

UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS SÉTIF 1



DÉPARTEMENT DE PHARMACIE

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES MÉDICALES

Dr Bouhedadja Zahia
Maitre-assistante en pharmacologie

**DÉVELOPPEMENT D'UN ALGORITHME
PHARMACOGÉNÉTIQUE PRÉDICTIF DE LA
POSOLOGIE D'ACÉNOCOUMAROL AU
NIVEAU DU CHU SÉTIF.**

Directeur de thèse :

Pr TOUMI Houari (Faculté de médecine d'Oran).

Co directeurs :

Pr BOUSSOUF Kheira (Université de Sétif).

Pr REZGOUNE-CHELLAT Djalila (Université Mentouri Constantine 1).

Président du jury :

Pr MANSOURI Kamel (Faculté de Médecine d'Alger).

Membres du jury :

Pr CHADER Henni (Faculté de Médecine d'Alger).

Pr BOUDIA Fatima (Faculté de Médecine d'Oran).

Pr BORSALI Nabil (Faculté de Médecine de Tlemcen).

Date de soutenance :

.....

***Au Nom de Dieu, le Tout Miséricordieux,
Le Très Miséricordieux***

*Merci dieu tout puissant, de m'avoir tenu en bonne santé pour la
réalisation de cette thèse.*

*Merci de m'avoir donné la force et le courage d'entreprendre ce
travail.*

Merci de m'avoir honoré d'être parmi ceux qui savent lire et écrire

Que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.

Remerciements

Ces remerciements sont l'occasion d'exprimer ma gratitude aux personnes qui ont composé mon environnement professionnel durant ces dernières années. J'espère que le futur me donnera l'occasion de vous témoigner ma gratitude.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, **Professeur TOUMI Houari**, qui bien avant de tenir ce rôle, a été mon professeur durant 9 ans et m'a dirigé dans la réalisation de mon mémoire de DEMS, ce qui a, sans conteste, été le point de départ de toute la démarche qui a suivie. Je vous remercie de vous ériger en modèle : vous montrez en effet chaque jour ce que c'est que d'être passionné et dévoué à son travail. Soyez assurée que je garderai toujours cette image en mémoire et qu'elle me sera souvent utile. Merci d'avoir toujours fait preuve d'une généreuse intransigeance à mon égard. Merci également pour votre humanité quand j'en ai eu besoin plus que jamais. J'ai énormément appris avec vous tout au long de ces années.

Professeur BOUSSOUF Kheira, chef service de cardiologie au CHU Sétif et co-directeur de cette thèse, pour sa disponibilité tout au long de ce travail de recherche .Vous êtes pour beaucoup dans la réalisation de ce travail ; fruit d'une collaboration étroite entre cardiologues et pharmacologues.

Professeur REZGOUNE-CHELLAT Djalila, généticienne à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, membre dans le laboratoire de recherche de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU Ibn Badis Constantine 3 et co-directeur de cette thèse, pour sa rigueur, sa disponibilité et son soutien sans faille tout au long de ce travail de recherche.

Professeur MANSOURI Kamel, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous suis gré d'avoir accueilli ma demande avec bienveillance. J'espère que vous avez trouvé de l'intérêt à évaluer ma thèse.

Professeur CHADER Henni, d'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury pour examiner cette thèse, merci pour votre sens pédagogique.

Professeur BOUDIA Fatma, je vous suis gré d'avoir accueilli ma demande avec bienveillance. C'est un honneur de vous avoir et de bénéficier de votre expérience.

Professeur BORSALI Nabil, d'avoir accepté de faire partie de ce jury pour examiner cette thèse, merci pour votre lecture critique et votre disponibilité.

Professeur ABADI Noureddine, chef du laboratoire de recherche de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU Ibn Badis Constantine, qui m'a ouvert les portes et mis à ma disposition tous les moyens disponibles pour la réalisation de ce travail.

Professeur OMMEZINE Asmaa, chef de Service du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire au CHU SAHLOUL en Tunisie, pour votre aide et votre expertise lors de la réalisation de l'étude de biologie moléculaire. Veuillez accepter le témoignage de ma reconnaissance et de mon respectueux hommage. .

Un dernier merci, et non pas des moindres à ma très chère amie **LAOUAR Rania**, Doctorante en Génétique Moléculaire à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour tous ces efforts, ces encouragements et son aide précieuse tout au long de la réalisation de cette thèse que ce soit sur le plan pratique ou théorique, je te remercie du fond du cœur.

Dédicaces

Je dédie cet humble travail :

*À la mémoire de ma mère **Khaldia**; vous m'avez appris à cultiver le courage et à toujours relever le défi. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos attentes ! Pour votre amour... Pour tous vos sacrifices et soutien pour parfaire ma formation... Pour tous l'éducation et l'enseignement que vous m'avez transmis... Que ce modeste travail soit pour vous un témoignage de ma profonde affection de mon profond respect et de mon éternelle reconnaissance.*

Bien qu'aucune dédicace ne saura exprimer ma considération, ma reconnaissance et mon grand amour pour vous.

Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde!

*Ce travail est dédié à mon père **Abed**. Je suis très fière d'être votre fille et ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mes études et ma formation. Sans toi ce jour n'aurais pas existé ! Merci beaucoup. Je t'aime très fort papa.*

*À mon époux **Hichem**, un énorme merci pour ta patience, ton soutien et ta présence tout au long de cette thèse. Merci d'avoir été patient malgré toutes les difficultés rencontrées.*

*À mon enfant **Mohamed**, t'es ma vie, mon bonheur, ma force et mon courage. Que Dieu te protège et t'accorde une longue vie et une bonne santé mon cœur.*

*À ma meilleure amie **Rania** qui était toujours à mes côtés.*

À toute ma famille et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et que j'aurais oublié de citer.

Listes des abréviations

A:	Adénine
ABC1:	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AODs :	Anticoagulants oraux directs
ApoE:	Apolipoprotéine E
Arg:	Arginine
ARN:	Acide ribonucléique
AT:	Antithrombine
AVK:	Antivitamines K
C:	Cytosine
C4b-BP:	C4b binding protein
CALU:	Calumenine
CNIL :	Commission nationale de l'informatique et des libertés
CNV:	Copy number variant
CTAD:	Citrate théophylline, Adénosine, dipyridamole
CYP1A2:	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2
CYP2C19:	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 19
CYP2C9:	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 9
CYP3A4:	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4
CYP4F2:	Cytochrome P450 Family 4 Subfamily F Member 2
Cys:	Cystéine
DNTp:	Désoxyribonucléosides triphosphates
EDTA:	Éthylène diamine tétraacétique
EMA:	Agence Européenne du médicament
EMEA:	Agence européenne pour l'évaluation des produits médicamenteux
EPHX1:	Epoxyde hydrolase
FA:	Fibrillation auriculaire
FDA:	Food and Drug Administration
FT:	Facteur tissulaire
FVIIIa:	Facteur VIII activé
G:	Guanine
Gas 6:	Growth arrest-specific gene 6
GBEA :	Guide de bonnes exécutions des analyses
GGCX:	Gamma-glutamyl carboxylase
Gla:	Acide γ - carboxyglutamique
Glu:	Acide glutamique
GWAS:	Genome wide association study
HAS:	Haute Autorité de Santé
His:	Histidin
HON:	Health On the Net foundation
HTA:	Hypertension artérielle
HTZ:	Hétérozygote
HWE:	Équilibre de Hardy-Weinberg
ICER :	Incremental cost effectiveness ratio
Ile:	Isoleucine
IMC :	Indice de masse corporelle
In/Delet:	Insertions/délétions
INR:	International Normalized Ratio

ISI:	Indice de sensibilité internationale
Kb:	Kilobase
KHPM:	Kininogène de haut poids moléculaire
KO:	Vitamine K époxyde
Leu:	Leucine
LTB4:	Leucotriène B4
MAF :	Minor allele frequency
MDR1:	Multi-Drug Resistance 1
Met:	Méthionine
MGP:	Matrix Gla protein
m-Health :	Mobile health (santé mobile)
MK:	Ménaquinone
MTEV:	Maladie thromboembolique veineuse
Mut:	Mutant
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NIH:	National Institute of Health
NQO1:	NADPH déshydrogénase de la quinone1
ORM1:	Orosomucoid 1
ORM2:	Orosomucoid 2
Pb:	Paire de base
PC:	Protéine C
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PD:	Pharmacodynamie
PIVKA:	Protein Induced by Vitamin K Absence or antagonist
PK:	Pharmacocinétique
PLs:	Phospholipides
PS:	Protéine S
PT:	Prothrombin time
PVKD:	Protéines vitamino- K dépendants
RCP:	Résumés des Caractéristiques du Produit
RFLP:	Restriction Fragments Length Polymorphisms
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SNP:	Polymorphisme simple de nucléotide
T:	Thymine
TBE:	Tris-Borate-EDTA
TFPI:	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
Thr:	Thréonine
TIC :	Technologies de l'information et de la communication
TP:	Taux de prothrombine
TQ :	Temps de Quick
TTR:	Time in Therapeutic Range
Val:	Valine
VKH2 :	Vitamine K dihydroquinone
VKOR :	Vitamine K oxydo-réductase
VKORC1 :	Vitamine K époxyde réductase complex subunit 1
VNTR:	Variable number of tandem repeats
vWF:	Facteur de von Willebrand
Wt:	Wild-type

Liste des figures

Figure 1 :	Structure chimique des dérivés coumariniques.....	4
Figure 2 :	Mécanisme d'action des AVK.....	5
Figure 3 :	Hydroxylation du S- et R-Acénocoumarol.....	7
Figure 4 :	Principaux métabolites de l'Acénocoumarol et les voies impliquées.....	8
Figure 5 :	Exemple d'instabilité de l'anticoagulothérapie aux AVK au cours du temps.....	16
Figure 6 :	Séquence d'ADN d'un gène chez deux individus pris au hasard SNP.....	19
Figure 7 :	Structure du gène humain <i>CYP2C9</i>	20
Figure 8 :	Structure du <i>VKORC1</i> et emplacement des SNP.....	24
Figure 9 :	Topologie membranaire de la vitamine K époxyde réductase.....	24
Figure 10 :	Localisation du gène <i>CYP4F2</i>	26
Figure 11 :	Structure du gène humain <i>CYP4F2</i>	27
Figure 12 :	Localisation du gène <i>CALU</i>	28
Figure 13 :	Diagramme d'interaction entre GGCX et Calumenin.....	28
Figure 14 :	Les gènes impliqués dans la réponse à l'Acénocoumarol.....	30
Figure 15 :	Les applications de la de la e-santé.....	39
Figure 16 :	Schéma organisationnel de la m-santé.....	40
Figure 17 :	Classification des applications mobiles de santé.....	41
Figure 18 :	Modèle économique de 50 applications mobiles de santé éditées par les laboratoires pharmaceutiques.....	42
Figure 19 :	Diagramme de flux des patients dans l'étude.....	49
Figure 20 :	Coagulomètre automatique SYSMEX CA-600.....	53
Figure 21 :	Courbe de calibration.....	54
Figure 22 :	Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop® ND-1000).....	57
Figure 23 :	Etapas de la réaction en chaîne polymérase (PCR).....	60
Figure 24 :	Thermocycleur « ProFlex PCR System » utilisé dans le génotypage.....	61
Figure 25 :	Cuve utilisé pour le contrôle de PCR.....	62
Figure 26 :	Syngene Tm Transilluminateur LED Imager.....	63
Figure 27 :	Profils électrophorétique attendus des mutations <i>VKORC1*2</i> , <i>VKORC1*3</i> et <i>VKORC1*4</i>	66
Figure 28 :	Profil électrophorétique attendus des polymorphismes <i>VKORC1*intron1</i>	67
Figure 29 :	Profils électrophorétique attendus des mutations <i>CYP2C9*2</i> et <i>CYP2C9*3</i>	68
Figure 30 :	Profils électrophorétique attendus des mutations des gènes <i>CYP4F2</i> et <i>CALU</i>	71

Figure 31 :	Capture d'écran programme flutter.....	73
Figure 32 :	Répartition des patients selon deux tranches d'âge.....	76
Figure 33 :	Répartition des patients selon le sexe.....	76
Figure 34 :	Répartition des patients selon les indications de l'Acénocoumarol.....	76
Figure 35 :	Répartition des patients selon les comorbidités.....	77
Figure 36 :	Répartition des patients selon les médicaments interagissant avec l'Acénocoumarol.....	78
Figure 37 :	Distribution des doses d'équilibre.....	78
Figure 38 :	Diagramme en boite de la dose d'équilibre selon les deux tranches d'âge.....	80
Figure 39 :	Corrélation poids-dose à l'équilibre d'Acénocoumarol.....	81
Figure 40 :	Diagrammes en boite de la dose d'équilibre selon présence ou l'absence de l'HTA.....	82
Figure 41 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme <i>VKORC1</i> *2 du gène <i>VKORC1</i>	84
Figure 42 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme <i>VKORC1</i> *intron1 du gène <i>VKORC1</i>	84
Figure 43 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme <i>VKORC1</i> *3 du gène <i>VKORC1</i>	85
Figure 44 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme <i>VKORC1</i> *4 du gène <i>VKORC1</i>	85
Figure 45 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme <i>CYP2C9</i> *2 du gène <i>CYP2C9</i>	86
Figure 46 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme <i>CYP2C9</i> *3 du gène <i>CYP2C9</i>	86
Figure 47 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme 1347G>A du gène <i>CYP4F2</i>	87
Figure 48 :	Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme 29809A>G du gène <i>CALU</i>	87
Figure 49 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du <i>VKORC1</i> 1639G>A.....	91
Figure 50 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du <i>VKORC1</i> *intron1.....	92
Figure 51 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du <i>VKORC1</i> *3 (c.9041G>A).....	93
Figure 52 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du <i>VKORC1</i> *4.....	94
Figure 53 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du <i>CYP2C9</i> *2.....	95
Figure 54 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du <i>CYP2C9</i> *3 c.1075A>C.....	96
Figure 55 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du <i>CYP4F2</i> *3 (g.1347G>A).....	97
Figure 56 :	Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du gène <i>CALU</i>	98
Figure 57 :	Corrélation entre dose prédite par notre algorithme et la dose clinique observée.....	105

Figure 58 :	Corrélation entre la dose prédite par notre algorithme et la dose clinique observée dans la cohorte de validation.....	106
Figure 59 :	Proportion des sujets selon les doses prédites.....	107
Figure 60 :	Capture d'écran Création de compte.....	108
Figure 61 :	Capture d'écran du profil d'un patient.....	109
Figure 62 :	Capture d'écran de la page d'accueil du patient.....	110
Figure 63 :	Capture d'écran de la fenêtre de gestion de l'INR.....	111
Figure 64 :	Capture d'écran de la page d'accueil du médecin.....	112
Figure 65 :	Capture d'écran du profil du patient observé par le médecin.....	113
Figure 66 :	Capture d'écran sur le schéma posologique d'Acénocoumarol.....	114
Figure 67 :	Capture d'écran des médicaments prescrits par le médecin.....	115
Figure 68 :	Capture d'écran de la posologie prédite par l'algorithme pharmacogénétique.....	116

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Paramètres pharmacocinétiques des AVK.....	6
Tableau 2 :	Récapitulatif des traitements à forte probabilité d'interaction avec les AVK.....	11
Tableau 3 :	Les zones thérapeutiques d'INR et durées de traitement conseillées, en fonction des principales indications.....	13
Tableau 4 :	Différentes classes de variant génétiques.....	19
Tableau 5 :	Allèles du CYP2C9 et leurs fréquences dans les différents groupes ethniques.....	23
Tableau 6 :	Liste des polymorphismes les plus fréquemment rencontrés dans le gène <i>VKORC1</i>	26
Tableau 7 :	Action et Effet des autres gènes faiblement impliqués dans la réponse aux AVK.....	31
Tableau 8 :	Les principales applications mobiles de santé disponibles pour la gestion des AVK.....	44
Tableau 9 :	Calcul du TTR par la méthode Rosendaal.....	55
Tableau 10 :	Conditions de conservation de l'ADN.....	58
Tableau 11 :	Liste des amorces utilisées pour la détection des polymorphismes des gènes <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> , <i>CYP4F2</i> et <i>CALU</i>	64
Tableau 12 :	Milieu réactionnel de la PCR pour les polymorphismes <i>VKORC1</i> *2, <i>VKORC1</i> *3, <i>VKORC1</i> *4, et <i>VKORC1</i> *intron1 du gène <i>VKORC1</i>	65
Tableau 13 :	Programmes des PCR pour les polymorphismes <i>VKORC1</i> *2, <i>VKORC1</i> *3, <i>VKORC1</i> *4, et <i>VKORC1</i> *intron1 du gène <i>VKORC1</i>	65
Tableau 14 :	Composition du milieu réactionnel des digestions enzymatiques des polymorphismes du gène <i>VKORC1</i>	66
Tableau 15 :	Milieu réactionnel de la PCR pour les polymorphismes <i>CYP2C9</i> *2 et <i>CYP2C9</i> *3 du gène <i>CYP2C9</i>	67
Tableau 16 :	Programmes des PCR pour les polymorphismes <i>CYP2C9</i> *2 et <i>CYP2C9</i> *3 du gène <i>CYP2C9</i>	68
Tableau 17 :	Composition du milieu réactionnel des digestions enzymatiques des polymorphismes <i>CYP2C9</i> *2 et <i>CYP2C9</i> *3 du gène <i>CYP2C9</i>	68
Tableau 18 :	Milieu réactionnel de la PCR pour les polymorphismes des gènes <i>CYP4F2</i> et <i>CALU</i>	69
Tableau 19 :	Programme des PCR pour les polymorphismes du gène <i>CYP4F2</i> et <i>CALU</i>	70
Tableau 20 :	Composition du milieu réactionnel des digestions enzymatiques des polymorphismes des gènes <i>CYP4F2</i> et <i>CALU</i>	70
Tableau 21 :	Résultats de l'analyse unie variée des facteurs non génétiques évalués dans notre étude.....	79
Tableau 22 :	Évaluation de l'équilibre de Hardy- Weinberg des fréquences alléliques de la cohorte au moyen du test du chi-deux (x2).....	88
Tableau 23 :	Distribution génotypique et allélique des SNP des <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> , <i>CYP4F2</i> , et <i>CALU</i> et leur relation avec la dose journalière (mg) d'Acénocoumarol.....	90

Tableau 24 :	Résultats de la régression linéaire multiparamétrique par étapes montrant le pouvoir prédictif de chaque variable, définissant le modèle final de prédiction de dose d'équilibre en Acénocoumarol.....	99
Tableau 25 :	Caractéristiques cliniques de la cohorte de validation.....	102
Tableau 26 :	Caractéristiques génétiques de la cohorte de validation.....	103
Tableau 27 :	Comparaison entre la cohorte de validation et la cohorte de dérivation de l'algorithme.....	104
Tableau 28 :	Dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol dans de différentes populations.....	117
Tableau 29 :	Effet de l'âge sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol selon les différentes populations.....	118
Tableau 30 :	Récapitulatif des études ayant publiées différents algorithmes avec leurs coefficients de détermination.....	129

Table des matières

Remerciements et dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Eléments bibliographiques

Chapitre I : Les antivitamines K

1- La découverte des AVK.....	4
2- Structure chimique des AVK.....	4
3- Propriétés pharmacodynamiques des AVK.....	5
4- Propriétés pharmacocinétiques des AVK.....	6
5- Spécificité de la pharmacocinétique de l'Acénocoumarol.....	7
6- Indications des AVK.....	8
7- Les contre-indications.....	9
8- Iatrogénie et profil de risque.....	9
9- Variabilité de la réponse aux AVK.....	10
10- Usage des AVK chez la femme enceinte et allaitante.....	12
11- Suivi thérapeutique des AVK.....	12
11-1- Surveillance biologique.....	12
11-2- Le calcul du TTR.....	16
11-3- Education du patient et surveillance clinique.....	16
12- Le coût des AVK.....	17

Chapitre II : Pharmacogénétique des AVK

1- Historique et définition de la pharmacogénétique.....	18
2- Les formes des variations génétiques.....	18
2-1- Les polymorphismes mononucléotidiques SNPs.....	18
2-2- Les variations de structure.....	19
2-3- Les gènes influençant le plus la réponse aux AVK.....	20
2-3-1- Le gène <i>CYP2C9</i>	20
2-3-2- Le gène <i>VKORC1</i>	24
2-3-3- Le gène <i>CYP4F2</i>	26
2-3-4- Le gène <i>CALU</i>	28
2-3-5- Autres gènes faiblement impliqués dans la réponse aux AVK.....	30
3- Algorithme pharmacogénétique des AVK.....	34
3-1- Généralités.....	34
3-2- Sélection variable.....	34
3-3- Mesure des performances du modèle.....	35
3-4- Les algorithmes.....	35
4- Etude de coût efficacité.....	37

Chapitre III : Les applications numériques de santé : la m-santé

1- Le contexte définition de la santé mobile.....	39
1-1-La santé connectée.....	39
1-2- La santé mobile.....	40
1-2-1- Contexte.....	40

2- Les applications mobiles de santé.....	40
2-1- Définition.....	40
2-2- Classification des applications mobiles de santé.....	41
2-3- Modèle économique des applications mobiles de santé.....	42
2-4- Impact des applications mobile de santé sur la relation médecin-patient.....	42
2-5- Cadre juridique.....	43
2-6- Applications mobiles de santé pour la gestion des AVK.....	43

Partie expérimentale

Objectifs du travail.....	46
I- Patients et méthodes	
1- Patients.....	47
1-1-Type d'étude.....	47
1-2- Lieu d'étude.....	47
1-3- Population d'étude.....	47
1-3-1- Critères d'inclusion.....	47
1-3-2- Critères de non inclusion.....	48
1-4- Recueil de données.....	50
1-5- Consentement.....	50
1-6- Le suivi des patients.....	50
2- Méthodes.....	51
2-1- Partie suivi thérapeutique.....	51
2-1-1- Suivi biologique des patients sous acénocoumarol (INR).....	51
2-1-2- Calcul du temps passé dans la zone thérapeutique (TTR).....	55
2-2- Partie pharmacogénétique.....	56
2-2-1- Prélèvements sanguins.....	56
2-2-2- Conservation des prélèvements.....	56
2-2-3- Extraction de l'ADN.....	56
2-2-4- Détermination de la la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN extrait.....	57
2-2-5- Le génotypage.....	58
2-2-6- Méthodes d'études des polymorphismes des gènes <i>CY2C9</i> , <i>VKORC1</i> , <i>CYP4F2</i> et <i>CALU</i> par PCR-RFLP.....	64
2-3-Développement de l'application.....	72
2-4- Analyse statistique.....	74
II- Résultats	
1- Développement de l'algorithme prédictif de la posologie d'équilibre d'Acénocoumarol.....	76
1-1- Analyse descriptive de la population d'étude.....	76
1-1-1-L'âge.....	76
1-1-2- Le sexe.....	76
1-1-3- Indications de l'Acénocoumarol.....	77
1-1-4- Les comorbidités.....	77
1-1-5- La comédication.....	78
1-1-6- La dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	78
1-2- Analyse des facteurs influençant la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	79
1-2-1 Les facteurs non génétiques.....	79

1-2-2- Influence des facteurs cliniques statistiquement significatifs.....	80
1-2-3- Influence de facteurs génétiques.....	81
1-3-Etude de l'impact des polymorphismes génétiques sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	91
1-3-1-Effet du polymorphisme <i>VKORC1</i> *2 -1639G>A sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	91
1-3-2-Effet du polymorphisme <i>VKORC1</i> *intron1 (c.1173C>T) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	92
1-3-3-Effet du polymorphisme <i>VKORC1</i> *3 (c.9041G>A) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	93
1-3-4-Effet du polymorphisme <i>VKORC1</i> *4 (c.6009 C>T) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	94
1-3-5-Effet du polymorphisme <i>CYP2C9</i> *2 (c.430C>T) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	95
1-3-6-Effet du polymorphisme <i>CYP2C9</i> *3 c.1075A>C sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	96
1-3-7-Effet du polymorphisme <i>CYP4F2</i> *3 (g.1347G>A) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	97
1-3-7-Effet du polymorphisme du <i>CALU</i> (c.29809A>G) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.....	98
1-4- L'analyse multi variée (construction de l'algorithme).....	99
2- Validation de l'algorithme.....	102
2-1- Caractéristiques de la cohorte de validation.....	102
2-2- Etapes de la validation de l'algorithme.....	104
2-2-1-Comparaison de la cohorte de validation et la cohorte du développement de l'algorithme.....	104
2-2-2- Validation interne de l'algorithme.....	105
2-2-3- Validation externe de l'algorithme.....	106
3- Description de l'application androïde.....	108
3-1- Création d'un compte.....	108
3-2- Le profil patient.....	109
3-3- Page d'accueil du patient.....	110
3-4- Page d'accueil du médecin	112
3-5- Posologie de l'Acénocoumarol proposée par le médecin.....	114
3-6- Pharmacogénétique de l'acénocoumarol.....	116
III- Discussion.....	117
IV- Forces et limites de l'étude.....	134
V- Conclusion et perspectives.....	136
Références bibliographiques	137
Annexes	
Résumés	

INTRODUCTION

Introduction

À l'heure où de nouvelles molécules anticoagulantes (AOD) arrivent sur le marché mondial, les antivitamines K (AVK) restent le traitement anticoagulant de référence pour des pathologies fréquentes telles que : la fibrillation auriculaire, les thromboses veineuses et les valvulopathies [1] [2] [3].

Après plus de 60 ans d'utilisation, l'efficacité des AVK n'est plus à démontrer. Cependant, leur utilisation présente un véritable challenge pour les cliniciens. En effet, sous dosé, ils exposent les patients à des complications thrombotiques, mais en surdosage ils peuvent provoquer des hémorragies fatales. À titre d'exemple, les accidents hémorragiques aux AVK sont responsables de 5000 décès par an en France, 30000 consultations en urgence au USA et de 15,1 % des hospitalisations en Inde [4] [5]. Malheureusement, on ne dispose pas de données épidémiologiques sur le nombre d'accidents sous AVK en Algérie.

L'ampleur de cette iatrogénie s'explique par une marge thérapeutique étroite et par une importante variabilité inter- et intra-individuelle. Ainsi, pour obtenir des effets thérapeutiques optimaux on utilise des doses allant de 0,5 à 60 mg chez des patients traités par la Warfarine et des doses allant de 1 à 56 mg d'Acénocoumarol [6] [7].

La surveillance biologique de l'effet du traitement est de ce fait obligatoire et contraignante pour les patients traités, et l'adaptation posologique est strictement individuelle en fonction des résultats de l'*International Normalized Ratio* (INR). L'INR test global de la coagulation, est très bien corrélé avec les événements thrombotiques et hémorragiques [8] [9]. Or, malgré une surveillance adéquate et une adaptation des posologies à ce test biologique, le temps passé dans l'intervalle thérapeutique (TTR) obtenu avec les AVK est inférieur à 70% [10].

Afin de résoudre cette problématique, il faut développer une autre alternative. C'est pourquoi, il est nécessaire d'adopter une nouvelle stratégie basée sur l'identification des différentes sources de variabilité des traitements et proposer ainsi des adaptations posologiques, à priori selon les caractéristiques des patients, et non à posteriori sur les conséquences et les effets des traitements. Parmi les différentes sources de variabilité identifiées, on retrouve l'âge, le poids, le tabagisme, l'environnement et les interactions médicamenteuses. Ces dernières ont été largement décrites dans la littérature [11].

Plus récemment, les polymorphismes de certains gènes ont montré leurs implication dans la variabilité de la réponse pharmacocinétique et pharmacodynamique des AVK. À ce

jour, les polymorphismes identifiés comme ayant impact majeure sur la réponse au traitement à ces médicaments sont les polymorphismes du *CYP2C9* et du *VKORC1*. Effectivement, de nombreuses études ont mis en évidence qu'ils étaient les principaux déterminants génétiques de la réponse aux dérivés coumariniques, expliquant 30 à 40% de la variabilité de la dose à l'équilibre [12] [13] [14] [15]. D'autres polymorphismes génétiques tels que celui du *CYP4F2* et *CALU* ont également été identifiée comme des facteurs mineur de la variabilité de la réponse pharmacodynamique aux AVK [16] [17] [18].

Actuellement, l'intérêt d'intégrer la pharmacogénétique dans le processus de gestion des AVK est plus qu'important. Ainsi, FDA a mis à jour le RCP de la Warfarine en recommandant explicitement le recours au test pharmacogénétique. En Europe, la publication dans le *New England Journal of Medicine* des résultats d'essais cliniques randomisés en novembre 2013 a révolutionné le domaine de la pharmacogénétique des AVK. Peu d'études ont été réalisées dans la région du Maghreb. Une seule en Tunisie et deux au Maroc [19] [20] [21].

Par ailleurs, l'intégration de la pharmacogénétique dans la prise en charge des patients sous AVK présente également un intérêt pharmacoéconomique majeur. Les progrès technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire ont considérablement diminué les coûts des tests génétiques ces dernières années. À titre d'exemple, le coût du séquençage du génome humain est passé de 3 milliards de dollars en 2003 à 1000 dollars en 2006. Ce qui rend la stratégie du génotypage nettement coût- efficace. Au moins, 16 études ont été publiées évaluant le rapport coût-efficacité du dosage guidé par la pharmacogénétique de la Warfarine et dans l'ensemble, les résultats fournissent des preuves à l'appui que cette stratégie est rentable [22] [23].

Dans une démarche d'amélioration de la qualité et la sécurité de prescription des AVK, de nombreux algorithmes pharmacogénétiques prédictifs de la posologie des AVK ont été développés, permettant au clinicien de calculer la dose de départ en fonction des caractéristiques cliniques et génétiques du patient, ainsi que l'effet des interactions médicamenteuses. Dans ce sens, de nombreux algorithmes basés sur la pharmacogénétique ont été développés aux USA ainsi qu'en Europe [24] [25] [26].

En Algérie, l'unique AVK commercialisé est l'Acénocoumarol. Seulement, il n'existe aucun algorithme pharmacogénétique prédictif de sa posologie, que ce soit à l'échelle régionale ou nationale. Actuellement, au niveau du CHU Sétif, le suivi de ce médicament se

limite à une surveillance biologique qui reste insuffisante vue le nombre important d'accidents liés aux AVK. Afin, de mettre au point une stratégie de suivi thérapeutique approprié à l'Acénocoumarol basé sur la coordination, la coopération et la communication au sein de la triade formée par le laboratoire, les cliniciens et les patients ; **Nous avons développé et validé un algorithme pharmacogénétique prédictif de la posologie d'Acénocoumarol.**

Ce travail comporte deux volets :

- Une revue de littérature divisée en trois chapitres portant respectivement sur les AVK, la pharmacogénétique des AVK et la m-santé.
- Une revue de travaux que nous avons réalisés dans ce contexte, à savoir :
 - Etudier les fréquences alléliques de huit polymorphismes, *VKORC1*2*, *VKORC1*3*, *VKORC1*4*, *VKORC1 intron1*, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP4F2*3* et *CALU*, dans la population de Sétif.
 - Etudier l'impact des variations génétiques sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol chez la population de Sétif.
 - Développer une application androïde pour améliorer la gestion du traitement par l'Acénocoumarol (Acénocoumarol Doising).

Éléments bibliographique



Ce premier volet
introduit la
littérature
scientifique qui a
orienté notre
recherche et cadré
sa réalisation.

1. La découverte des AVK :

L'histoire de la découverte des AVK remonte à l'année 1921 dans les régions agricoles des Etats-Unis et du Canada, lieux d'élevage du bétail bovin. Lorsque les paysans de ces régions observèrent des hémorragies majeures chez leurs bovins. Les chercheurs, Roderick et Schofield, ont montré que la cause des hémorragies était l'alimentation du bétail par un fourrage à base d'une plante « mélilot ». En 1939, Link et ses collaborateurs identifient l'agent hémorragique en cause qu'ils nomment le dicoumarol. En 1948, ils synthétisèrent la warfarine mot formé à partir de « Wisconsin Alumni Research Foundation » et du suffixe de coumarin. Cet anticoagulant connut un succès sans précédent, lorsqu'en 1955, le président Dwight David Eisenhower bénéficia de cette thérapeutique à la suite de son infarctus. Elle deviendra la première molécule d'une grande classe thérapeutique, les AVK. A la même époque, les chercheurs européens ont développé d'autres dérivés du dicoumarol comme l'Acénocoumarol [27].

2. Structure chimique des AVK

Les traitements AVK actuellement proposés dans le marché mondial sont classés en fonction de leur structure chimique en deux familles chimiques : la famille coumarinique et la famille de l'indanedione [28].

- Les coumariniques regroupent 3 molécules (Figure1) :

Acénocoumarol : Sintrom® (comprimés à 4 mg), Minisintrom® (comprimés à 1mg).

Warfarine : non commercialisées en Algérie.

Phenprocoumon : non commercialisés en Algérie.

- ✓ Les dérivés de l'indane-1,3-dione :

fluindione : Préviscan® (comprimés à 20 mg) non commercialisé en Algérie.

Tous les AVK possèdent un centre chiral, dans le commerce ils existent donc sous forme de mélange racémique [29].

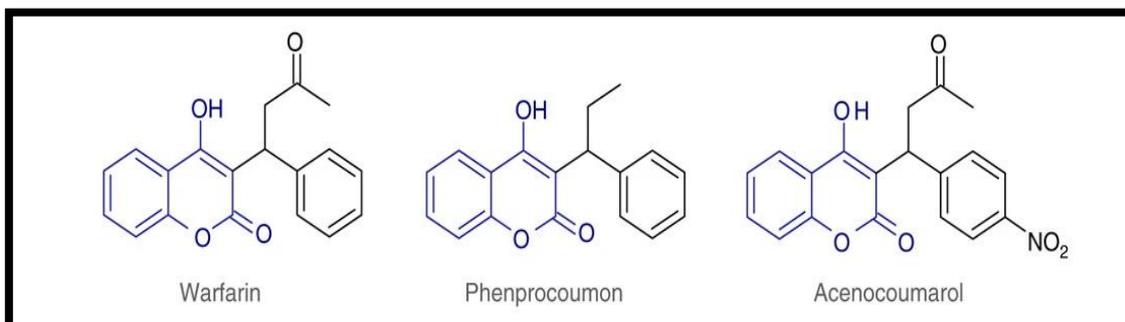


Figure 1: Structure chimique des dérivés coumariniques [30].

3. Propriétés pharmacodynamiques des AVK

Le mécanisme d'action de la warfarine ne fut élucidé qu'en 1974, lorsque Stenflo et collaborateurs ont décrit la γ -carboxylation des facteurs vitamine K dépendants de la coagulation. Au niveau de l'hépatocyte, les AVK agissent sur la coagulation de manière indirecte via l'enzyme VKORC1, leur cible, dont ils sont inhibiteurs non compétitifs. Cette inhibition compétitive est liée à une similarité de structures entre les AVK et les substrats habituels de la VKOR [31]. L'inhibition de la VKOR entraîne un ralentissement du cycle d'oxydoréduction de la vitamine K, limitant la disponibilité de l'hydroquinone (Figure 2). La vitamine K réduite ; étant primordial à la synthèse de 4 facteurs de coagulation (II, VII, IX et X). Ainsi, l'utilisation des AVK induit un effet anticoagulant dans les 36 à 72 heures.

