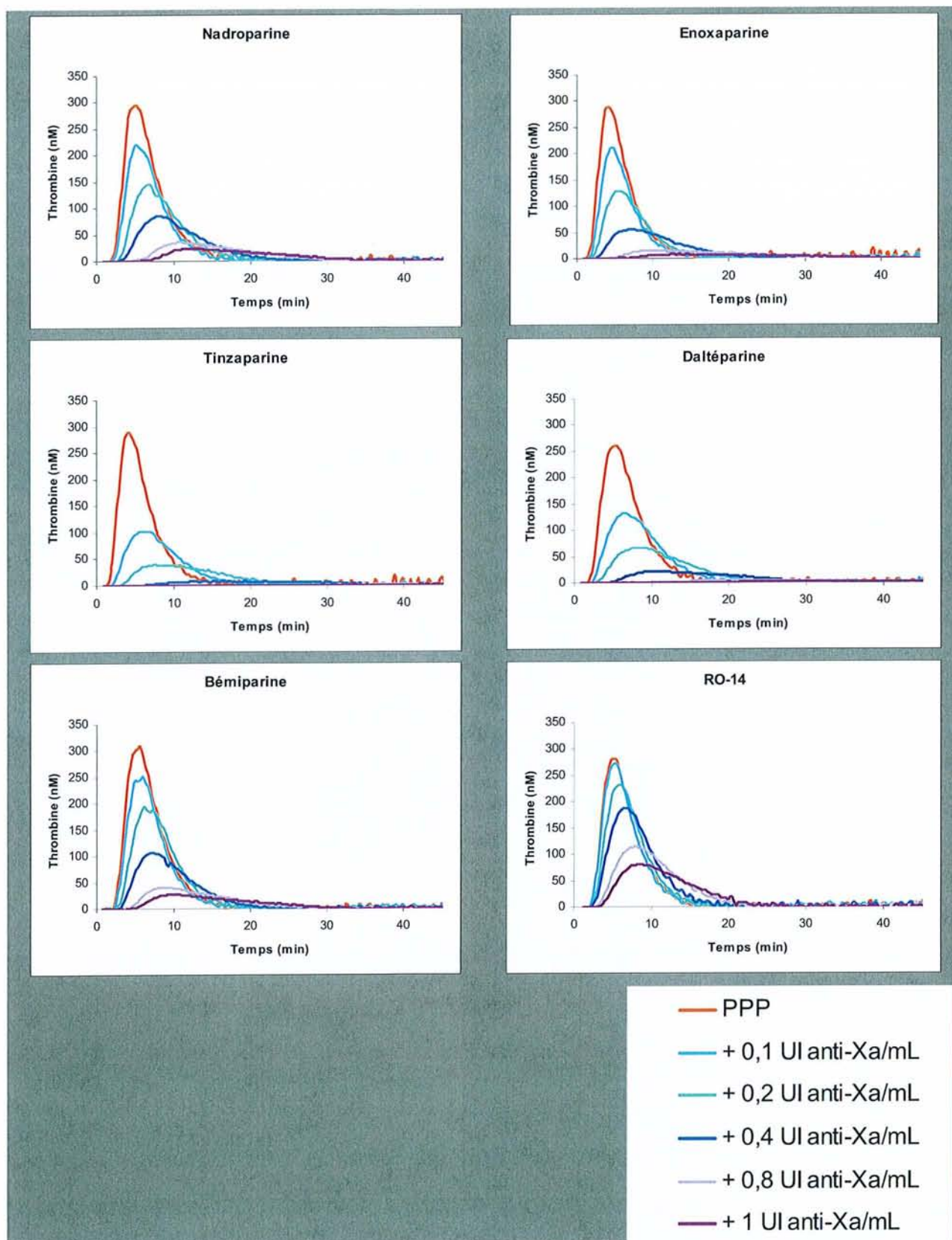
Comme attendu, la surcharge du PPP avec des concentrations croissantes en molécules à activité anti-Xa prédominante aboutit à une modification du profil de génération de thrombine traduisant une hypocoagulabilité. Globalement, plus l'activité anti-Xa plasmatique augmente, plus l'ETP et le pic de thrombine diminuent, et plus le temps de latence se prolonge. Pour chaque individu et pour chaque molécule étudiée, nous avons calculé les ratios d'ETP, et de temps de latence (ETP et temps de latence résiduels), par rapport aux paramètres avant surcharge. Pour certaines molécules et en particulier pour la tinzaparine, l'inhibition de

la génération de thrombine est si puissante, qu'il est impossible de calculer les différents paramètres au-delà d'une certaine concentration. Ceci s'applique particulièrement pour le calcul du pic résiduel de thrombine, que nous n'avons par conséquent pas intégré à nos calculs.

### 3.2.3 Variabilité inter-héparine

Pour un même donneur, les profils de concentration-réponse obtenus dans la gamme de concentrations retenue sont très différents d'une HBPM à l'autre comme l'illustre la figure 9. L'inhibition de la génération de thrombine et en particulier l'ETP résiduel, peuvent parfois varier du simple au double d'une HBPM à l'autre, *à activité anti-Xa égale*. Par exemple, sur la figure 9, on note que pour la tinzaparine, la génération de thrombine est quasi nulle dès 0,4 UI anti-Xa/mL, alors que c'est loin d'être le cas pour toutes les autres HBPM.

Lorsqu'on calcule les pourcentages d'ETP résiduel et d'allongement du temps de latence, pour chaque concentration d'HBPM et pour chacun des sujets, on constate que chaque HBPM a un profil d'inhibition qui lui est propre.



**Figure 9 : Profil de réponse de chaque HBPM pour un sujet donné.**

*Les profils de génération de thrombine de chaque donneur avec toutes les molécules étudiées sont présentés en annexes (figures 18 à 24).*



Si l'on s'intéresse plus particulièrement à la variation de l'ETP, lorsqu'on superpose les profils d'ETP résiduel de chaque HBPM en fonction de l'activité anti-Xa plasmatique, on observe que les courbes d'inhibition sont relativement bien individualisées et que leur répartition sur le graphe peut être calquée sur le ratio anti-Xa / anti-IIa de chaque HBPM (*vide supra* tableau II). En effet, plus l'activité anti-IIa résiduelle est forte, plus l'ETP résiduel est faible et tend vers 0 pour les fortes concentrations (figure 10). Ainsi la tinzaparine dont le ratio est de 1,8 exerce une activité inhibitrice sur l'ETP bien plus marquée que la bémiparine, dont le ratio est de 8. Sur ce même graphe, on note que le profil du RO-14, qui n'a pas d'activité anti-IIa, est lui-même bien individualisé du profil de la bémiparine, avec un ETP résiduel final aux alentours de 60%, à 1 UI anti-Xa/mL.

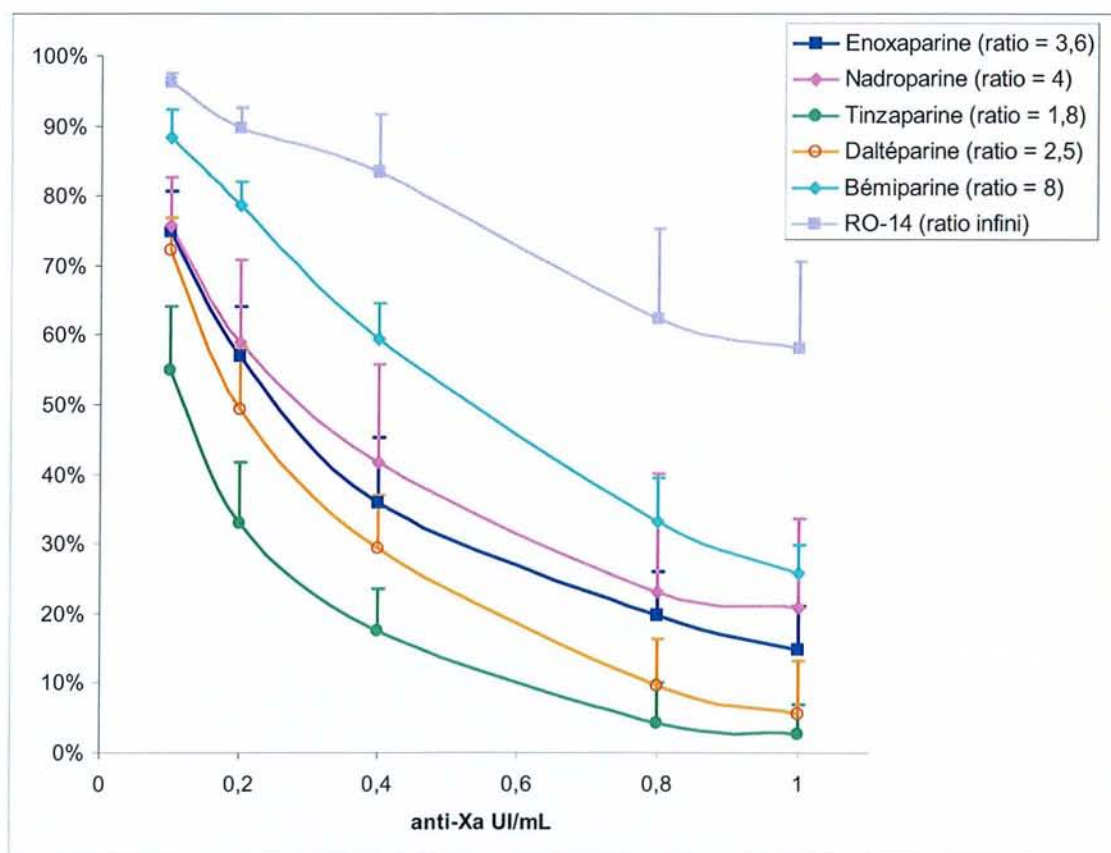


Figure 10 : Comparaison de l'ETP résiduel moyen en fonction de la concentration et du type d'HBPM.



En outre, un profil similaire est observé pour le fondaparinux (figures 11 et 12). L'inhibition de la génération de thrombine n'est pas totale aux fortes concentrations et on remarque que l'ETP résiduel moyen tend vers 60%, comme pour le RO-14, mais surtout on note la présence d'un plateau, car à partir d'une certaine concentration (à partir de 1,4  $\mu\text{g/mL}$ ), l'ETP ne varie plus (figure 12).

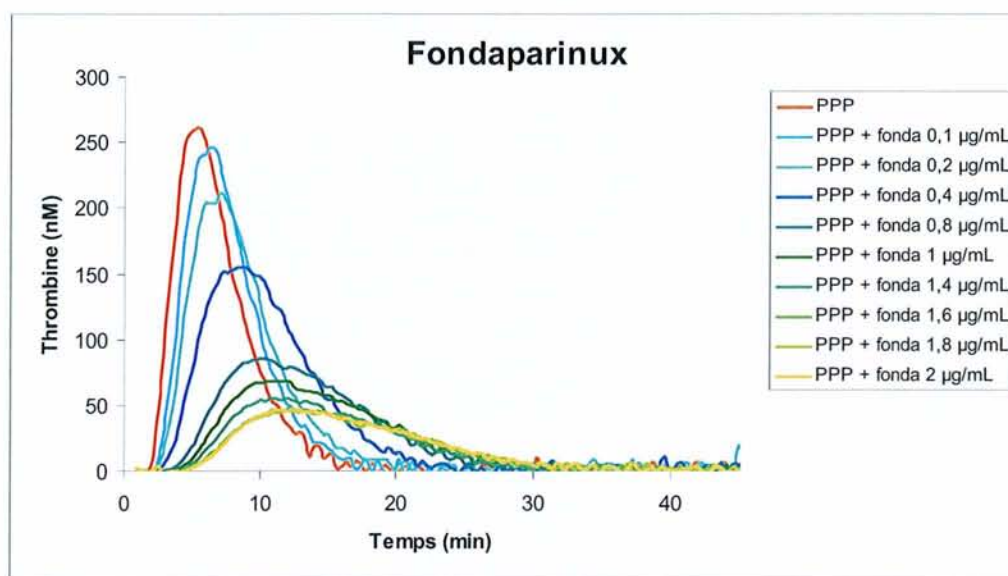


Figure 11 : Profil type de réponse au fondaparinux.

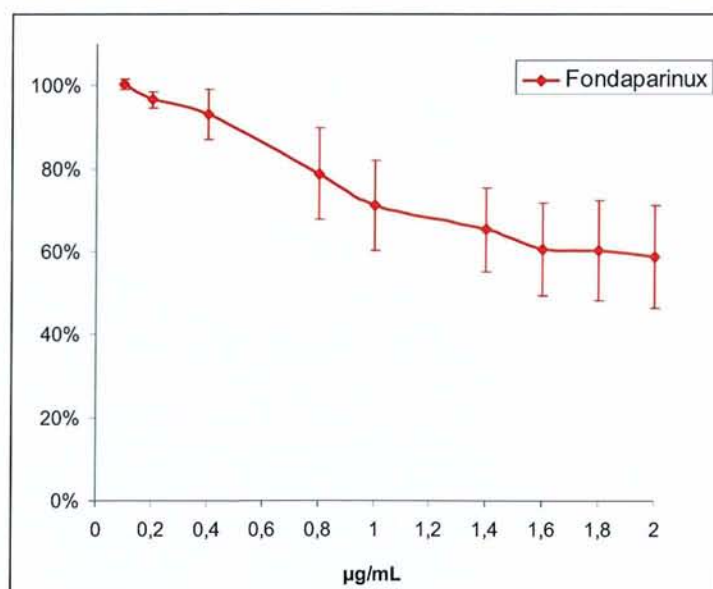


Figure 12 : ETP résiduel moyen en fonction de la concentration en fondaparinux.

### 3.2.4 Profils de réponse inter-individuels

Pour une même molécule testée, il apparaît que les réponses varient parfois considérablement selon les donneurs. La figure 13 illustre les différences de profils de réponse de 2 donneurs à 3 HBPM (RO-14, énoxaparine et tinzaparine), pour deux concentrations (0,2 et 0,8 UI anti-Xa/mL). Ainsi dès 0,2 UI anti-Xa /mL, on note une différence de réponse pour les deux sujets, et ce avec les 3 molécules étudiées. Ces différences sont ensuite encore plus marquées à 0,8 UI anti-Xa/mL, où l'on remarque que pour l'énoxaparine, le profil semble varier du simple au double entre les deux.

On note une tendance pour un même sujet à répondre plus ou moins fortement. En effet, sur la figure 14, on constate que les profils des différents donneurs sont assez bien individualisés les uns des autres mais surtout que les pourcentages d'ETP résiduel sont conservés pour toutes les molécules. Ainsi, le sujet 4 est systématiquement celui qui montre une inhibition la moins forte, alors que le sujet 3 est celui pour lequel l'inhibition est systématiquement la plus forte.

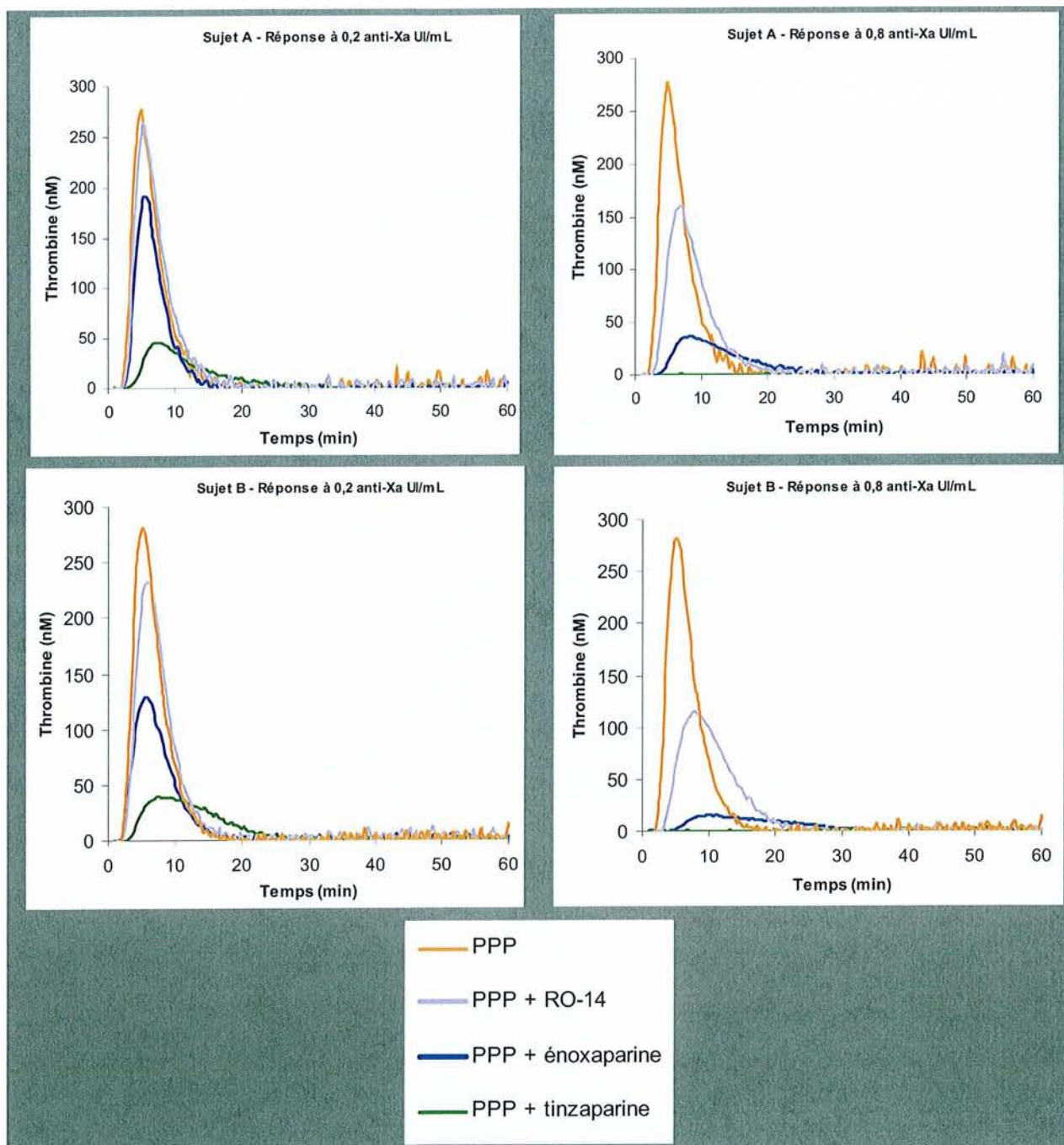


Figure 13 : Profils de réponse de 2 volontaires sains à 3 HBPM pour 2 concentrations.



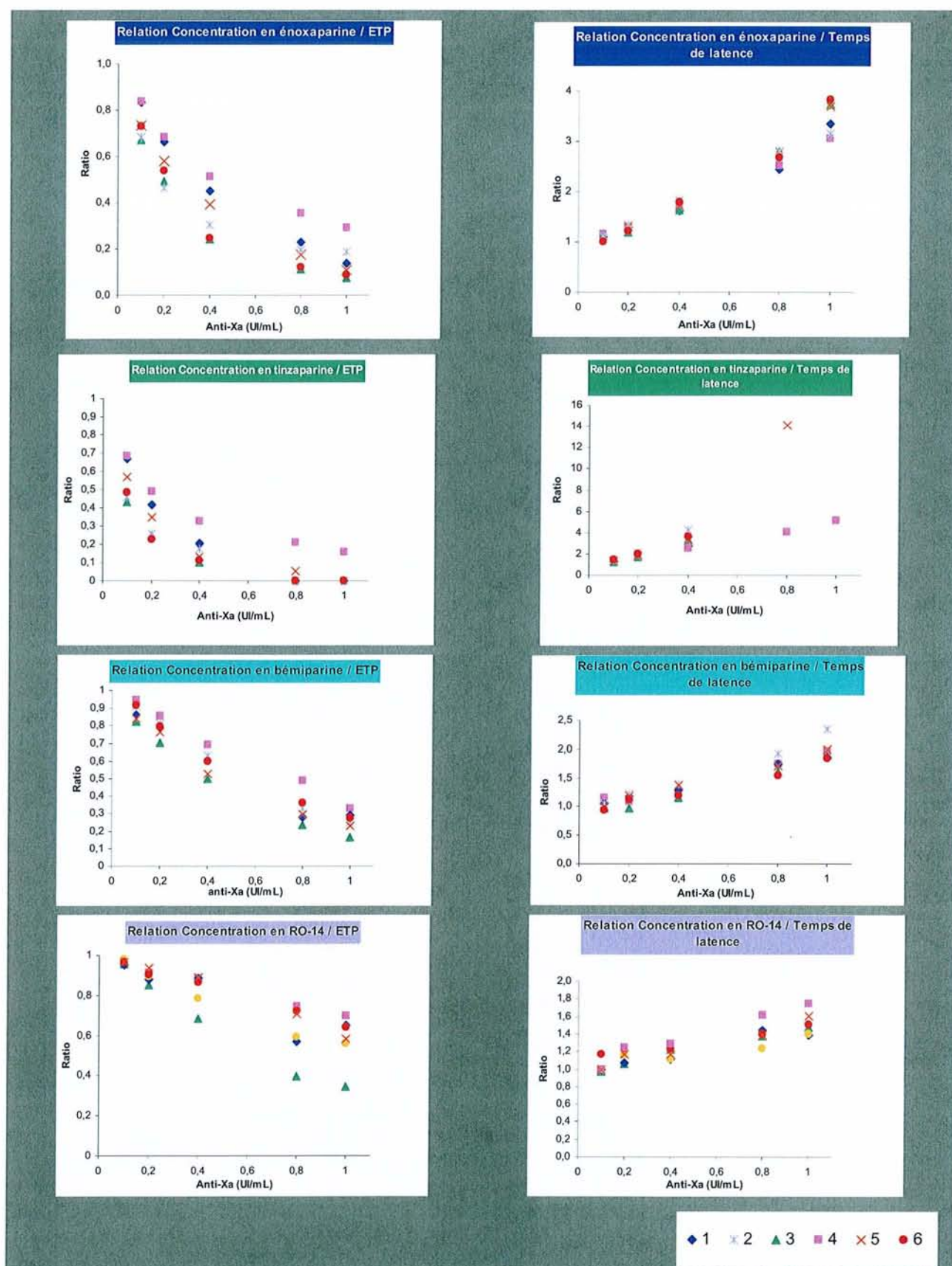


Figure 14 : Variation de l'ETP et du temps de latence en fonction de l'anti-Xa plasmatique.



Enfin, il faut noter que cette variabilité de réponse est également observée avec le fondaparinux, comme l'illustre la figure 15. Le profil de réponse du sujet 5 est celui le plus fréquemment obtenu, mais on remarque que ce profil varie entre les sujets 3 et 4 parfois à l'extrême, pouvant atteindre une inhibition quasi-totale de la génération de thrombine (sujet 3).