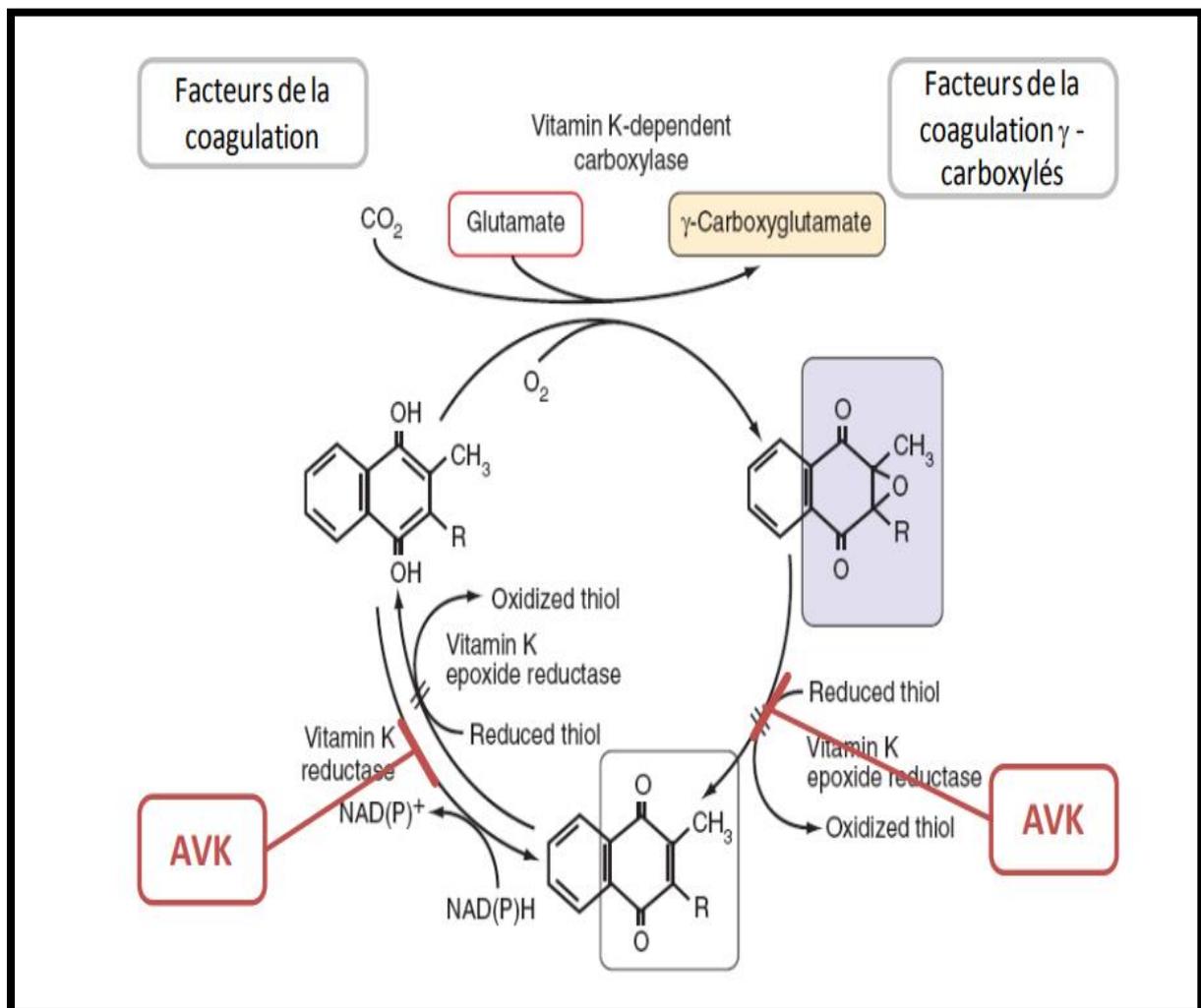


Figure 2 : Mécanisme d'action des AVK (adapté de Hoffman et coll. et Loriot et Beaune) [32].

4. Propriétés pharmacocinétiques des AVK

Les AVK sont rapidement absorbés par le tube digestif. Dans le plasma, ils sont fortement liés à l'albumine (à 97 %) ce qui explique le nombre important des interactions médicamenteuses. Ce sont des molécules lipophiles d'où leur passage à travers le placenta et leur diffusion dans le lait maternel. Le métabolisme des AVK est principalement hépatique, par oxydation et hydroxylation sous la dépendance de systèmes enzymatiques de la famille des cytochromes P450 (CYP450 2C9). Les métabolites obtenus sont inactifs. Les AVK subissent un cycle entéro-hépatique. La demi-vie des différents AVK varie selon la molécule, avec un AVK à demi-vie courte (Acénocoumarol, environ 9h), intermédiaire (fluindione, 30h) et longue (warfarine, environ 40h) [33].

Le tableau 1 résume les paramètres pharmacocinétiques de la warfarine, de la phenprocoumone et de l'Acénocoumarol [29] [34].

Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques des AVK.

Paramètres	Warfarine	Phenprocoumone	Acénocoumarol
pKa	5	4.2	5
Poids Moléculaire	308.3	280.3	353.3
Volume de distribution	1.5-12	0.75-9	1-9
Liaison aux protéines	0.08-0.12	0.11-0.14	0.22-0.52
Concentration plasmatique ($\mu\text{mol/L}$)^a	>99%	>99%	>98%
CYP impliqués dans le métabolisme	1.5-8	1.5-15	0.03-0.3
Demi-vie d'élimination terminale (h)	<i>S</i> -WAR: 24-33 <i>R</i> -WAR: 35-38	<i>S</i> -PPC: 110-130 <i>R</i> -PPC: 110-125	<i>S</i> -AC: 1.8 ^b <i>R</i> -AC: 6.6 ^b
Clairance plasmatique (L/h)	<i>S</i> -WAR: 0.10-1.0 <i>R</i> -WAR: 0.07-0.35	<i>S</i> -PPC: 0.045-0.055 <i>R</i> -PPC: 0.055-0.08	<i>S</i> -AC: 28.5 ^b <i>R</i> -AC: 1.9 ^b
Élimination cinétique	Premier ordre	Premier ordre	Biphasique

^a : concentration plasmatique totale

^b : valeurs illustrées pour des sujets exprimant le génotype CYP2C9 (génotype sauvage)
AC = acénocoumarol; PPC = phenprocoumone; WAR = warfarine

L'élimination des AVK est urinaire sous forme de produit pur ou d'un métabolite dégradé [33].

5. Spécificité de la pharmacocinétique de l'Acénocoumarol

L'Acénocoumarol est un mélange racémique de deux énantiomères, le R- et le S. L'énantiomère S est intrinsèquement plus puissant que l'énantiomère R, sa clairance est approximativement dix fois plus élevée que celle du R-Acénocoumarol et sa demi-vie est de deux heures [35]. La demi-vie du R-acénocoumarol est de six à dix heures [35].

L'effet thérapeutique est dû principalement à l'énantiomère R. L'acénocoumarol est éliminé sous forme de métabolites. Il est excrété à 65% dans les urines et 35% par les fèces. L'Acénocoumarol est métabolisé majoritairement par hydroxylation (95%) en 6- et 7-hydroxy-Acénocoumarol (Figure 3).

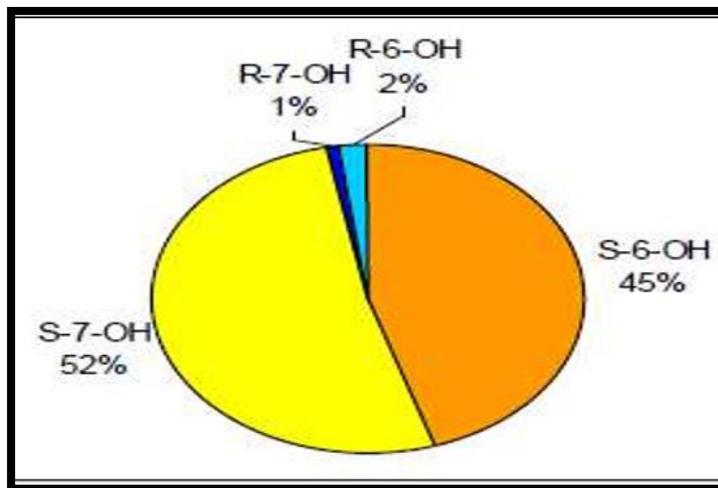


Figure 3 : Hydroxylation du S- et R-Acénocoumarol [29].

L'hydroxylation de l'Acénocoumarol est effectuée principalement par le CYP2C9.

Le S Acénocoumarol est majoritairement hydroxylé par le CYP2C9. Le R-acénocoumarol est hydroxylé par CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19 [36]. L'Acénocoumarol est également métabolisé en métabolites mineurs: l' amino- et l'acétaminoacénocoumarol ainsi que deux alcools diastéréomériques. Le 8-hydroxy-acénocoumarol est un métabolite mineur de moindre importance. L' amino-acénocoumarol est formé par la microflore intestinale. La figure 4 décrit les principaux métabolites de l'acénocoumarol et les différents cytochromes impliqués [29].

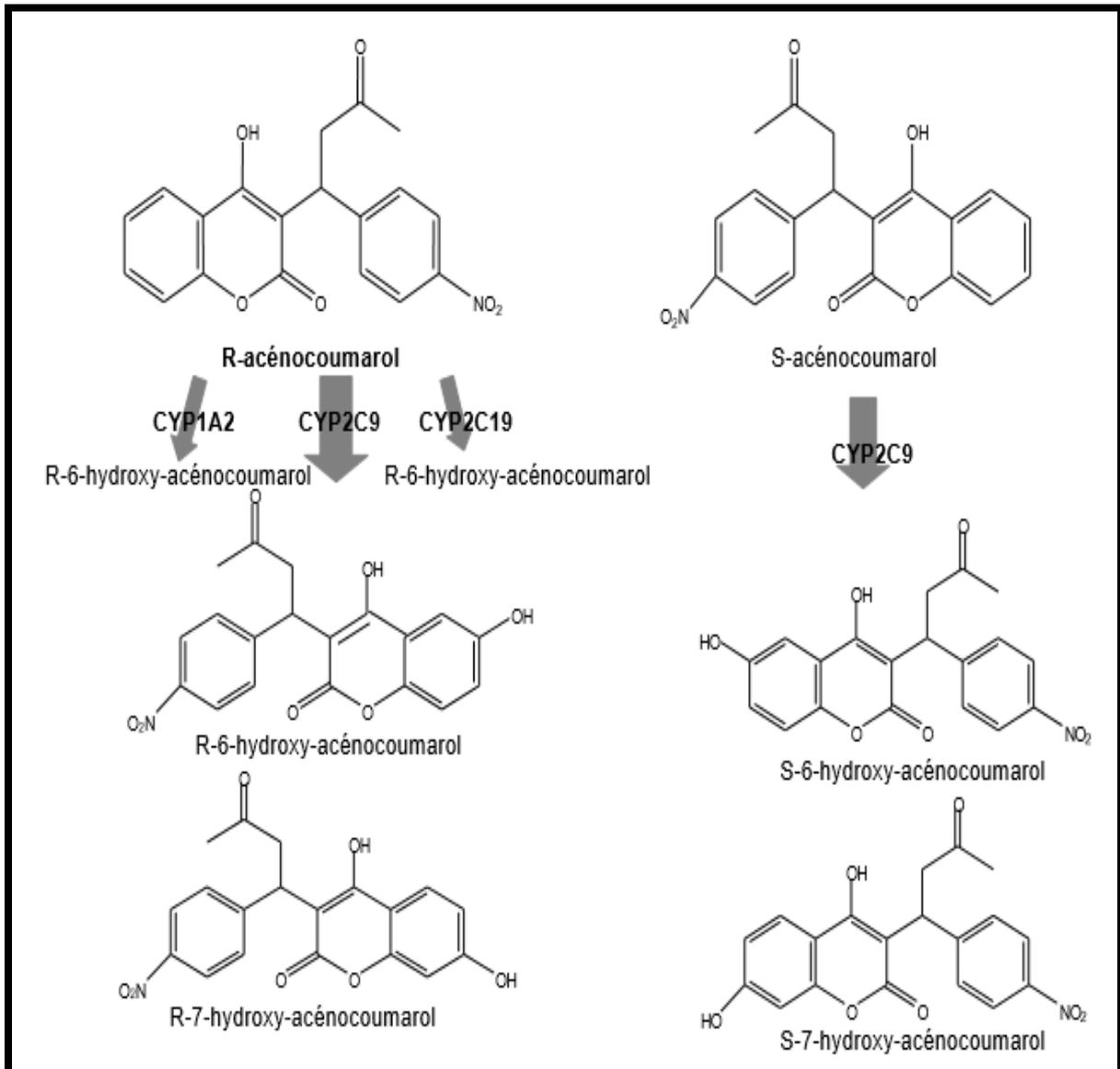


Figure 4 : Principaux métabolites de l'Acénocoumarol et les voies impliquées [29].

Seul environ 0,12 à 0,18 % de la dose est excrété sous forme inchangée dans l'urine [37].

6. Indications des AVK

Les AVK commercialisés à l'échelle internationale possèdent tous les mêmes indications.

Ils sont utilisés pour :

- ✓ La prévention des complications thromboemboliques en relation avec certains troubles du rythme auriculaire (fibrillations auriculaires, flutter, tachycardie atriale), certaines valvulopathies mitrales ainsi que les prothèses valvulaires.

- ✓ La prévention des complications thromboemboliques des infarctus du myocarde compliqués : thrombus mural, dysfonction ventriculaire gauche sévère, dyskinésie emboligène, en relais de l'héparine.
- ✓ Traitement des thromboses veineuses profondes et de l'embolie pulmonaire ainsi que la prévention de leurs récurrences, en relais de l'héparine.

Les AVK ne sont plus indiqués en prévention des thromboses veineuses et de l'embolie pulmonaire en chirurgie de hanche depuis 2011, après la révision du schéma commun des AVK par l'ANSM [28].

7. Les contre-indications :

Les AVK sont contre-indiqués dans les cas suivants [38] :

- ✓ Une hypersensibilité connue au médicament,
- ✓ Une insuffisance hépatique sévère,
- ✓ La prise d'aspirine à forte dose, de miconazole par voie générale ou en gel buccal, l'AINS pyrazolés et de millepertuis.
- ✓ Durant la grossesse, sauf cas particulier.

8. Iatrogénie et profil de risque

Tous les AVK exposent principalement les patients à deux types de risques.

- Le risque hémorragique : des saignements majeurs, spontanés ou traumatiques, peuvent survenir, notamment, mais pas seulement, en cas de surdosage.
- Le risque thrombotique : l'AVK est inefficace, notamment en cas de sous-dosage.

Les autres effets indésirables recensés sont les **troubles digestifs** (diarrhée) ainsi que la possibilité d'**arthralgies** isolées. Rarement, on peut observer des **nécroses cutanées**.

Plus récemment, il a été rapporté que les AVK, et plus particulièrement la fluindione, peuvent être à l'origine de manifestations immuno-allergiques [28].

9. Variabilité de la réponse aux AVK

Les AVK sont des molécules qui ont une marge thérapeutique étroite. La variabilité inter et intra-individuelle de la réponse aux AVK est majeure. Cette variabilité est liée à des facteurs génétiques ou non génétiques.

✓ Facteurs non génétiques

Plusieurs facteurs de type non génétique ont été mis en évidence par Siguet et collaborateurs [39].

▪ Caractéristiques physiologiques du patient.

- ✓ L'âge est un facteur principal qui nécessite d'être pris en considération lors de l'ajustement de la dose des AVK, les posologies d'AVK exigées sont plus faibles chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes [40] [41].
- ✓ Le sexe, a une influence controversée sur la réponse aux AVK (ce point serait traité à la section discussion).
- ✓ Le poids, influence également la réponse aux AVK [42].

▪ Comorbidités

Certaines comorbidités comme les insuffisances cardiaques, hypertension artérielle, diabète, ainsi que les dysthyroïdies ont été associées à une grande variabilité de la réponse au traitement [43].

▪ Adhésion thérapeutique

Chez les patients sous AVK, l'adhésion au traitement est responsable de la variabilité dans la réponse. En effet, la non-adhésion au traitement est une cause majeure de l'instabilité de l'anticoagulothérapie (36% des INR hors fourchettes thérapeutiques) [44].

▪ Facteurs environnementaux

- ✓ Alimentation

L'apport alimentaire en vitamine K doit être équilibré. En effet, un régime alimentaire dépourvu en légumes verts peut engendrer une carence en vitamine K contribuant à l'instabilité du traitement [45] [46]. Cependant, des apports élevés de vitamine K étaient associés à une meilleure stabilité du traitement [47].

- ✓ Interactions médicamenteuses

Un grand nombre de médicaments peuvent interagir pharmacocinétiquement et / ou pharmacodynamiquement avec les AVK. De nombreuses molécules interagissent également avec les AVK sans que le mécanisme de l'interaction n'ait été élucidé. Ces interactions médicamenteuses peuvent engendrer une augmentation ou une diminution de l'effet anticoagulant, se traduisant par la survenue d'hémorragies ou respectivement de thromboses. Le tableau 2 reprend un récapitulatif des différentes interactions médicamenteuses avec les AVK.

Tableau 2: Récapitulatif des traitements à forte probabilité d'interaction avec les AVK [48] [49].

Médicaments potentialisateurs	Principaux médicaments inhibiteurs
AINS	Barbituriques
ANTIPLAQUETTAIRES	Carbamazépine
Amiodarone	Cholestyramine
Céphalosporines	Griséofulvine
Clofibrates	Rifampicine
Hormones thyroïdiennes	Vitamine k
Isoniazides	Alcoolisme chronique
Métronidazole	Œstrogènes
Miconazole	
Phénylbutazone	
Sulfamides	
Allopurinol	
Cimvastatine	
Antidépresseurs tricycliques	
Cimétidine	
Chlorpromazine	
Paracétamol	
Fluorouracile (et par extrapolation tegafur et capécitabine)	

✓ **Facteurs génétiques :**

Cette partie serait traitée dans le chapitre 2 (pharmacogénétique des AVK).

10. Usage des AVK chez la femme enceinte et allaitante

✓ Grossesse

Les AVK sont contre indiqués durant la grossesse, sauf pour les femmes porteuses d'une valve cardiaque mécanique présentant un risque élevé de thrombose pour lesquelles il n'existe pas d'alternative thérapeutique plus efficace [51].

Il faut utiliser un autre anticoagulant chez la femme enceinte quel que soit le terme de la grossesse : héparine fractionnée ou non fractionnée [50].

✓ Allaitement

L'acénocoumarol et la warfarine peuvent être utilisés pendant l'allaitement.

Le fluindione est contre indiqué pour la femme qui allaite [50].

11. Suivi thérapeutique des AVK

11.1. Surveillance biologique

- ✓ La surveillance biologique du traitement par AVK repose sur le dosage de l'INR qui est un calcul basé sur la mesure du temps de Quick (TQ).

Dans la plus part des situations (cf. voir tableau 3), un INR compris entre 2 et 3 avec une valeur cible de 2,5 est recherché, ce qui signifie que :

- l'INR idéal vers lequel il faut tendre est de 2,5
- un INR inférieur à 2 reflète une anti-coagulation insuffisante
- un INR supérieur à 3 traduit un excès d'anti-coagulation.
- un INR supérieur à 5 est associé à un risque hémorragique [52].

- ✓ Rythme des contrôles biologiques

Avant de débiter le traitement, il est recommandé de faire un contrôle de l'INR afin de détecter d'éventuels troubles de la coagulation et de pouvoir ainsi adapter au mieux la posologie initiale.

Le premier contrôle doit se réaliser le matin, du 4ème jour après la première prise, pour dépister une hypersensibilité individuelle : un INR supérieur à 2 annonce un surdosage à l'équilibre et doit faire réduire la posologie.

Le second contrôle s'effectue en fonction des résultats du premier INR, pour apprécier l'efficacité anticoagulante (selon les cas entre 3 à 6 jours après le 1er contrôle) [53].

Les contrôles ultérieurs doivent être pratiqués (1 à 2 fois par semaine) jusqu'à stabilisation de l'INR, puis avec un espacement progressif jusqu'à un intervalle maximal de 1 mois.

Après une modification de la posologie, le premier contrôle doit être fait 3 jours après une modification de dose, les contrôles doivent être répétés jusqu'à stabilisation (1 à 2 fois par semaine).

✓ INR recommandés et durées de traitement :

Les zones thérapeutiques et durées de traitement conseillées sont précisées dans le tableau 3, en fonction des principales situations. Elles sont conformes aux recommandations actuelles internationales [53].

Tableau 3 : Les zones thérapeutiques d'INR et durées de traitement conseillées, en fonction des principales indications [27].

Indications	Recommandations INR-durée de traitement
<p>Troubles du rythme supra-ventriculaires (fibrillations auriculaires et flutters auriculaires) selon les conditions suivantes :</p> <p>âge < 75 avec facteur de risque (antécédent d'accident cérébral ischémique transitoire ou constitué, HTA, insuffisance cardiaque, diabète)</p> <p>> 75 ans après évaluation soigneuse du rapport bénéfice/risque</p> <p>Valvulopathies mitrales (particulièrement le rétrécissement mitral) si facteur(s) favorisant(s) : FA ou flutter, antécédent thromboembolique, dilatation de l'oreillette gauche et/ou image de contraste spontané décelé en échographie transoesophagienne et/ou thrombus intra auriculaire gauche à l'échocardiogramme</p>	<p>Cible 2.5 ; INR 2 à 3 ; à long terme</p>
<p>Prothèses valvulaires - prothèses mécaniques</p>	<p>à long terme</p>

	<table border="1" data-bbox="1027 230 1342 786"> <tr> <td data-bbox="1027 230 1145 562" rowspan="2"> Risque thrombogénique intrinsèque des prothèses </td> <td colspan="2" data-bbox="1145 230 1342 338">Facteurs de risque liés au patient</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1145 338 1145 562">Aucun facteur de risque</td> <td data-bbox="1145 338 1342 562">≥ 1 facteur de risque</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1027 562 1145 667">Faible</td> <td data-bbox="1145 562 1145 667">2.5</td> <td data-bbox="1145 562 1342 667">3.0</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1027 667 1145 725">Moyen</td> <td data-bbox="1145 667 1145 725">3.0</td> <td data-bbox="1145 667 1342 725">3.5</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1027 725 1145 786">Elevé</td> <td data-bbox="1145 725 1145 786">3.5</td> <td data-bbox="1145 725 1342 786">4.0</td> </tr> </table> <p data-bbox="783 842 1385 1644"> a risque thrombogénique des prothèse mécaniques : Faible : prothèses ayant fait la preuve de leur efficacité avec une anticoagulation modérée Elevé : prothèses d'ancienne génération, en particulier à bille Moyen : toutes les autres prothèses, y compris d'introduction récente b Facteurs de risque liés au patient : position mitrale, tricuspide ou pulmonaire de la prothèse ; antécédents thromboemboliques; grosse OG >50 mm ; sténose mitrale quelque soit le degré ; FE< 35% ; certains troubles du rythme auriculaire tels que FA, flutter, tachycardie atriale. cible 2.5 ; INR 2 à 3 ; 3 mois </p>	Risque thrombogénique intrinsèque des prothèses	Facteurs de risque liés au patient		Aucun facteur de risque	≥ 1 facteur de risque	Faible	2.5	3.0	Moyen	3.0	3.5	Elevé	3.5	4.0
Risque thrombogénique intrinsèque des prothèses	Facteurs de risque liés au patient														
	Aucun facteur de risque	≥ 1 facteur de risque													
Faible	2.5	3.0													
Moyen	3.0	3.5													
Elevé	3.5	4.0													
prothèses biologiques Prévention des complications thromboemboliques des infarctus du myocarde compliqués : thrombus mural, dysfonction ventriculaire gauche sévère, dyskinésie emboligène...	Cible 2.5 ; INR 2 à 3 ; Au moins 3 mois (la poursuite du traitement sera discutée au cas par cas).														

Indications	Recommandations INR-durée de traitement	
<p>Traitement des thromboses veineuses profondes et de l'embolie pulmonaire ainsi que la prévention de leurs récurrences, en relais de l'héparine</p>	<p>Cible 2.5 ; INR 2 à 3 ; Durée minimale de 3 mois à moduler en fonction du contexte clinique et de la présence de facteurs de modulation.</p>	
	<p>Contexte clinique de la maladie thromboembolique veineuse (MTEV)</p>	<p>Durée de traitement*</p>
	<p>MTEV avec facteur déclenchant majeur transitoire (chirurgie, immobilisation prolongée de 3 jours ou plus, fracture des membres inférieurs dans les 3 derniers mois)</p>	<p>3 mois</p>
	<p>MTEV avec facteur de risque persistant majeur (cancer en cours de traitement, syndrome des antiphospholipides)</p>	<p>≥ 6 mois, tant que le facteur persiste</p>
	<p>MTEV idiopathique</p>	<p>≥ 6 mois</p>
<p>La durée de traitement peut être allongée ou réduite en présence de facteurs de modulation tels que thrombophilie majeure connue, récurrence de MTEV, risque hémorragique élevé, instabilité de l'INR.</p>		

11.2. Le calcul du TTR

Afin de réduire les risques de complications cliniques reliées à l'anticoagulothérapie aux AVK, l'objectif thérapeutique est de maintenir l'INR dans de la fenêtre thérapeutique au fil du temps (Figure 5). Néanmoins, malgré un suivi soutenu, les méta-analyses indiquent la stabilité à long terme est atteinte en moyenne $\leq 60\%$ du temps [54] [55]. Rosendaal et collaborateurs ont proposé en 1993 une méthode pour déterminer l'intensité thérapeutique optimale du traitement. Celle-ci permet d'estimer, par interpolation linéaire entre les valeurs consécutives d'INR, la proportion de temps où les INR d'un individu demeurent dans la fenêtre thérapeutique (TTR; time in therapeutic range).

Le TTR est majoritairement exprimé en tant que variable continue (%), mais peut aussi être catégorisé. Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur la définition d'un contrôle stable de l'INR, certains ont suggéré des valeurs seuil de TTR variant de 60-75% [56].

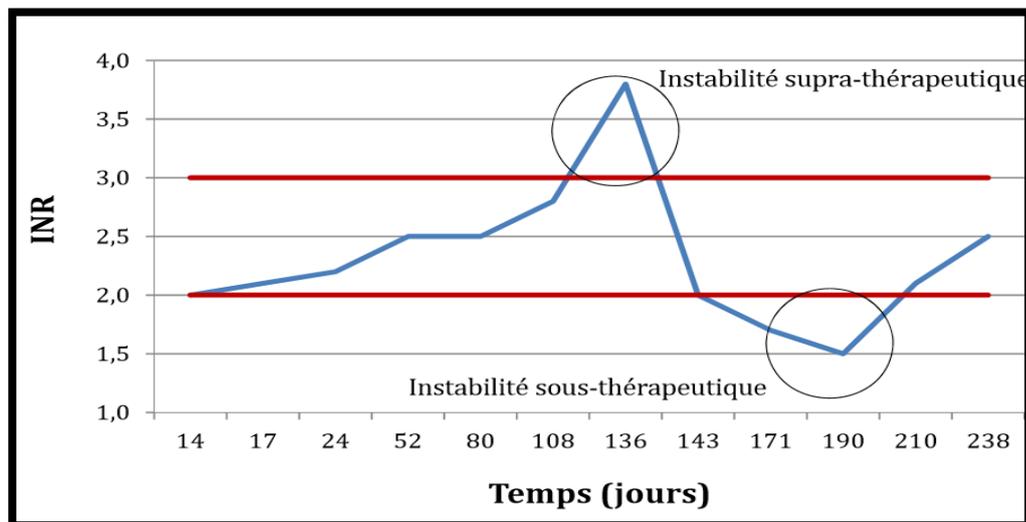


Figure 5 : Exemple d'instabilité de l'anticoagulothérapie aux AVK au cours du temps.

Dans cet exemple, la cible thérapeutique d'INR est de 2-3.

11.2. Education du patient et surveillance clinique

Le patient joue un rôle déterminant dans le bon usage des AVK.

L'éducation thérapeutique dispensée lors d'entretiens individuels ou collectifs comprend :

- ✓ L'information sur la pathologie du patient et les propriétés du traitement ainsi que le but de l'anticoagulation.
- ✓ la durée de traitement envisagée
- ✓ La remise d'un carnet de surveillance

- ✓ Les principes de l'INR et de l'adaptation de posologie
- ✓ Les adaptations de son mode de vie (activités professionnelles et sportives),
- ✓ Les modifications de son alimentation (stabilité du régime alimentaire, notamment vis-à-vis des aliments riches en vitamine, les principales interactions avec les médicaments,
- ✓ La conduite à tenir en urgence, en cas d'accident.

Cette éducation est faite par le professionnel de santé ou par la structure qui pose l'indication d'un traitement anticoagulant [57].

12. Le coût des AVK

Les antivitamines K (AVK) engendrent des coûts importants pour le système de santé. En effet, les coûts consommés ne peuvent être résumés au seul prix des molécules mais doivent considérer également les coûts associés à la surveillance biologique et aux accidents de surdosage ou sous-dosage liés à leur utilisation. Les coûts peuvent être estimés selon une perspective assurance maladie ou une perspective collective plus large.

Dans la perspective collective, on pourrait intégrer les coûts indirects liés aux pertes de productivité associés aux traitements et à leur surveillance, aux effets sur l'espérance de vie des patients. Dans la littérature très peu de données sont disponibles, les données disponibles sont seulement sur les coûts directs liés aux traitements par AVK. En France, les coûts pour l'assurance maladie des AVK dépassent les 300 millions d'euros [58]. La réévaluation du Service Médical Rendu, de l'Amélioration du Service Médical Rendu, a été effectuée le 24 janvier 2018. La Commission d'évaluation médicale, économique et de santé publique considère que le service médical rendu par l'acénocoumarol en prévention des complications thromboemboliques en rapport avec une FANV reste important. La Commission a estimé jusqu'à présent que tous les AVK apportaient un service médical rendu important et, en raison du long recul dans leur utilisation, qu'ils représentaient des traitements de première intention dans leurs indications [53].

1. Historique et définition de la pharmacogénétique

Le problème majeur qu'on peut observer lors d'un traitement pharmacologique est que les patients répondent différemment aux médicaments et leur profil de toxicité varie d'un individu à un autre. Les déterminants génétiques expliqueraient, en partie, cette variabilité. La pharmacogénétique est apparue pour la première fois en 1953 avec la description du phénotype « acétyleur lent » de l'isoniazide, un antituberculeux. Ce phénotype a été rapidement associé à une augmentation de la neurotoxicité de l'isoniazide [59]. La pharmacogénétique représente l'étude de l'influence de la variabilité du génome dans la réponse aux médicaments.

Les deux termes pharmacogénétique et pharmacogénomique sont souvent employés pour désigner la même chose. Cependant, la pharmacogénomique à l'opposition de la pharmacogénétique, étudie le profil d'expression des gènes impliqués dans la susceptibilité aux maladies et la réponse aux médicaments au niveau d'une cellule, d'un tissu, d'un individu ou d'une population [60] [61]. Le but final de toute étude pharmacogénétique est de pouvoir personnaliser le traitement pharmacologique. Il est clair que les études pharmacogénétiques visent en particulier les médicaments avec une marge thérapeutique étroite, puisque les variations au niveau de la réponse risquent de compromettre l'effet de ces médicaments. La pharmacogénétique peut s'appliquer à de nombreux domaines médicaux, notamment, le traitement de maladies cardiovasculaires, de la maladie d'Alzheimer, des cancers. Suite aux recommandations de la FDA, la pharmacogénétique prend de plus en plus sa place dans le développement de médicaments.

2. Les formes des variations génétiques

2.1. Les polymorphismes mononucléotidiques SNPs

Les variations génétiques les plus étudiées sont les Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), des variations d'ADN, localisées au niveau d'un nucléotide (ou base azotée, adénine [a], thymine [t], guanine [g], cytosine [c]) et survenant en moyenne toutes les 300 paires de base (Figure 6). Les SNPs représentent des marqueurs de choix dans les études pharmacogénétique.

On peut définir des variantes rares qui correspondent à moins de 0,1% de la population [36].

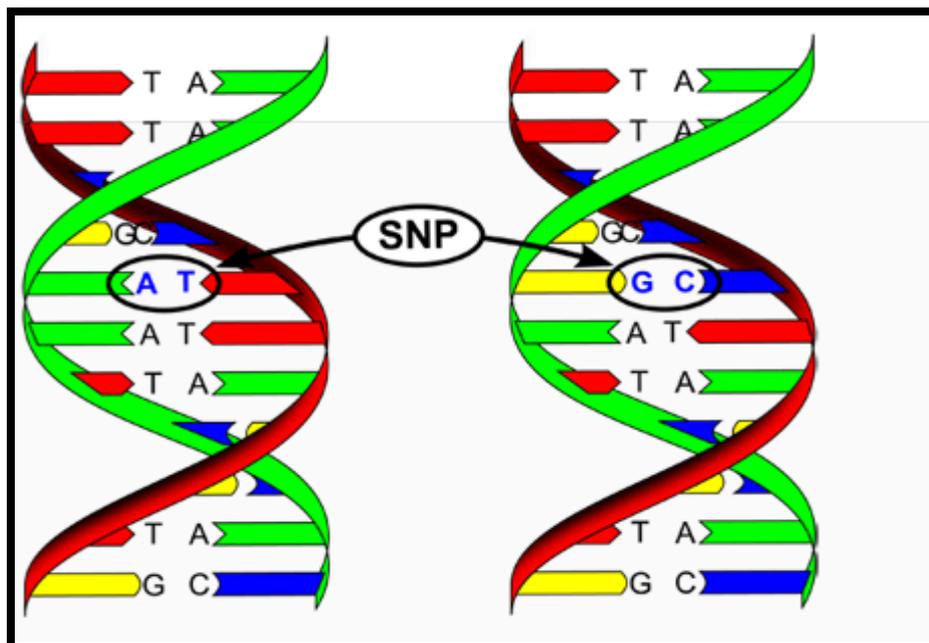


Figure 6 : Séquence d'ADN d'un gène chez deux individus pris au hasard SNP.

2.2. Les variations de structure

On distingue les séquences répétées (mini ou micro-satellites ou VNTR pour “*variable number of tandem repeats*”) et les insertions/délétions qui correspondent à la présence ou l'absence d'une ou de plusieurs bases alors qu'elles ne sont pas présentes dans un autre génome et dont la taille est inférieure à 1 kilobase. Les altérations de structure correspondent aux délétions, duplications, insertions, inversions et translocations. Les variations de structure peuvent ainsi modifier la quantité d'ADN comme les CNV (*copy number variant*), qui intéressent des fragments d'ADN de plus de 1 kb (Tableau 4).

Tableau 4 : Différentes classes de variant génétiques (D'après Frazer et collaborateurs) [62].

Single nucleotide variant	AGGCCTTAACCAAT C ATGCACGATAT AGGCCTTAACCAAT T ATGCACGATA
Insertion-deletion variant	AGGCCTTAACCAAT CGAT TATGCACGATAT AGGCCTTAACCAAT --- TATGCACGATATT
Block substitution	AGGCCTTAACCAAT CATG GCACGATAT AGGCCTTAACCAAT CCAC GCACGATAT
Inversion variant	AGGCCTT AACCAATCATG GCACGATAT AGGCCTT TTCCAATCATG GCACGATAT
Copy number variant	ATT GGCCTTACGCCTTA ACCCCCGATTATCAGGAT ATTGGCCTTA -----ACCCCCGATTATCAGGAT

2.3. Les gènes influençant le plus la réponse aux AVK

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés comme ayant un impact sur la réponse au traitement par AVK. Etant donné que la warfarine est l'AVK le plus fréquemment prescrit à travers le monde, une grande partie des études publiées concernent ce dérivé coumarinique. En effet, les mots-clés « warfarin and pharmacogenetics » introduits dans le moteur de recherche de PubMed aboutissent à une liste de 928 publications (dernière recherche effectuée le 22.09.20) tandis que seuls 100 articles se réfèrent aux mots-clés « acenocoumarol and pharmacogenetics ». A ce jour, les polymorphismes identifiés comme ayant le plus d'impact sur la réponse au traitement de ces trois AVK sont les polymorphismes du CYP2C9 et du VKORC1 et CYP4F2 [63].

2.3.1. Le gène CYP2C9

2.3.1.1. Structure et propriétés

Le gène codant pour l'enzyme CYP2C9 est localisé au bras long du chromosome 10 (10q24.2) [64]. Il a été identifié pour la première fois lors de l'étude du mécanisme de l'oxydation d'un antidiabétique : le tolbutamide [65] [66]. Par la suite, l'analyse des séquences d'ADNc du CYP2C9 a fourni des preuves de la présence de plusieurs SNP impliqués dans le métabolisme des AVK. Ce gène est constitué de 9 exons séparés par 8 introns (Figure 7).

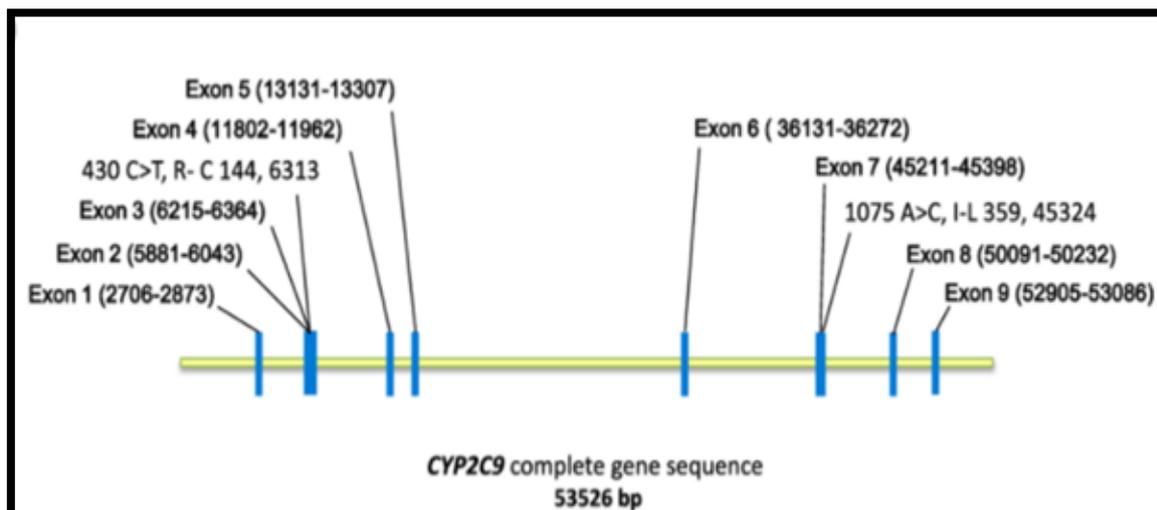


Figure7 : Structure du gène humain CYP2C9 [67].

2.3.1.2. Polymorphismes du gène *CYP2C9*

L'allèle sauvage, est désigné par le CYP2C9*1. Cet allèle de référence est le plus fréquemment observé dans la population caucasienne et possède une activité normale [68].

Pour les AVK, les polymorphismes génétiques du CYP2C9 définissent deux phénotypes appelés «métaboliseurs lent» et «métaboliseurs rapide». Les métaboliseurs rapides désactivent plus vite l'AVK et diminuent son efficacité thérapeutique, alors que les métaboliseurs lents accumulent l'AVK ce qui peut augmenter le risque hémorragique [69]. Pour le CYP2C9, 31 allèles ont été rapportés [70]. Par rapport au type sauvage, ces variantes alléliques sont responsables d'une diminution de l'activité catalytique du CYP2C9. Toutes les variantes énumérées dans le tableau 5, engendrent une diminution de l'activité enzymatique basée sur des preuves combinées in vitro et /ou in vivo. C'est pourquoi, le génotypage des patients recevant un traitement à base de dérivés coumariniques est important [71] [72].

➤ Polymorphismes à effet majeur

Les CYP2C9*2 (rs1799853) et CYP2C9*3 (rs10579) sont les allèles les plus étudiés du CYP2C9 et sont les variantes les plus courantes sur la base des fréquences alléliques globales disponibles à ce jour [73]. Le CYP2C9*2 et le CYP2C9*3 possèdent respectivement environ 40% et 5% de l'activité catalytique de l'allèle sauvage [74]. Ces deux allèles mutés sont responsables d'un phénotype métaboliseur lent caractérisé par une activité enzymatique très réduite, ce qui conduit à une augmentation des taux plasmatiques des AVK.

La faible activité du CYP2C9*2 et du CYP2C9*3 est due à des modifications du site catalytique P450, en raison de différents degrés de couplage et de découplage [45].

➤ Polymorphismes à effet mineur

Les allèles du CYP2C9 ont été identifiés, et cliniquement impliqués dans la réponse aux AVK (Tableau 5).

- L'allèle CYP2C9*8 est présent chez les Afro-Américains. Il est responsable d'une clairance réduite des AVK [75].
- In vivo les données sur l'allèle CYP2C9*9 ne sont pas disponibles, mais in vitro il est responsable d'une légère diminution, statistiquement non significative, de la clairance des AVK [76].

- CYP2C9*11, sa présence a été lié à une diminution des doses de warfarine et d'Acénocoumarol [77] [78]. La fréquence de cet allèle est trop faible, 0.4% dans la population caucasienne [79].

Tableau 5 : Allèles du *CYP2C9* et leurs fréquences dans les différents groupes ethniques.

SNP	Effet	*Allèle	Changement de séquence	Fréquence européenne	Fréquence africaine	Effet du polymorphisme
rs1799853	p.Arg144Cys	*2	c.430C>T	0.1268	0.0235	Diminution du métabolisme des AVK in vitro et in vivo [80].
rs1057910	p.Ile359Leu	*3	c.1075A>C	0.0688	0.0126	Diminution du métabolisme des AVK in vitro et in vivo [81].
rs7900194	p.Arg150His	*8	c.449G>A	0.0003	0.056	Diminution du métabolisme des AVK in vitro et in vivo[82].
rs28371685	p.Arg335Trp	*11	c.1003C>T	0.0021	0.0214	Diminution du métabolisme des AVK in vitro et in vivo[58] [83].
rs9332239	p.Arg125His	*14	c.374G>A	0.0001	>0.0001	Activité faible in vitro [84].
rs9332239	p.Pro489Ser	*12	c.1465C>T	0.003	0.0006	Diminution de la dose de warfarine [85].
rs2837168	p.Asp360Glu	*5	c.1080C>G	<0.0001	0.0127	Diminution du métabolisme des AVK in vitro [86].
rs182132442	p.Pro279Thr	*29	c.835C>A	0.0005	0	Diminution du métabolisme des AVK in vitro[84].
rs72558192	p.Thr299Ala	*52	c.895A>G	0	0	Diminution du métabolisme des AVK in vitro [87].
rs7900194	p.Arg150Leu	*27	c.449G>T	0	0	Diminution de la clairance in vitro des AVK [84].

2.3.2. Le gène *VKORC1*

2.3.2.1 Structure et propriétés

Le gène codant pour le VKORC1 (vitamine K époxyde réductase complex subunit 1) a été identifié en 2004. IL est composé de 5126 paires de bases situé sur le bras court du chromosome 16, constitué de trois exons (Figure 8).

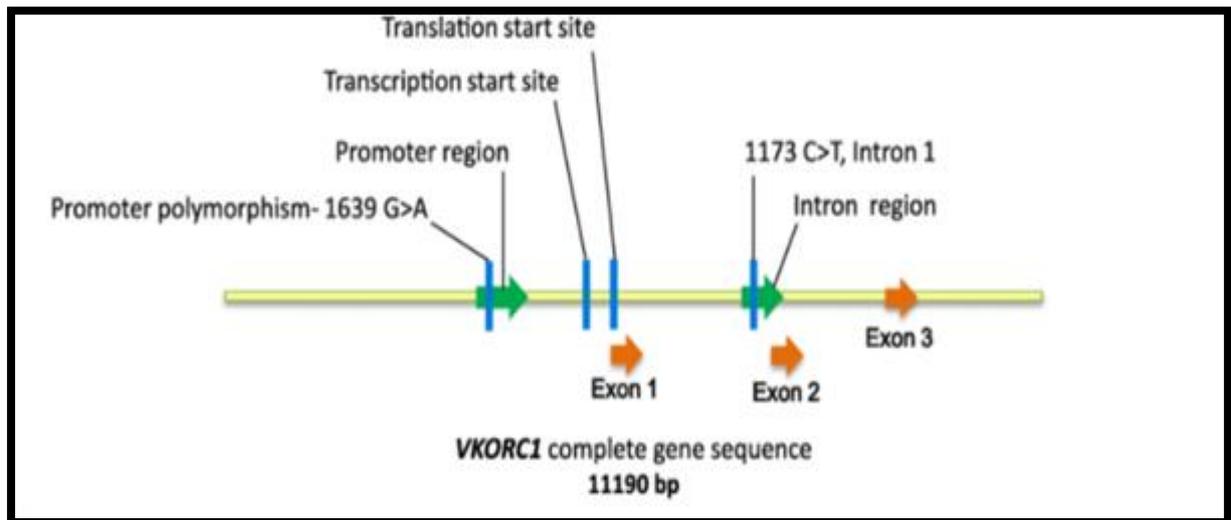


Figure 8: Structure du *VKORC1* et emplacement des SNP [88].

Ce gène code pour une protéine de 163 acides aminés, constituée de trois domaines transmembranaires, l'acide aminé N-terminal localisé dans la lumière du réticulum endoplasmique et le carboxyl terminal dans le cytoplasme (Figure 9). L'enzyme vitamine K époxyde réductase transforme la vitamine K époxyde en vitamine K oxydée [90]. Elle est présente principalement dans le foie, le cœur et le pancréas [89].

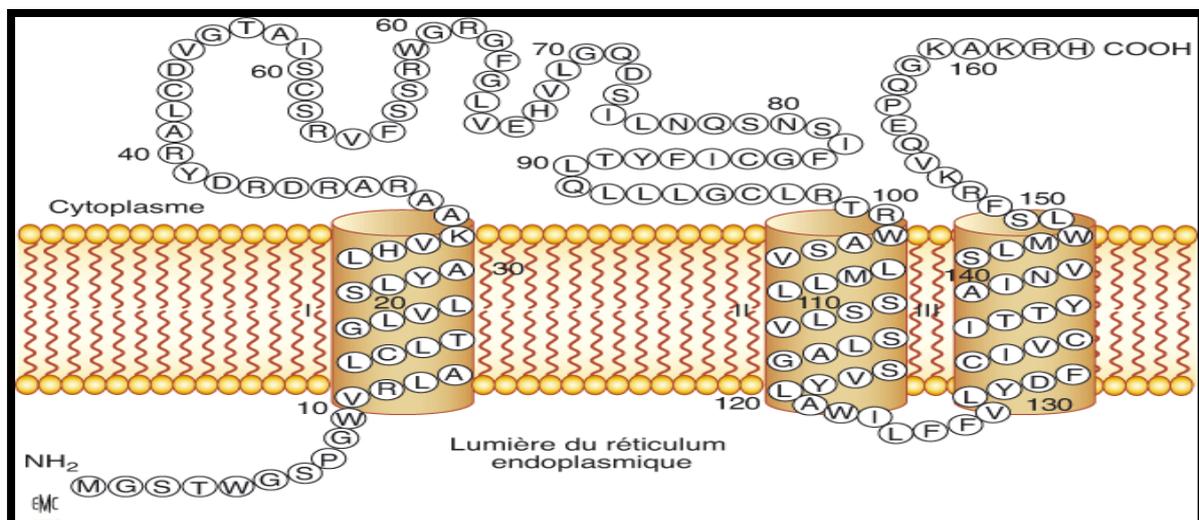


Figure 9 : Topologie membranaire de la vitamine K époxyde réductase [89].

2.3.2.2 Polymorphismes du gène *vkorc1*

Plusieurs travaux ont été effectués pour étudier l'influence du polymorphismes *VKORC1* sur la variabilité inter-individuelle de doses d'AVK [91] [92]. Les polymorphismes génétiques du *VKORC1* représentent le principal facteur pharmacodynamique impliqué dans la variabilité interindividuelle de la réponse aux AVK.

➤ Le SNP rs9923231

Le SNP rs9923231 représente la mutation la plus commune du gène *VKORC1*. Il s'agit d'une modification de nucléotide guanine par une adénine -1639G>A, à 1639 nucléotides en amont de la partie codante du gène. Cet SNP est située dans la région promotrice du gène [93]. Les porteurs de la mutation et les homozygotes mutants sont plus sensibles aux AVK. Cette mutation est rare dans la population africaine (7%), fréquente dans la population asiatique (92%) et caucasienne (42%) [94]. La liste des mutations les plus fréquemment rencontrées dans le gène *VKORC1* est représentée dans le tableau 6.

➤ Le SNP rs 9934438

Ce polymorphisme est en déséquilibre de liaison avec la *VKORC1*-1639G>A. Les deux SNP conduisent à une diminution de la quantité d'ARNm produite [95]. Rieder et collaborateurs ont proposé une analyse haplotypique du *VKORC1* [61]. Ils ont désigné par l'haplotype A ; la combinaison d'allèles mutés -1639A, 1173T, 1542C, 2255C et 3730A alors que la combinaison d'allèles sauvages -1639G, 1173C, 1542G, 2255T et 3730G est nommée haplotype B [96].

Tableau 6 : Liste des polymorphismes les plus fréquemment rencontrés dans le gène *VKORC1* [94].

SNP	Nucléotide changé	FAM rapporté dans la littérature	Effet sur la dose des AVK
rs17708472	698C/T 6009C/T 689C/T	21% (caucasien)	Augmentée
rs2359612	7566C/T 2255C/T	45% (caucasien)	Diminuée
rs2884737	497T/G 5808G/T	30% (caucasien)	Diminuée
rs7200749	3462T/C	0% (caucasien) 21% (afro-américains)	Augmentée
rs7294	9041G/A	33% (caucasien)	Augmentée
rs8050894	1542C/G	46% (caucasien)	Diminuée
rs9934438	1173C/T 6484C/T	48% (caucasien)	Diminuée
rs9923231	3673G/A -1639G/A	43% (caucasien)	Diminuée

2.3.3. Gène *CYP4F2*

2.3.3.1. Structure et propriétés

Le gène *CYP4F2* appartient à l'ensemble des gènes du *CYP4F* localisé sur le bras court du chromosome 19 (19p13) (Figure 10). Il est impliqué dans le métabolisme du *VKORC1* [97].

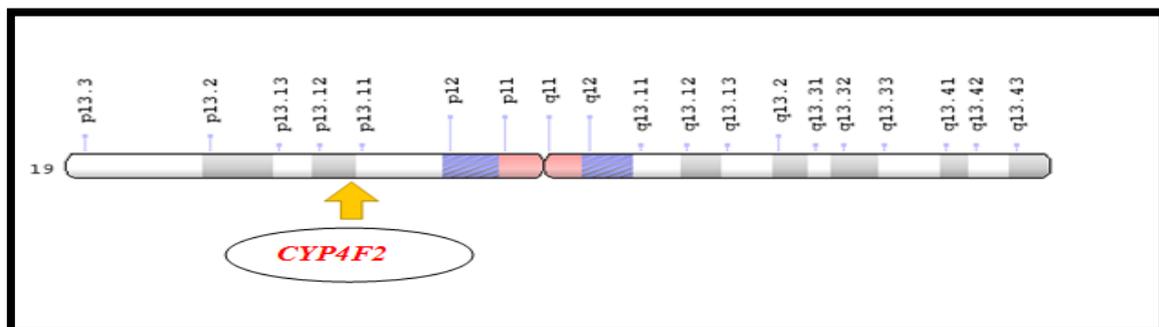


Figure 10: Localisation du gène *CYP4F2* [98].

Le gène *CYP4F2* est constitué de 13 exons et 12 introns et code pour l'enzyme *CYP4F2* localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules (Figure 11) [99].

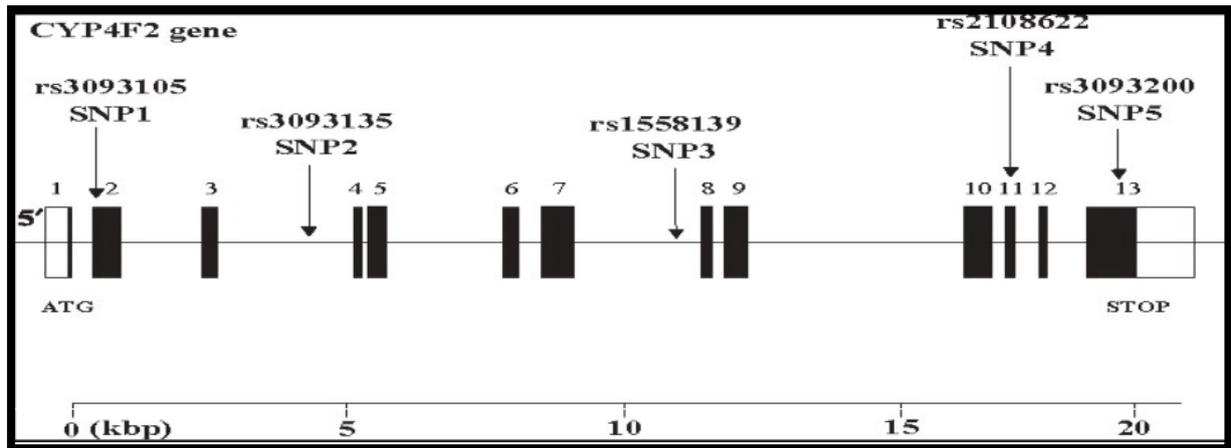


Figure 11 : Structure du gène humain *CYP4F2* [100].

2.3.3.2. Polymorphismes du gène *CYP4F2*

Le polymorphisme (rs2108622 désigné par l'allèle *CYP4F2**3) est le SNP le plus impliqué dans l'étude de la variabilité inter-individuelle aux traitements par les AVK. Ce SNP engendre un remplacement de la valine par une méthionine en position 433 au niveau de la protéine codée.

Le polymorphisme *CYP4F2**3 était lié à un dysfonctionnement du métabolisme d'acide arachidonique [101], à une élévation de la tension artérielle [102] et à un abaissement du métabolisme de la vitamine E [103]. Après, son rôle la variabilité de la dose de warfarine a été découvert [104] [105].

2.3.4. Le gène *CALU*

2.3.4.1. Structure et propriétés

Le gène *CALU* est situé sur le bras long(q) à la position 32.1 du chromosome 7 (Figure 12) [106].

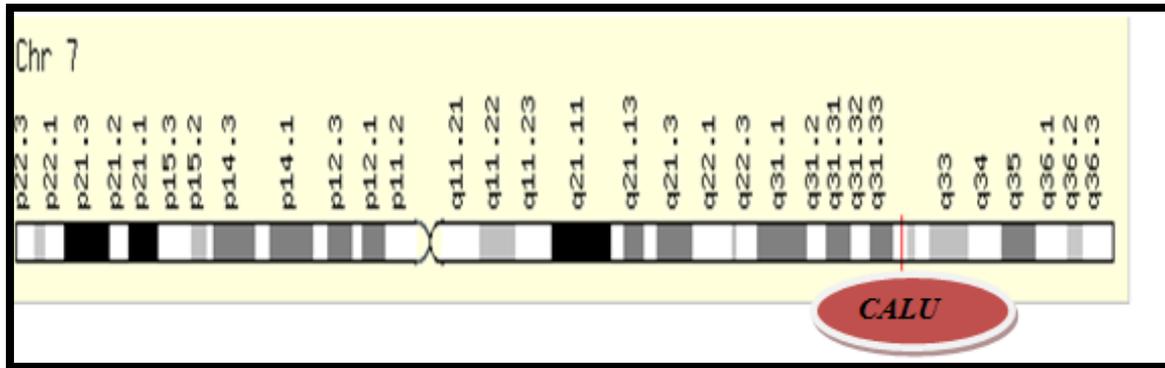


Figure 12: Localisation du gène *CALU* [106].

Ce gène code pour une protéine de 315 acides aminés contenant 6 motifs EF-Hand la Calumenine. Cette dernière est une protéine liant le calcium localisée dans le réticulum endoplasmique [107]. Elle est impliquée dans la régulation de la carboxylation des protéines vitamine K dépendantes et inhibé par GGCX (Figure 13) [106].

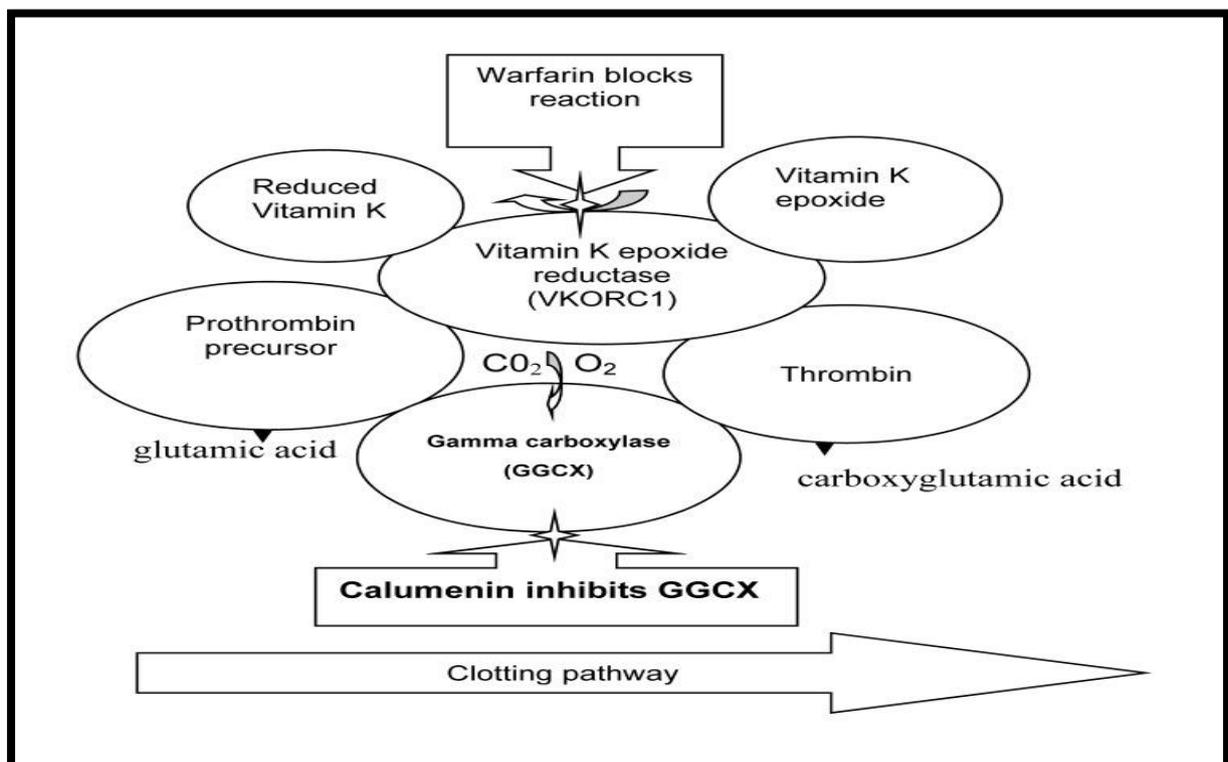


Figure 13: Diagramme d'interaction entre GGCX et Calumenin [106].

2.3.4.2. Polymorphismes du gène *CALU*

Le SNP rs339097 de ce gène est le seul qui possède un rôle dans la variabilité interindividuelle des doses d'AVK avec un impact toutefois modéré [108].

Le polymorphisme *CALU* rs339097 A>G a été associé de manière significative à des doses plus élevées d'AVK chez la population afro-américaine ce qui rendrait les tests pharmacogénétiques de ces variant extrêmement dépendants du groupe ethnique [109].

2.3.5. Autres gènes faiblement impliqués dans la réponse aux AVK

D'autres gènes agissent directement ou indirectement sur la réponse aux AVK par le biais des gènes majeurs sous cités. Leurs sites d'action sont reportés sur la figure 14 et leurs actions sont mentionnées sur le tableau 7. Nous signalons que la majorité des études ont été réalisées sur warfarine.

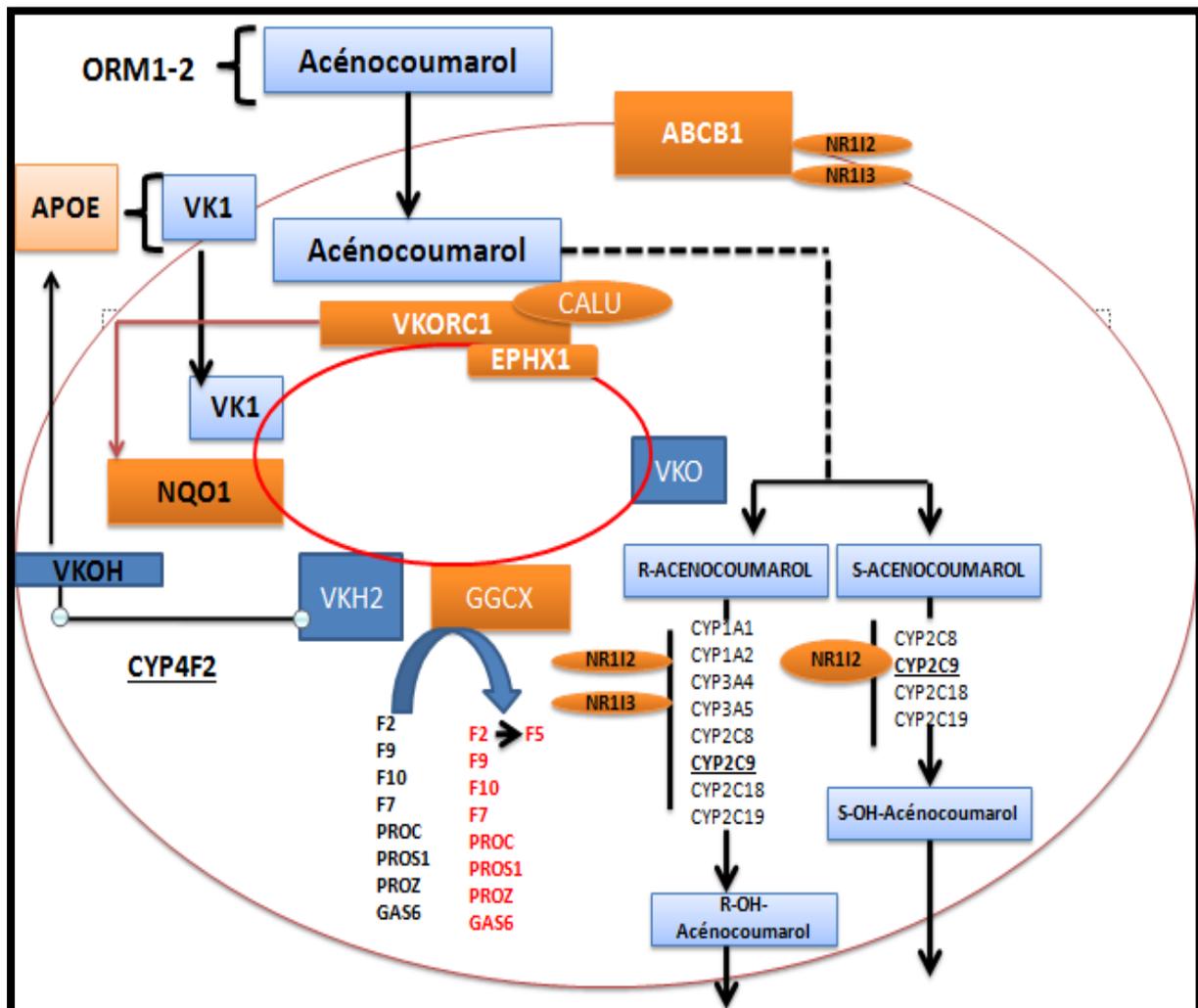


Figure 14: Les gènes impliqués dans la réponse à l'Acénocoumarol.

- L'AVK, pénètre dans la cellule par la glycoprotéine acide 1-2 (ORM 1-2).
- La vitamine K1 (VK1) entre dans la cellule via l'apolipoprotéine E (APOE) et est réduite par l'enzyme NQO1 (NADPH déshydrogénase de la quinone1) en vitamine K dihydroquinone (VKH2). Une portion de la vitamine (VKH2) est hydroxylé par l'enzyme CYP4F2 et éliminé par la cellule. Le GGCX est inhibé par la calumeline (CALU).
- Les FII, FIX et FX (codés par les gènes FII, FIX, FX) peuvent être inhibés par l'antithrombine, codée par le gène SERPINC1.
- L'AVK exerce son action anticoagulante en bloquant l'enzyme VKOR et, dans une moindre mesure, l'enzyme NADPH déshydrogénase quinone.

Tableau 7 : Action et Effet des autres gènes faiblement impliqués dans la réponse aux AVK.

Gènes	Nom de la protéine	Fonction de la protéine	Effet du mutant sur la dose d'AVK	Références Bibliographiques
Gènes impliqués dans le transport des AVK				
ORM1	Alpha -1-acid glycoprotein1, Orosomucoïd 1	Lie l'AVK dans le sang.	Les porteurs du polymorphisme ORM1 rs17650 requièrent une dose plus faible de la warfarine pour obtenir le même effet thérapeutique que les non porteurs.	[110] [111]
ORM2	Alpha -1-acid glycoprotein2, Orosomucoïd 2	Lie l'AVK dans le sang	Non reporté.	[84]
ABCB1 (MDR1)	La glycoprotéine P transmembranaire,	Responsable de l'expulsion hors de la cellule de nombreuses molécules	-Les polymorphismes de ce gène sont responsables de la résistance à différents traitements, d'où la nomination de MDR (multi-drug resistance) -Le polymorphisme C3435T a été mis en corrélation avec les doses réduites de warfarine. L'effet de ce polymorphisme reste très faible pour les avk	[112]
Gènes associés aux enzymes métabolisant les AVK, le cytochrome P450				
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1	L'hydroxylation en positions 6 et 8 de la R warfarine et la R-Acénocoumarol.	Diminue l'activité enzymatique par rapport au type sauvage.	[113]
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2	L'hydroxylation en positions 6 et 8 de la R warfarine	Diminue l'activité enzymatique par rapport au type sauvage.	[113]
CYP2A6	Cytochrome P450 2A6	Metabolism de S-warfarin	Diminue l'activité enzymatique par rapport au type sauvage	[114]
CYP2C8	Cytochrome P450 2C8	Metabolism of R- and S-warfarin	Non reportée	[115]
CYP2C18	Cytochrome P450 2C18	Metabolism of R- and S-warfarin	Diminue l'activité enzymatique par rapport au type sauvage	[115]

Gènes	Nom de la protéine	Fonction de la protéine	Effet du mutant sur la dose d'AVK	Références Bibliographiques
CYP2C19	Cytochrome P450 2C19	Metabolism of R- and S-warfarin	Diminue l'activité enzymatique par rapport au type sauvage	[115]
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4	Metabolism of R-warfarin	Non reporté.	[115]
CYP3A5	Cytochrome P450 3A5	Métabolisme de la R-warfarine	Non reporté.	[116]
NR1/2	Pregnane X receptor (PXR)	Mediateurs entre les médicaments inducteurs et le CYP2C9, du CYP3A4 et d'autres CYP enzymes et ABCB1	Non reporté.	[117]
NR1/3	Constitutive androstane receptor (CAR)	Régulation transcriptionnelle d'un certain nombre de gènes y compris CYP2C9 et CYP3A4	Non reporté.	[118]
Gènes associés aux facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K				
F7	Coagulation Factor VII	Convertit le fibrinogène en fibrine; active FV, FVIII, FXI, FXIII, protéine C	le polymorphisme -401T diminue l'activité de transcription de ce facteur.	[119] [120]
F9	Coagulation Factor IX	Crée un complexe avec FVIIIa, puis convertit FX en son forme active	Les SNP rs401597-rs392959 Une mutation provoque réduction de l'activité du FIX chez les patients traités, car ils réduisaient l'affinité du peptide mutant pour le GGCX	[121]
F10	Coagulation Factor X	Convertit FII en FIIa en présence du facteur Va	Non reporté	[121]
PROC	Protein C	La protéine C activée neutralise la coagulation ensemble avec la protéine S en inactivant FVa et VIIIa	Les porteurs homozygotes de l'allèle G liés au polymorphisme rs1799809 (G/G) étaient ceux qui nécessitaient une dose plus faible	[122]

Gènes	Nom de la protéine	Fonction de la protéine	Effet du mutant sur la dose d'AVK	Références Bibliographiques
PROS1	Protein S	Participe à de nombreux processus, par exemple, la potentialisation de l'agrégation plaquettaire induite par un agoniste.	Le polymorphisme c.1907A> G, entraînant une permutation d'acides aminés (p.Tyr636Cys), a été découvert chez un patient qui présentait une thrombose aiguë	[123]
Gènes impliqués dans le cycle de la vitamine K				
APOE	L'apolipoprotéine E	l'absorption de la vitamine K lipophile par le foie.	-Trois allèles codominants, E2, E3 et E4, définis par les polymorphismes rs429358 (334T> C, C112R) et rs7412 (472 C> T, R158C) et six génotypes résultants E2 / 2, E2. / 3, E2 / 4, E3 / 3, E3 / 4 et E4 / 4 -L'allèle E4 pourrait avoir un effet sur le métabolisme de la vitamine K. - Le variant E2 est associé à une dose plus faible de warfarine	[124]
EPHX1	Époxyde Hydrolase 1	possède un site de liaison pour la vitamine K époxyde réductase.	le polymorphisme rs4653436 est faiblement associé aux doses réduites de warfarine.	[125]
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Une enzyme détoxifiante qui a le potentiel de réduire la forme quinone de la vitamine K .	Non reporté.	[126]
GGCX	Gamma-glutamyl carboxylase	Carboxylates Coagulation dépendante de la vitamine K facteurs et protéines de la vitamine K cy.	les porteurs de l'allèle muté pour le SNP rs699664 nécessitaient des doses plus faibles par rapport aux porteurs de l'allèle sauvage.	[127]

3. Algorithme pharmacogénétiques des AVK

3.1. Généralités

Un algorithme est une suite finie et non ambiguë d'opérations ou d'instructions permettant de résoudre une classe de problèmes. Le mot *algorithme* vient du nom d'un mathématicien perse du IX^e siècle, Al-Khwârizmî (en arabe الخوارزمي) [128]. Dans le domaine médical, il est le plus souvent le résultat d'un modèle de régression avec des coefficients estimés pour chaque variable.

Le modèle de régression linéaire le plus simple pourrait être exprimé par l'équation 1 :

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i$$

Equation 1 [129].

i peut varier de $1, \dots, n$ et n est le nombre d'observations

β_0 est une valeur (qui peut être négative, positive ou nulle) est appelée l'intercept ou ordonnée à l'origine,

β_1 (qui peut être négative ou positive) est appelée pente ou coefficient de régression.

ε est une quantité représentant une somme d'erreurs.

Lorsque le modèle possède plus d'une variable indépendante l'équation s'écrit comme suite :

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_k x_{ik} + \varepsilon_i$$

Equation 2 [130].

3.2. Sélection variable

Habituellement, les chercheurs débutent leurs modèles prédictifs avec une liste assez longue de variables indépendantes : les nouveaux prédicateurs potentiels du résultat et des prédicateurs précédemment connus et validés. Cependant, le plus souvent, ils suppriment certaines variables pour simplifier le modèle [130].

La suppression de certaines variables peut avoir un intérêt économique, par exemple si un SNP ou un biomarqueur coûteux est supprimé du modèle, le coût final de son utilisation sera abaissé.

La décision de supprimer des variables pourraient être prises en pourrait également être effectuée en étudiant les relations entre les variables indépendantes et les variables de suppression qui sont redondantes (par exemple poids et IMC), le modèle choisi comme modèle final reflète souvent le meilleur jugement de l'analyste au moment du processus de modélisation.

3.3. Mesures des performances du modèle

La mesure commune de la performance d'un modèle de régression linéaire est donnée par le coefficient de détermination R^2 .

On appelle le coefficient de détermination le rapport qui est donc la part de variation de Y expliquée par le modèle de régression. Géométriquement, c'est un rapport de carrés de longueur de deux vecteurs [131].

$$R^2 = \frac{SSR}{SST}$$

SSR est la somme des carrés des résidus (sum of squared errors),

SST Total sum of squares

3.4. Les algorithmes

Différents algorithmes ont été conceptualisés afin d'individualiser les doses d'AVK en fonction des caractéristiques de chaque patient. Les anciens algorithmes étaient fondés uniquement sur les variables cliniques tels que, l'âge du patient, l'indication au traitement, les comorbidités et les co-médications [132] [133].

Ultérieurement, les paramètres pharmacogénétiques ont été intégrés principalement le VKORC1. Le premier algorithme pharmacogénétique a été développé par l'équipe de Sconce et coll [79], il a porté sur l'essai de clarification de l'anticoagulation optimale par la génétique.

L'algorithme publié par Gage et collaborateurs en 2008 représente l'un des rares modèles valide sur une grande échelle (n=1015). Il permet d'expliquer ($R^2 = 54\%$) [134]. Il est utilisable online (www.warfarindosing.org).

Plusieurs algorithmes pharmacogénétiques pour la warfarine ont été validés sur des populations relativement larges. Parmi ces modèles prédictifs, on retrouve celui de l'International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Il a été élaboré par 20 groupes de recherche (4 continents) ayant intégré les données de plus de 6000 patients et validés sur 1009 patients [135].

Quant aux algorithmes pharmacogénétiques développés pour l'acénocoumarol, ils sont moins nombreux, ils ont été cités dans la partie discussion de ce manuscrit. Tout comme pour la warfarine, ces algorithmes intègrent les données pharmacogénétiques ainsi que des paramètres cliniques.

Bien que les algorithmes pharmacogénétiques présentent un intérêt majeur, leur utilisation en pratique clinique reste limitée. En effet, la conversion du bénéfice théorique en bénéfice clinique validé s'est avérée difficile. À cet effet, deux grands essais contrôlés randomisés ont été réalisés [136] [137].