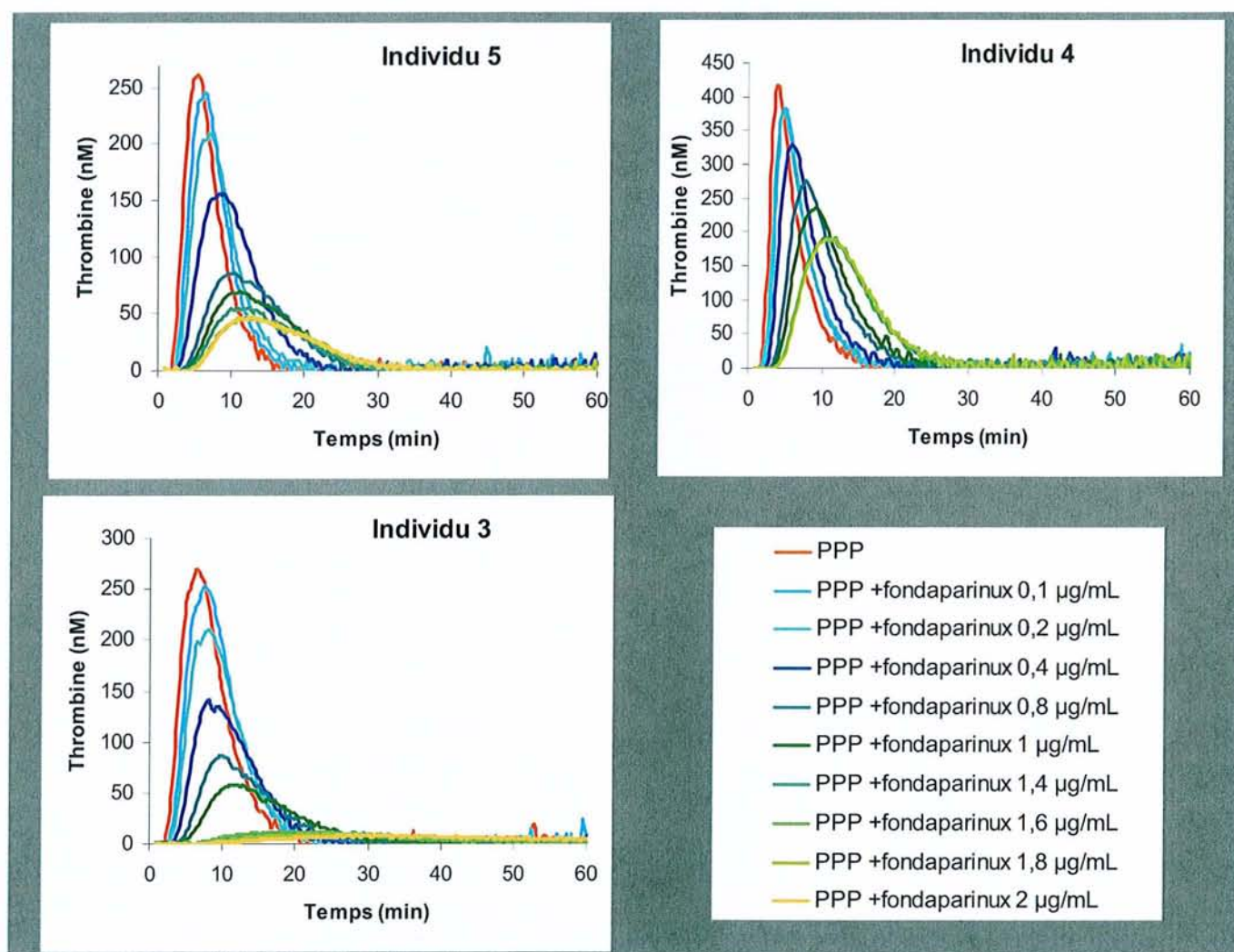


Figure 15 : variabilité inter-individuelle de réponse au fondaparinux.

# 4

## DISCUSSION

Nous avons étudié l'effet de plusieurs molécules anticoagulantes dont l'activité est médiée par l'AT (HBPM et fondaparinux) sur la génération de thrombine *in vitro*. Les HBPM constituent une classe de médicaments très hétérogène et ne sont pas équivalentes entre-elles en terme de propriétés anticoagulantes puisque chaque préparation est caractérisée par un ratio d'inhibition anti-Xa / anti-IIa qui lui est propre, résultant de son mode de dépolymérisation industriel [9]. Les répercussions de ces différences sur le profil d'anticoagulation sont mal connues. En effet, les tests usuels de coagulation sont peu sensibles aux HBPM et les mesures d'activités anti-Xa ou anti-IIa plasmatiques ne sont qu'un simple reflet de la concentration en principe actif, et non une manière d'appréhender cette efficacité anticoagulante ; en outre, il existe de grandes disparités entre les héparinémies (anti-Xa) attendues au pic pour chaque HBPM après administration d'une dose thérapeutique [30] et cette mesure n'est pas corrélée avec l'efficacité clinique de ces molécules [27,28].

### ⇒ Méthodologie

Plusieurs auteurs ont montré que la thrombinographie est une méthode appropriée pour étudier voire monitorer l'effet anticoagulant des HBPM [36,37,38]. Cependant les conditions expérimentales mises en œuvre lors de ces études sont sensiblement différentes (méthode chromogénique, présence de plaquettes, concentrations en FT plus importantes ou encore utilisation de plasma défibriné). Nous avons, dans notre étude, déclenché la génération de thrombine par du facteur tissulaire à 5 pM et des phospholipides à 4 µM, conformément aux recommandations pour des études en PPP [32]. Nous avons, de plus, délibérément choisi un milieu réactionnel fermé et acellulaire, afin de limiter au maximum les facteurs de variabilité. Ainsi, pour toutes les molécules testées, nous avons réalisé des surcharges *in vitro* afin, d'une part, d'obtenir des gammes de concentrations homogènes et bien définies, de l'ordre des concentrations thérapeutiques mesurées chez l'homme, et afin, d'autre part, de limiter la



variabilité pharmacocinétique des principes actifs. De plus, nous avons travaillé en l'absence de plaquettes (et de microvésicules), afin de s'affranchir de l'effet inhibiteur des plaquettes sur l'activité des HBPM, qui constitue certainement l'un des facteurs de variabilité de réponse les plus importants, notamment par la neutralisation partielle des molécules testées par le F4P [39]. Dans notre système, l'inhibition de la coagulation est quasi exclusivement due à l'activité de l'antithrombine et par conséquent, est très sensible à l'action des dérivés hépariniques.

#### **⇒ *Potentiel anticoagulant des molécules étudiées***

Dans les conditions expérimentales retenues, nous avons pu mettre en évidence un effet des molécules testées sur la génération de thrombine, traduisant un potentiel anticoagulant attendu et ce dans une gamme de concentrations plasmatiques mesurées en pratique thérapeutique courante. L'effet anticoagulant se traduit par une diminution de l'ETP, une prolongation du temps de latence, associés à une réduction de la quantité maximale de thrombine générée.

Les résultats renforcent la notion d'inéquivalence des HBPM entre-elles puisqu'à concentration identique, on observe selon les molécules de grandes disparités dans les profils de génération de thrombine, et ce malgré notre milieu réactionnel particulièrement fermé (figures 9 et 13). Chaque HBPM possède un profil d'activité qui lui est propre, et nous avons pu montrer que ce profil est directement fonction du ratio anti-Xa / anti-IIa (figure 10). Ceci suggère donc que les différentes HBPM ont chacune une potentialité inhibitrice vis-à-vis de la coagulation qui leur est propre. Plus l'activité anti-IIa résiduelle est importante, plus la génération de thrombine (= Facteur IIa) est diminuée, ce qui est tout à fait cohérent et attendu. Ainsi on remarque qu'en présence de tinzaparine, qui est dotée de l'activité anti-IIa la plus forte dans notre étude (ratio anti-Xa / anti-IIa de 1,8), la génération de thrombine est la plus



fortement et « rapidement » altérée, c'est-à-dire dès les plus faibles concentrations ; cette puissante activité inhibitrice de la tinzaparine a été aussi rapporté par Gerotziafas et al [36]. Inversement, pour les molécules n'ayant pas de propriétés anti-IIa (RO-14 et fondaparinux), à faibles concentrations, les thrombinogrammes sont peu modifiés par rapport au profil avant surcharge. Il est surprenant de constater qu'en présence de tinzaparine, la génération de thrombine est considérablement réduite dès 0,4 UI anti-Xa/mL ( $ETP_{résiduel} < 20\%$ ), surtout lorsqu'on met ceci en parallèle avec la concentration thérapeutique attendue au pic, qui est de 0,9 UI anti-Xa/mL. Ceci appuie le fait que la mesure de l'anti-Xa plasmatique ne reflète en rien les répercussions sur la coagulation, à la réserve près de nos conditions expérimentales.

En outre, l'activité anti-Xa ne se reflète non pas sur l'ETP mais principalement sur la hauteur du pic de thrombine générée et sur le temps pour l'atteindre, ce qui rend la génération de thrombine plus prolongée dans le temps et le thrombinogramme plus « écrasé ». En effet, plus l'activité anti-Xa est exclusive, moins l'ETP diminue, mais parallèlement moins le temps de latence s'allonge. Ainsi on peut s'apercevoir que pour le fondaparinux, au delà d'une certaine concentration (environ 1,4  $\mu\text{g/mL}$ ), l'ETP atteint un plateau et ne varie quasiment plus. Cette notion de « plateau » avec le fondaparinux a déjà été notée dans des études de génération de thrombine (de méthodologie toutefois différente) [16]. L'explication de ce phénomène réside probablement dans la saturation de l'AT [40] : au-delà d'un certain seuil de concentration en fondaparinux, toute l'AT est mobilisée et aucun effet anticoagulant supplémentaire ne peut être obtenu. Des expérimentations chez des volontaires sains ont étayé cette hypothèse puisque l'effet de plateau est levé lorsqu'on surcharge le plasma en AT [41]. Cette hypothèse est aussi supportée par une étude récente de l'effet sur la génération de thrombine du rivaroxaban, un inhibiteur direct du facteur Xa, non AT-médié [42]. Dans celle-ci, aucun effet-plateau n'a été noté, et des concentrations croissantes en rivaroxaban ont abouti à l'inhibition quasi-totale de la génération de thrombine.

Il est à noter que dans nos conditions, l'effet plateau est obtenu pour des concentrations en fondaparinux de l'ordre de 1,4 µg/mL, ce qui correspond à la concentration maximale moyenne attendue après une administration d'ARIXTRA® en thérapeutique [43]. De même, au plateau, le niveau d'ETP résiduel est de l'ordre de 60%, niveau qui a été rapporté comme étant suffisant pour inhiber la survenue de thrombose *in vivo*, dans un modèle animal (lapin) de thrombose veineuse [16].