L'essai European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy (EU-PACT) a étudié l'utilisation d'un algorithme pharmacogénétique comprenant des données cliniques, le génotype CYP2C9 * 2, CYP2C9 * 3 et VKORC1 * 2 pour la phase par rapport à un schéma posologique clinique standard de la warfarine [136]. L'étude EU-PACT a démontré un bénéfice pour l'utilisation d'algorithmes pharmacogénétiques, le critère de jugement principal était le temps passé dans la zone d'INR thérapeutique.

À l'opposé, l'essai de clarification de l'anticoagulation optimale par la génétique (COAG) publié le même mois a également utilisé un algorithme très similaire par rapport à un groupe témoin qui a utilisé des données cliniques pour la prédiction de la dose, et n'a pas trouvée une différence statistiquement significative [137].

L'essai COAG a été critiqué sur la stratification des patients selon l'âge et l'indication du traitement par la warfarine, avec des implications que les patients atteints de fibrillation auriculaire et de thromboembolie veineuse peuvent répondre différemment à l'effet anticoagulant de la warfarine [83].

De plus de nombreux patients ont reçu des informations pharmacogénétiques après la première dose et certains auteurs pensent que c'est la première posologie qui bénéficie de l'apport de la pharmacogénétique [138].

Les algorithmes pharmacogénétiques prédictifs de la posologie des AVK s'avèrent très prometteurs pour optimiser la sélection des doses. Cependant, il faut garder à l'esprit que la plupart des preuves sont fondées sur des essais cliniques prospectifs proviennent principalement de populations caucasiennes.

La variation des fréquences d'allèles entre les ethnies entrave l'utilisation d'un algorithme pharmacogénétique commun, car la prise en compte de tous les allèles peut être trop coûteuse. Les pharmacologues peuvent adapter ces algorithmes pour différentes ethnies en tenant compte des allèles les plus répandus au sein de chaque population ethnique.

Bien que, les algorithmes pharmacogénomique puisse fournir une estimation raisonnable de la dose de warfarine, une expertise et une clinique dédiées pour le suivi sont toujours nécessaires.

4. Etude de coût-efficacité

Dans la littérature, les études de coût-efficacité basées sur la comparaison des deux stratégies : administration des AVK basée sur le génotypage versus sans génotypage sont limitées. En effet, les résultats publiés jusqu'à ce jour, sont insuffisants et ne s'appuient pas sur des données réelles recueillies à long terme.

Le premier modèle pharmacoéconomique qui visait à étudier les rapports coût / efficacité du génotypage CYP2C9 en comparaison avec la pratique clinique standard en anticoagulation a été présenté par You et collaborateurs en 2004. Les résultats de cette étude ont démontré que l'administration de la warfarine à l'aide de génotypage du CYP2C9 permettait d'éviter un coût marginal de 5778 dollars américains [139]. Cinq ans plus tard, les mêmes chercheurs ont effectué une étude de coût-efficacité qui a permis de calculer un ICER de 347 059 \$ par QALY. Les économistes de la FDA ont également démontré que l'introduction de tests génétiques pour le CYP2C9 et le VKORC1 dans la pratique clinique éviterait 85 000 saignements et 17000 ACV par année aux États-Unis. Selon les auteurs l'intégration des tests pharmacogénétique permettait une réduction des coûts de santé de 1.1 milliard de dollars par année [140].

En général, la majorité des études publiées, utilisent un horizon temporel trop court ce qui ne permet pas d'analyser convenablement l'incidence des évènements thromboemboliques, des hémorragies et des décès à long terme. Cependant, l'étude réalisée récemment en suède et au Royaume-Unis en 2016 avait clairement démontré que la stratégie du génotypage de la warfarine est cost-effective avec des ICER de 253 848 SEK/QUALY et 6702£/QUALY respectivement [141].

Notons qu'une seule étude de cout/ efficacité a été réalisée sur l'Acénocoumarol en 2015 aux Pays –BAS [142] .Cette dernière a abouti à un ICER de 24,427€ per QALY. Ces résultats montrent que les rapports obtenus sont légèrement au-delà des seuils considérés comme acceptables à savoir 20,000€.

D'un pont de vue pharmacoeconomique, il est dextrement difficile de transposer ses résultats pour effectuer des études de cout/efficacité en Algérie, sachant que le prix de certains tests sur le marché américain varie de 100 dollars américains à 450 dollars américains. Par contre, en Algérie nous n'avons pas encore commercialisé ces tests de pharmacogénétiques[143].

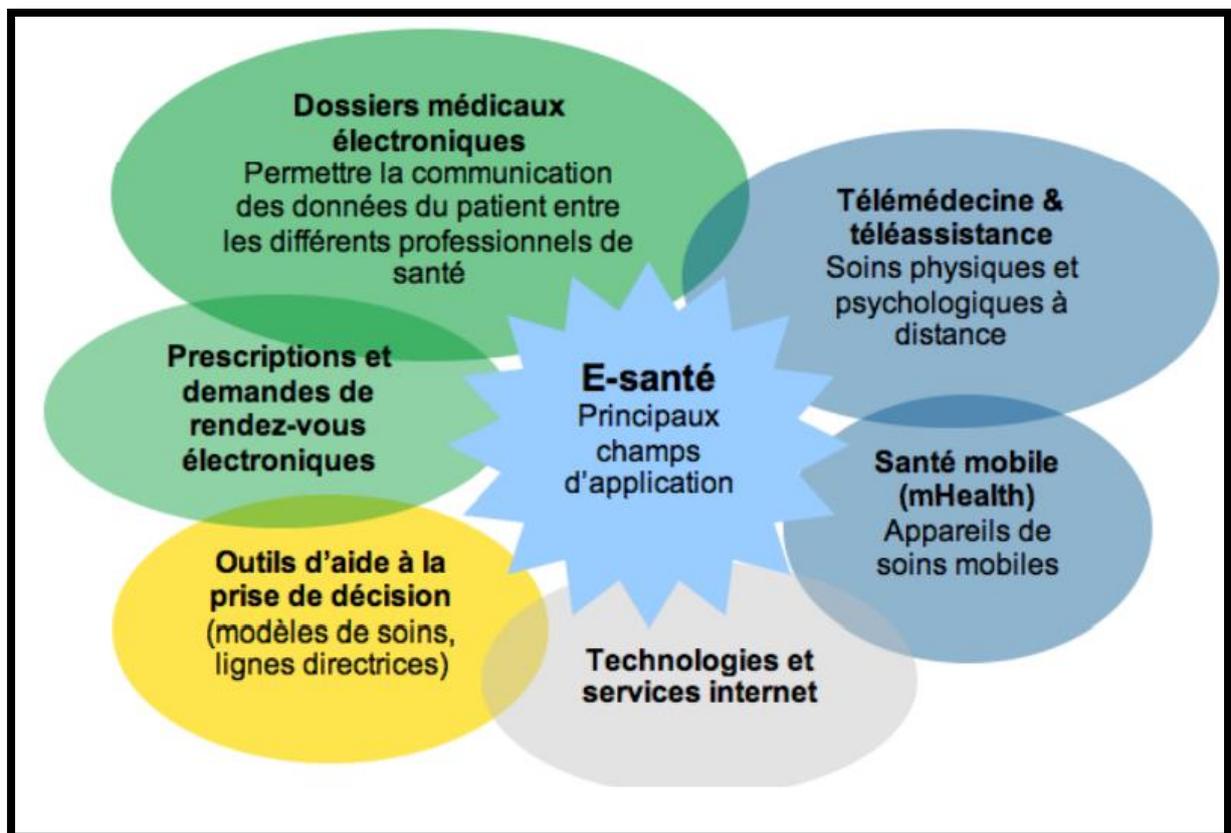
1. Le contexte définitions de la santé mobile

1.1. La santé connectée

L'utilisation des Technologies de l'Information et de la Communication (TIC) au domaine de la santé a créé la santé connectée. Le terme « e-health », a été utilisé pour la première fois en Novembre 1999, lors du 7ème Congrès International de Télémedecine, à Londres [144].

Plus tard, la Commission Européenne (CE) définit, la e-santé par « l'application des Technologies de l'Information et de la Communication (TIC) à l'ensemble des activités en rapport avec la santé » et/ou « la fourniture de soins à distance » [145].

La e-santé possède de nombreuses applications figure 15. Elle inclut le suivi électronique des patients, la télémedecine et le dossier médical électronique [146].



Figures 15 : Les applications de la de la e-santé [146].

1.2. La santé mobile

1.2.1. Contexte

D'après l'OMS, m-santé (m-Health en anglais) englobe « les pratiques médicales et de santé publique reposant sur des dispositifs mobiles tels que les téléphones portables, système de surveillance des patients, assistants numériques personnels et autres appareils sans fils » [147].

- La m-santé s'organise autour des 3 axes (Figure 16):

- ✓ Les objets connectés de santé dédiés dans le domaine de la santé qui sont de plus en plus disponibles au public comme les tensiomètres connectés.
- ✓ Les terminaux : ce sont les Smartphones et tablettes qui diffusent les applications destinées aux utilisateurs de la m-santé.
- ✓ Les applications mobiles de santé.

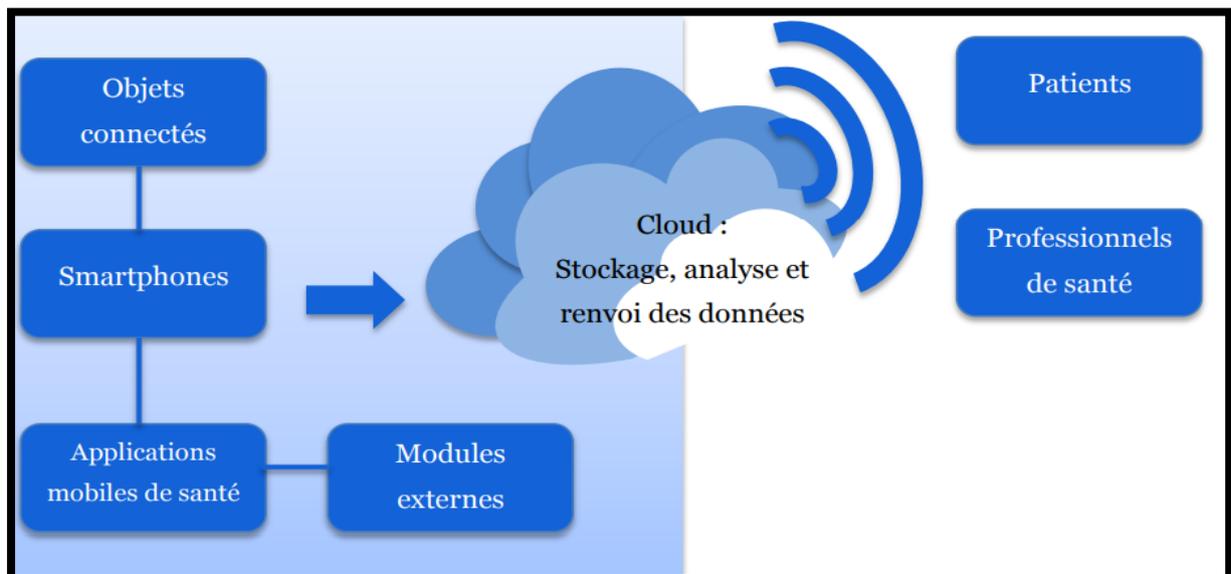


Figure 16 : Schéma organisationnel de la m-santé [148].

2. Les applications mobiles de santé

2.1. Définition

- Les applications mobiles sont des logiciels développés pour effectuer une tâche spécifique et destinées à un groupe particulier de dispositifs intelligents tels que les Smartphones et tablettes [149].
 - Les applications mobiles de santé sont disponibles sur trois plateformes :
 - ✓ App Store pour les appareils iOS d'Apple.
 - ✓ Google Play pour les appareils Android de Google.
 - ✓ Windows Phone Store pour les appareils Windows Phone de Microsoft.

2.2. Classification des applications mobiles de santé

Actuellement, il existe des centaines de milliers d'applications.ils sont classés (figure 17) :

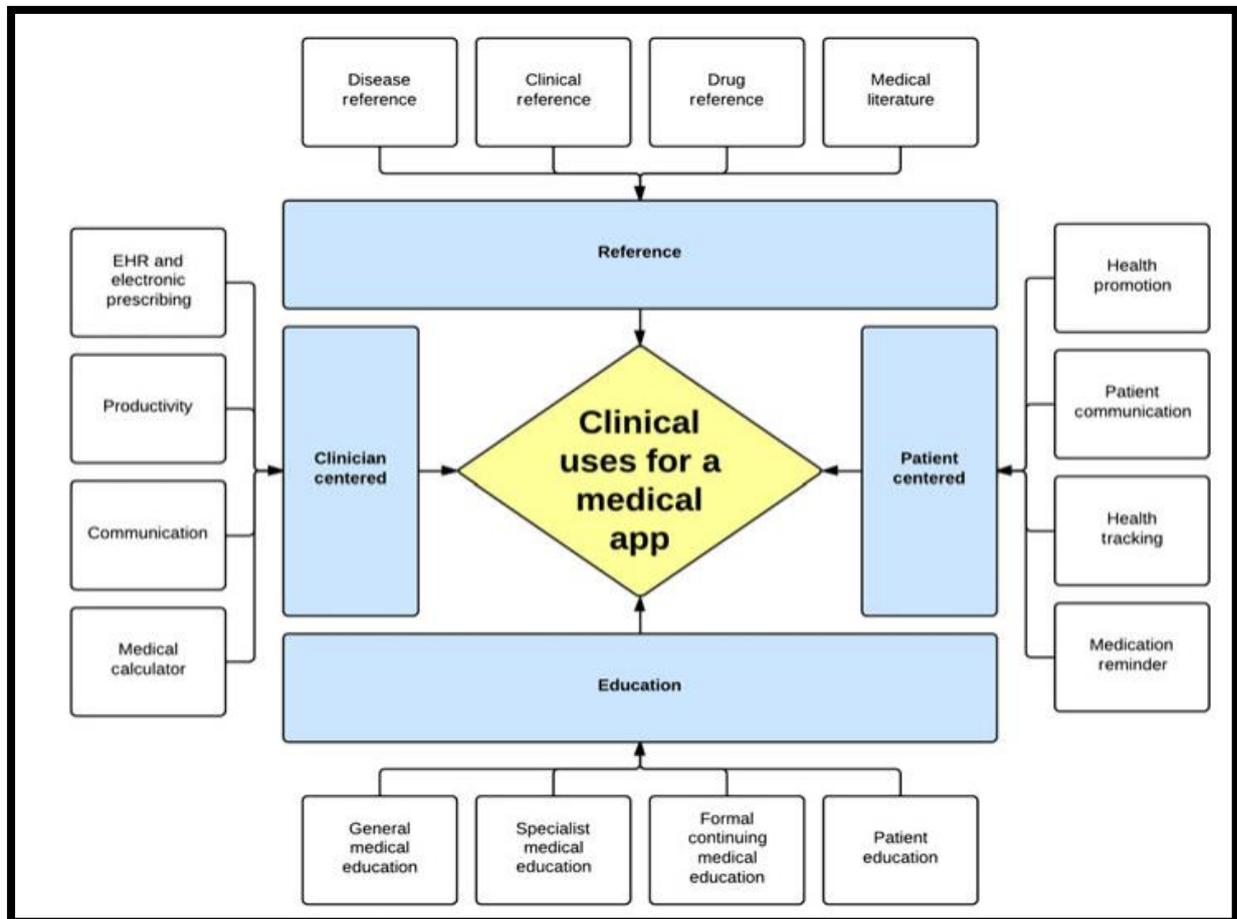


Figure 17 : Classification des applications mobiles de santé [150].

- Les applications dédiées exclusivement au patient (à droite de la figure 17).
- ✓ L'observance du traitement
- ✓ La publicité en santé
- ✓ La communication vers le patient
- ✓ Le suivi dans la santé
- Les applications centrées sur le professionnel de santé (à gauche de la figure 17).
- ✓ Dossier patient informatisé
- ✓ Calculateur médical - Références
 - littérature médicale (en haut de la figure 17)
 - Référence sur les pathologies et leur traitement
 - Education (en bas du schéma)
- ✓ Enseignement médical général et spécialisé

2.3. Modèle économique des applications mobiles de santé

Les applications mobiles de santé sont présentes dans les plateformes sous deux formes gratuites ou payantes. Les applications payantes ont un coût moyen de 10,53€ et de 2,55€ respectivement pour les professionnels de santé et le grand public [151]. Dans la majorité des cas, les laboratoires pharmaceutiques mettent à la disposition des mobinautes des applications mobiles de santé sous forme gratuites [152].

En effet, sur 50 applications analysées toutes étaient gratuites (Figure 18). Le choix d'un tel modèle économique par les laboratoires pharmaceutiques est justifié. En effet, les laboratoires cherchent à rentabiliser leur investissement par le renforcement de leur notoriété auprès des patients et des professionnels de santé.

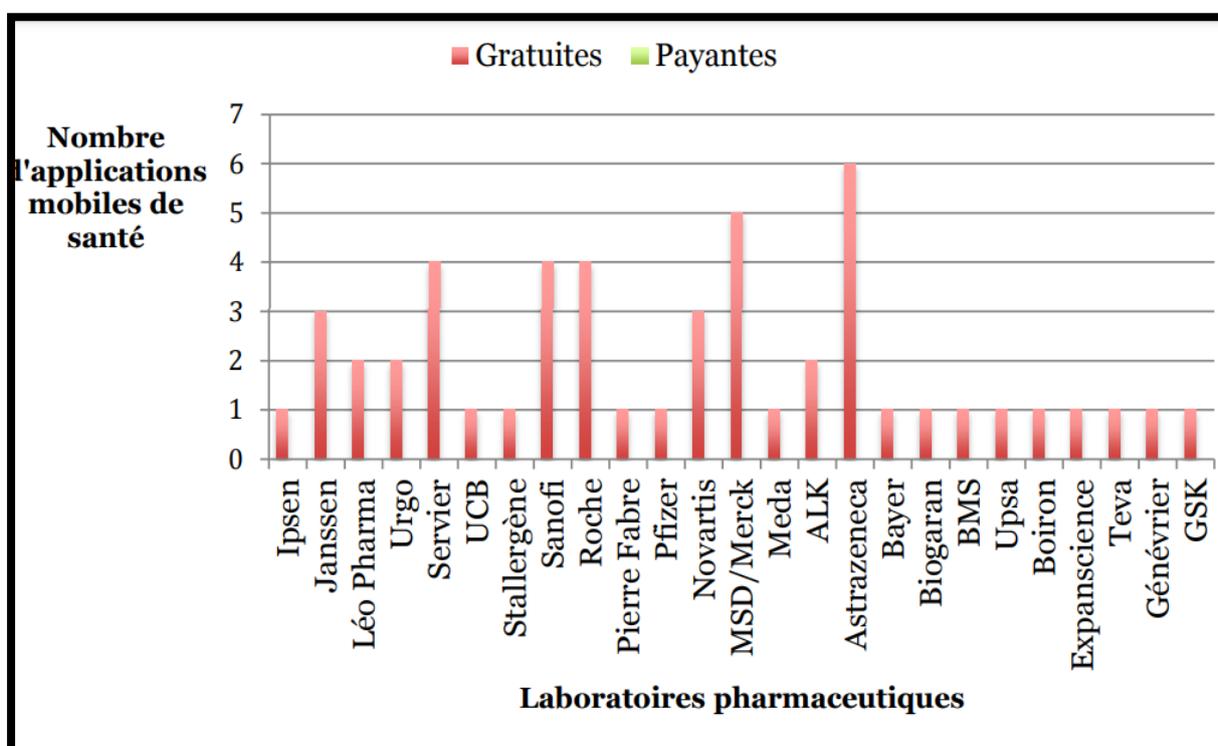


Figure 18 : Modèle économique de 50 applications mobiles de santé éditées par les laboratoires pharmaceutiques [152].

2.4. Impact des applications mobile de santé sur la relation médecin-patient

Avec l'émergence des applications mobiles de santé, on assiste à une perception totalement différente de la médecine. En effet, le modèle hippocratique avec le médecin dans son rôle paternaliste, est en voie de disparition, place désormais à l'empowerment.

L'OMS définit l'empowerment comme étant un procédé à travers lequel les personnes prennent le contrôle des décisions et actions affectant leur santé [153].

2 composantes sont obligatoires dans cette évolution :

- ✓ La compréhension par le patient de son rôle.
- ✓ L'acquisition d'un savoir lui permettant de dialoguer avec le professionnel.

Il est clair que les applications mobiles de santé peuvent apporter ces composantes. Par conséquent, le médecin devient un conseiller et accompagnant dans la démarche de soins [154].

2.5. Cadre juridique

➤ En Algérie

Malheureusement, l'Algérie connaît un retard certain dans la mise en place de son cadre juridique et organisationnel concernant les applications mobiles de santé. Contrairement aux autres pays comme les Etats-Unis et la France qui ont déjà défini leurs cadres juridiques, en Algérie on constate un vide juridique total.

➤ Aux Etats Unis

La FDA émis un rapport concernant l'évaluation des applications mobiles, elle donne son approbation aux éditeurs d'applications qui remplissent les critères médicaux (mention «FDA approved») [155].

Les applications de bien-être et loisirs, relatives à la santé, ne sont pas concernées par l'accréditation de la FDA.

➤ En France

Il existe la directive 95/46/CE relative à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données. La loi n° 2004-810 du 13 août 2004 relative à l'Assurance Maladie [156] a chargé la Haute Autorité de Santé (HAS) la mission de certification des sites Internet santé.

En Novembre 2007, la HAS accrédite la fondation HON pour certifier les sites de santé en France [157].

2.6. Applications mobiles de santé pour la gestion des AVK

Ce bref état des lieux est réalisé dans le but de connaître les applications mobiles de santé disponibles dans le domaine de la gestion de l'anticoagulation lors de la prise des AVK, afin de les comparer. Le tableau 8 représente les principales applications disponibles.

Tableau 8 : Les principales applications mobiles de santé disponibles pour la gestion des AVK.

Nom de l'application	Date de création	Fonctions	Cibles	Gratuite ou Payante	Plateforme de téléchargement
Warfarin Dosing HTK	2014	- Calcul de la posologie de la Warfarine.	Patient	Gratuite	Androïd
Mon carnet AVK	2015	- Conserver au format numérique les résultats du test sanguin INR. - Doses de médicaments ingérées par le patient. - Fonction agenda et une option de rappel automatique pour les examens de laboratoire.	Patient	Gratuite	IOS
My INR	2015	- Surveillance et suivi des lectures INR. - Ajout de nouvelles lectures INR. - Ajout des dosages alternatifs pour chaque jour de la semaine. - Lecture rétrospective des INR et des entrées de dosage. - Ajout d'un nouveau rendez-vous. - Exporter l'historique INR sous forme de fichier.	Patient	Gratuite	Androïd
Manege Anticoag	2017	- Conçue par <i>American College of Cardiology</i> , elle permet au clinicien de suivre les patients sous AVK.	Clinicien	Gratuite	Androïd

Partie expérimentale



Le but de notre travail est de mettre au point une stratégie de suivi thérapeutique appropriée à l'Acénocoumarol basé sur la coordination, la coopération et la communication au sein de la triade formée par le laboratoire, les cliniciens et les patients. Nous nous sommes alors fixés les objectifs suivant :

➤ Pour objectif principal :

- **Développer et valider un algorithme pharmacogénétique prédictif de la posologie d'Acénocoumarol.**

➤ Pour objectifs secondaires :

- Etudier les fréquences alléliques de huit polymorphismes *VKORC1*2*, *VKORC1*3*, *VKORC1*4*, *VKORC1 intron1*, *CYP2C9*2*, *CYP2C9 *3*, *CYP4F2*3*, *CALU*, dans la population de Sétif ;
- Etudier l'impact des variations génétiques sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol chez la population de Sétif.

Développer une application androïde pour améliorer la gestion du traitement par l'Acénocoumarol (Acénocoumarol Doising).

Patients et méthodes

1. Patients

1.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude transversale à recueil prospectif.

Le recrutement des patients a été mené sur une période de 23 mois allant de Novembre 2017 à la fin Septembre 2019. L'analyse moléculaire a duré 1 mois (Janvier 2020).

1.2. Lieu d'étude

L'étude s'est déroulée au niveau du service de Cardiologie du CHU Sétif.

Le dosage des INR a été réalisé au niveau de l'unité d'Hémodiagnostic du CHU Sétif.

L'extraction d'ADN s'est effectuée au niveau du laboratoire de recherche de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU Ibn Badis Constantine 3.

L'analyse moléculaire a été réalisée dans le laboratoire de Biologie Moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire Sahloul Tunisie.

1.3. Population d'étude

Durant cette période 250 patients ont été sélectionnés mais seulement 119 ont été inclus dans l'étude. La période de suivi des patients est de 6 mois minimum pour chaque patient.

La sélection des patients a été effectuée en deux temps :

Premier temps : la sélection des patients de la cohorte du développement de l'algorithme.

Second temps : la sélection des patients de la cohorte de validation de l'algorithme.

Le Diagramme de flux présentant la sélection des patients de l'étude est illustré sur la figure 19.

1.3.1. Critères d'inclusion

- ✓ Patients âgés de plus de 18ans, des deux sexes
- ✓ Patients suivis au niveau du service de cardiologie du CHU Sétif.
- ✓ Patients présentant des pathologies cardio-vasculaires ou thromboemboliques recevant de l'Acénocoumarol à long terme (plus de 6mois) et équilibré, c'est-à-dire que la mesure d'INR sur un intervalle de 3 mois reste plus ou moins constante en zone thérapeutique

1.3.2. Critères de non inclusion

- ✓ Les patients n'ayant pas été suivis au niveau du service de cardiologie du CHU Sétif dans les six derniers mois.
- ✓ Les patients ayant une insuffisance hépatique
- ✓ Les femmes enceintes,
- ✓ Les patients avec troubles cognitifs.
- ✓ Les patients avec un TTR <65%
- ✓ Les patients qui n'ont pas un carnet de suivi des AVK
- ✓ Les patients qui ont présenté des effets secondaires de type hémorragies ou thromboses.
- ✓ Patients présentant des difficultés d'adhésion médicamenteuses.
- ✓ Patients qui n'ont pas reçu une éducation thérapeutique au niveau du service de cardiologie.

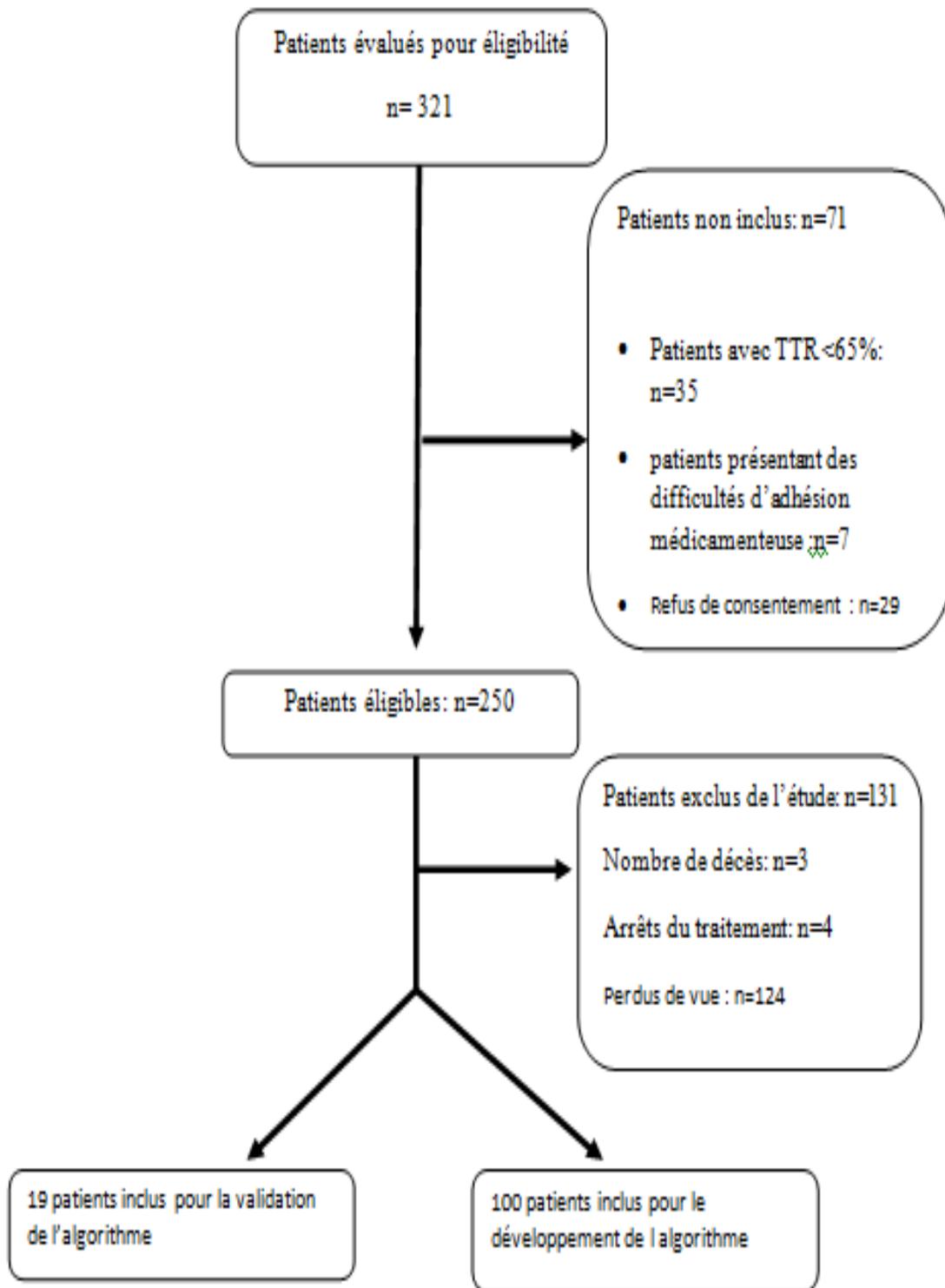


Figure 19 : Diagramme de flux des patients dans l'étude.

1.4. Recueil de données

Un formulaire de collecte de données a été conçu pour recueillir les informations sociodémographiques, les comorbidités, les traitements associés, les paramètres biologiques, et les effets indésirables (Annexe 1).

Le recueil des données a été réalisé en interrogeant le patient, en examinant le dossier médical d'hospitalisation, et en consultant le médecin traitant. Un interrogatoire a été effectué pendant la phase d'inclusion et d'autres au cours du suivi ultérieur. Les données des interrogatoires ont été inscrites sur la même fiche.

1.5. Consentement

Un consentement éclairé écrit et signé a été obtenu auprès de chaque patient sélectionné (Annexe 2), après que ce dernier ait reçu toutes les informations nécessaires, notamment l'objectif de notre travail de recherche, sa méthodologie, sa durée, les bénéfices attendus et le droit de se retirer à tout moment de la recherche.

La confidentialité des données a été respectée tout au long de notre étude.

1.6. Le suivi des patients

Les patients ont été suivis jusqu'à l'équilibre. Une fois l'équilibre est atteint, ils ont été suivi jusqu'à la fin de l'étude. Toutes les dates de contrôle ainsi que les valeurs de l'INR ont été inscrites sur la fiche de renseignement (Annexe 1).

L'équilibre a été défini par un INR appartenant à la zone thérapeutique (en fonction de l'indication) sur un intervalle d'au moins 3 mois.

A fin de faciliter le suivi, les patients ont été contactés la veille de l'analyse pour confirmer la date du rendez vous fixé par le médecin ou pour noter un éventuel changement. Le jour de l'analyse, le résultat de l'INR a été collecté en personne, puis analysé en coopération avec le médecin traitant, ainsi les éventuels changements de posologie sont notés sur la fiche du patient avec la date du prochain contrôle.

A chaque fois que le patient revient pour le contrôle, un interrogatoire est refait pour la recherche de signes d'apparition des effets indésirables de l'Acénocoumarol (hémorragie en cas de surdosage, ou de thrombose en cas de sous dosage).

2. Méthodes

2.1. Partie suivi thérapeutique

2.1.1. Suivi biologique des patients sous Acénocoumarol (INR)

2.1.1.1. Principe de dosage

L'International Normalized Ratio (INR): est le seul test utilisé pour la surveillance de l'Acénocoumarol. L'INR est définie par la formule suivante :

« Temps de Quick du malade/temps de Quick du témoin », ce rapport étant élevé à la puissance ISI (Indice de Sensibilité International).

Il s'agit d'une technique de coagulation où le processus est déclenché suite à l'incubation du plasma citraté à une température de 37°C avec une quantité optimale de thromboplastine «Thromborel S ».

La mesure du temps nécessaire à la formation d'un caillot de fibrine est déterminée par un dosage chromométrique spectrophotométrique correspondant au temps de Quick (TQ).

Ce paramètre explore l'activité globale de trois des quatre facteurs pro coagulants vitamine K dépendants : les facteurs II (prothrombine), VII et X.

2.1.1.2. Prélèvement

Le prélèvement est effectué le matin entre 9 et 12 heures. Le patient ne doit pas être à jeun, toute fois il doit éviter un repas trop riche en matière grasse avant la prise de sang. Le prélèvement est effectué chez le patient en position assise, en utilisant une aiguille dont le diamètre est compris entre 0,7 à 1 mm, de préférence sans garrot.

Le transport des tubes au laboratoire se fait dans l'heure suivant le prélèvement ; en position verticale en évitant toute agitation.

Le test doit être effectué dans un délai de 4 heures si le tube a été centrifugé immédiatement, sinon dans les 2 heures suivant le prélèvement.

2.1.1.3. Phase analytique

Réactifs utilisés

- ✓ Le réactif Thromborel S, est une thromboplastine lyophilisée dont l'ISI est de 1.02, obtenue à partir de placenta humain (<60mg/l), additionné de chlorure de calcium (environ 1.5g/l) et de stabilisateurs conservateurs : -Gentamicine (0.1g/l).

La reconstitution du réactif Thromborel S se fait par ajout d'une quantité d'eau distillée (4ml).

La dissolution de l'ensemble est assurée manuellement par 8 à 10 retournements, suivie d'une incubation pendant 45min à 37°C.

- ✓ Plasmas de contrôle et de calibration
- Plasma de contrôle normal : est un contrôle titré destiné à l'évaluation de la précision et du biais analytique des substances à analyser dans le domaine normal.
- Plasma de contrôle pathologique : est un contrôle titré destiné à l'évaluation de la précision et du biais analytiques des substances à analyser dans le domaine pathologique.
- Plasma de calibration « TP Multi Calibrateur » : il s'agit d'un lot de calibration, pour l'étalonnage direct des temps de Quick (TQ) en taux de prothrombine (TP) puis en INR. Il est composé de six plasmas calibrant (différentes dilutions) pour l'étalonnage du TP. Ils contiennent des pools de plasmas humains stabilisés avec un tampon et sont ensuite lyophilisés et calibrés et exempt de conservateurs.

La reconstitution du multi calibrateur se fait en ajoutant 1ml d'eau distillée dans chaque flacon, puis laisser la solution se stabiliser pendant 30 min à température ambiante (15-25°C). Quand le réactif est reconstitué, sa stabilité est de : * 8 heures entre 2 à 8°C.

- ✓ Solution tampon « Buffer ® », est utilisé comme tampon de dilution dans les tests d'hémostase. Il s'agit d'une solution tamponnée présentant un PH de 7.35 contenant de l'azide de sodium comme conservateur.
- ✓ Solution de rinçage « CELLCLEAN® », est un détergent alcalin puissant conçu pour éliminer les traces d'agent de lyse sur l'automate SYSMEX.

Equipements

-Coagulomètre automatique SYSMEX CA-600 séries system.

Le coagulomètre automatique SYSMEX (figure 20), est un analyseur permettant la réalisation des dosages d'hémostase de routine et spécialisés, parfaitement adapté aux

activités de laboratoires. Il permet la réalisation simultanée des tests chromométriques et colorimétriques.



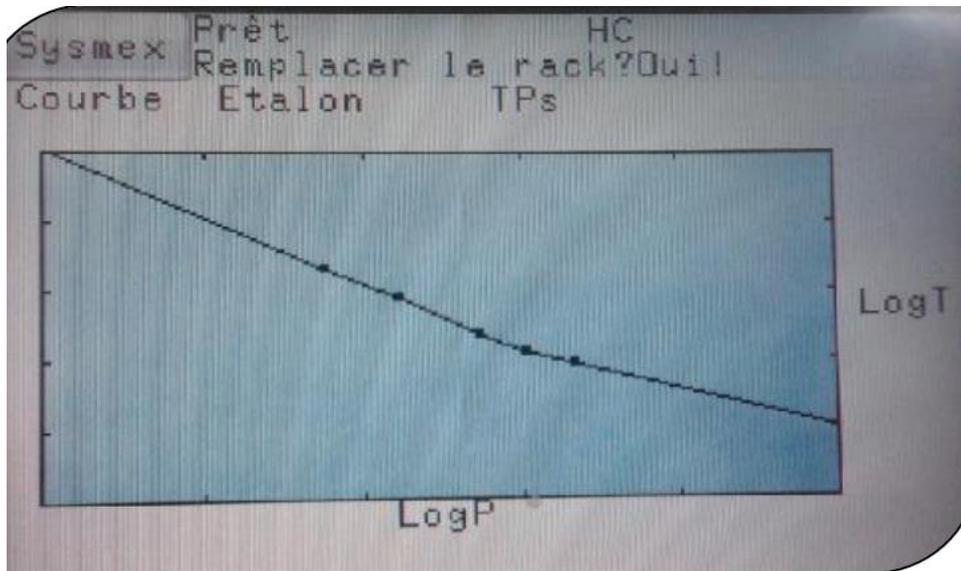
Figure 20: Coagulomètre automatique SYSMEX CA-600.

Mode opératoire

Une calibration est effectuée pour chaque nouveau lot de réactif, l'objectif est l'obtention de la courbe de calibration. Le « Multi Calibrateur » est préconisé pour la calibration du coagulomètre SYSMEX, dans le but de déterminer le temps de Quick, et permet ainsi, sa conversion en taux de prothrombine exprimé en pourcentage. Ce réactif est composé de six plasmas lyophilisés présentés purs et dilués avec un tampon de dilution : Le Multi Calibrateur pur (non dilué) correspond à un taux de prothrombine égale à 100%.

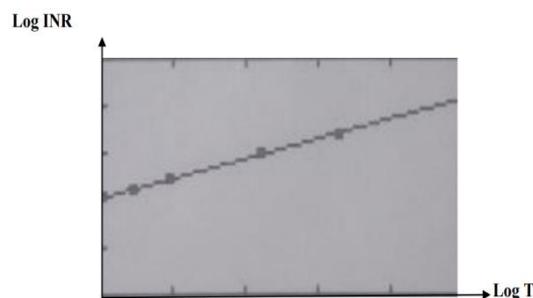
Pour établir la courbe de calibration : Prélever 50 μ l de chaque plasma calibrant (pur et dilué), puis les incubent pendant 2min à 37°C, ensuite on procède au dosage ; après ajout de 100 μ l du réactif Thromborel ®S pré incubé, en notant à chaque fois le temps de coagulation (TQ en secondes). Au niveau du laboratoire, la courbe est établie avec cinq calibrant (100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%). La courbe de calibration (Figure 21), est obtenue d'une manière automatique en portant sur l'axe des abscisses le logarithme de l'inverse de la dilution (1,4/3, 2,4 ,8) de chaque point d'étalonnage et en ordonnée le logarithme des temps de coagulation correspondant (TQ).

Grâce au TP Multi calibrateur ; L'INR est obtenu directement grâce à une formule logarithmique ($\text{Log INR} = a \text{ Log T} + b$) ; converti en droite (figure 21), permettant d'avoir les valeurs de l'INR sans utiliser sa formule de calcul.



. Figure 21: Courbe de calibration.

L'équation de la droite est : $\text{Log INR} = a \text{ Log T} + b$; avec $r = 1.00$ $a = 1.0021$ e $b = 1.091e$



Courbe log INR

Pour effectuer le dosage, l'automate prélève 50µl de plasma du patient puis l'incube pendant 180 sec à 37°C, ensuite 100µl du réactif Thromborel @S pré incubé sont introduite au plasma, la lecture est faite par spectrophotométrie. Après chaque dosage, et avant d'entamer l'analyse d'autres plasmas, l'automate fait un rinçage par le CELLCLEAN.

Notons que nous avons suivi les indications du fabricant.

2.1.2. Calcul du temps passé dans la zone thérapeutique (TTR)

Le TTR est le « gold standard » pour l'évaluation de l'efficacité d'un traitement par AVK. Il est utilisé dans tous les essais thérapeutiques utilisant un AVK comme comparateur. Il est devenu, à l'instar de l'hémoglobine glyquée des diabétiques, un marqueur pronostique de l'équilibre des patients sous AVK.

Il doit-être idéalement compris entre 65 et 70%; en deçà de cette valeur, les risques hémorragiques et de complications thromboemboliques augmentent significativement [158].

Afin de sélectionner les patients inclus dans notre étude nous avons calculé le TTR pour chaque patient. Nous avons retenu pour l'étude seulement les patients avec un TTR supérieur ou égale à 65%.

La méthode de Rosendaal a été utilisée pour calculer le TTR. Cette méthode prend pour hypothèse qu'entre deux INR, la variation est linéaire. C'est la méthode de calcul la plus la fiable et la plus utilisée dans les études et les cliniques d'anticoagulations malgré sa complexité.

A titre d'exemple, si un patient se présente à J1 avec un INR à 2.5 puis à J30 à 3.5 pour un INR cible entre 2 et 3 ; on peut conclure qu'à J15, l'INR du patient était autour de 3, puis est passé au-dessus de l'intervalle. On peut alors estimer que le patient a passé 15 jours dans l'intervalle thérapeutique et 15 jours hors intervalle au cours de cette période de 30 jours. Ce qui veut dire que le patient est dans la zone thérapeutique 50% du temps.

Ci-dessous (tableau 9) un exemple du calcul du TTR pour un patient de l'étude par cette méthode, les étapes du calcul sont illustré dans un fichier Excel (annexe 4).

Le TTR pour ce patient est de 78.5%.

Tableau 9 : Calcul du TTR par la méthode Rosendaal.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Test Date	INR	Days Since Last Test	INR Diff	Previous INR Within Range?	Current INR Within Range?	Scenario	INR Diff Above Range	INR Diff Within Range	INR Diff Below Range	Days within Range since Last Test	% Days within Range since Last Test
2	30/05/2019	2,3				In Range						
3	06/06/2019	3,3	7	1	In Range	Above	Calculate	0,3	0,7	0	4,9	70%
4	13/06/2019	2,5	7	-0,8	Above	In Range	Calculate	0,3	0,5	0	4,4	63%
5	20/06/2019	1,9	7	-0,6	In Range	Below	Calculate	0	0,5	0,1	5,8	83%
6	27/06/2019	2,1	7	0,2	Below	In Range	Calculate	0	0,1	0,1	3,5	50%
7	04/07/2019	2,7	7	0,6	In Range	In Range	In Range	0	0,6	0	7,0	100%
8	11/07/2019	2,8	7	0,1	In Range	In Range	In Range	0	0,1	0	7,0	100%
9	18/07/2019	3,1	7	0,3	In Range	Above	Calculate	0,1	0,2	0	4,7	67%

Low Range	2
High Range	3
Rosendaal Method	
Days Within Range	60,5
Total Days	77,0
% Days Within Range	78,5%

2.2. Partie pharmacogénétique

2.2.1. Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin a été réalisé pour chaque patient à partir du sang veineux au pli du coude, sous des conditions stériles. Le sang est recueilli dans des tubes vacutainer (5 à 10 ml) contenant l'anticoagulant EDTA qui est un inhibiteur de l'action des enzymes ADNase ou nucléases, préservant ainsi l'intégrité moléculaire.

Notons que ces prélèvements ont été réalisés par des infirmiers qualifiés du service de cardiologie.

2.2.2. Conservation des prélèvements

L'extraction d'ADN doit se faire sur du sang frais, mais dans certains cas d'impossibilité technique, l'extraction est différée puis réalisée sur du sang stocké 1 à 2 jour à 25°C ou pendant 7 jours à + 4°C.

2.2.3. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Elle consiste à obtenir des acides nucléiques plus ou moins purs et plus ou moins concentrés, adaptés aux différents tests génétiques pratiqués.

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN et la plus exploitable. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies musculaires ou des biopsies de villosités chorales ou des cultures de cellules amniotiques (amniocytes, fibroblastes...).

Il existe plusieurs procédés d'extraction et de purification d'ADN, dans notre étude nous avons utilisé la technique au NaCl (solvant inorganique).

Méthode d'extraction au NaCl : Elle se résume en 3 grandes étapes :

La Lyse cellulaire : elle est réalisée en présence de solution de lyse, de protéinase K et de détergent SDS (Sodium Dodécyle Sulfate). Les éléments figurés du sang, dont les leucocytes sont lysés.

- **Extraction de l'ADN proprement dite :** l'ADN nucléaire est libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl.

- **Lavages et solubilisation:** la pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol pur. L'ADN est ensuite solubilisé en phase aqueuse (eau stérile bidistillée).

Le protocole détaillé est fourni en annexe 3.

2.2.4. Détermination de la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN extrait :

La pureté ainsi que la concentration de l'ADN sont déterminées par spectrophotométrie à UV avec un Nanodrop® (Thermo Scientific Nanodrop® ND-1000) (figure 22). Il s'agit d'un spectrophotomètre qui ne nécessite pas l'utilisation de cuvette. Un volume de 2 µl de l'échantillon est déposé directement à l'extrémité d'un câble de fibre optique. Lorsque celui-ci est mis en contact avec un second câble par fermeture de l'appareil, l'échantillon est maintenu par une tension de surface et traversé par un signal lumineux. Il est possible ainsi de mesurer et de quantifier les ADN double comme simple brins. L'analyse de l'absorbance se fait par un logiciel (Nanodrop® 1000 v3.7) installé sur un ordinateur relié à l'appareil.

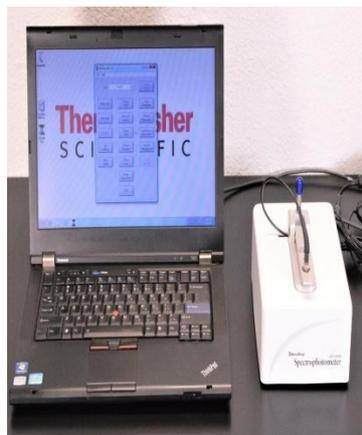


Figure 22: Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop® ND-1000).

L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines qui représentent les témoins de contamination absorbent à 280 nm. L'absorption (absorbance ou Densité Optique (DO)) est mesurée à 3 longueurs d'ondes différentes (230, 260 et 280) et deux rapports sont établis (260/280 et 260/230). Tous ces paramètres sont calculés automatiquement par le logiciel. En

effectuant le rapport de DO 260/280, la pureté de l'ADN est déterminée en vérifiant une éventuelle contamination par les protéines ou par les ARN.

On considère que : l'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO\ 260/280$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$), l'ADN est contaminé par les protéines si $R < 1,6$ et que l'ADN est contaminé par les ARN si $R > 2$.

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, on n'aboutira pas à des résultats fiables dans les étapes suivantes de son analyse par PCR-RFLP. Il est donc indispensable de procéder à la réextraction de la pelote afin d'obtenir la pureté souhaitée.

N.B : les ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à leur utilisation.

Le tableau suivant résume les différentes conditions de conservation de l'ADN.

Tableau 10 : Conditions de conservation de l'ADN.

Température	Durée de la stabilité de la solution d'ADN
Ambiante	Quelques jours
+4°C	6 mois
-20°C	1 an au minimum
-80°C	7 ans au minimum

Après dosage, une deuxième vérification de la qualité de l'ADN extrait est réalisée par migration sur gel d'agarose à 1 % (1 g dans 100 ml) pendant une heure et à 100 Volts. L'apparition de « traînées » est témoin d'une dégradation partielle ou totale de l'ADN génomique extrait.

Nous avons ajustés nos ADN à la concentration de 100 ng/ul pour la réalisation de la PCR.

2.2.5. Le géotypage

Le géotypage repose sur l'amplification PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilisant des amorces spécifiques qui permettent d'amplifier la section d'ADN qui contient le polymorphisme d'intérêt. Ce fragment d'ADN amplifié et purifié permet ensuite la détection du polymorphisme au moyen de la technique RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*).

Cette technique repose sur l'utilisation d'une enzyme de restriction spécifique à chaque polymorphisme étudié, dont la fonction est de parcourir chacun des brins d'ADN amplifiés et de «couper» si le motif de reconnaissance (SNP) est présent dans le fragment.

L'action de cette enzyme permet de scinder l'ADN en plusieurs fragments de restriction de longueurs différentes (c'est-à-dire le nombre de paires de bases), ce qui permet leur reconnaissance sur un gel d'agarose après une migration électrophorétique.

Selon que l'ADN ait été fragmenté ou non, il est possible d'établir le génotype des porteurs de la mutation (hétérozygotes), non porteurs de la mutation (homozygotes sauvages ou normaux) et des porteurs des deux allèles mutés (homozygotes mutés).

2.2.5.1. PCR (Réaction en chaîne polymérase)

La PCR est un outil fondamental de la biologie moléculaire. Elle permet à partir d'un fragment d'ADN particulier (ADN d'intérêt), d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions voir des milliards) de copies identiques de ce même fragment. Cette réaction est réalisée in vitro et est automatisée.

La PCR a été décrite pour la première fois par Karry Mullis en 1983 et publiée en 1985, ce qui a valu à Karry Mullis le prix Nobel de chimie en 1993.

Principe de la PCR

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire, d'un ADN servant de matrice, elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Cette séquence servira à synthétiser une amorce d'oligonucléotides complémentaires, afin d'initier le processus.

Cette amorce ou primer a une longueur de 17 à 30 bases, et dont la séquence est complémentaire à celle du brin à amplifier. L'association à l'ADN cible est suivie de l'élongation du brin complémentaire par une polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin.

La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes (figure 23), sachant que l'ADN extrait du milieu biologique à étudier baigne dans un milieu réactionnel tamponné qui comprend tous les éléments indispensables : les précurseurs nucléotidiques (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation Mg^{++} indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs, de l'ADN polymérase et des amorces.

- **Première étape** : dénaturation thermique de l'ADN double brin

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins en rompant les liaisons hydrogènes.

L'ADN double brin est chauffé à 94°C. Cette température est supérieure à la température de dénaturation (Température melting ou T_m) de l'ADN qui devient sous forme simple brin.

Ces brins servent de matrice au cours des cycles d'amplification.

- **Deuxième étape** : hybridation des deux amorces ou annealing (sens et anti-sens)

Le milieu réactionnel est amené à une température inférieure au T_m des amorces. Ce T_m est en fonction de la séquence et est en général de l'ordre de 50 à 70 °C. Les amorces en large excès, s'hybrident à tout l'ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

- **Troisième étape** : élongation et extension des amorces par une ADN polymérase

Une ADN polymérase (la taq polymérase) allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle est hybridée et la synthèse s'effectue dans le sens 5'→3' à 72°C (température optimale).

A la fin de chaque cycle, on aura deux copies de la séquence d'ADN cible. Un nouveau cycle commencera par l'étape de dénaturation, suivie successivement des étapes d'hybridation et d'extension.

L'amplification est exponentielle selon la formule 2^n et n représente le nombre de cycles, par exemple une PCR de 30 cycles génère théoriquement 2 à la puissance 30 copies de cibles initialement présentes.

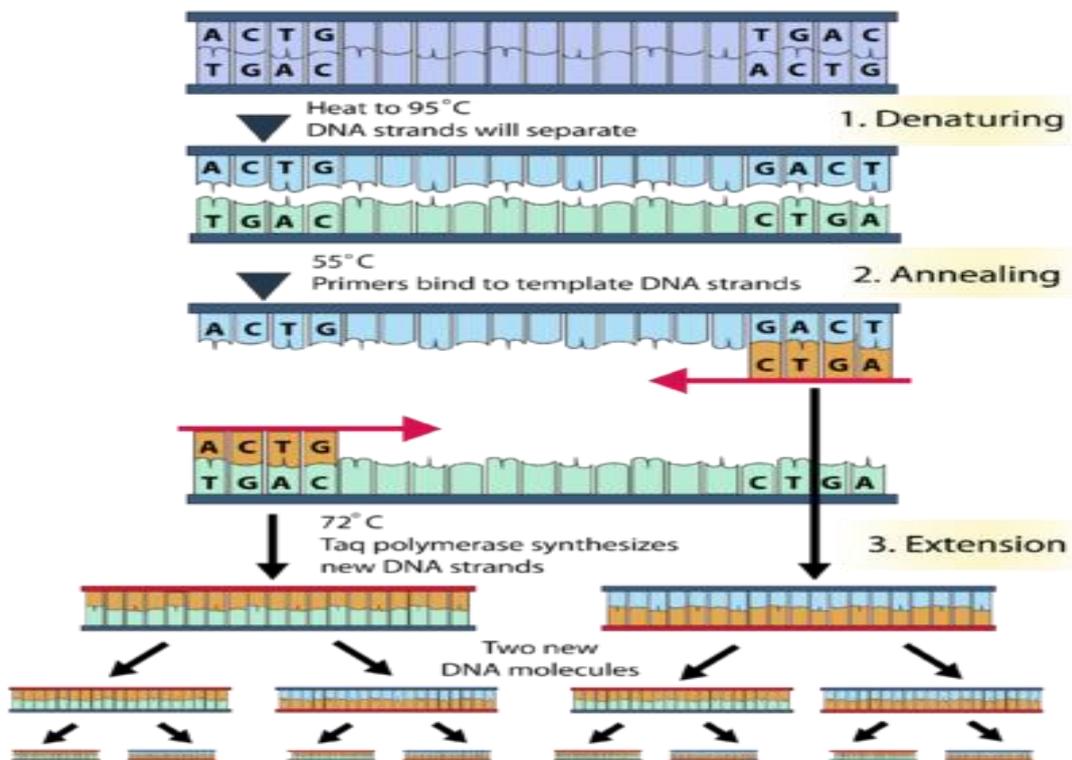


Figure 23: Etapes de la réaction en chaîne polymérase (PCR).

2.2.5.2. Préparation du milieu réactionnel (mix) pour la PCR

La méthode suivante a été suivie pour la préparation du milieu réactionnel pour l'étude de tous les SNP.

Les réactifs utilisés dans cette étape de PCR doivent d'abord être dilués selon la formule suivante : $C1 \times V1 = C2 \times V2$

Sachant que :

C1 : concentration initiale de chaque réactif (mentionnée sur le tube).

V1 : volume initial nécessaire à la dilution (inconnu).

C2 : concentration finale (mentionnée dans le protocole utilisé).

V2 : volume final (selon le nombre de tubes).

Donc :

$$V1 = C2 \times V2 / C1$$

Une fois que le volume initial (V1) est connu, le volume de l'eau distillée nécessaire pour la dilution de chaque réactif est calculé comme suit :

$$V2 - V1 = \text{Veau distillée}$$

Le volume de chaque réactif est ensuite multiplié par le nombre de tubes (nombre d'individus), plus deux tubes (témoin négatif et positif).

2.2.5.3. Déroulement des cycles de la PCR

Après préparation du milieu réactionnel, ce dernier est dispatché dans des microtubes à PCR. Les tubes de PCR préparés sont posés ensuite dans le thermocycleur programmé au préalable. Les conditions pour le déroulement des cycles d'amplification par PCR diffèrent d'un gène à autre.

La réaction s'est effectuée à l'aide d'un thermocycleur ProFlex PCR System (figure 24).



Figure 24: Thermocycleur « ProFlex PCR System » utilisé dans le génotypage.

2.2.5.4. Contrôle de la PCR

Une électrophorèse est nécessaire pour le contrôle de la taille des fragments amplifiés par PCR et la détection d'une éventuelle contamination de l'ADN (grâce au témoin négatif). La migration d'une molécule d'ADN dépend de sa taille et de la concentration du gel d'agarose, mais le voltage et la force ionique du tampon interviennent également.

Dans notre étude, nous avons assuré ce contrôle dans une cuve horizontale (figure 25) sur un gel d'agarose à 2% (2g d'agarose+ 100 ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA) dans lequel ont été incorporé 10µl de BET (un agent intercalant se fixant entre les bases nucléiques, rendant l'ADN fluorescent sous UV pour visualiser les bandes résultantes).

Dans chaque puits du gel et du côté cathode (-), un mélange du produit d'amplification et 3µl du marqueur de mobilité BBP qui permet de suivre le front de migration sont déposés, en réservant 2 puits, un pour le dépôt du marqueur de taille (100pb) et le deuxième pour le dépôt du blanc (témoin négatif). Ensuite, le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 à 40 min. Après migration, la visualisation des produits amplifiés est réalisée sous UV.



Figure 25: Cuve utilisé pour le contrôle de PCR.

2.2.5.5. Digestion des produits de PCR par les enzymes de restriction

Après le control de PCR, l'ADN est soumis à une digestion enzymatique clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restriction.

Dans notre étude, une quantité de l'ADN est mélangée à une quantité d'enzyme de restriction appropriée à chaque gène. L'ensemble, est ensuite incubé à 37°C une nuit.

La mutation crée un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction. L'action de clivage de l'enzyme est détectée par une variation du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après une digestion enzymatique.

2.2.5.6. Contrôle de la digestion

La migration et la visualisation des fragments de restriction obtenus ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles des produits PCR. Dans chaque puits du gel, une quantité du produit digéré et 3 μ l de BBP sont déposés. La migration s'effectue sous un courant de 100 volts pendant 45min. Les fragments résultants sont ensuite visualisés sous UV Le gel est ensuite photographié par Syngene Tm Transilluminateur LED Imager (figure 26).



Figure 26: Syngene Tm Transilluminateur LED Imager.

2.2.6. Méthodes d'études des polymorphismes des gènes *CY2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* et *CALU* par PCR-RFLP

Protocole suivis

Pour l'étude des polymorphismes des gènes *CY2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* et *CALU*, nous nous sommes basés sur les protocoles publiés par Cadamuro et collaborateurs, 2010, Moridani et collaborateurs, 2006, Scone et collaborateurs, 2005, Scott et collaborateurs, 2008, Anton A. I et collaborateurs, 2013, Bejarano-Achache et collaborateurs, 2012 et Gonzalez-Conejero et collaborateurs, 2007 (Tableau 11).

Tableau 11: Liste des amorces utilisées pour la détection des polymorphismes des gènes *CY2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* et *CALU*.

Polymorphismes	Couple d'amorces	Références
<i>CYP2C9</i>		
<i>CYP2C9</i>*2 rs1799853 (c.430C>T)	Sens: 5' CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAG 3' Antisens: 5'GTGATATGGAGTAGGGTCACCCAC 3'	[159]
<i>CYP2C9</i>*3 rs1057910 (c.1075A>C)	Sens:5'AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC3' Antisens : 5'GATACTATGAATTTGGGGACTTC3'	[160]
<i>VKORC1</i>		
<i>VKORC1</i>*2 rs9923231 (g.-1639 G>A)	Sens : 5' GCCAGCAGGAGAGGGAAATA 3' Antisens :5' AGTTTGGACTACAGGTGCCT 3'	[161]
<i>VKORC1</i>*3 rs7294 (c.9041G>A)	Sens : 5' TTTGCTTTGGCATGTGAGCCTTGC 3' Antisens : 5' ACAGTCCATGGCAGACACATGGTT 3'	[162]
<i>VORC1</i>*4 rs17708472 (c.6009 C>T)	Sens :5' GCATAATGACGGAATACAGAGGAGGC 3' Antisens :5' GGTAGAGACAGGCTTTCACCATGT 3'	[162]
<i>VKORC1</i>*intron1 rs9934438 (c.1173C>T)	Sens : 5' AGGGGAGGATAGGGTCAGTGACATG 3' Antisens :5' TGGATTGATTGAGGATGCTGTCCTG 3'	[163]
<i>CYP4F2</i> rs2108622 (g.1347G>A)	Sens : 5' GTCTCCTGGGTAGGAAGAG 3' Antisens : 5' GTTGTGTGTGTCTTTGAG 3'	[164]
<i>CALU</i> rs1043550 (c.29809A>G)	Sens : 5' GGATGGCAAGCTTACCAAGG 3' Antisens : 5' GTTTGTAGTAACAGTCTCAG 3'	[165]

2.2.6.1. Amplification des polymorphismes *VKORC12, *VKORC1**3, *VKORC1**4, et *VKORC1**intron1 du gène *VKORC1***

Les protocoles que nous avons utilisé sont ceux décrits par Cadamuro et collaborateurs, 2010, Scone et collaborateurs, 2005, Scott et collaborateurs, 2008 et Anton A. I et collaborateurs, 2013 [166] [167] [168] [169]. Ces protocoles ont été optimisés pour chaque polymorphisme et sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Milieu réactionnel de la PCR pour les polymorphismes *VKORC12, *VKORC1**3, *VKORC1**4, et *VKORC1**intron1 du gène *VKORC1*.**

Réactifs	Concentrations			
	<i>VKORC1</i> *2 <i>rs9923231</i> (g.- <i>1639 G>A</i>)	<i>VKORC1</i> *3 <i>rs7294</i> (c. <i>9041G>A</i>)	<i>VKORC1</i> *4 <i>rs17708472</i> (c. <i>6009C>T</i>)	<i>VKORC1</i> *intron1 <i>rs9934438</i> (c. <i>1173C>T</i>)
ADN	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM	1.7 mM	1.7 mM
Tampon	1X	1X	1X	1X
dNTP	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Amorce sens	0.2 µM	0.2 µM	0.4 µM	0.4 µM
Amorce anti-sens	0.2 µM	0.2 µM	0.4 µM	0.4 µM
<i>Taq</i> polymerase	1U	1U	1U	1U
Eau bidistillée	qsp 25 µL	qsp 25 µL	qsp 25 µL	qsp 25 µL

Les programmes optimisés du thermocycleur pour les polymorphismes du gène *VKORC1* sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Programmes des PCR pour les polymorphismes *VKORC12, *VKORC1**3, *VKORC1**4, et *VKORC1**intron1 du gène *VKORC1*.**

Etape	<i>VKORC1</i> *2 <i>rs9923231</i> (g.- <i>1639 G>A</i>)	<i>VKORC1</i> *3 <i>rs7294</i> (c. <i>9041G>A</i>)	<i>VKORC1</i> *4 <i>rs17708472</i> (c. <i>6009 C>T</i>)	<i>VKORC1</i> *intron1 <i>rs9934438</i> (c. <i>1173C>T</i>)
Dénaturation initiale	94 → 5mn	95 → 5mn	95 → 1mn	95 → 5 mn
Dénaturation	94 → 1mn	95 → 1mn	95 → 1mn	94 → 30sec
Hybridation	61 → 1mn x 35	62 → 30sec } x 35	64 → 30sec } x 35	62 → 30sec } x 35
Elongation	72 → 1mn	72 → 2mn } x 35	72 → 2mn } x 35	72 → 30 seg } x 35
Elongation finale	72 → 5mn	72 → 5mn	72 → 10mn	72 → 5 mn
Produit de PCR attendu (pb)	290	281	271	189

▪ **Digestion enzymatiques des produits de PCR**

Les produits de PCR pour chaque polymorphisme ont été digérés par une enzyme de restriction spécifique pour chaque mutation. La composition du milieu réactionnel de la digestion est décrite dans le tableau 14.

Tableau 14: Composition du milieu réactionnel des digestions enzymatiques des polymorphismes du gène *VKORC1*.

Produit	<i>VKORC1</i> *2 rs9923231 (g.-1639 G>A)	<i>VKORC1</i> *3 rs7294 (c.9041G>A)	<i>VKORC1</i> *4 rs17708472 (c.6009 C>T)	<i>VKORC1</i> *intro n1 rs9934438 (c.1173C>T)
Enzyme de restriction	MspI 2U	Acil 2U	<i>Bfal</i> 4U	<i>StyI</i> 2U
Tampon	1X	1X	1X	1X
Produit PCR	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Eau Bidistillée	qsp 10µl	qsp 10µl	qsp 10µl	qsp 10µl
Température (°C) et temps d'incubation (h)	37 Toute une nuit	37 Toute une nuit	37 Toute une nuit	37 Toute une nuit

L'ADN amplifié et digéré a été mis en évidence par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2% et une révélation sous UV par BET en présence de marqueurs de poids moléculaire de 25 paires de base (pb) ou de 100 pb selon la longueur des fragments amplifiés. Les profils électrophorétiques attendus sont décrits dans les figures 27 et 28.

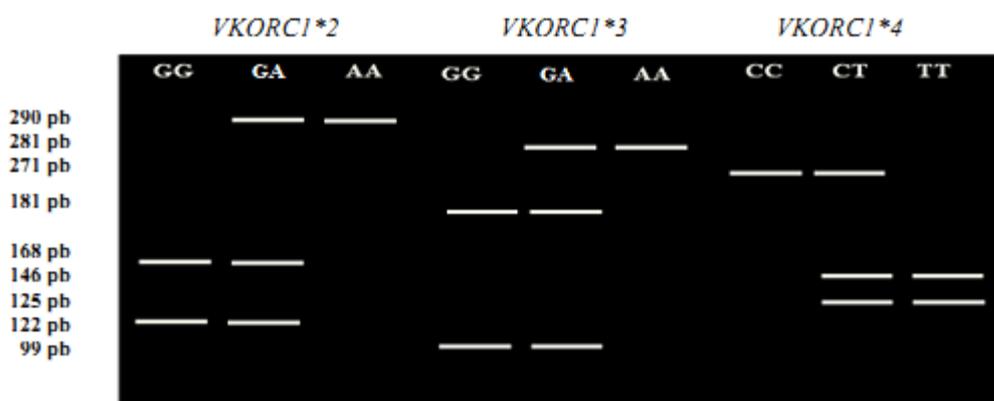


Figure 27 : Profils électrophorétique attendus des mutations *VKORC12, *VKORC1**3 et *VKORC1**4.**

Polymorphisme *VKORC1**2 : génotype homozygote normal GG (168+ 122 pb), génotype hétérozygote GA (290+ 168+ 122 pb) et génotype homozygote muté AA (290 pb). Polymorphisme *VKORC1**3 : génotype homozygote normal GG (181+99 pb), génotype hétérozygote GA (281+ 181+ 99 pb) et génotype homozygote muté AA (281 pb). Polymorphisme *VKORC1**4 : génotype homozygote normal CC (271 pb), génotype hétérozygote CT (271+ 146+ 125 pb) et génotype homozygote muté TT (146+ 125 pb).

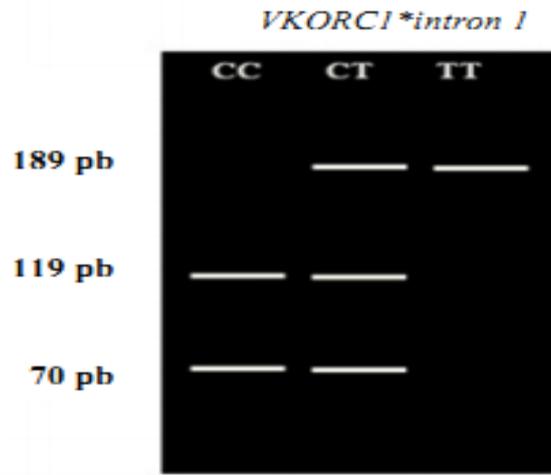


Figure 28: Profil électrophorétique attendus des polymorphismes *VKORC1*intron1*. Polymorphisme *VKORC1*intron1* : génotype homozygote normal CC (119+ 70 pb), génotype hétérozygote CT (189+ 119+ 70 pb) et génotype homozygote muté TT (189 pb).

2.2.6.2. Amplification des polymorphismes *CYP2C9*2* et *CYP2C9*3* du gène *CYP2C9*

Le protocole que nous avons utilisé est celui décrit par Moridani et collaborateurs, 2006 [429]. Ce protocole a été optimisé pour chaque polymorphisme et est présenté dans le tableau 15.

Tableau 15 : Milieu réactionnel de la PCR pour les polymorphismes *CYP2C9*2* et *CYP2C9*3* du gène *CYP2C9*.

Réactifs	Concentrations	
	<i>CYP2C9*2</i> rs1799853 (c.430C>T)	<i>CYP2C9*3</i> rs1057910 (c.1075A>C)
ADN	100ng	100ng
MgCl ₂	1.5 mM	1.5mM
Tampon	1X	1X
dNTP	0.2 mM	0.2 mM
Amorce sens	0,2 µM	0.2 µM
Amorce anti-Sens	0,2 µM	0.2µM
<i>Taq</i> polymérase	1 U	1U
Eau bidistillée	qsp 25 µL	qsp 25µL

Les programmes optimisés du thermocycleur pour les *polymorphismes CYP2C9*2 et CYP2C9*3 du gène CYP2C9* sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Programmes des PCR pour les polymorphismes *CYP2C9*2 et CYP2C9*3 du gène CYP2C9*.

Etape	CYP2C9*2 rs1799853 (c.430C>T)	CYP2C9*3 rs1057910 (c.1075A>C)
Dénaturation initiale	94 → 5 mn	94 → 5 mn
Dénaturation	94 → 45 sec	94 → 1mn
Hybridation	61 → 45 sec	61 → 1mn
Elongation	72 → 1 mn	72 → 1mn
Elongation finale	72 → 7 mn	72 → 7 mn
	} x 35	} x 35
Produit de PCR attendu (pb)	375	166

▪ **Digestion enzymatiques des produits de PCR**

Les produits de PCR pour chaque polymorphisme ont été digérés par une enzyme de restriction spécifique pour chaque mutation. La composition de milieu réactionnel de la digestion est décrite dans le tableau 17.

Tableau 17 : Composition du milieu réactionnel des digestions enzymatiques des polymorphismes *CYP2C9*2 et CYP2C9*3 du gène CYP2C9*.

Produit	CYP2C9*2 rs1799853 (c.430C>T)	CYP2C9*3 rs1057910 (c.1075A>C)
Enzyme de restriction	<i>AvaII</i> 2U	<i>AvaIII</i> 2U
Tampon	1X	1X
Produit PCR	5 µl	5 µl
Eau Bi distillée	qsp 10µl	qsp 10µl
Température (°C) et temps d'incubation (h)	37 Toute une nuit	37 Toute une nuit

L'ADN amplifié et digéré a été mis en évidence par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2% et une révélation sous UV par BET en présence de marqueurs de poids moléculaire de 25 paires de base (pb) ou de 100 pb selon la longueur des fragments amplifiés.

Les profils électrophorétiques attendus sont décrits dans la figure 29.

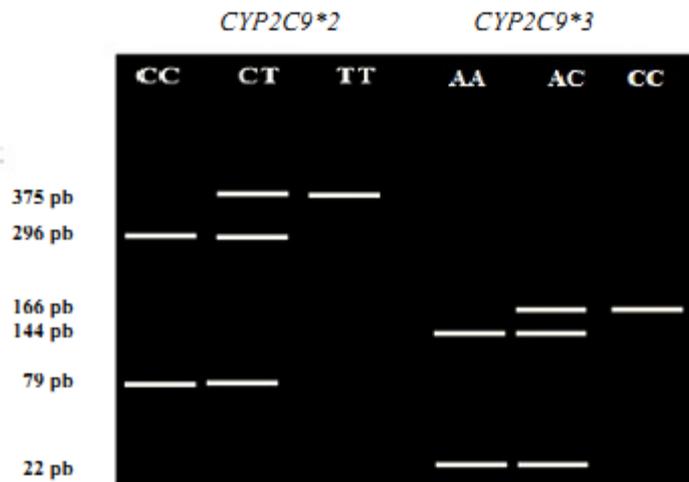


Figure 29: Profils électrophorétique attendus des mutations *CYP2C9*2* et *CYP2C9*3*.
 Polymorphisme *CYP2C9*2* : génotype homozygote normal CC (296+ 79 pb), génotype hétérozygote CT (375+ 296+ 79 pb) et génotype homozygote muté TT (375 pb). Polymorphisme *CYP2C9*3* : génotype homozygote normal AA (144+ 22 pb), génotype hétérozygote AC (166+ 144+ 22 pb) et génotype homozygote muté CC (166 pb).

2.2.6.3. Amplification des polymorphismes des gènes *CYP4F2* et *CALU*

Les protocoles que nous avons utilisés sont ceux décrits par Bejarano-Achache et collaborateurs, 2012 et Gonzalez-Conejero et collaborateurs, 2007 [430, 431]. Ces protocoles ont été optimisés pour chaque polymorphisme et sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18: Milieu réactionnel de la PCR pour les polymorphismes des gènes *CYP4F2* et *CALU*.