#### ⇒ Mécanismes d'action dans les conditions expérimentales retenues : hypothèses

Les observations précédentes amènent à plusieurs hypothèses mécanistiques (figures 16 et 17) :

La comparaison de profils d'anticoagulants anti-Xa direct ou AT-médié permet d'éclaircir les répercussions observées sur les thrombinogrammes. En effet, lorsqu'il est complexé au sein de la prothrombinase, le facteur Xa est très bien protégé de l'action inhibitrice de l'AT, que celle-ci soit potentialisée ou non par des glycosaminoglycanes [44] (alors qu'un anti-Xa direct de faible masse moléculaire, tel que le rivaroxaban, est capable d'inhiber le FXa libre *et* celui complexé au sein de la prothrombinase). Ainsi, une molécule anticoagulante anti-Xa, dont l'action est médiée par l'AT, aura peu d'action sur le facteur Xa produit lors de la phase d'initiation. En effet, celui-ci est formé à la surface des cellules portant le FT, par la tenase extrinsèque, et il va s'associer sur cette même surface pour former la prothrombinase [2]. On peut dès lors penser qu'il existe peu de Xa disponible pour l'inhibition par l'AT, car, d'une part, le FXa produit à la surface de ces cellules n'aurait pas à migrer en phase fluide pour se fixer sur une autre surface cellulaire et d'autre part, car l'activité catalytique de la tenase extrinsèque, si elle est élevée, est moindre que celle de la tenase intrinsèque (efficiency ratio  $1,8 \cdot 10^7$  [3]). Par conséquent, selon cette hypothèse, une molécule anti-Xa spécifique et dont



l'activité dépend de l'AT (tel que le fondaparinux) n'aura que peu d'effet sur le temps de latence (figure 16).

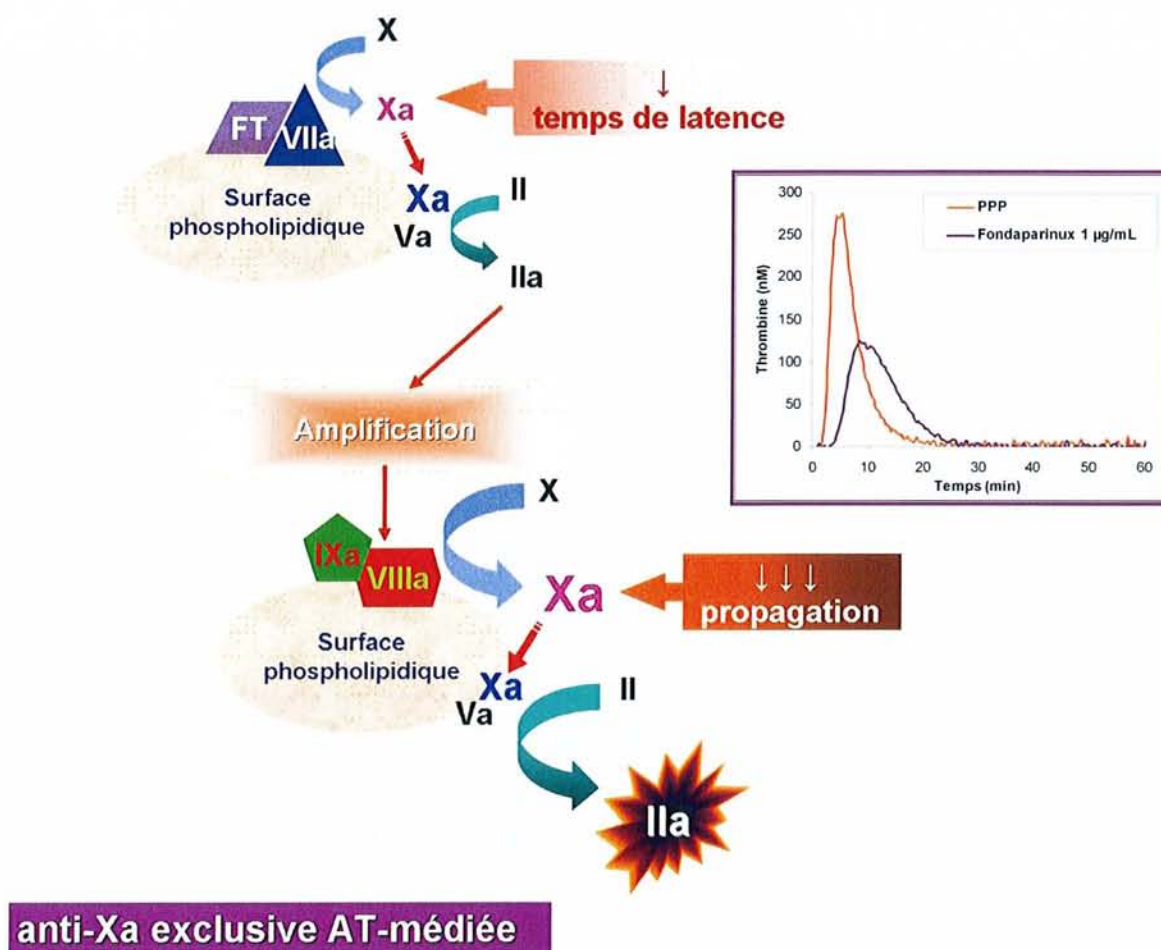


Figure 16 : Hypothèse du mécanisme d'action d'un inhibiteur spécifique du FXa médié par l'AT, dans nos conditions expérimentales.

En revanche, dès qu'il existera une activité anti-IIa résiduelle (figure 17), se surajoutera une activité inhibitrice sur les premières traces de thrombine formée ; ainsi plus l'activité résiduelle anti-IIa sera forte, plus l'anticoagulant allongera le temps de latence. En outre, si un anti-Xa indirect spécifique inhibe peu la formation de la prothrombinase à la surface des cellules portant le FT, on peut légitimement penser que la majorité de son activité

inhibitrice sera concentrée sur le FXa formé par la tenase intrinsèque, diminuant ainsi la formation du deuxième complexe prothrombinase, assemblé à la surface des plaquettes. En effet, l'activité catalytique de la tenase intrinsèque est bien plus importante que celle de la tenase extrinsèque (efficiency ratio  $1,2 \cdot 10^9$  [3]) : ainsi il y aura une plus grande quantité de Xa libre dans le milieu, potentiellement accessible à l'AT. Ceci aurait pour conséquence de ralentir la propagation de la génération de thrombine et cela peut se vérifier sur le thrombinogramme avec le fondaparinux, où la pente de génération de thrombine est diminuée, ainsi que le pic de thrombine et temps pour atteindre ce pic : la réaction est plus prolongée dans le temps.

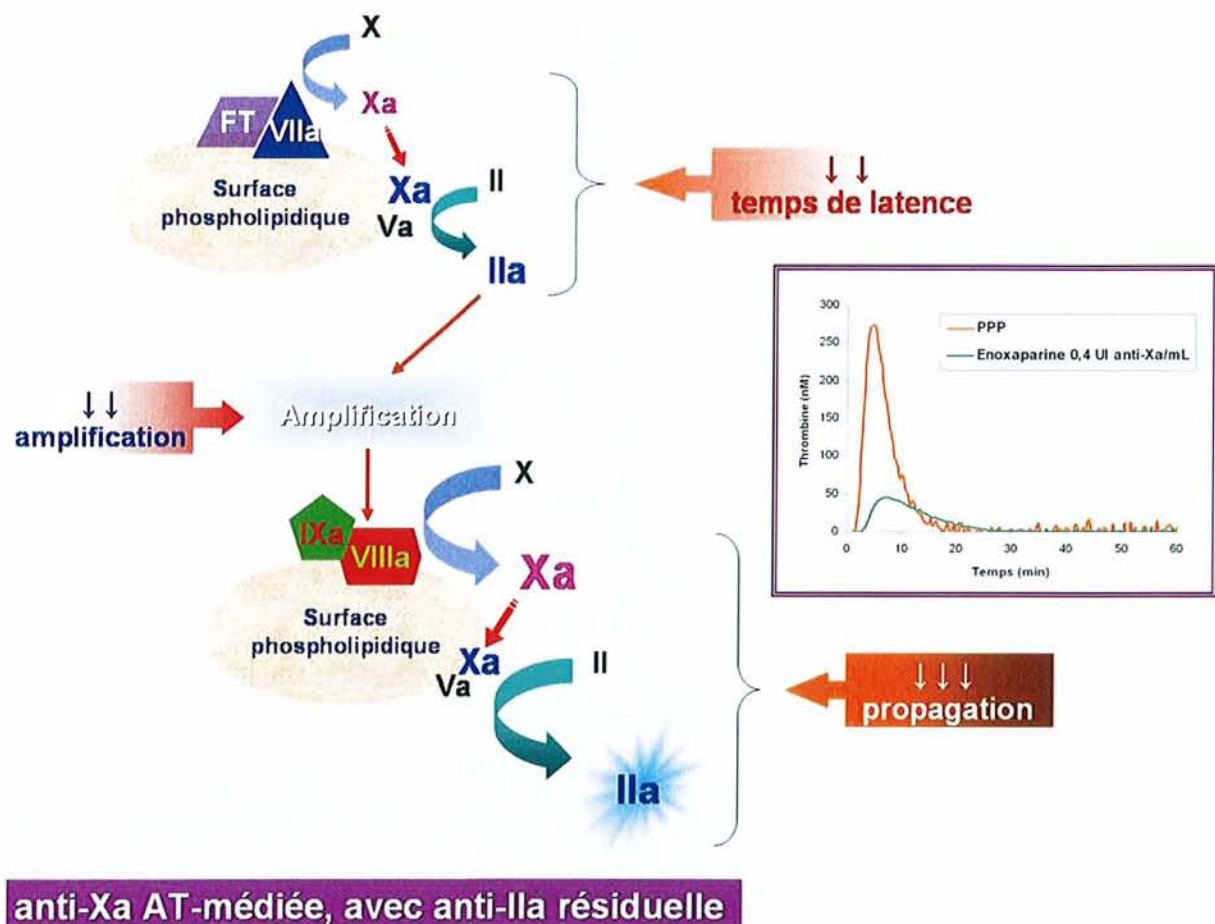


Figure 17 : Hypothèse du mécanisme d'action d'un inhibiteur du FXa avec activité anti-IIa résiduelle médié par l'AT, dans nos conditions expérimentales.



Enfin, ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle l'activité inhibitrice des anti-Xa spécifiques AT-médié est ciblée sur la formation du complexe prothrombinase, mais dès qu'il existe une activité anti-IIa résiduelle, celle-ci « prend le dessus » dans le retentissement anticoagulant [45]. C'est pourquoi, plus l'on tend vers une activité anti-IIa résiduelle forte, plus la génération de thrombine est altérée et ce retentissement se fait sur tous les paramètres (ETP, temps de latence et pic).

#### ***⇒ Caractérisation de l'effet anticoagulant : peut-on se baser uniquement sur l'ETP ?***

Ces considérations amènent à penser que l'évaluation et la caractérisation de l'effet anticoagulant des molécules à activité anti-Xa prédominante ne peut pas se réduire exclusivement à la mesure de l'ETP. Il semble plus opportun de s'attacher également à observer attentivement le thrombinogramme lui-même, en particulier pour l'étude des inhibiteurs spécifiques du FXa AT-médié. Gerotziafas et al [36] ont étudié la génération de thrombine *in vitro* et après surcharge en différents anticoagulants AT-médiés en présence de plaquettes et de facteur tissulaire recombinant, et ont également conclu que l'ETP n'est pas le paramètre le plus sensible pour caractériser l'effet anticoagulant. Ils proposent de mesurer la vélocité de la réaction, tenant ainsi compte du temps de latence et du pic de thrombine ; cette étude fait toutefois état de biais méthodologiques non négligeables. Enfin, il serait peut-être également judicieux de mesurer la vélocité de décroissance de la courbe, traduisant indirectement l'activité de l'AT ; mais ce paramètre est plus difficilement accessible.