Réactifs	Concentrations	
	<i>CYP4F2</i> <i>rs2108622 (g.1347G>A)</i>	<i>CALU</i> <i>rs1043550 (c.29809A>G)</i>
ADN	100ng	100ng
MgCl ₂	1.5 mM	1.7 mM
Tampon	1X	1X
dNTP	0.2 mM	0.2 mM
Amorce sens	0,2 μM	0.4 μM
Amorce anti-Sens	0,2 μM	0.4μM
<i>Taq</i> polymérase	1 U	1U
Eau bidistillée	qsp 25 μL	qsp 25μL

Les programmes optimisés du thermocycleur pour les polymorphismes des gènes *CYP4F2* et *CALU* sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Programme des PCR pour les polymorphismes du gène *CYP4F2* et *CALU*.

Étape	<i>CYP4F2</i> <i>rs2108622</i> (<i>g.1347G>A</i>)	<i>CALU rs1043550</i> (<i>c.29809A>G</i>)
Dénaturation initiale	94 → 5 mn	95 → 5 mn
Dénaturation	94 → 30 sec	95 → 30 sec
Hybridation	60 → 30 sec	60 → 30 sec
Elongation	72 → 1 mn	72 → 3 mn
Elongation finale	72 → 10 mn	72 → 5 mn
	} x 40	} x 35
Produit de PCR attendu (pb)	243	203

▪ **Digestion enzymatiques des produits de PCR**

Les produits de PCR pour chaque polymorphisme ont été digérés par une enzyme de restriction spécifique pour chaque mutation. La composition du milieu réactionnel de la digestion est décrite dans le tableau 20.

Tableau 20: Composition du milieu réactionnel des digestions enzymatiques des polymorphismes des gènes *CYP4F2* et *CALU*.

Produit	<i>CYP4F2</i> <i>rs2108622</i> (<i>g.1347G>A</i>)	<i>CALU</i> <i>rs1043550</i> (<i>c.29809A>G</i>)
Enzyme de restriction	<i>PvuII</i> 2U	<i>SatI</i> 2U
Tampon	1X	1X
Produit PCR	5 µl	5µl
Eau Bidistillée	qsp 10µl	qsp 10µl
Température (°C) et temps d'incubation (h)	37 Toute une nuit	37 Toute une nuit

L'ADN amplifié et digéré a été mis en évidence par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2% et une révélation sous UV par BET en présence de marqueurs de poids moléculaire de 25 paires de base (pb) ou de 100 pb selon la longueur des fragments amplifiés. Les profils électrophorétique attendues sont décrits dans la figure 30.



Figure 30 : Profils électrophorétique attendus des mutations des gènes *CYP4F2* et *CALU*.

Polymorphisme *CYP4F2* : génotype homozygote normal GG (127+ 116 pb), génotype hétérozygote GA (243+ 127+ 116 pb) et génotype homozygote muté AA (243 pb). Polymorphisme *CALU* : génotype homozygote normal AA (148+ 55et 53 pb), génotype hétérozygote AG (148+ 95+ 55+ 53 pb) et génotype homozygote muté GG (95+ 55+ 53 pb).

2.3. Développement de l'application

L'objectif a été de proposer une application simple permettant d'intégrer le patient dans son processus de soins et de renforcer la communication entre le patient et son médecin.

Choix de techniques

➤ La première étape pour définir les modalités techniques, a consisté de décider si l'application proposée doit être sous la forme d'une application à télécharger sur le Smartphone ou alors un site web capable de s'adapter à différents médias.

Nous avons choisi une application androïde pour deux raisons principales :

La majorité des patients ont des Smartphones.

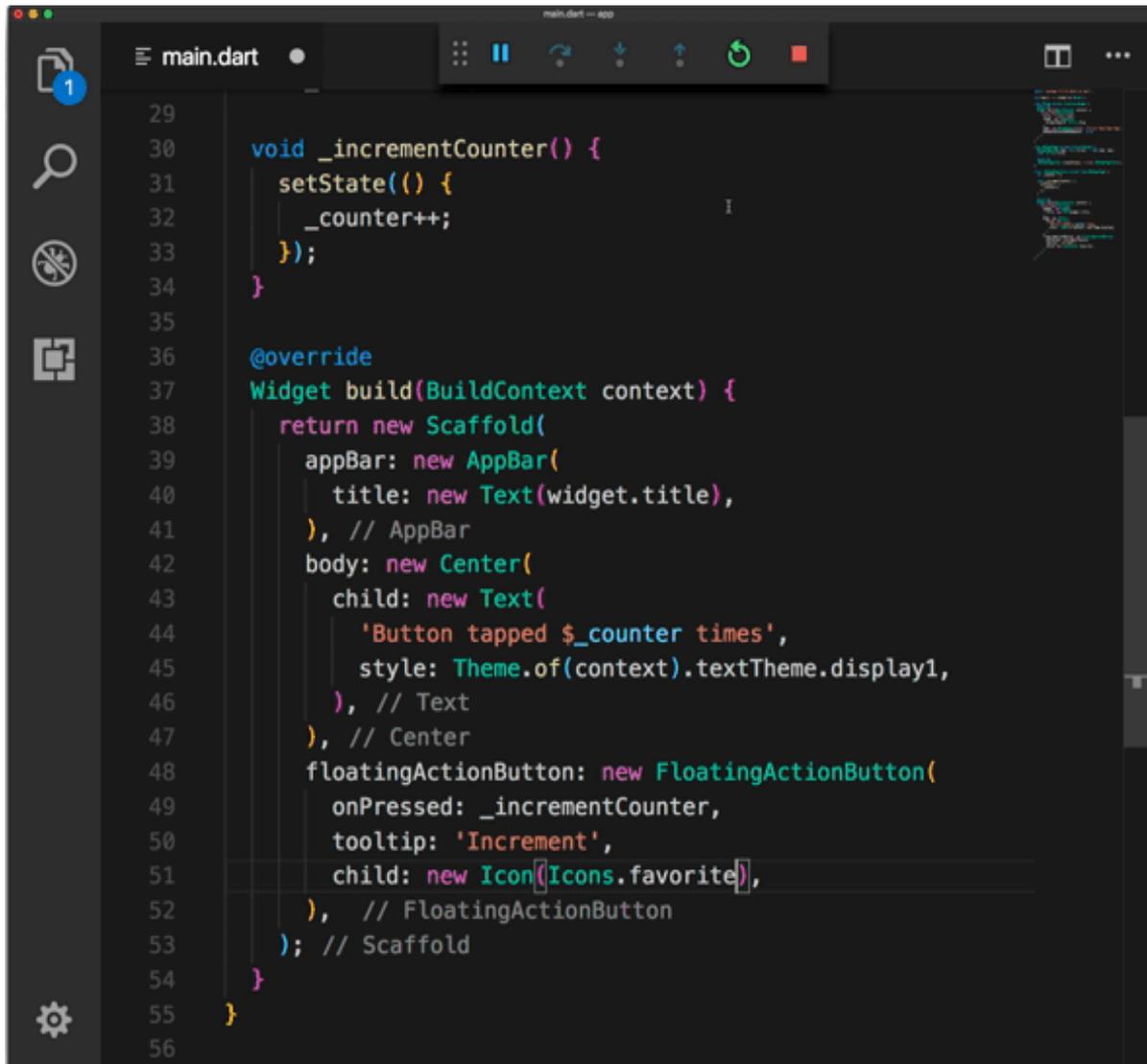
➤ La deuxième raison était purement financière. En effet, une application androïde coûte 4 fois moins chère qu'une application IOS.

Par la suite, le choix du langage de développement de l'application a été réalisé en concertation avec un expert en informatique.

Pour ce travail, nous avons donc choisi un langage moderne. Il s'agit de la nouvelle technologie Flutter (figure 31).

Flutter est un projet open source développé par Google. Il s'appuie sur le langage de programmation DART, lancé en 2011. Flutter est un Framework capable de faire du développement multiplateforme. Il présente plusieurs avantages :

- ✓ Une maintenance accélérée et optimisée : Les corrections de bugs sont rapides et régulières.
- ✓ Simplicité des mises à jour
- ✓ Sécurité des données
- ✓ Le temps de développement est limité par rapport à d'autres programmes.



```
29
30 void _incrementCounter() {
31   setState(() {
32     _counter++;
33   });
34 }
35
36 @override
37 Widget build(BuildContext context) {
38   return new Scaffold(
39     appBar: new AppBar(
40       title: new Text(widget.title),
41     ), // AppBar
42     body: new Center(
43       child: new Text(
44         'Button tapped $_counter times',
45         style: Theme.of(context).textTheme.display1,
46       ), // Text
47     ), // Center
48     floatingActionButton: new FloatingActionButton(
49       onPressed: _incrementCounter,
50       tooltip: 'Increment',
51       child: new Icon(Icons.favorite),
52     ), // FloatingActionButton
53   ); // Scaffold
54 }
55 }
56
```

Figure 31 : Capture d'écran programme flutter.

2.4. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel SPSS version 23, et pour la partie génétique par SNP Analyzer 2.0.version.

Les variables quantitatives ont été représentées sous forme de moyennes et d'écart type.

Les variables qualitatives ont été exprimées en pourcentage.

La distribution gaussienne des résultats quantitatifs a été vérifiée par les tests *SHAPIRO-WILK* et *Kolmogorov-Smirnov*.

Si la distribution des résultats quantitatifs est gaussienne, nous avons utilisé les tests paramétriques, dans le cas contraire les tests non paramétriques ont été utilisés.

Les tests non paramétriques qui ont été utilisés sont le test de *Mann et Whitney* et *Wilcoxon* pour les variables binaires et le test de *Kruskall-Wallis* pour les variables qualitatives à plus de deux modalités.

Concernant la partie génétique, avant toute analyse statistique, il est important d'évaluer l'équilibre de Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)) pour éviter des erreurs importantes dues à un biais de génotypage ou de sélection. Pour vérifier que notre population est en équilibre d'Hardy-Weinberg, nous avons utilisé le test du χ^2 standard. Cette évaluation classique du χ^2 est possible lorsque les effectifs sont supérieurs à 5. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'utiliser le χ^2 corrigé, soit avec la correction de Yates (effectif inférieur à 5) soit avec la correction de Fisher (effectif inférieur à 3).

Si le degré de significativité (p-value) indiqué est $< 0,05$, cela permet de conclure que notre population d'étude n'est pas en équilibre d'Hardy-Weinberg. Cette valeur a été déterminée pour les cohortes de construction et de validation de l'algorithme pharmacogénétique.

L'analyse de régression linéaire univariée a été utilisée pour déterminer l'influence de chaque variable indépendante (génétique et non génétique) sur la variable dépendante (dose quotidienne transférée en forme logarithmique).

Pour la construction de l'algorithme, nous avons appliqué une régression linéaire multiple selon les modèles pas à pas « *STEPWISE* » sur la cohorte dérivée en considérant le log de la dose moyenne d'équilibre comme variable dépendante et toutes les variables ayant montrées

une association significative lors des analyses univariées qui ont précédé comme variables indépendantes.

Log Dose prédite = intercept + somme Beta (variable) * valeur (variable).

Nous avons également calculé R-deux (R^2) et les betas (β) pour évaluer l'effet des différentes variables sur la dose d'équilibre.

Pour tous les tests, une valeur p inférieure à 0,05 est considérée statistiquement significative.

Résultats

1. Développement de l'algorithme prédictif de la posologie d'équilibre d'Acénocoumarol

1.1. Analyse descriptive de la population d'étude

Cent patients recrutés à partir du service de cardiologie du CHU de Sétif recevant une dose d'équilibre en Acénocoumarol, ont été inclus dans notre étude.

1.1.1. L'âge

L'âge moyen était de $54,5 \pm 16$ ans avec des extrêmes allant de 18 à 84 ans. 66% de nos patients avait moins de 65ans (Figure 32).

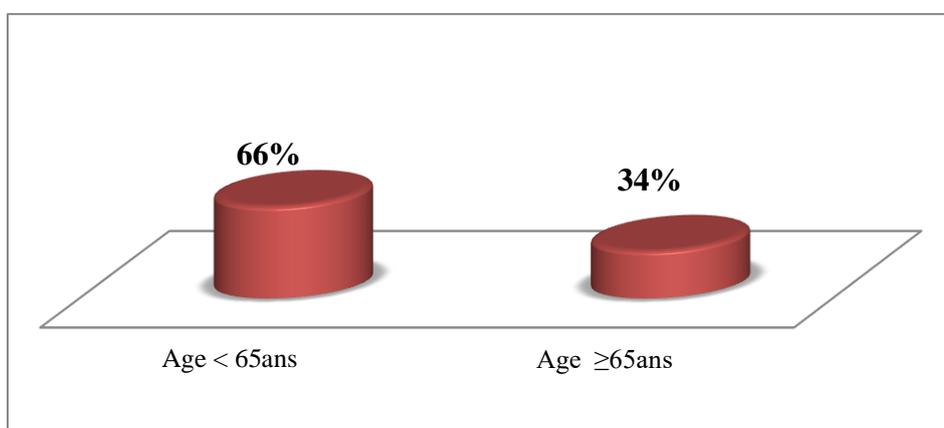


Figure 32 : Répartition des patients selon deux tranches d'âge.

1.1.2. Le sexe

La répartition selon le sexe est illustrée dans la figure 32. Nous soulignons une prédominance féminine avec un sex-ratio (M/F) de 0.75.

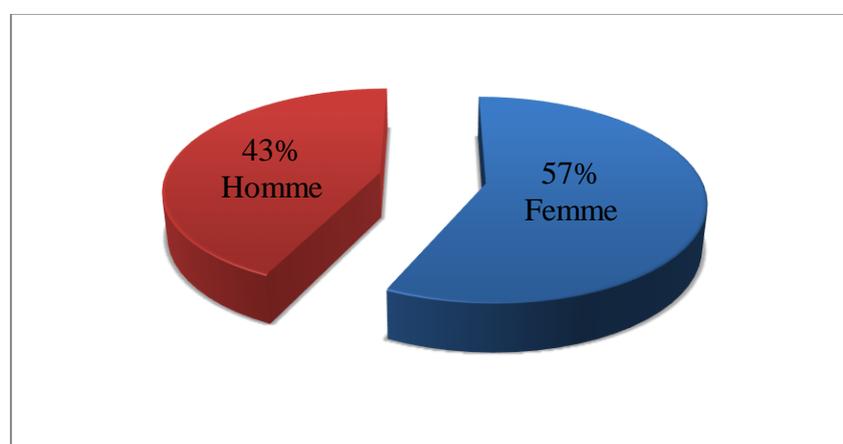


Figure 33 : Répartition des patients selon le sexe.

1.1.3. Indications de l'Acénocoumarol

Cet anticoagulant était indiqué pour (Figure 34) :

- La fibrillation auriculaire chez 23% des patients ;
- La maladie thromboembolique veineuse chez 58% des patients;
- Les remplacements valvulaires chez 19% des patients.

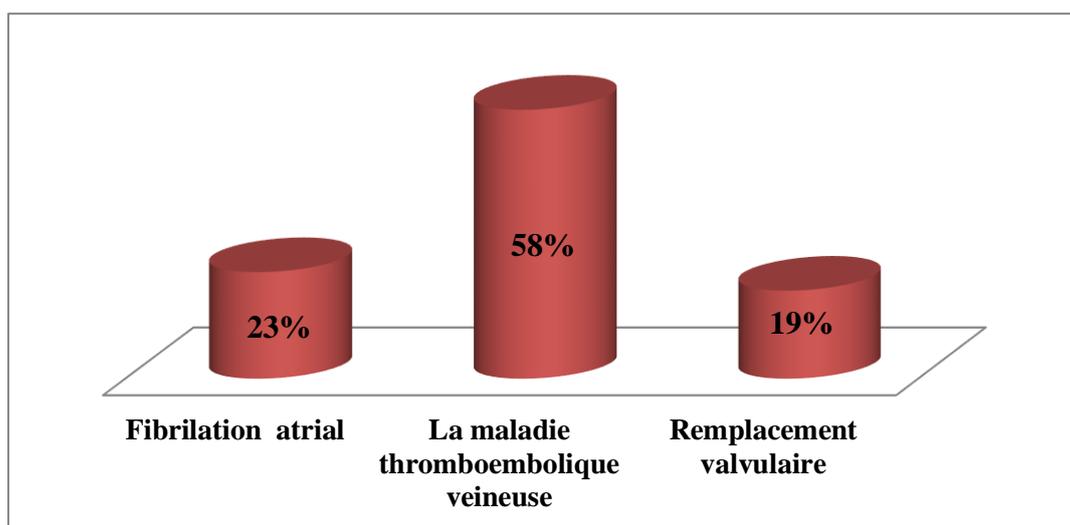


Figure 34 : Répartition des patients selon les indications de l'Acénocoumarol.

1.1.4. Les comorbidités

Parmi les facteurs de risques cardiovasculaires associés nous avons trouvé principalement l'hypertension artérielle chez 37% des patients (Figure 35).

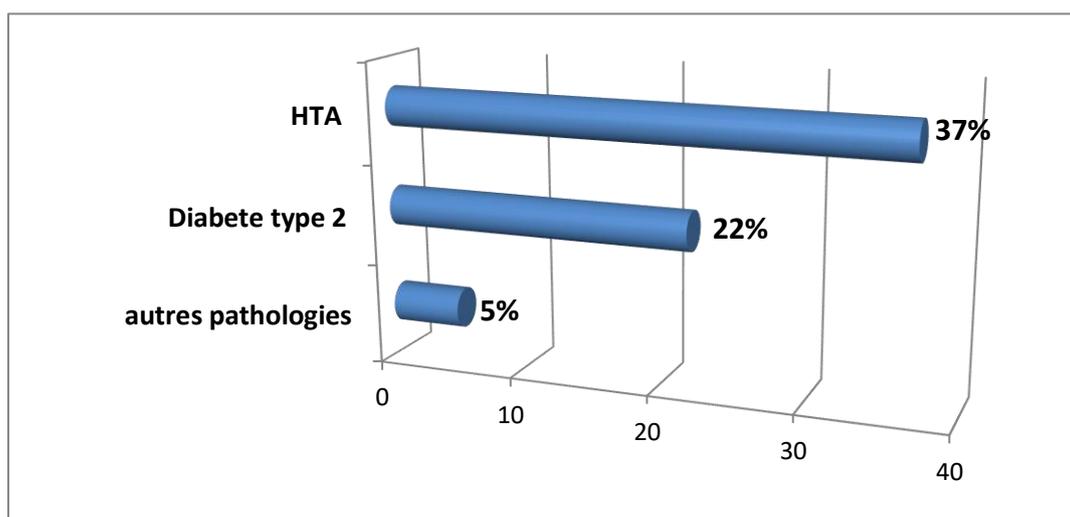


Figure 35: Répartition des patients selon les comorbidités.

1.1.5. La comédication

Entre les 100 patients de la série, 22 patients étaient sous Amiodarone et 16 sous statine (Figure 36).

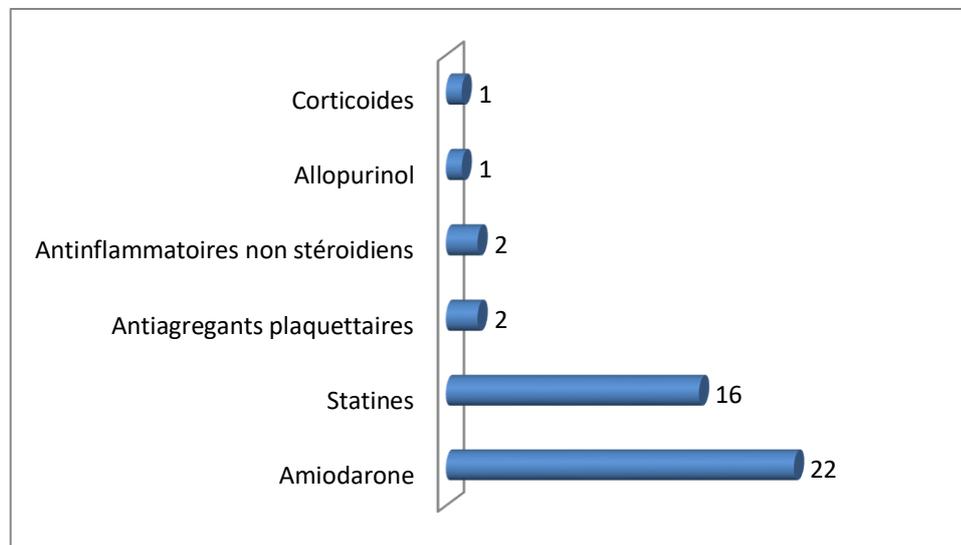


Figure 36 : Répartition des patients selon les médicaments interagissant avec l'Acénocoumarol.

1.1.6. La dose d'équilibre d'Acénocoumarol

La dose d'équilibre d'Acénocoumarol correspond à la posologie d'Acénocoumarol pendant la période de stabilisation. Cette dernière se définit comme étant les trois mesures consécutives d'INR dans l'intervalle thérapeutique. Ces trois dosages d'INR devaient s'étendre sur une période d'au moins 14 jours.

Durant notre étude nous avons retrouvé une moyenne des doses observées égale à $2,96 \pm 1,94$ mg/jour avec une valeur minimale de 1mg et une valeur maximale de 16mg (Figure 37).

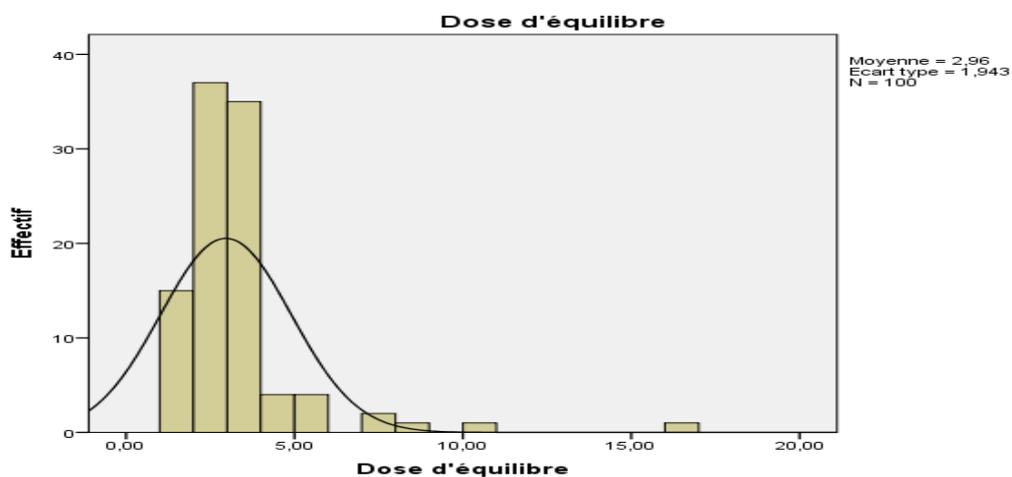


Figure 37 : Distribution des doses d'équilibre.

1.2. Analyse des facteurs influençant la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

1.2.1. Les facteurs non génétiques

Les résultats de l'influence des facteurs non génétique sur la dose d'équilibre en Acénocoumarol sont représentés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Résultats de l'analyse unie variée des facteurs non génétiques évalués dans notre étude.

Variables	Moyenne± ET [Min-Max] /n (%)	P value
Age	54,5±16,42 [18-84]	0.004
Taille	1,65±0,08 [1,50-1,85]	0,267
Poids	74,97±15,85 [45-130]	0.017
Indice de masse corporel	27,58±6,49 [17,85-57,77]	0,070
Sexe		
* Homme	43 (43)	0,927
* Femme	57 (57)	
Les indications		
* Fibrillation atrial	23 (23)	0,407
* La maladie thromboembolique	58 (58)	
* Remplacement valvulaire	19 (19)	
INR Cible (Zone thérapeutique)		
* INR [2-3]	81 (81)	0,331
* INR [2,5-3,5]	19 (19)	
* INR [3-4]	0	
Consommation de Tabac	11 (11)	0,495
Consommation alcool	0 (0)	
Activité sportive	05 (5)	0,414
Co morbidité		
* HTA	37 (37)	0 ,024
* DIABETE	22 (22)	0,80
* Autres pathologies	5 (5)	NS
Co médication		
* Amiodarone	22 (22)	0,109
* Statines	16 (16)	0,27
* Antiagrégants plaquettaires	2 (2)	0,55
* antiinflammatoiresnonstéroïdien	2 (2)	0,55
* allopurinol	1 (1)	0,58
* Corticoides	1 (1)	0,58
* Autres traitement		
Furosémide	37 (37)	NS
Insuline	22 (22)	
Captopril	3 (3)	

p value de <0.05 est considérée significative.

1.2.2. Influence des facteurs cliniques statistiquement significatifs

1.2.2.1. L'Age

L'âge est négativement corrélé avec la dose d'équilibre : $r = -0.26$; $p = 0,004$; c'est à dire plus l'âge augmente plus la dose diminue. En effet, pour la tranche d'âge supérieur ou égale à 65ans la moyenne de la dose d'équilibre était de $2,49 \pm 1,13$ mg/jours, alors que pour la tranche d'âge inférieur à 65ans la moyenne de dose d'équilibre était $3,23 \pm 2,23$ mg /jour (Figure 38).

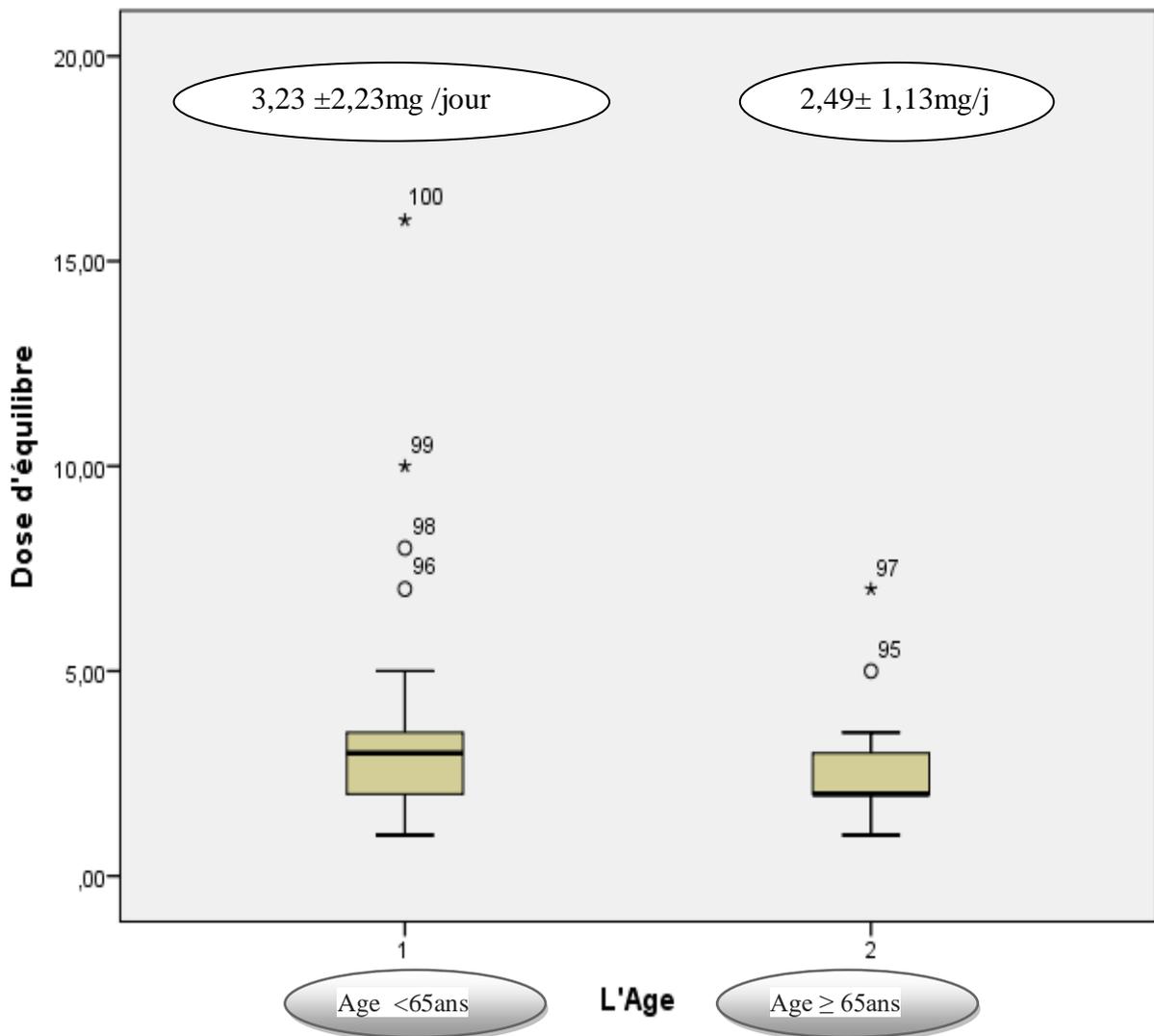


Figure 38 : Diagramme en boîte de la dose d'équilibre selon les deux tranches d'âge.

1.2.2.2. Le poids

Le poids était corrélé positivement avec la dose d'équilibre : $r=0,23$; $p=0,017$ (Figure 39).

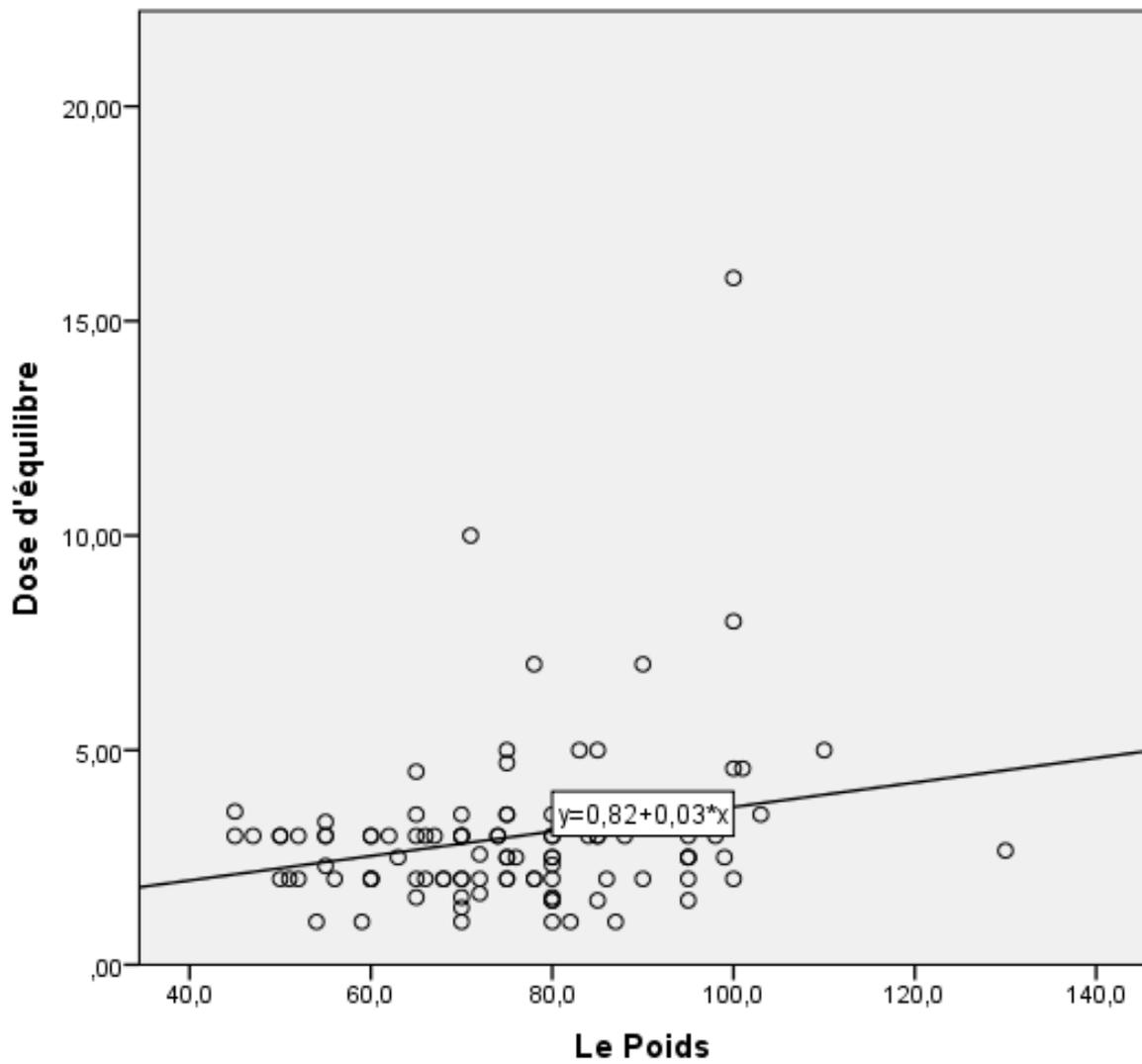


Figure 39: Corrélation poids-dose à l'équilibre d'Acénocoumarol.

1.2.2.3. Hypertension artérielle

Les patients qui ont une HTA ont nécessité des doses plus faibles ($2,41 \pm 0,77 \text{ mg/j}$) par rapport aux patients qui n'ont pas d'HTA ($3,26 \pm 2,29 \text{ mg/j}$) (Figure 40).

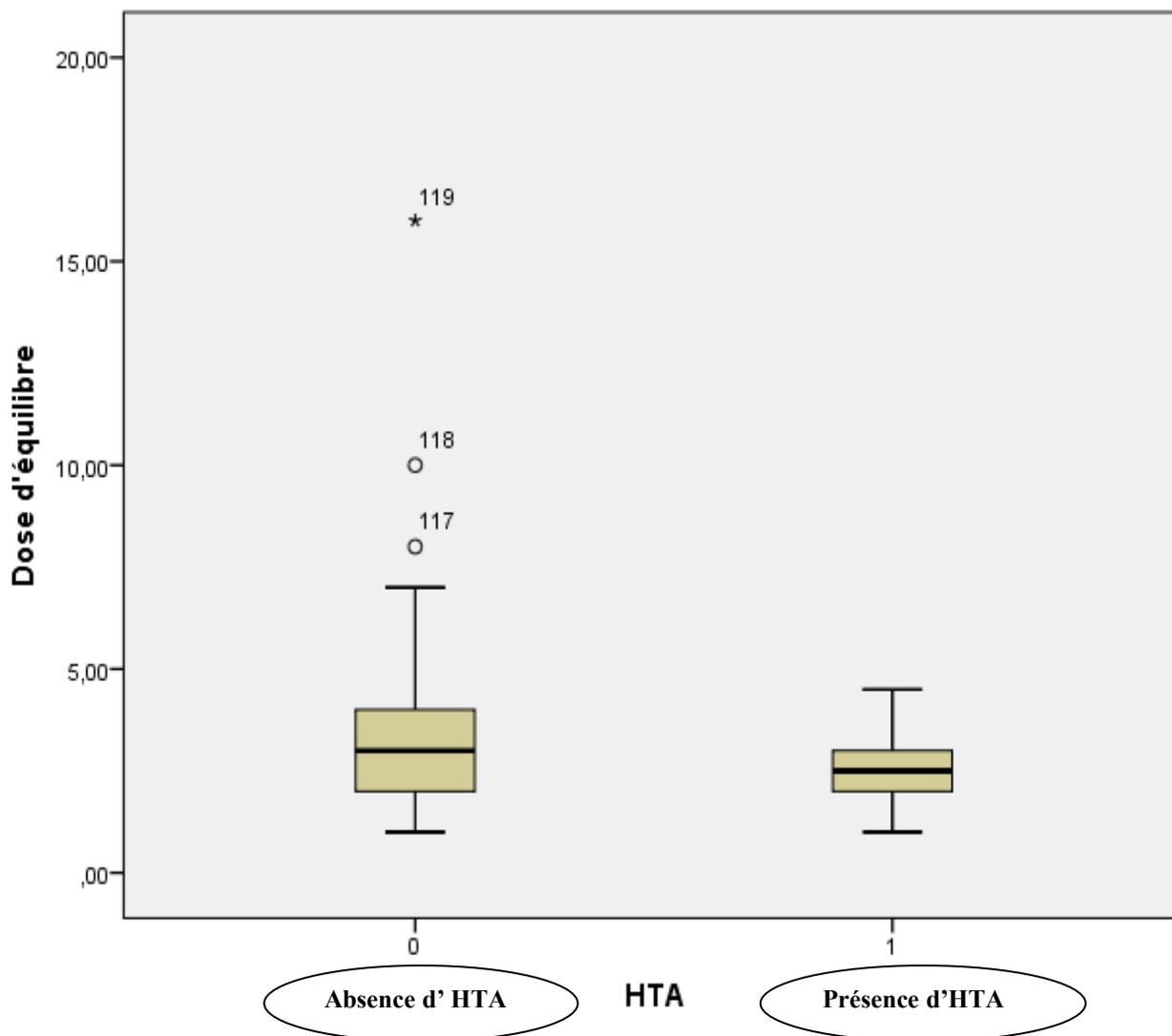


Figure 40 : Diagrammes en boîte de la dose d'équilibre selon présence ou l'absence de l'HTA.

1.2.3. Influence des facteurs génétiques

1.2.3.1. Quantification de l'ADN génomique

Les résultats de quantification de l'ADN génomique extrait à partir des échantillons de sang, et dosé par spectrophotométrie sont représentés dans l'annexe 5.

1.2.3.2. Résultats de la PCR-RFLP

Les 100ADN extraits ont été génotypés par PCR-RFLP pour huit SNPs :

- ✓ *VKORC1**2 (rs9923231)
- ✓ *VKORC1**intron1 (rs9934438)
- ✓ *VKORC1**3 (rs7294)
- ✓ *VKORC1**4 (rs17708472)
- ✓ *CYP2C9**2 (rs1799853)
- ✓ *CYP2C9**3 (rs1057910)
- ✓ *CYP4F2* (rs1558139)
- ✓ *CALU* (rs1043550)

Les résultats de la PCR montrent les gènes amplifiés sous forme de bandes fluorescentes sur gel d'agarose après l'électrophorèse. Ils sont présentés sous forme d'images de gel prises à partir du Syngene[™] Transilluminateur LED Imager.

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme *VKORC1**2 (rs9923231) est présenté dans la figure 41.

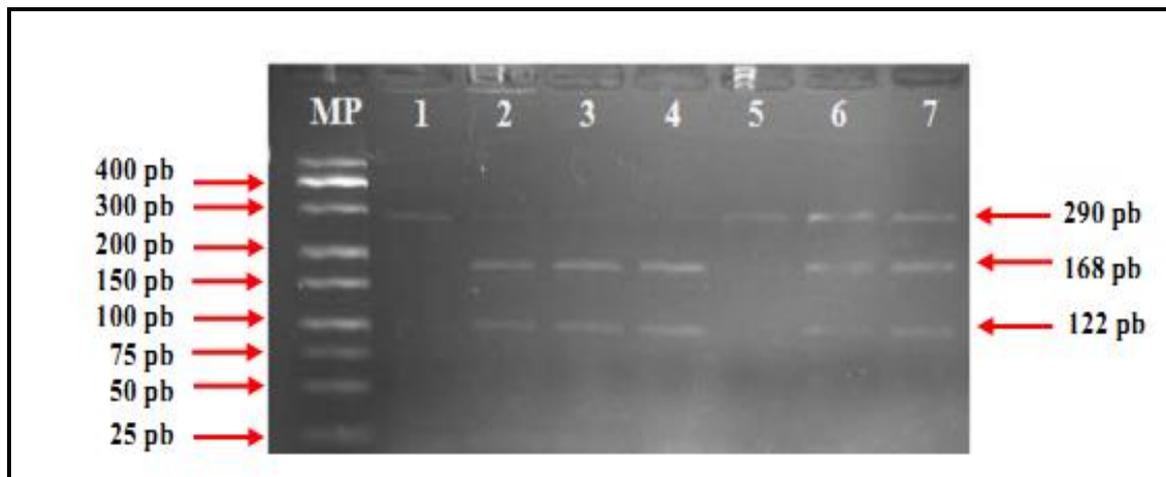


Figure 41 : Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme *VKORC12 du gène *VKORC1*.**

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 25 pb;
 Puits 1 et 5 : génotype homozygote muté AA (290 pb);
 Puits : 2, 3 et 4 : génotype homozygote normal GG (168+ 122 pb); Puits 6
 et 7: génotype hétérozygote GA (290+ 168+ 122 pb).

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme *VKORC1**intron1 (rs9934438) est présenté dans la figure 42.

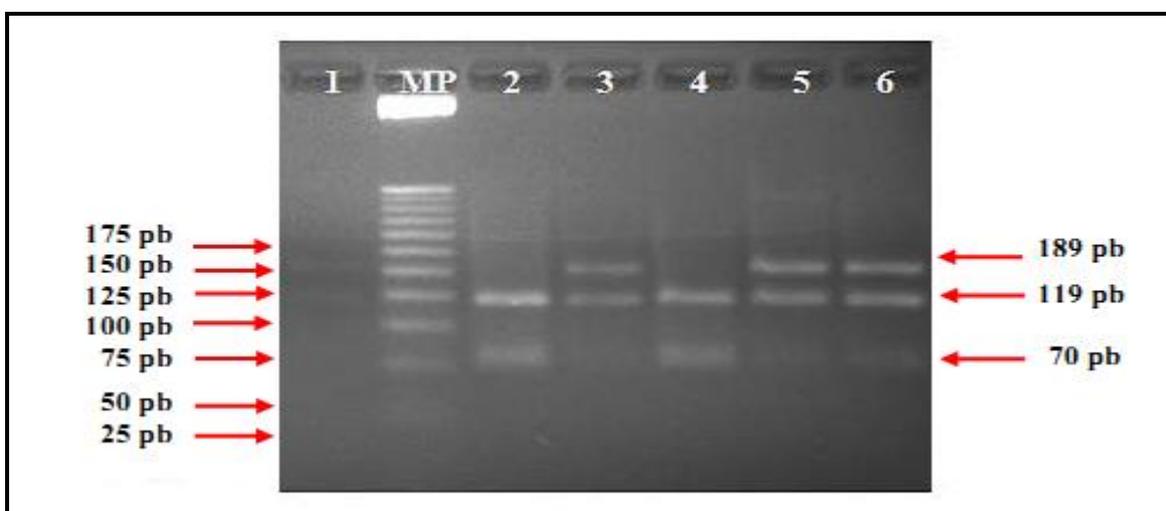


Figure 42: Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme *VKORC1intron1 du gène *VKORC1*.**

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 25 pb;
 Puits 2 et 4 : génotype homozygote normal CC (119+ 70 pb);
 Puits : 3, 5 et 6 : génotype hétérozygote CT (189+ 119+ 70 pb);
 Puits 1: génotype homozygote muté TT (189 pb).

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme *VKORC1**3 (rs7294) est présenté dans la figure 43.

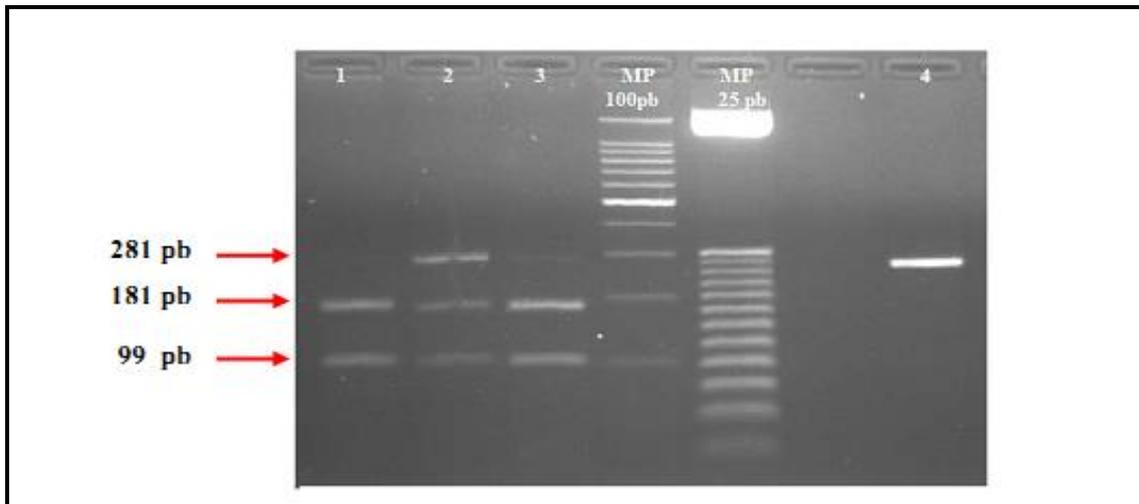


Figure 43 : Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme *VKORC13 du gène *VKORC1*.**

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 100 et 25 pb;
 Puits 1 et 3 : génotype homozygote normal GG (181+99 pb);
 Puits 2 : génotype hétérozygote GA (281+ 181+ 99 pb);
 Puits 4: génotype homozygote muté AA (281 pb).

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme *VKORC1**4 (rs17708472) est présenté dans la figure 44.

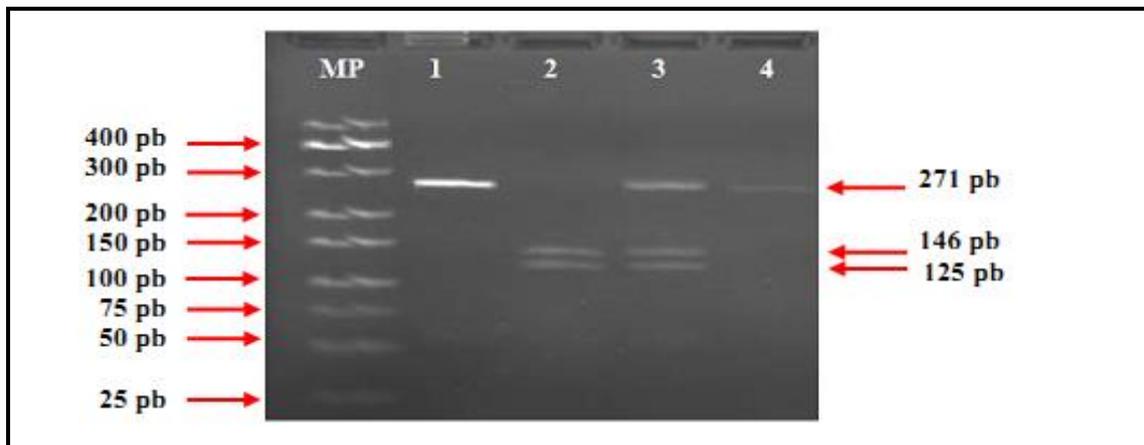


Figure 44: Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme *VKORC14 du gène *VKORC1*.**

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 25 pb;
 Puits 1 et 4 : génotype homozygote normal CC (271 pb);
 Puits 3 : génotype hétérozygote CT (271+ 146+ 125 pb); Puits 2:
 génotype homozygote muté TT (146+ 125 pb).

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme *CYP2C9**2 (rs1799853) est présenté dans la figure 45.

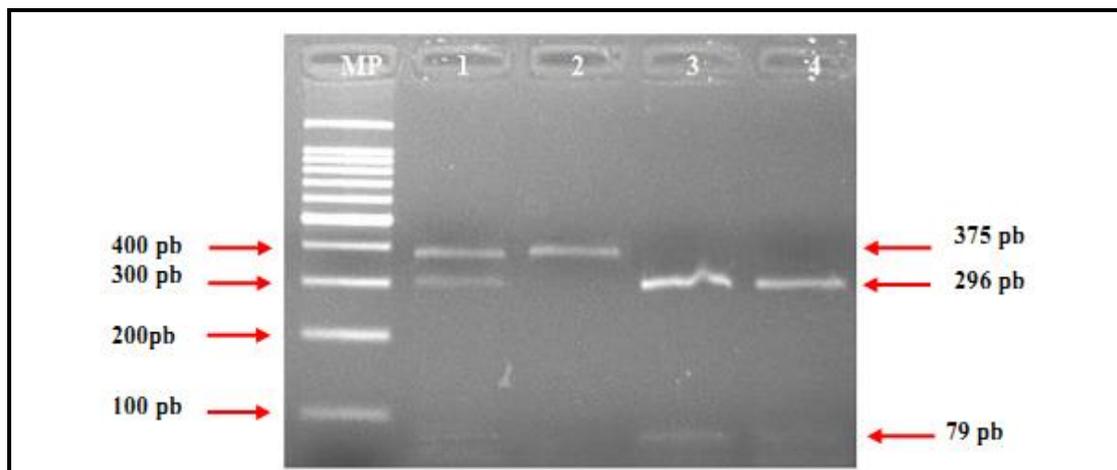


Figure 45 : Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme *CYP2C92 du gène *CYP2C9*.**

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 100 pb;
 Puits 1: génotype hétérozygote CT (375+ 296+ 79 pb);
 Puits 2 : génotype homozygote muté TT (375 pb);
 Puits 3 et 4: génotype homozygote normal CC (296+ 79 pb).

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme *CYP2C9**3 (rs1057910) est présenté dans la figure 46.

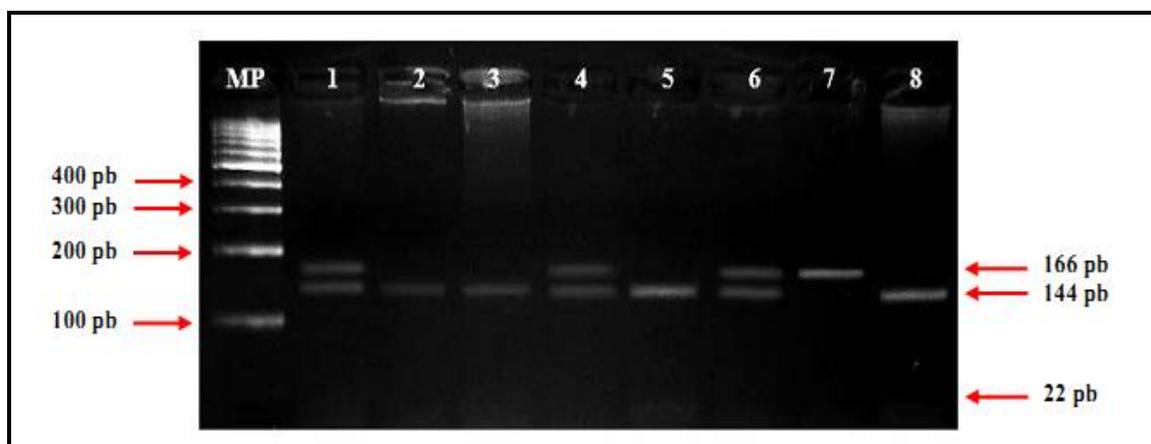


Figure 46 : Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme *CYP2C93 du gène *CYP2C9*.**

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 100 pb;
 Puits 2, 3, 5 et 8 : génotype homozygote normal AA (144+ 22pb);
 Puits : 1, 4 et 6 : génotype hétérozygote AC (166+ 144+ 22 pb);
 Puits 7: génotype homozygote muté CC (166 pb).
 La bande 22 pb n'est pas toujours visible sur le gel.

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme c.1347G>A du gène *CYP4F2* est présenté dans la figure 47.

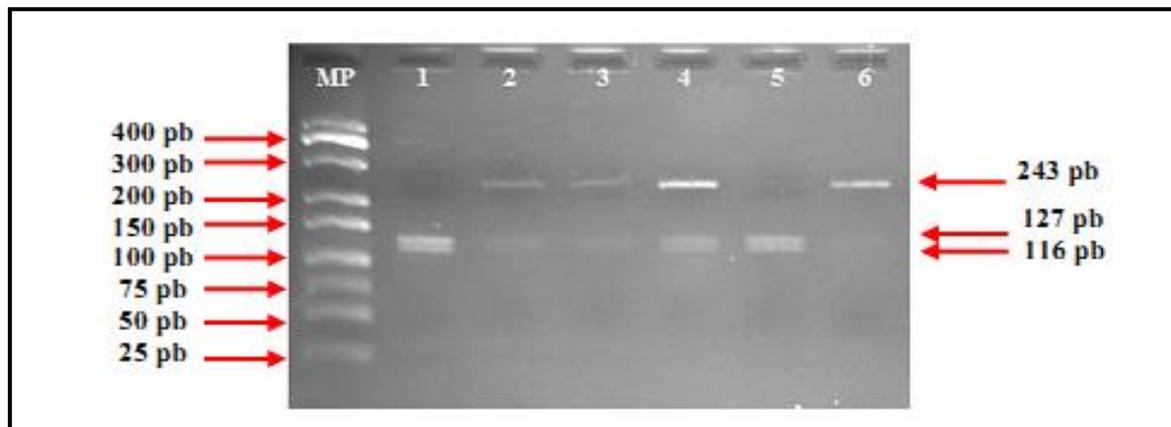


Figure 47 : Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme 1347G>A du gène *CYP4F2*.

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 25 pb;
 Puits 1 et 5 : génotype homozygote normal GG (127+ 116 pb);
 Puits : 2, 3 et 4 : génotype hétérozygote GA (243+ 127+ 116 pb);
 Puits 6: génotype homozygote muté AA (243 pb).

- Le profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique du polymorphisme c.29809A>G du gène *CALU* est présenté dans la figure 48.

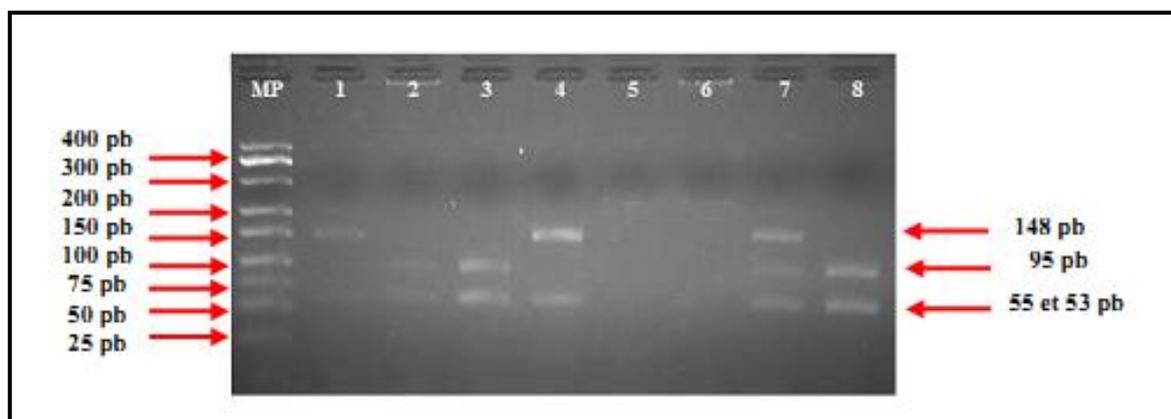


Figure 48: Révélation de la PCR-RFLP du polymorphisme 29809A>G du gène *CALU*.

(MP) : marqueur de poids moléculaire de 25 pb;
 Puits 1 et 4 : génotype homozygote normal AA (148+ 55et 53 pb);
 Puits : 2, 3 et 8 : génotype homozygote muté GG (95+ 55+53 pb);
 Puits 7: génotype hétérozygote AG (148+ 95+ 55+ 53 pb).

1.2.3.3. Évaluation de l'équilibre de Hardy-Weinberg des fréquences alléliques de la cohorte

La première étape du traitement des données génotypiques de notre étude a été l'évaluation de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Pour vérifier ce dernier, nous avons utilisé le test du χ^2 qui mesure l'écart entre les fréquences observées et les fréquences théoriques des fréquences alléliques et génotypiques.

Les résultats du test de χ^2 (Tableau 22) ont montré que toutes les probabilités étaient supérieures à 5 % (entre 5,5 et 50 %) de même pour les *p value* avaient des valeurs > 0.05. Ceci permet d'accepter l'hypothèse H_0 , soit que les fréquences alléliques sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Tableau 22 : Évaluation de l'équilibre de Hardy-Weinberg des fréquences alléliques de la cohorte au moyen du test du chi-deux (χ^2).

Polymorphisme génétique	Mutation (substitution)	Allèles		Fréquences génotypiques observées n(%)	Fréquences génotypiques attendu n(%)	*EHW Test de χ^2	
		Nb	Fréq			<i>p value</i>	Probabilité <i>ddl=1</i> (%)
VKORC1*2 (G-1639A)	G>A	G= 75 A=125	G= 0.38 A= 0.62	GG=14 (14) GA=47 (47) AA=39 (39)	GG=15 (15) GA=47 (47) AA=38 (38)	1	50
VKORC1*intro n1 (c.1173C>T)	C>T	C=118 T= 82	C= 0,59 T= 0,41	CC=28 (28) CT=62 (62) TT=10 (10)	CC=34 (34) CT=50 (50) TT=16 (16)	0.153	7.6
VKORC1*3 (G9041A)	G>A	G=167 A=33	G= 0.8 A= 0.16	GG=72 (72) GA=23 (23) AA=05 (05)	GG=71 (71) GA=26 (26) AA=03 (03)	0.139	6.5
VKORC1*4 (C6009T)	C>T	C=170 T= 30	C= 0.85 T= 0.15	CC=74 (74) CT=22 (22) TT=04 (04)	CC=72 (72) CT=25 (25) TT=03 (03)	0.225	11
CYP2C9*2 (C430T)	C>T	C=146 T= 54	C= 0.73 T= 0.27	CC=51 (51) CT=44 (44) TT=05 (05)	CC=53 (53) CT=40 (40) TT=07 (07)	0.320	16
CYP2C9 *3 (A1075C)	A>C	A=155 C= 45	A= 0.78 C= 0.22	AA=66 (66) AC=23 (23) CC=11 (11)	AA=60 (60) AC=35 (35) CC=05 (05)	0.110	5.5
CYP4F2*3 (g.1347G>A)	G>A	G=121 A= 79	G= 0.60 A= 0.4	GG=30 (30) GA=61 (61) AA=09 (09)	GG=36 (36) GA=50 (50) AA=14 (14)	0.115	6.5
CALU (c.29809A>G)	A>G	A=107 G=29	A= 0.79 G= 0.21	AA=43 (63) AG=21 (31) GG=04 (06)	AA=42 (62) AG=22 (32) GG=04 (06)	0.48	24

1.2.3.4. Distribution génotypique et alléliques des polymorphismes des gènes : *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2*, *CALU* et leur impact sur la dose d'équilibre journalière d'Acénocoumarol

Cette étude a abouti à la caractérisation des trois génotypes pour les polymorphismes : *VKORC1*2* (g.-1639 G>A), *VKORC1*3* (c.9041G>A), *VKORC1*4* (c.6009 C>T), *VKORC1*intron1* (c.1173C>T), *CYP2C9*2* (c.430C>T), *CYP2C9*3* (c.1075A>C), *CYP4F2* (g.1347G>A), *CALU* (c.29809A>G).

Les génotypes des huit variantes et leurs profils alléliques correspondants sont présentés dans le tableau 23.

En ce qui concerne, les fréquences alléliques des variantes mutés (*VKORC1*2*, *VKORC1*3*, *VKORC1*4*, *VKORC1*intron1*, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP4F2 G>A* et *CALU A>G*) dans le groupe étudié, il semble que la majorité des patients inclus dans cette étude sont porteurs de l'allèle sauvage pour les trois variantes *VKORC1*3*, *VKORC1*4*, *VKORC1*intron1*, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP4F2 G>A* et *CALU A>G* avec les fréquences de 80%, 85%, 59%, 73%, 78%, 60%, et 79% respectivement. Cependant, l'allèle muté est plus représentatif pour les variantes *VKORC1*2* avec une fréquence de 62%.

L'étude de l'impact de ces polymorphismes génétiques sur la dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol a montré que seuls les polymorphismes *VKORC1*2* (g.-1639 G>A), *VKORC1*3* (c.9041G>A), *VKORC1*4* et *CYP2C9*3* avaient une association statistiquement significative et ils ont été retenus dans l'analyse multi variée.

Par contre, les polymorphismes *VKORC1*intron1*, *CYP2C9*2*, *CYP4F2 G>A* et *CALU A>G* n'avaient aucun effet statistiquement significatif sur la dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol.

Tableau 23: Distribution génotypique et allélique des SNP des *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2*, et *CALU* et leur relation avec la dose journalière (mg) d'Acénocoumarol.

Polymorphismes génétiques	Génotypes	Nombre de patients (%)	Fréquences alléliques	Dose moyenne d'équilibre (mg/jour) ± DS (95% CI)	P-value*
<i>VKORC1</i>*2 <i>rs9923231</i> (g.-1639 G>A)	GG	14 (14)	G 0.38	4.58 ± 1	0.0001
	GA	47 (47)	A 0.62	3.27± 0.21	
	AA	39 (39)		2.01± 0.11	
<i>VKORC1</i>*3 <i>rs7294</i> (c.9041G>A)	GG	72 (72)	G 0.84	2.69 ±0.21	0.001
	GA	23 (23)	A 0.16	3.17 ±0.42	
	AA	5 (5)		5.91 ± 0.67	
<i>VKORC1</i>*4 <i>rs17708472</i> (c.6009 C>T)	CC	74 (74)	C 0.85	2.8 ± 0.22	0.044
	CT	22 (22)	T 0.15	3.1 ± 0.34	
	TT	04 (4)		5.25± 1.65	
<i>VKORC1</i>*intron1 <i>rs9934438</i> (c.1173C>T)	CC	28 (28)	C 0.59	3.52 ± 0.52	0.18
	CT	62 (62)	T 0.41	2.79 ± 0.2	
	TT	10 (10)		2.48 ± 0.17	
<i>CYP2C9</i>*2 <i>rs1799853</i> (c.430C>T)	CC	51 (55)	C 0,73	3.22 ± 0.33	0.38
	CT	44 (44)	T 0,27	2.67 ± 0.21	
	TT	5 (5)		2.86 ± 0.52	
<i>CYP2C9</i>*3 <i>rs1057910</i> (c.1075A>C)	AA	66 (66)	A 0.78	2.86 ± 0.16	0.04
	AC	23 (23)	C 0.22	3.71± 0.68	
	CC	11 (11)		1.99 ± 0.18	
<i>CYP4F2</i> <i>rs1558139</i> (g.1347G>A)	GG	30 (30)	G 0.6	3.08± 0.51	0.77
	GA	61 (61)	A 0.4	2.86± 0.18	
	AA	9 (9)		3.29± 0.6	
<i>CALU</i> <i>rs1043550</i> (c.29809A>G)	AA	43 (63)	A 0.79	3.08 ± 0.36	0.62
	AG	21 (0.31)	G 0.21	3.44± 0.5	
	GG	4 (0.06)		2.27± 0.33	

1.3. Etude de l'impact des polymorphismes génétiques sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

1.3.1. Effet du polymorphisme *VKORC1**2 -1639G>A sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

L'étude de l'effet du polymorphisme *VKORC1*- 1639G>A sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol a montré qu'il l'impact de façon significative ($p=0,0001$) (Tableau 23). Effectivement, les porteurs du génotype homozygote sauvage GG du polymorphisme *VKORC1*-1639 recevaient une dose journalière moyenne d'Acénocoumarol significativement plus élevée ($4,58\text{mg} \pm 1$) comparés aux porteurs de génotype hétérozygote GA ($3,27\text{mg} \pm 0,21$) et aux porteurs du génotype double muté AA ($2,01\text{mg} \pm 0,11$) (Figure 49).

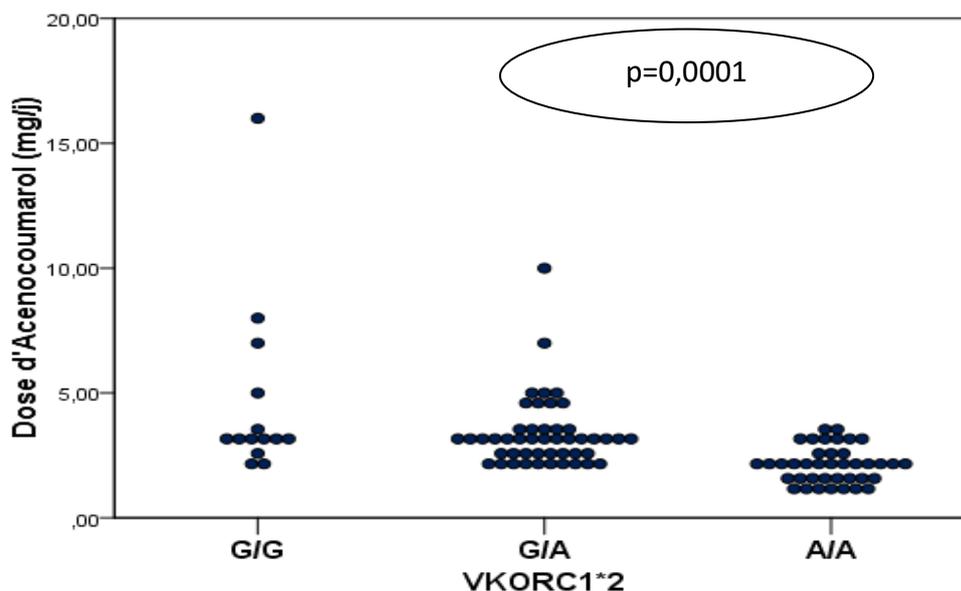


Figure 49 : Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du *VKORC1* 1639G>A.

GG : génotype homozygote sauvage
 GA : génotype hétérozygote
 AA : génotype homozygote muté

1.3.2. Effet du polymorphisme *VKORC1*intron1* (c.1173C>T) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

Pour ce polymorphisme, il n'a pas été observé de différence statistiquement significative entre la dose d'équilibre d'Acénocoumarol et les différents génotypes observés (Figure 50).

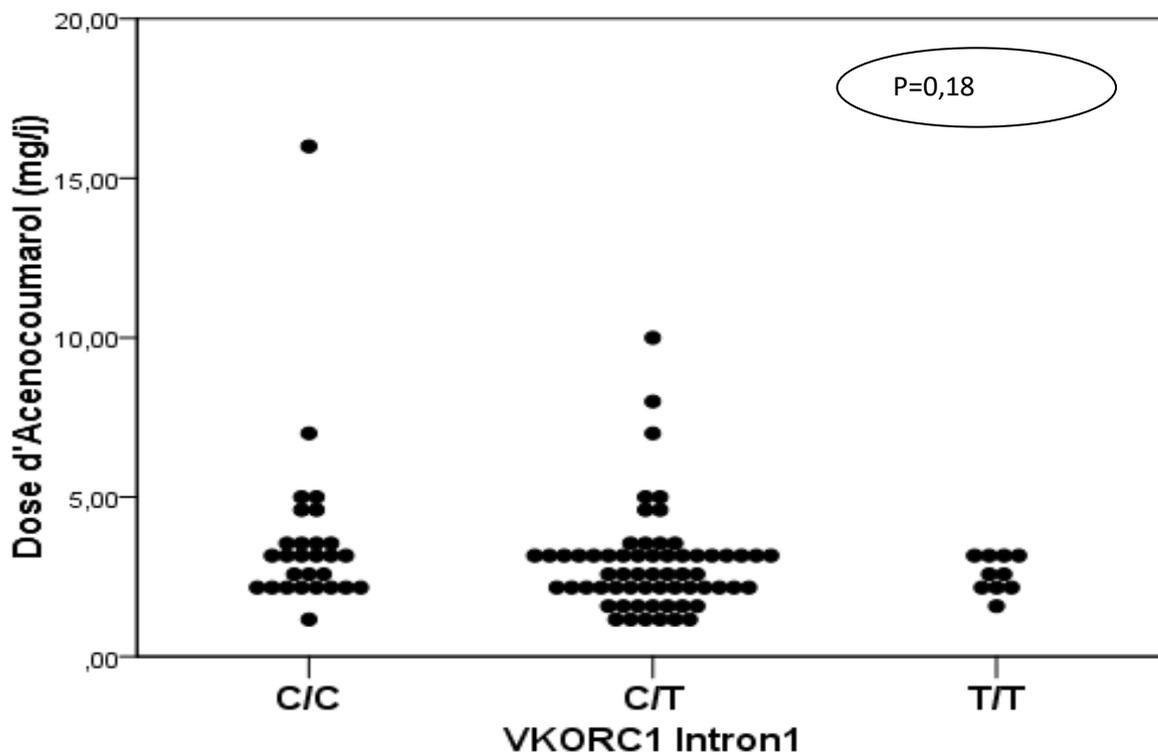


Figure 50: Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du *VKORC1*intron1*.

- CC: génotype homozygote sauvage
- CT : génotype hétérozygote
- TT : génotype homozygote muté

1.3.3. Effet du polymorphisme *VKORC13 (c.9041G>A) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol**

A l'opposé du SNP *VKORC1* -1639G>A, les porteurs du génotype double muté AA du polymorphisme *VKORC1**3 (c.9041G>A) reçoivent une dose journalière moyenne d'Acénocoumarol significativement plus élevée AA (5,91mg±0,67) comparés aux porteurs de génotype hétérozygote GA (3,17mg ± 0,42) et ceux du génotype sauvage GG (2,69mg ± 0,21) (Figure 51).

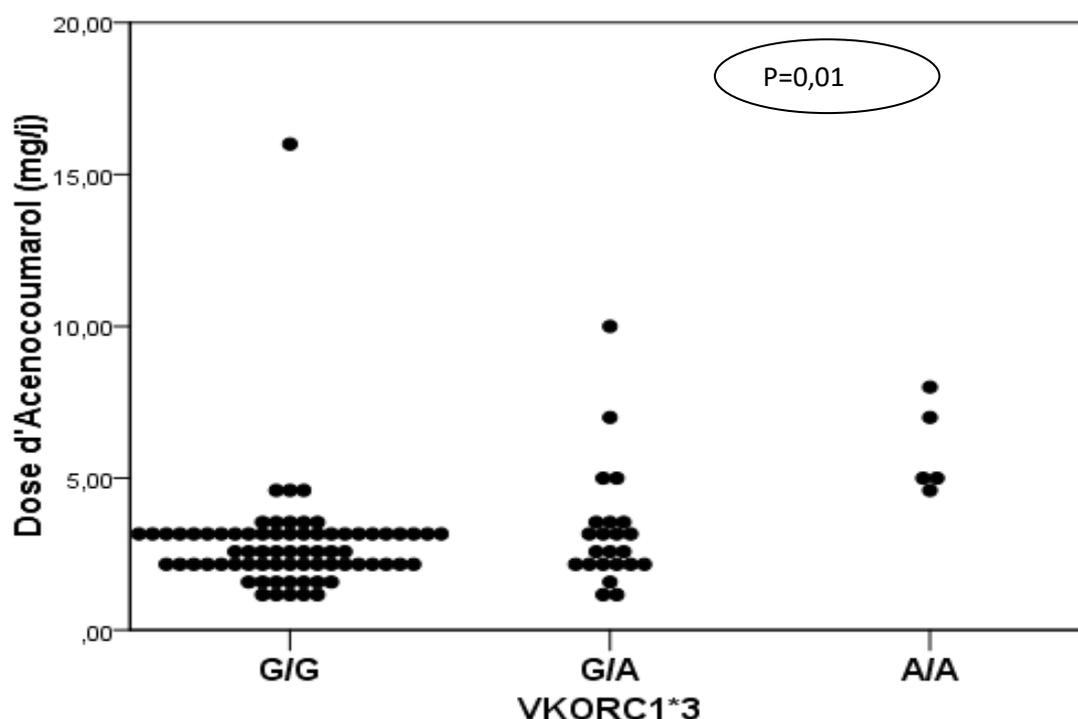


Figure 51 : Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du *VKORC13 (c.9041G>A).**

GG : génotype homozygote sauvage

GA : génotype hétérozygote

AA : génotype homozygote muté

1.3.4. Effet du polymorphisme *VKORC1*4* (c.6009 C>T) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

Les résultats obtenus de l'analyse génétique de ce polymorphisme révèlent qu'il y avait une influence significative ($p=0,044$) sur la dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol (Tableau 3). Cette dernière était nettement plus élevée chez les sujets avec un génotype homozygote muté TT (5,25mg \pm 1,56) que chez les porteurs du génotype hétérozygote CT (3,1mg \pm 0,34 mg) et homozygote sauvage CC (2,8 \pm 0,22 mg) (Figure 52).