#### ***⇒ Variabilité de réponse inter-individuelle***

A côté de ces différences d'activités anticoagulantes des HBPM, nous avons pu observer une variabilité de réponse inter-individuelle très marquée, alors que nous n'avons

exploré que 6 individus. Pourtant les HBPM, si elles font état de différences entre-elles, sont réputées pour avoir des paramètres pharmacocinétiques favorables et une homogénéité de réponse entre les individus. Or, les résultats obtenus montrent clairement des disparités de réponse (figures 13, 14 et annexes). De plus, cette variabilité est d'autant plus surprenante, que nous avons choisi un milieu réactionnel très fermé. Cela suggère implicitement que les variabilités de réponse *in vivo* devraient être encore plus marquées.

Al Dieri et al ont également noté des variations inter-individuelles dans une première étude de génération de thrombine *ex vivo* en méthode chromogénique et en PPP défibriné [38]. Après injection d'une même dose ajustée au poids chez 12 volontaires sains de 4 héparines de différents poids moléculaire, ils ont remarqué que la même concentration en héparine pouvait inhiber la coagulation plus fortement d'un individu à l'autre. La même équipe a confirmé cette variation inter-individuelle dans une étude ultérieure (selon la même méthodologie) et suggérant l'existence de forts et de faibles répondeurs, en montrant que cette différence ne peut pas être expliquée uniquement par le poids de l'individu [46]. Bien que nos conditions soient très différentes de celles d'Al Dieri, nous observons également l'existence de « fort- » ou « faible-répondeurs » ; en effet, la tendance à répondre fortement ou faiblement est conservée chez un même individu, quelle que soit la molécule testée ; ainsi sur la figure 14, le sujet 3 (symbolisé par ▲) est systématiquement celui qui répond le plus fortement vis-à-vis de l'ETP, alors que le sujet 4 (symbolisé par ■) est celui qui répond systématiquement le moins.

Cette variabilité de réponse est somme toute facilement concevable pour des produits d'origine naturelle, et dont la composition en chaînes polysaccharidiques n'est pas définie avec exactitude. En revanche, la variabilité de réponse observée pour le fondaparinux n'était pas attendue et s'explique mal, du fait de la nature fixe et bien déterminée de ce principe actif synthétique. En effet, à coté d'un « profil-type » représenté par le sujet 5 sur la figure 15, nous



avons observé deux profils particulièrement différents, se situant chacun de part et d'autre du profil moyen. Le sujet 3 se révèle être remarquablement sensible à l'activité du fondaparinux, puisque pour les plus fortes concentrations, la génération de thrombine est quasiment nulle. Inversement le sujet 4 montre un profil de réponse « atténué », avec une altération de la génération de thrombine bien plus progressive et modérée par rapport aux autres volontaires sains, mais surtout, il se trouve que l'ETP ne varie quasiment pas et reste proche de la valeur de base avant surcharge malgré l'augmentation en concentration (figure 18 et tableau III).

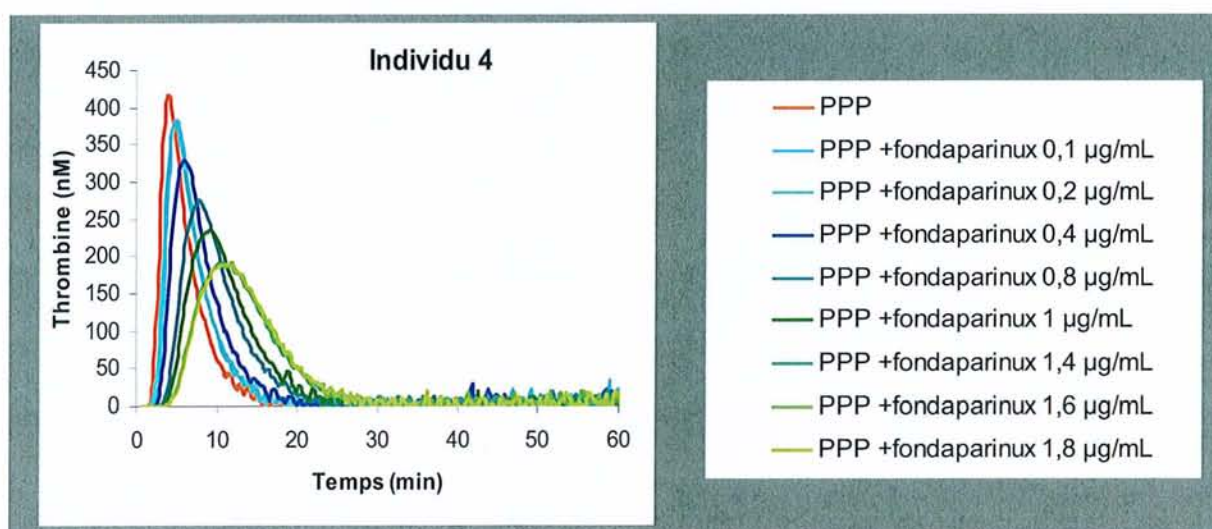


Figure 18 : Profil de réponse après surcharge en fondaparinux chez le sujet 4.

Tableau III : Variation de l'ETP après surcharge avec du fondaparinux chez le sujet 4.

	PPP	PPP + 0,1 µg/mL	PPP + 0,2 µg/mL	PPP + 0,4 µg/mL	PPP + 0,8 µg/mL	PPP + 1 µg/mL	PPP + 1,4 µg/mL	PPP + 1,6 µg/mL	PPP + 1,8 µg/mL
<b>ETP</b>	<b>1932</b>	1954	2040	2017	2096	2042	2100	2112	2139
<b>SD</b>	<b>37</b>	67	6	21	106	64	83	27	115

Ce résultat constitue une preuve que l'ETP ne reflète pas entièrement une activité plasmatique anticoagulante et que l'observation du thrombinogramme même est utile.

Ceci amène à penser qu'il puisse exister des facteurs individuels de sensibilité aux anticoagulants dont l'activité est médiée par l'AT. En effet, la taille des chaînes de GAG ne semble pas être le déterminant majeur de cette variabilité, puisqu'un même individu conserve sa capacité à inhiber plus ou moins fortement la génération de thrombine quelle que soit la molécule, même avec le pentasaccharide. Cela pourrait être lié à l'existence d'un polymorphisme du gène codant pour l'AT, comme cela a déjà été décrit pour d'autres médicaments antithrombotiques (polymorphisme de VKORC1 expliquant une résistance au traitement par antagoniste de la vitamine K [47], polymorphisme  $P1^{A1/A2}$  associé à la sensibilité de réponse à l'aspirine [48], ou encore polymorphisme H1/H2 du gène de  $P2Y_{12}$  potentiellement associé à une variation de sensibilité de réponse au clopidogrel [49], entre autres).



# 5

## CONCLUSION

La thrombinographie, dans les conditions expérimentales retenues, a permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice vis-à-vis de la coagulation de plusieurs HBPM ainsi que du fondaparinux, dans une gamme de concentrations observées en pratique courante.

- L'inéquivalence des HBPM entre-elles, admise sur le plan biochimique et structural, a également été observée quant à leur capacité à inhiber la génération de thrombine. En effet, des différences importantes entre les principes actifs, en ce qui concerne leur retentissement global sur la coagulation *in vitro*, ont été mises en évidence. Il apparaît que ce retentissement, évalué notamment à travers l'ETP résiduel obtenu avec chaque concentration, est fonction du ratio anti-Xa / anti-IIa, propre à chaque préparation.
- Ainsi, la thrombinographie apparaît comme une méthode de choix pour la mise en évidence du retentissement des HBPM sur la coagulation et des différences de profils entre chaque préparation. De ce fait, cette technique peut s'avérer très utile dans le développement de génériques, car celui-ci se heurte à de nombreuses difficultés quant à la démonstration de l'équivalence entre la préparation générique des chaînes polysaccharidiques et la préparation *princeps* [50].
- De façon inattendue, une grande variabilité de réponse à une même molécule a été notée entre les sujets, et ce avec toutes les molécules testées, même avec le fondaparinux. Ces différences de réponse ont été observées dans des conditions expérimentales particulièrement fermées, visant à limiter au maximum les facteurs de variabilité, notamment pharmacocinétiques (absorption SC ou fixation non spécifique cellulaire ou protéique) et dans une population de volontaires sains

restreinte (N=6). Le retentissement *in vivo* de cette variabilité n'est pas connu, mais on peut légitimement émettre l'hypothèse que, si elle n'est pas plus marquée, elle devrait être au moins aussi importante.

- Enfin, ces résultats, avec toutes les limites dues aux conditions expérimentales choisies, peuvent amener, après étude *ex vivo*, à améliorer la prescription des HBPM et du fondaparinux, en tendant vers des thérapeutiques adaptées à chaque patient, en particulier dans les populations chez qui la question d'une adaptation de dose peut se poser (par exemple, prophylaxie à dose fixe chez les obèses ou posologie chez l'insuffisant rénal).





# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



- [1] Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev* 2003;17:S1-5.
- [2] Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:41-8.
- [3] Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:3-12.
- [4] Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007;5:102-15.
- [5] Vincenot A, Gaussem P. Physiologie et régulation cellulaire du système de la protéine C. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997;55:17-24.
- [6] Guillin M. Physiologie de la coagulation. In: Sampol J, Arnoux D, Boutiere B, eds. Manuel d'hémostase. Paris: Elsevier, 1995:147-163.
- [7] Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 2007;5:73-80.
- [8] De Prost D, Moatti D, Petit L, Ollivier V. L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), molécule clé de défense contre la thrombose. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1999;11: 548-554.
- [9] Hirsch J. Low molecular weight heparins. BC Decker Inc: Hamilton 2007
- [10] Sie P. [Heparins, antivitamins K. Principles and rules for their use. Dosage of non-fractionated heparins]. *Rev Prat* 1998;48:1361-5.
- [11] Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 1988;50:803-13.



- [12] Cosmi B, Fredenburgh JC, Rischke J, Hirsh J, Young E, Weitz JI. Effect of nonspecific binding to plasma proteins on the antithrombin activities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and dermatan sulfate. *Circulation* 1997;95:118-24.
- [13] Boneu B, Guerrero F. Existe-t-il des différences entre les héparines de bas poids moléculaire ? *Sang Thrombose Vaisseaux* 2006 ;18, 6-10.
- [14] Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy *Chest* 2004;126:188S-203S.
- [15] Hirsch J. Fondaparinux. BC Decker Inc: Hamilton 2007
- [16] Walenga JM, Jeske WP, Bara L, Samama MM, Fareed J. Biochemical and pharmacologic rationale for the development of a synthetic heparin pentasaccharide. *Thromb Res* 1997;86:1-36.
- [17] White RH, Ginsberg JS. Low-molecular-weight heparins: are they all the same? *Br J Haematol* 2003;121:12-20.
- [18] Buller HR, Agnelli G, Hull RD, Hyers TM, Prins MH, Raskob GE. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:401S-428S.
- [19] Nenci GG. Low molecular weight heparins: are they interchangeable? No. *J Thromb Haemost* 2003;1:12-3.
- [20] Prandoni P. Low molecular weight heparins: are they interchangeable? Yes. *J Thromb Haemost* 2003 Jan;1:10-1.

- [21] Cimminiello C. Choice of low molecular weight heparins. *J Thromb Haemost* 2003;1:596-7.
- [22] Turpie AG. Choice of low molecular weight heparins. *J Thromb Haemost* 2003;1:598.
- [23] Hirsch J. Choice of low molecular weight heparins. *J Thromb Haemost* 2003;1:598-9.
- [24] Samama MM. Choice of low molecular weight heparins. *J Thromb Haemost* 2003;1:599-600.
- [25] Fareed J, Jeske W, Hoppensteadt D, Clarizio R, Walenga JM. Low-molecular-weight heparins: pharmacologic profile and product differentiation. *Am J Cardiol* 1998 10;82:3L-10L.
- [26] Fareed J, Walenga JM. Why differentiate low molecular weight heparins for venous thromboembolism? *Thromb J* 2007;5:8.
- [27] Leizorovicz A, Bara L, Samama MM, Haugh MC. Factor Xa inhibition: correlation between the plasma levels of anti-Xa activity and occurrence of thrombosis and haemorrhage. *Haemostasis* 1993;23:89-98.
- [28] Lindhoff-Last E, Mosch G, Breddin HK. Treatment doses of different low-molecular weight heparins and unfractionated heparins differ in their anticoagulating effects in respect to aPTT, heptest, anti-IIa- and anti-Xa-activity. *Lab Med* 1992;16:174-177.
- [29] Depasse F, Samama MM. Héparine non fractionnée et héparines de bas poids moléculaire. In Samama MM et collaborateurs eds. Hémorragies et thromboses. Du diagnostic au traitement Paris: Masson, 2004: 294-304.
- [30] Boneu B, Nguyen F, Cambus JP. Difficultés et pièges de la surveillance des traitements par l'héparine. *Sang Thrombose Vaisseaux* 2003;15:131-4.



- [31] Walenga JM, Jeske WP, Samama MM, Frapaise FX, Bick RL, Fareed J. Fondaparinux: a synthetic heparin pentasaccharide as a new antithrombotic agent. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:397-407.
- [32] Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-53.
- [33] Lecompte T, Wahl D, Regnault V. Thrombinographie. *Hématologie* 2006 ;12:115-27.
- [34] Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol* 2005;130:653-61.
- [35] Chapman TM, Goa KL. Bemiparin: A review of its use in the prevention of venous thromboembolism and treatment of deep vein thrombosis. *Drugs* 2003;63: 2357-2377.
- [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* 2007;5:955-62.
- [37] Petros S, Siegemund T, Siegemund A, Engelmann L. The effects of different anticoagulants on thrombin generation. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 2006;17:131-137.
- [38] Al Dieri R, Alban S, Beguin S, Hemker HC. Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost* 2004;2:1395-401.
- [39] Padilla A, Gray E, Pepper DS, Barrowcliffe T. Inhibition of thrombin generation by heparin and low molecular weight (LMW) heparins in the absence and presence of platelet factor 4. *Br J Haematol* 1992;82:406-413.



- [40] Walenga J, Bara L, Hoppensteadt D, Choay J, Fareed J, Samama MM. ATIII as a rate limiting factor for the measurement of pentasaccharide in laboratory assays. *Thromb Haemost* 1991;65:1314.
- [41] Boneu B, Necciari J, Cariou R, Sié P, Gabaig AM, Kieffer G, Dickinson J, Lamond G, Moelker H, Mant T, Magnani H. Pharmacokinetics and tolerance of the natural pentasaccharide (SR90107/ORG31540) with high affinity to antithrombin III in man. *Thromb Haemost* 1995;74:1468-1473.
- [42] Gerotziafas G, Elalamy I, Depasse F, Perzborn E, Samama MM. In vitro inhibition of thrombin generation, after tissue factor pathway activation, by the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban. *J Thromb Haemost* 2007;5:886-888.
- [43] ARIXTRA® Résumé des caractéristiques du produit.
- [44] Brufatto N, Ward A, Nesheim ME. Factor Xa is highly protected from antithrombin-fondaparinux and antithrombin-enoxaparin when incorporated into the prothrombinase complex. *J Thromb Haemost* 2003;1:1258-63.
- [45] Lindhout T, Hemker HC. Anticoagulant mechanism of actions of low molecular weight heparins. In: Doutremepuich C ed. Low molecular weight heparins in clinical practice. New York: Marcel Dekker Inc,1992: 23-50.
- [46] Al Dieri R, Alban S, Beguin S, Hemker HC. Fixed dosage of low-molecular-weight heparins causes large individual variation in coagulability, only partly correlated to body weight. *J Thromb Haemost* 2006;4:83-9.

- [47] Oldenburg J, Bevans CG, Fregin A, Geisen C, Muller-Reible C, Watzka M. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: The influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thromb Haemost* 2007;98:570-8.
- [48] Rozalski M, Boncler M, Luzak B, Watala C. Genetic factors underlying differential blood platelet sensitivity to inhibitors. *Pharmacol Rep* 2005;57:1-13.
- [49] Fontana P, Reny JL. Pharmacogénétique et médicaments antiplaquettaires. *Rev Med Interne* 2005;26:725-32.
- [50] Fareed J, Leong W, Hoppensteadt DA, Jeske WP, Walenga J, Bick RL. Development of generic low molecular weight heparins: a perspective. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005;19:53-68.

7

# **ANNEXES**

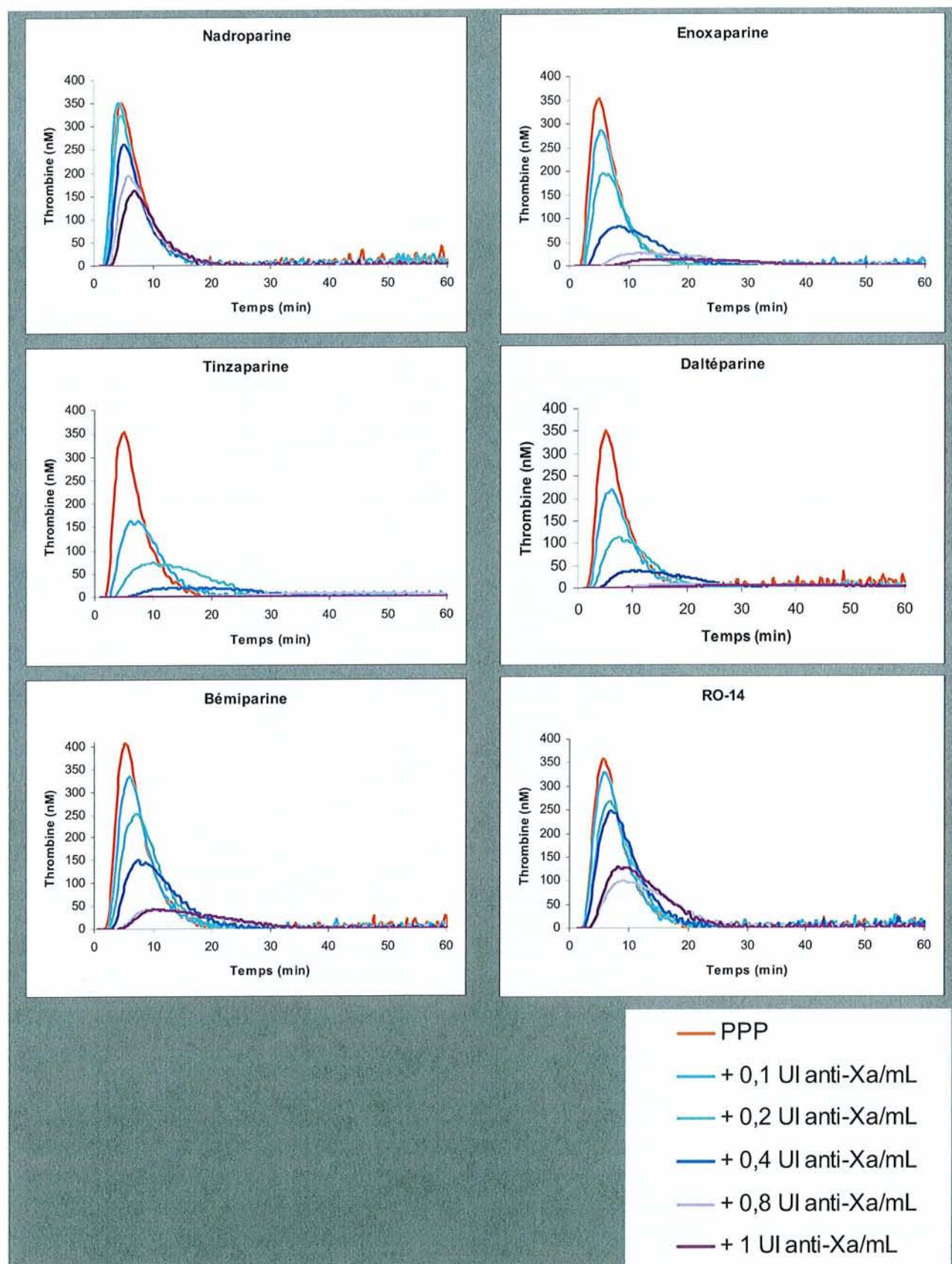


Figure 19 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 1 avec les 6 HBPM.



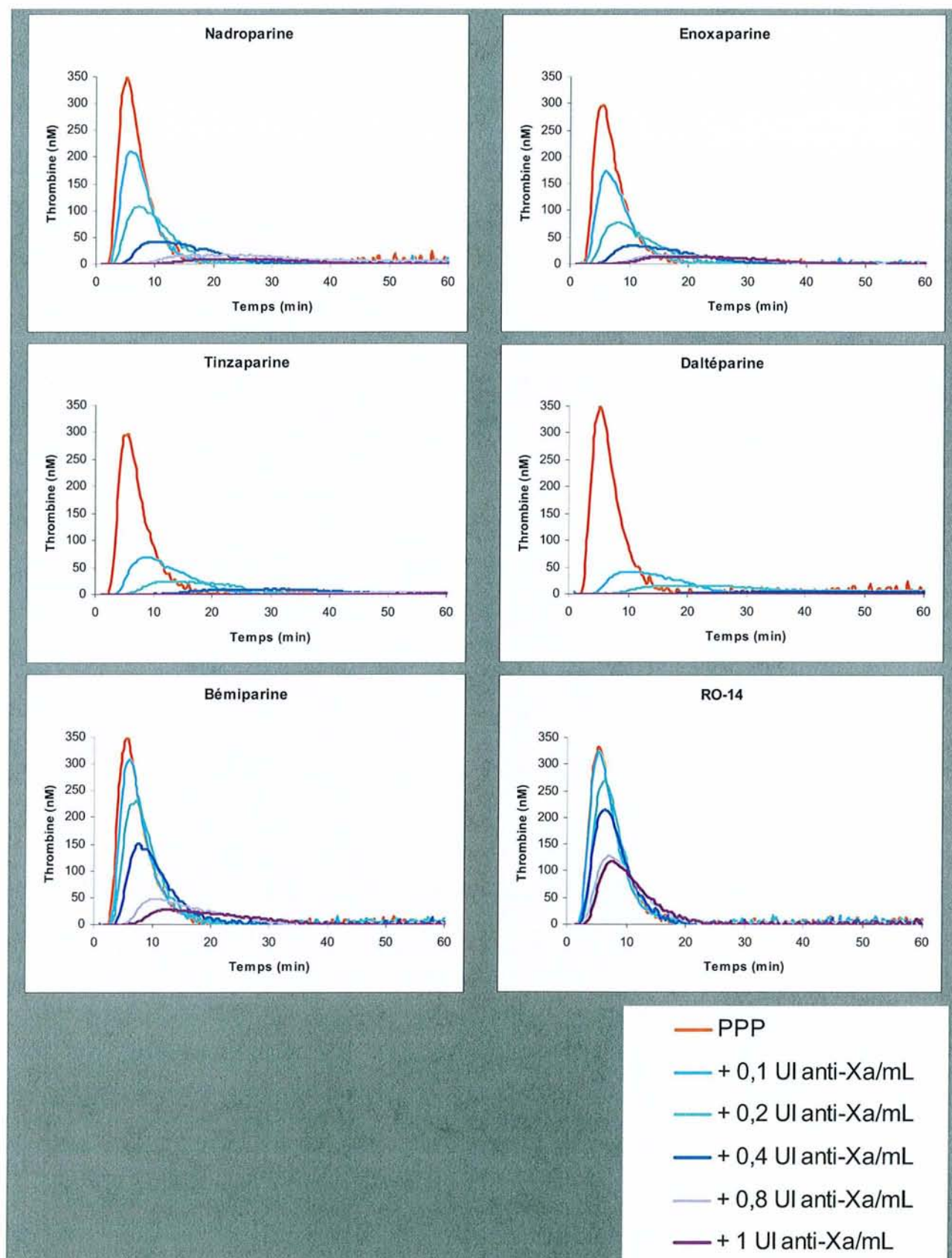


Figure 20 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 2 avec les 6 HBPM.