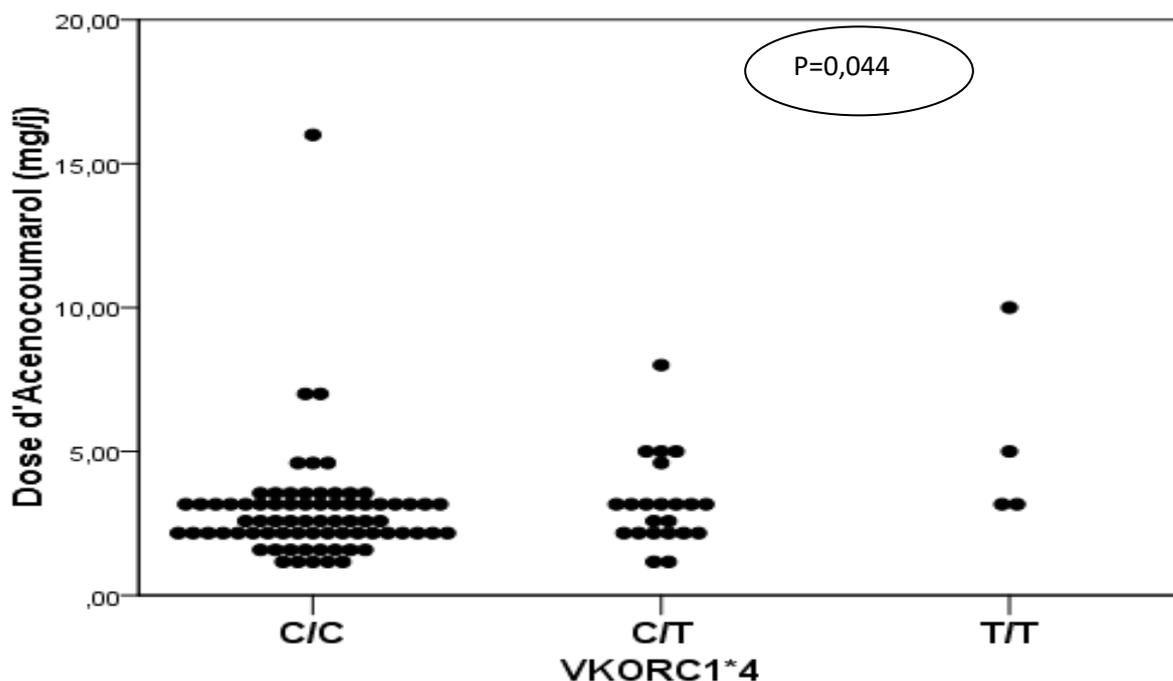


Figure 52 : Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du *VKORC1*4*.

CC: génotype homozygote sauvage

CT : génotype hétérozygote

TT : génotype homozygote muté

1.3.5. Effet du polymorphisme *CYP2C9*2* (c.430C>T) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

Les porteurs du génotype homozygote muté TT avaient besoin d'une dose plus faible que les porteur du génotype homozygote sauvage CC (Tableau ?). Toutefois, cette différence n'était pas statistiquement significative, probablement attribuable à la faible taille de l'échantillon (Figure 53).

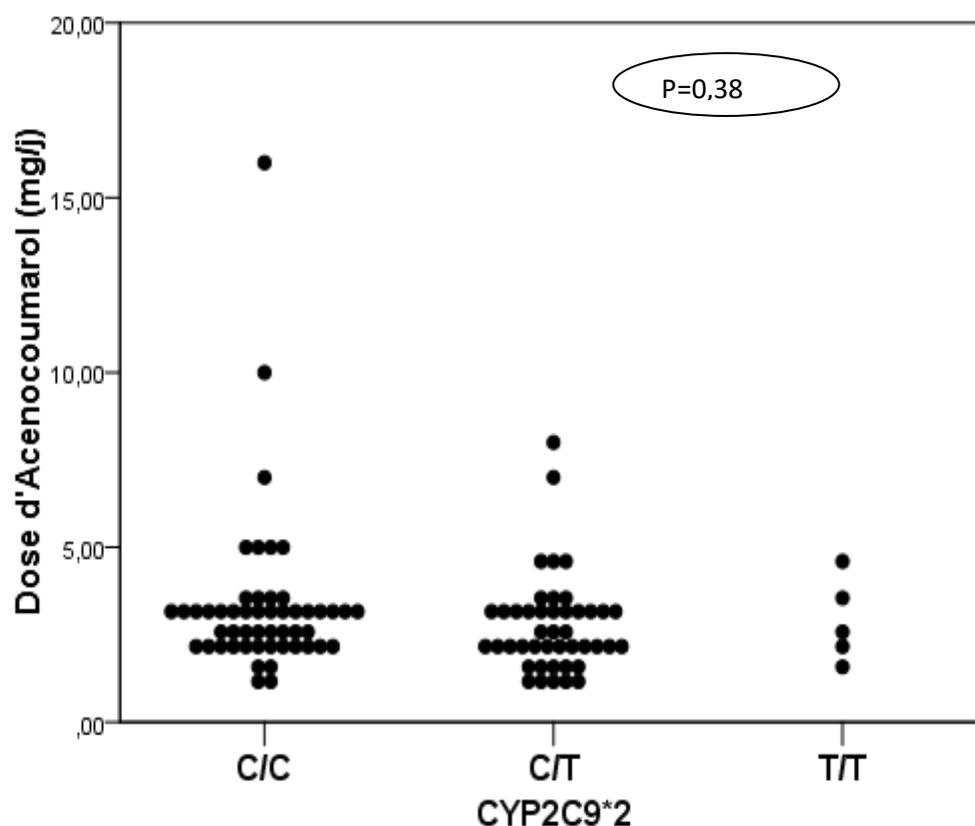


Figure 53 : Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du *CYP2C9*2*.

CC: génotype homozygote sauvage
 CT : génotype hétérozygote
 TT : génotype homozygote muté

1.3.6. Effet du polymorphisme *CYP2C9*3 c.1075A>C* sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

Nous avons trouvé une association statistiquement significative entre la dose d'équilibre journalière en Acénocoumarol et les génotypes du polymorphisme *CYP2C9*3* (Tableau 23) : les patients porteurs du génotype homozygote sauvage AA avaient besoin d'une dose plus élevée (2,86 mg ±0,16) pour atteindre l'équilibre comparés aux patients ayant un génotype homozygotes muté CC qui avaient besoin des doses nettement plus faible (1,99mg ±0,18), (Figure 54).

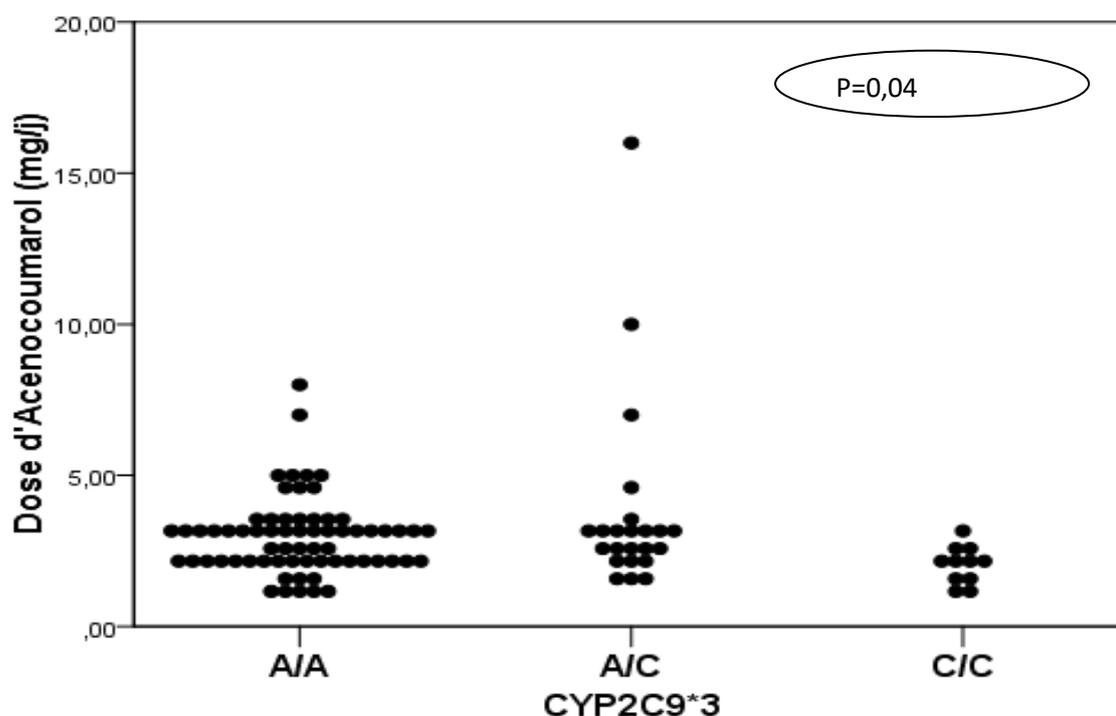


Figure 54 : Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du *CYP2C9*3 c.1075A>C*.

AA: génotype homozygote sauvage
 AC : génotype hétérozygote
 CC : génotype homozygote muté

1.3.7. Effet du polymorphisme *CYP4F2*3* (g.1347G>A) sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol

Les résultats obtenus de l'analyse génétique de ce polymorphisme révèlent qu'il n'y avait pas d'influence statistiquement significative sur la dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol (Tableau 23). La dose d'équilibre pour le génotype homozygote sauvage GG était de 3.08 ± 0.51 mg/j (Figure 55).

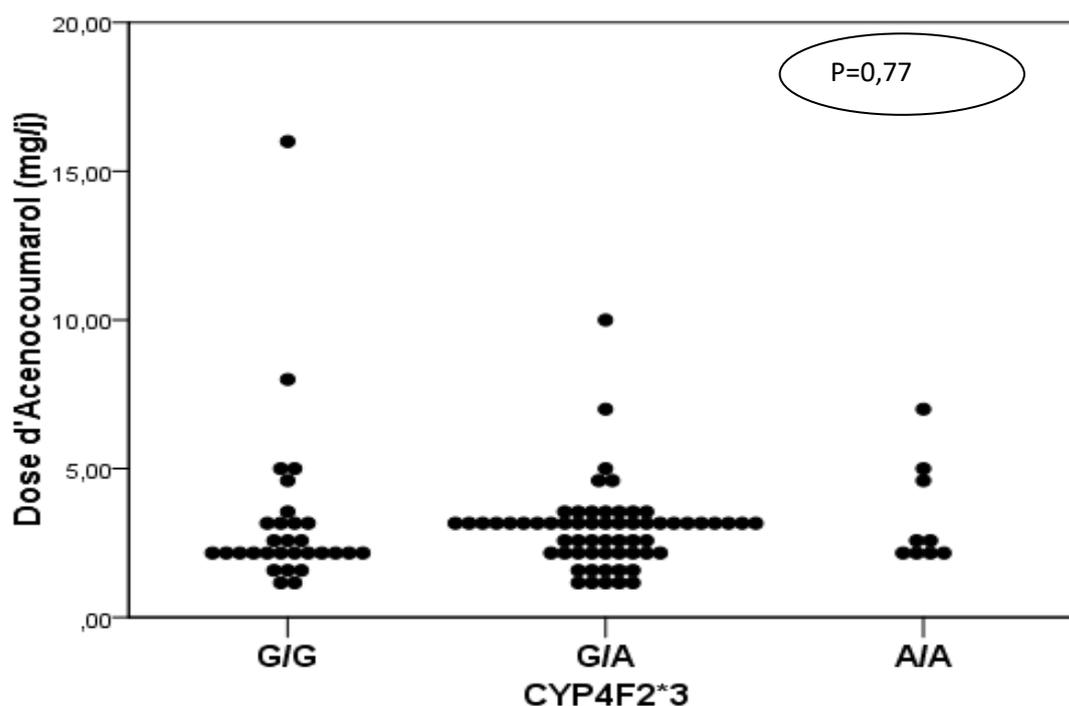


Figure 55 : Variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction des génotypes du *CYP4F2*3* (g.1347G>A).

GG: génotype homozygote sauvage

GA : génotype hétérozygote

AA : génotype homozygote muté

1.4. L'analyse multi variée (construction de l'algorithme)

Pour augmenter la qualité prédictive du modèle en analyse de régression linéaire univariée et multi-variée, une transformation de la dose journalière d'équilibre en Acénocumarol selon le logarithme décimale a été effectuée.

Cette dose logarithmique journalière moyenne est utilisée comme variable dépendante en analyse univariée et multi-variée avec les variables indépendantes génétiques et non génétiques incluses dans l'étude. Toutes les variables indépendantes testées avec la régression linéaire en modèle uni-varié et qui étaient à un seuil inférieur à 0,05 ont été incluses dans le modèle final (Tableau 24).

Tableau 24: Résultats de la régression linéaire multiparamétrique par étapes montrant le pouvoir prédictif de chaque variable, définissant le modèle final de prédiction de dose d'équilibre en Acénocoumarol.

Modèle	Composition	Coefficients non normalisés		Coefficients normalisés Beta	P-value	Intervalle de confiance à 95% pour B		Résumé du modèle		
		B	SE			Borne inférieure	Limite Supérieure	R	R ²	R ² ajusté
1	Constant	0,788	0,060			0,669	0,906	0,549	0,302	0,294
	VKORC1 – 1639G>A	-0,165	0,25	-0,549	0,000	-0,215	-0,115			
2	Constant	0,634	0,074		0,000	0,488	0,780	0,610	0,372	0,359
	VKORC1 – 1639G>A	-0,154	0,024	-0,513	0,000	-0,203	-0,106			
	VKORC1*3 (c.9041G>A)	0,097	0,029	0,267	0,001	0,038	0,155			
3	Constant	0,754	0,086		0,000	0,583	0,925	0,641	0,411	0,392
	VKORC1 – 1639G>A	-0,142	0,024	-0,473	0,000	-0,190	-0,094			
	VKORC1*3 (c.9041G>A)	0,091	0,029	0,251	0,002	0,34	0,148			
	Age	-0,003	0,001	-0,203	0,013	-0,05	-0,001			
Modèle final	Constant	0,599	0,102		0,000	0,397	0,801	0,672	0,451	0,428
	VKORC1 – 1639G>A	-0,147	0,024	-0,489	0,000	-0,194	-0,100			
	VKORC1*3 (c.9041G>A)	0,074	0,029	0,204	0,011	0,017	0,131			
	Age	-0,003	0,001	0,224	0,005	-0,005	-0,001			
	Poids	0,003	0,001	0,208	0,009	0,001	-0,005			

Les facteurs sélectionnés par l'analyse de régression multi variée <<stepwise>> pour faire apparaitre le modèle finale étaient :

- $VKORC1*2 -1639G>A$
- $VKORC1*3 (c.9041G>A)$
- L'âge
- Le poids

Modèle 1: $\text{Log (D)} = 0,788 - 0.165 \times (\text{VKORC1 } -1639 \text{ G} > \text{ A})$

Modèle 2: $\text{Log (D)} = 0,634 - 0.154 \times (\text{VKORC1 } -1639 \text{ G} > \text{ A}) + 0,097 \text{ VKORC1*3 (c.9041G} > \text{A)}$

Modèle 3: $\text{Log (D)} = 0,754 - 0,142 \times (\text{VKORC1 } -1639 \text{ G} > \text{ A}) + 0,091 \text{ VKORC1*3 (c.9041G} > \text{A}) - 0,003 (\text{Age})$

Il en résulte que l'équation de l'algorithme final pour prédire la dose journalière d'Acénocoumarol est la suivante :

$\text{Log (Dose d'Acénocoumarol (mg/j))} = 0.599 - 0.147 \times (\text{Génotype VKORC1*2}) + 0.074 \times (\text{Génotype VKORC1*3}) - 0.003 \times (\text{Age}) + 0.003 \times (\text{Poids})$

- ✓ Génotype homozygote sauvage GG on multiplie par 1
- ✓ Génotype Hétérozygote GA on multiplie par 2
- ✓ Génotype Homozygote muté AA on multiplie par 3
- ✓ Age en années
- ✓ Poids en Kg

Selon les résultats de l'analyse de la régression multi-variée pas a pas représenté dans le tableau :

- **L'âge** : permet d'expliquer **3,9%** de la variabilité inter-sujet en ce qui concerne la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.
- **Le poids** : permet d'expliquer **4%** de la variabilité inter-sujet en ce qui concerne la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.
- **VKORC1*3** : permet d'expliquer **7%** de la variabilité inter-sujet en ce qui concerne la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.
- **VKORC1*2** : permet d'expliquer **30,2%** de la variabilité inter-sujet en ce qui concerne la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.

Le critère le plus important pour un algorithme est le coefficient de détermination ou R^2 , qui correspond à la part de variation expliquée par le modèle de régression. C'est une grandeur qui varie entre 0 et 1 (100%), plus le nombre de variables explicatives ayant un effet intense est élevé, plus le R^2 va se rapprocher de 1. Le notre est de **45,1%**.

2. Validation de l'algorithme

2.1. Caractéristiques de la cohorte de validation

Cette population était composée de 19 patients recevant une dose d'équilibre en Acénocoumarol pour une durée illimitée.

Les caractéristiques cliniques et génétiques de la cohorte de validation sont représentées dans les tableaux 25 et 26 respectivement.

Tableau 25 : Caractéristiques cliniques de la cohorte de validation.

Variables	Moyenne± ET [Min-Max] /n (%)
Age	47,26±11,85 [33-78]
Taille	1,66±0,79 [1,50-1,78]
Poids	83 ,15±15,4 [55-100]
Indice de masse corporel	27,02±4,53 [20,20-37,10]
Sexe	
* Homme	9 (47,4)
* Femme	10 (52,6)
Les indications	
* Fibrillation atrial	1 (5,3)
* La maladie thromboembolique	17 (89,5)
* Remplacement valvulaire	1 (5,3)
INR Cible (Zone thérapeutique)	
* INR [2-3]	18 (94,7)
* INR [2,5-3,5]	1 (5,3)
Consommation de Tabac	1 (5,3)
Consommation alcool	0 (0)
Activité sportive	1 (5,3)
Co morbidité	
* HTA	2 (6,2%)
* DIABETE	1 (10,5)
* Autres pathologies	3 (15,7)
Co médication	
* Amiodarone	1 (5,3)
* Statine	2 (10,58)
* Antiagrégants plaquettaires	0 (0)
* anti-inflammatoires no stéroïdien	1 (5,3)
* allopurinol	0 (0)
* Corticoides	0

Tableau 26 : Caractéristiques génétiques de la cohorte de validation.

Polymorphismes génétiques	Génotypes	Nombre de patients (%)
VKORC1*2 <i>rs9923231</i> (g.-1639 G>A)	GG	1 (5,3)
	GA	11 (57,9)
	AA	7 (34,5)
VKORC1*3 <i>rs7294</i> (c.9041G>A)	GG	14 (73,7)
	GA	2 (10,5)
	AA	3 (15,8)
VKORC1*4 <i>rs17708472</i> (c.6009 C>T)	CC	12 (63,2)
	CT	5 (26,3)
	TT	2 (10,5)
VKORC1*intron1 <i>rs9934438</i> (c.1173C>T)	CC	9 (47,4)
	CT	8 (42,1)
	TT	2 (10,5)
CYP2C9*2 <i>rs1799853</i> (c.430C>T)	CC	13 (68,4)
	CT	3 (15,8)
	TT	3 (15,8)
CYP2C9*3 <i>rs1057910</i> (c.1075A>C)	AA	7 (36,8)
	AC	10 (52,6)
	CC	2 (10,5)
CYP4F2 <i>rs2108622</i> (g.1347G>A)	GG	10 (52,6)
	GA	8 (42,1)
	AA	1 (5,3)
CALU <i>rs1043550</i> (c.29809A>G)	AA	11 (78,6)
	AG	3 (21,4)
	GG	0 (0)

2.2. Etapes de la validation de l'algorithme

Les deux approches principales pour valider l'algorithme correspondent au calcul du coefficient de corrélation de Pearson et l'erreur absolue moyenne.

2.2.1. Comparaison de la cohorte de validation et la cohorte du développement de l'algorithme

La comparaison a été effectuée pour chaque covariable incluse dans l'algorithme par des tests statistiques (test du Chi2, test t de student).

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les variables des deux échantillons (Tableau 27). Donc, on peut dire qu'il s'agit de deux échantillons indépendants.

Tableau 27: Comparaison entre la cohorte de validation et la cohorte de dérivation de l'algorithme.

Covariables	Cohorte de dérivation	Cohorte de validation	<i>p-value</i>
Age	54,5±16,42 [18-84]	47,26±11,85 [33-78]	0,1
Poids	74,97±15,85 [45-130]	83 ,15±15,4 [55-100]	0,557
Vkorc1*2	GG GA 47 (47) AA 39 (39)	GG 1 (5,3) GA 11 (57,9) AA 7 (34,5)	0 ,074
Vkorc1*3	GG 72 (72%) GA 23 (23%) AA 5 (5%)	GG 14 (73,7%) GA 2 (10,5%) AA 3 (15,8%)	0,468

2.2.2. Validation interne de l'algorithme

Nous avons constaté une forte corrélation entre la dose prédite par notre algorithme et la dose clinique observée : $r= 0,672$, $p= 0,000$ (Figure 57).

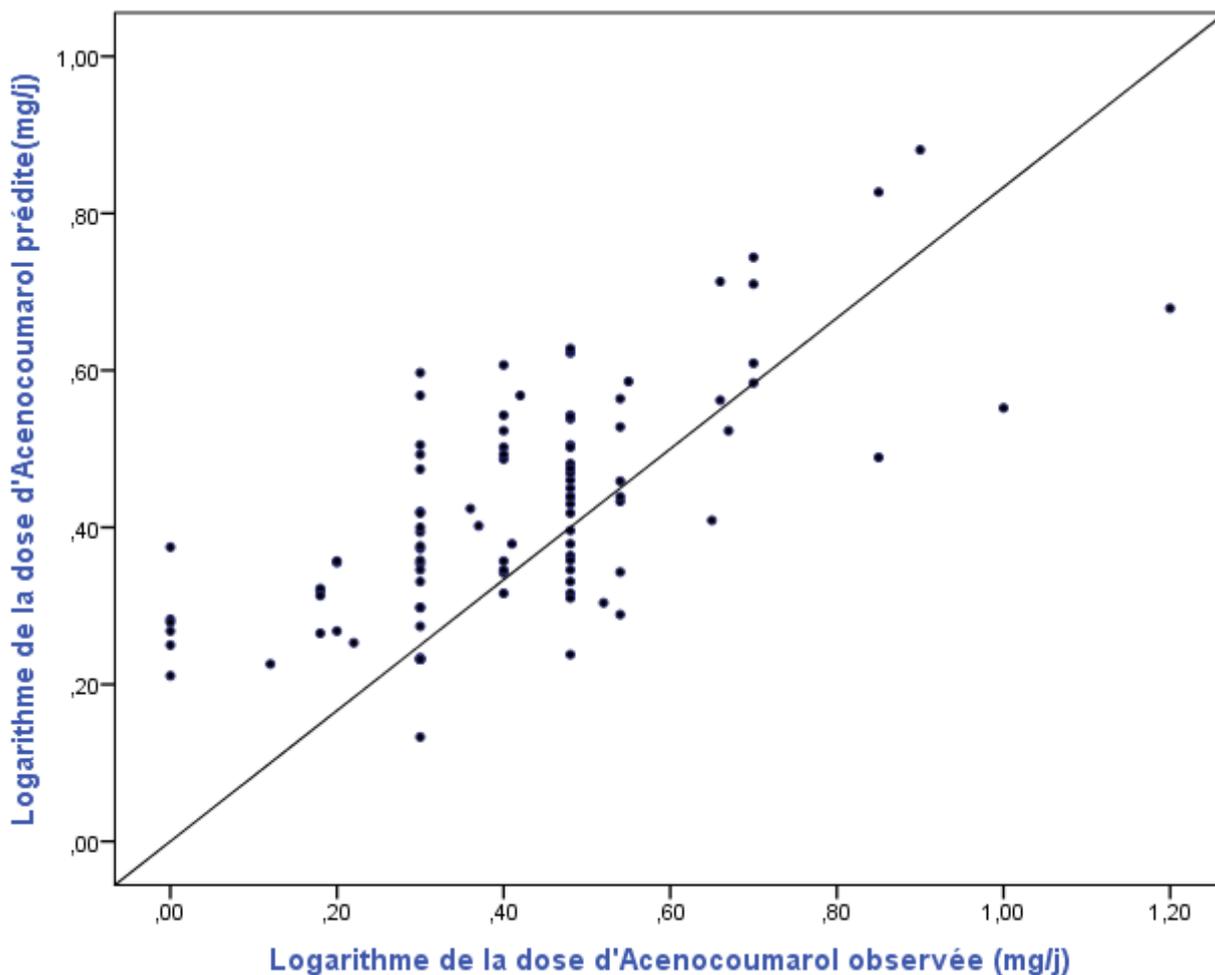


Figure 57 : Corrélation entre dose prédite par notre algorithme et la dose clinique observée.

2.2.3. Validation externe de l'algorithme

Nous avons trouvé une corrélation statistiquement significative entre les doses prédites par l'algorithme et les doses obtenues dans un environnement clinique réel (cohorte de validation) : $r= 0,653$ et $p=0,002$ (Figure 58).

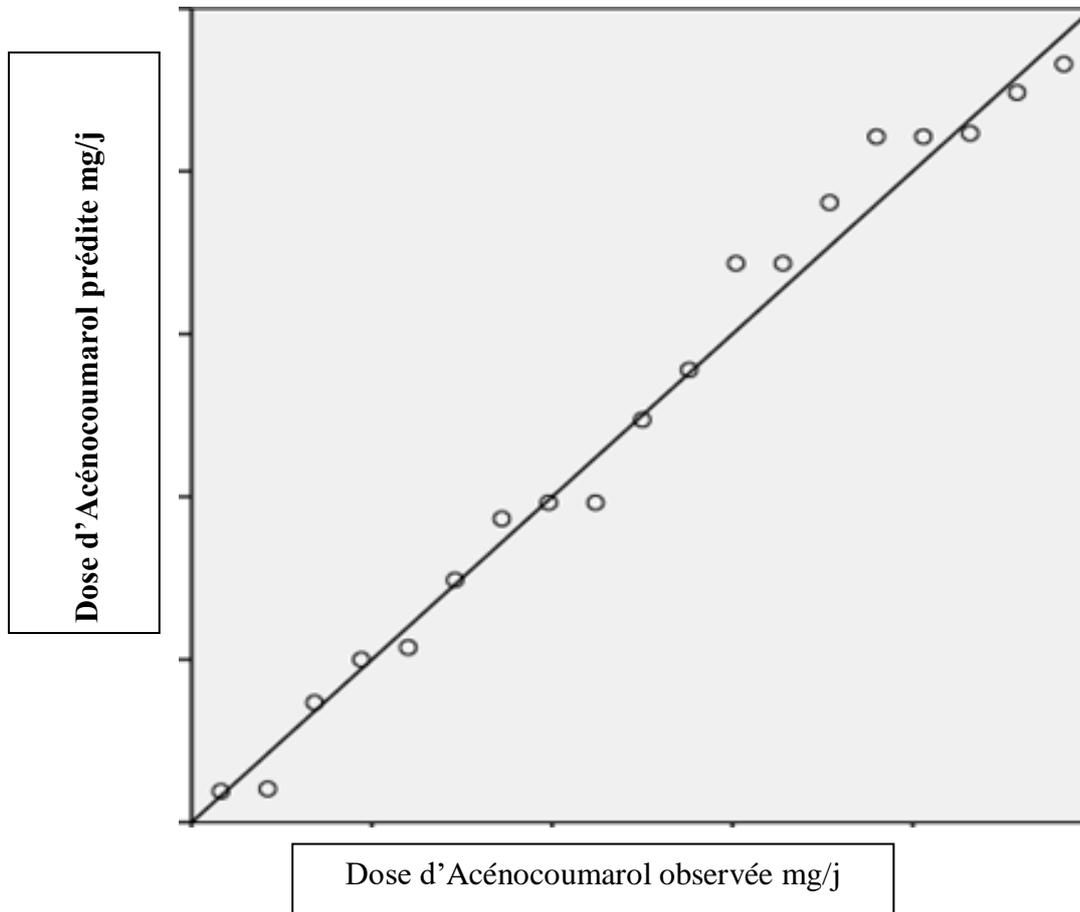


Figure 58: Corrélation entre la dose prédite par notre algorithme et la dose clinique observée dans la cohorte de validation.

- Pour établir une validité clinique de notre algorithme, nous avons calculé la proportion des patients pour lesquels la dose prédite se situait entre **95%** et **105 % (+/-5%)** de la dose observée, ce qui correspond à une dose prédite idéale.

Le pourcentage des patients ayant une dose prédite idéale calculée par l'algorithme était de **47%**.

- Lorsqu'on prend comme seuil de différence **+/-10 %** qui est celui utilisé dans la majorité des publications on retrouve un pourcentage de **89.5%** (Figure 59).
 - ✓ Ainsi, en ce qui concerne les patients avec des doses prédites sous-estimées le pourcentage est **nul**.
 - ✓ Pour les patients avec des doses prédites surestimées le pourcentage est de **10,5%**.
 - ✓ Pour les patients avec des doses prédites idéale le pourcentage est de **89,5%**.

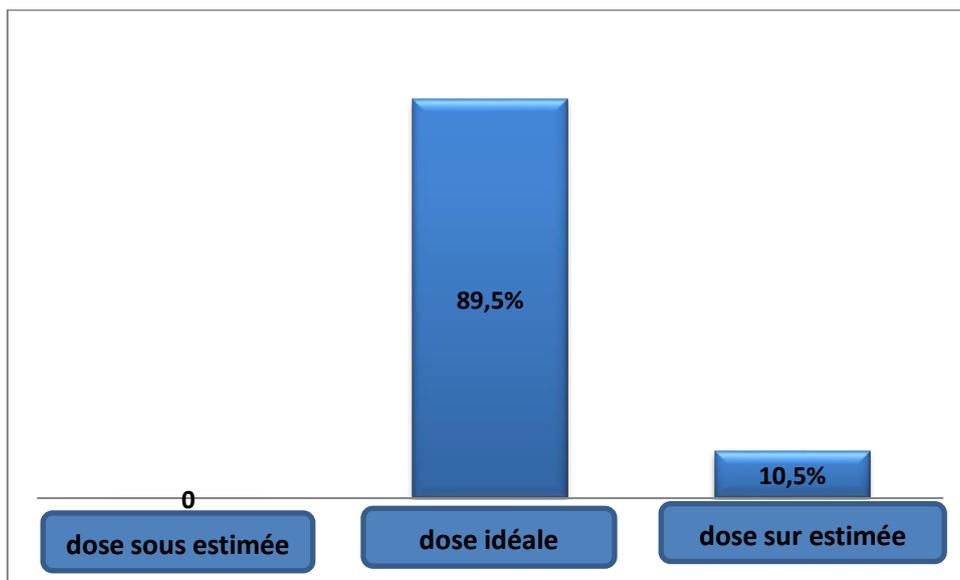


Figure 59 : Proportion des sujets selon les doses prédites.

- L'erreur absolue moyenne est une moyenne des erreurs absolues entre les doses prédites et les valeurs réelle. Elle est utilisée pour évaluer la précision prédictive de l'algorithme.

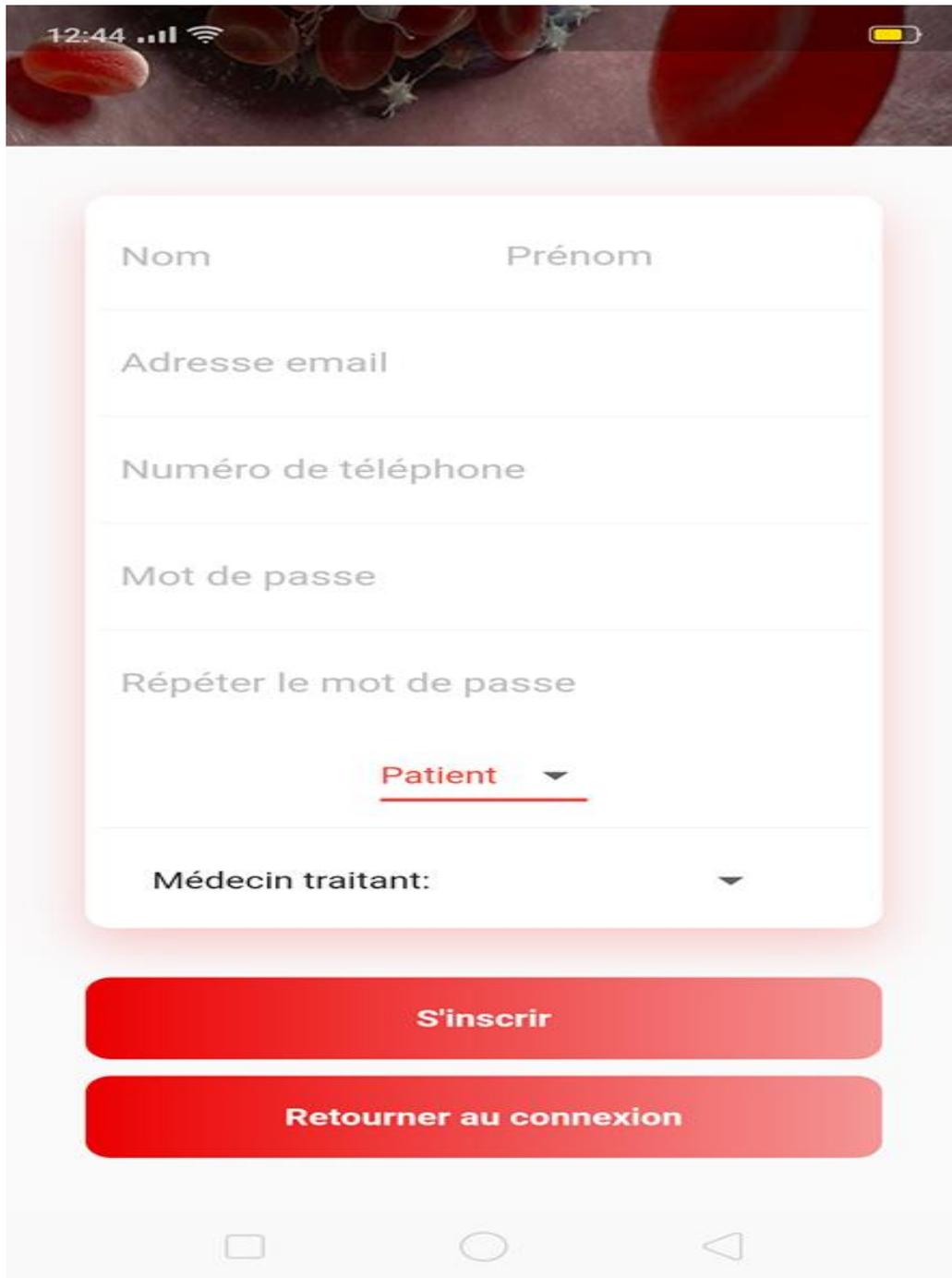
Pour notre algorithme l'erreur absolue moyenne (MAE) égale a : 1.057 [1.037-1.078].

3. Description de l'application androïde

3.1. Création d'un compte

Lors de leur première connexion, les utilisateurs (médecin et patient) sont invités à créer un profil.

Pour le patient, il doit choisir un médecin traitant déjà inscrit (figure 60).



The screenshot displays the account creation interface. At the top, the status bar shows the time 12:44, signal strength, Wi-Fi, and battery icons. The background features a close-up of red pills. The registration form consists of several input fields: 'Nom' (Name), 'Prénom' (First Name), 'Adresse email' (Email address), 'Numéro de téléphone' (Phone number), 'Mot de passe' (Password), and 'Répéter le mot de passe' (Repeat password). Below these fields is a dropdown menu currently set to 'Patient'. At the bottom of the form is another dropdown menu labeled 'Médecin traitant:'. Two prominent red buttons are located at the bottom of the screen: 'S'inscrire' (Sign up) and 'Retourner au connexion' (Return to login). The Android navigation bar is visible at the very bottom.

Figure 60 : Capture d'écran Création de compte.

3.2. Le profil patient

Chaque patient doit saisir lui-même ces données concernant : l'âge, le sexe, le poids, la taille et s'il est fumeur ou non (Figure 61).

The screenshot displays a mobile application interface for a patient profile. At the top, a red header bar contains the text "Acenocoumarol (Sintrom)" and a power icon. Below the header, a white card shows a blue profile icon and the name "boutelja hicham". A second white card, titled "Donnee du patient", contains the following information:

Age :	46
Sexe :	homme
Poids (Kg):	77
Taille (cm):	180
Fumeur :	Non

A red "Enregistrer" button is located at the bottom right of the form. The bottom navigation bar is red and features two icons: a house icon labeled "Accueil" and a person icon labeled "Profile".

Figure 61: Capture d'écran du profil d'un patient.

3.3. Page d'accueil du patient

Une fois le profil du patient complété, l'utilisateur arrive sur la page d'accueil. Celle-ci présente plusieurs contrôles : la posologie de l'Acénocoumarol proposé par son médecin, autres médicaments prescrits par son médecin, ainsi que la dernière valeur d'INR (Figure 62).

Il est proposé aux patients d'ajouter un nouveau dosage d'INR, des rendez-vous, un événement particulier (oubli de prise ou excès alimentaire, automédication, maladie, etc.)