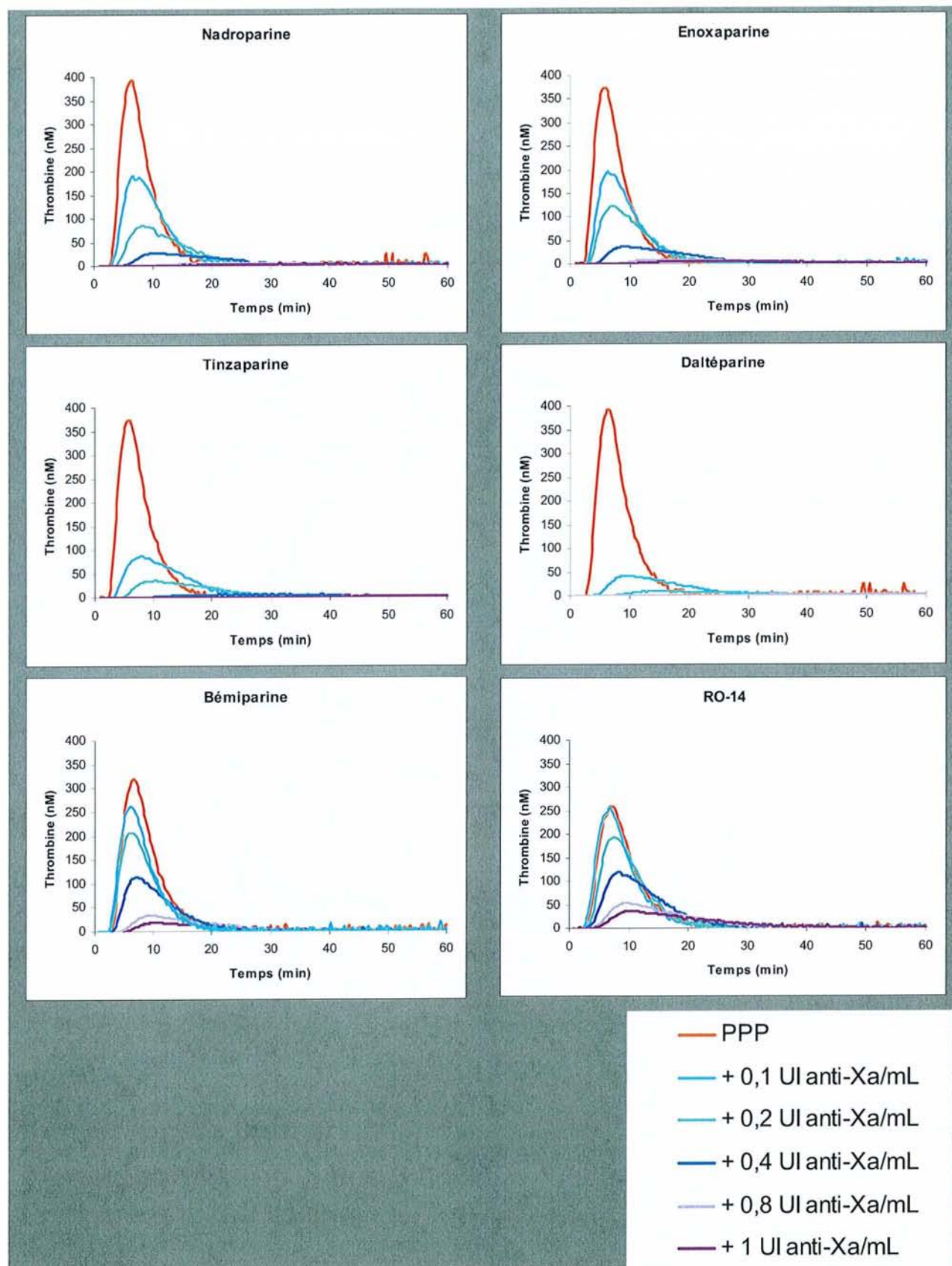


Figure 21 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 3 avec les 6 HBPM.



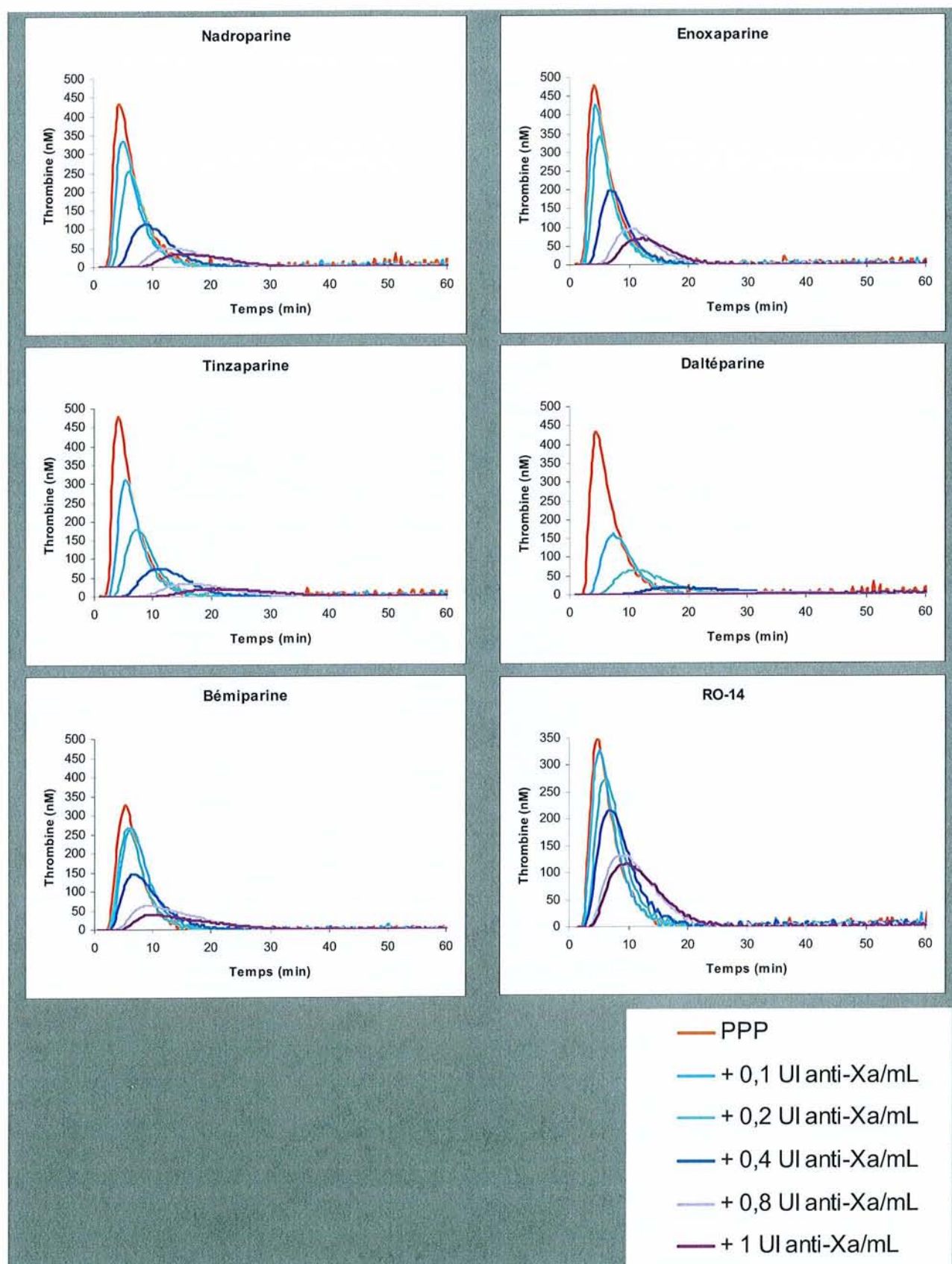


Figure 22 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 4 avec les 6 HBPM.

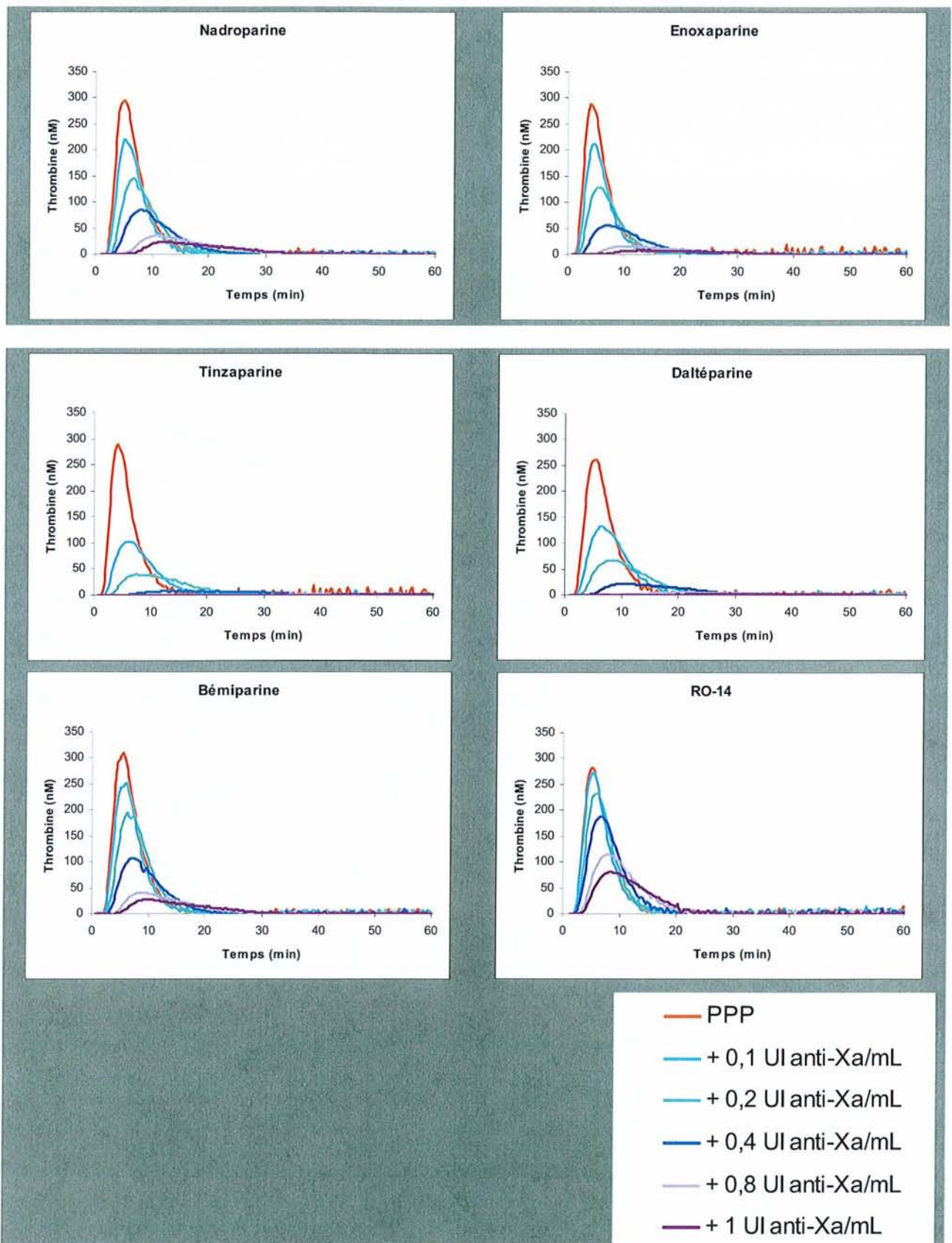


Figure 23 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 5 avec les 6 HBPM.



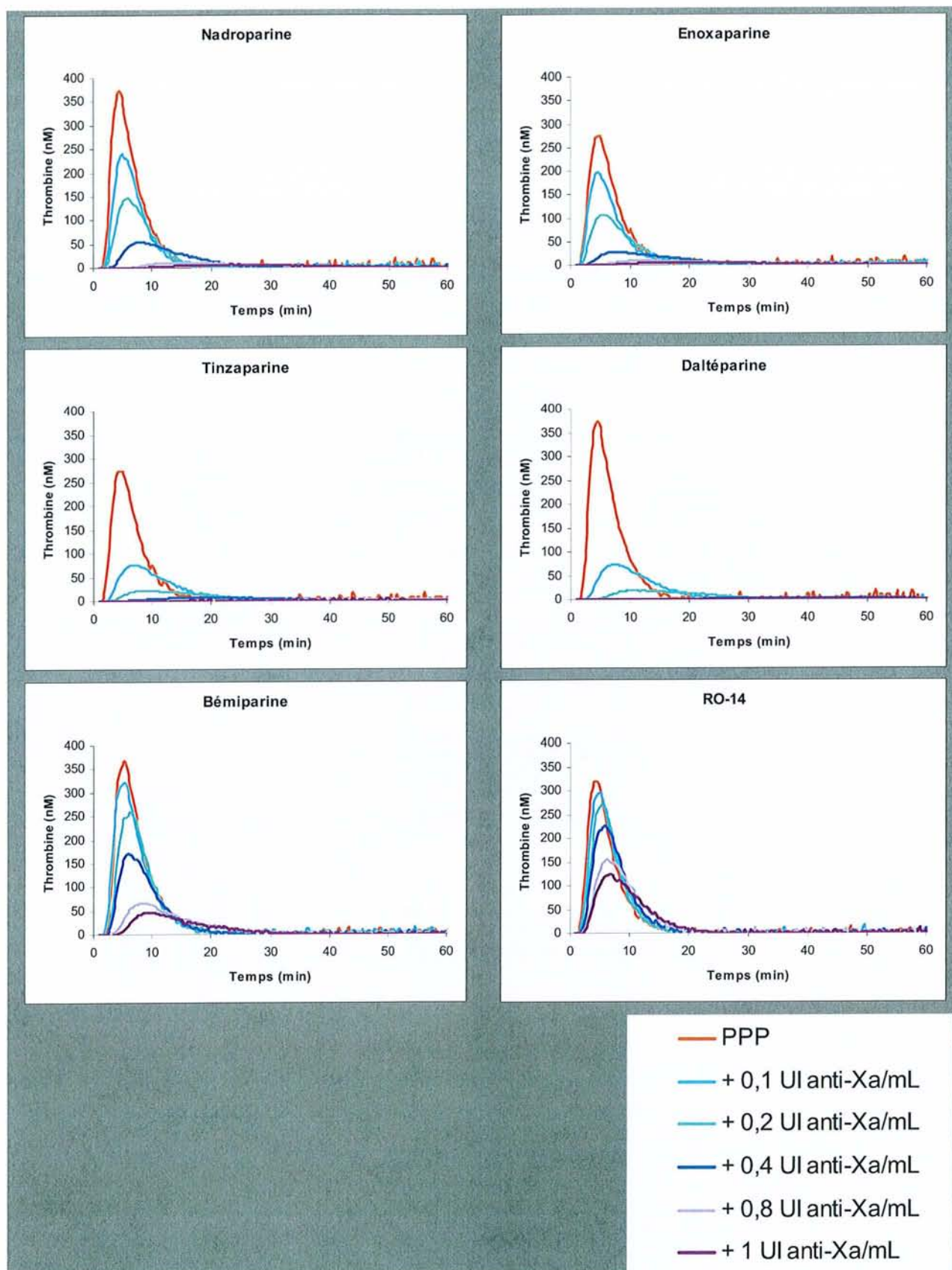


Figure 24 : Thrombinogrammes obtenus chez le sujet 6 avec les 6 HBPM.

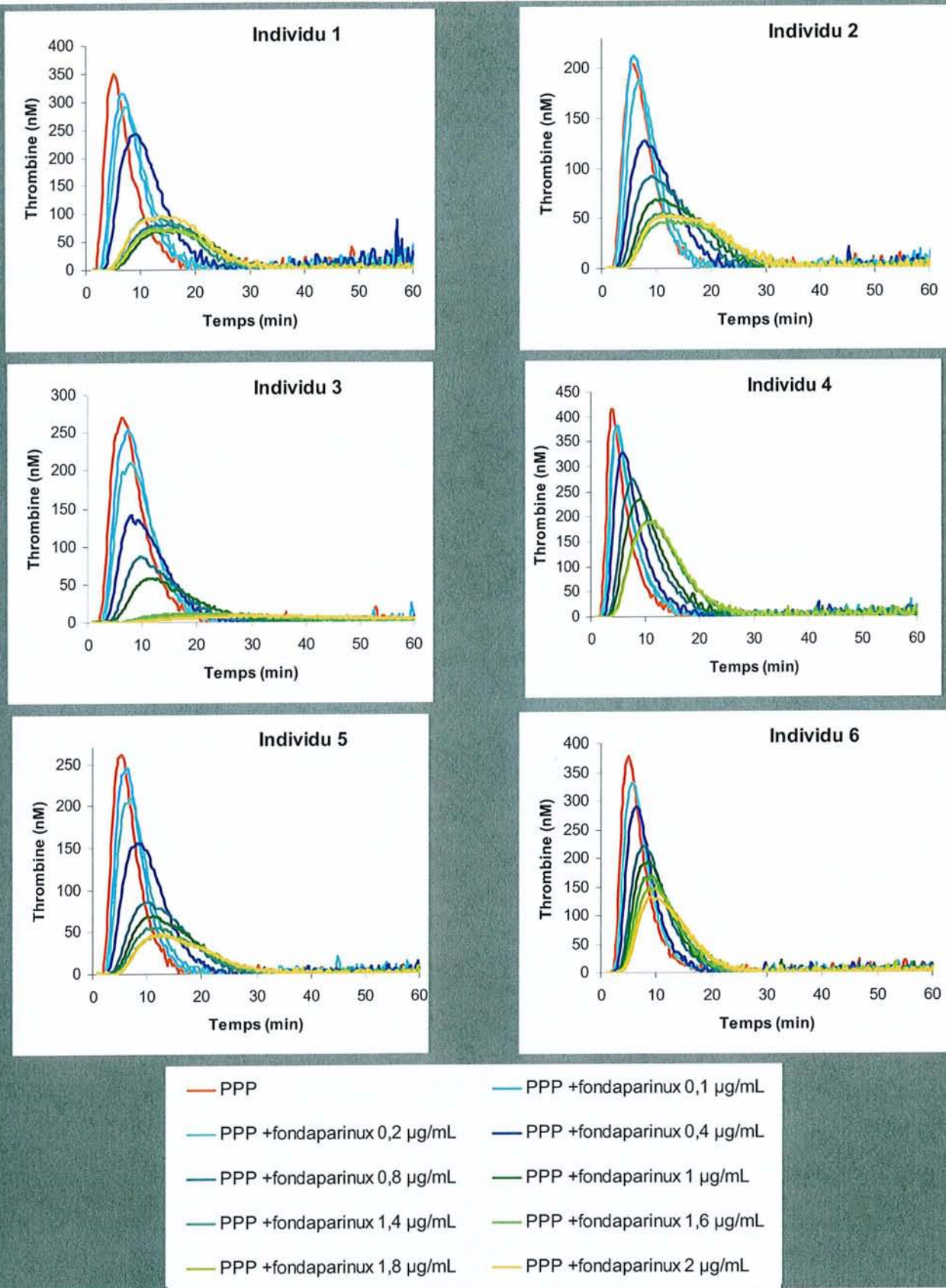


Figure 25 : Thrombinogrammes obtenus chez les 6 sujets avec le fondaparinux.







N° d'identification : 211

**TITRE**

**Inéquivalence et variabilité de profil d'anticoagulation *in vitro* étudié par thrombinographie de 6 héparines de bas poids moléculaire et du fondaparinux**

Thèse soutenue le 25 octobre 2007

Par Julien PERRIN

**RESUME :**

Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) et le fondaparinux sont des médicaments appartenant à la classe des anticoagulants. Leur action sur la coagulation est indirecte car médiée par l'antithrombine, principal inhibiteur physiologique du système. Leurs propriétés pharmacocinétiques étant bien établies et prédictibles, la surveillance de l'efficacité du traitement est inutile dans la majorité des cas. Or, il est avéré que les différentes HBPM disponibles ne sont pas équivalentes, principalement en terme de longueur de chaînes polysaccharidiques, conduisant à une activité anti-Xa et anti-IIa propre à chaque préparation. L'objet de notre étude est de caractériser le retentissement global sur la coagulation de plusieurs HBPM (bémiparine, daltéparine, énoxaparine, nadroparine, RO-14, tinzaparine), en comparaison avec celui obtenu avec le fondaparinux (pentasaccharide synthétique), après surcharge *in vitro* de plasmas pauvres en plaquettes issus d'une population de volontaires sains et à l'aide d'une méthode intégrative globale de la coagulation, la thrombinographie. Les résultats montrent des disparités marquées entre les différents principes actifs étudiés en terme de potentialité à inhiber la génération de thrombine, et cette potentialité est corrélée avec le niveau d'activité anti-IIa résiduelle, appuyant ainsi le concept d'inéquivalence. Une variabilité de réponse inter-individuelle non négligeable a également été observée avec non seulement toutes les HBPM mais aussi avec le fondaparinux et ce, en dépit des conditions expérimentales visant à limiter au maximum les facteurs de variabilité entre individus. Le retentissement *in vivo* de cette variabilité n'est pas connu, mais on peut émettre l'hypothèse que, si elle n'est pas plus marquée, elle devrait être au moins aussi importante

**MOTS CLES :** HBPM – Fondaparinux – Thrombinographie – Variabilité inter-individuelle

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr M. TOUSSAINT-HACQUARD	Service d'Hématologie biologique CHU de Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input checked="" type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle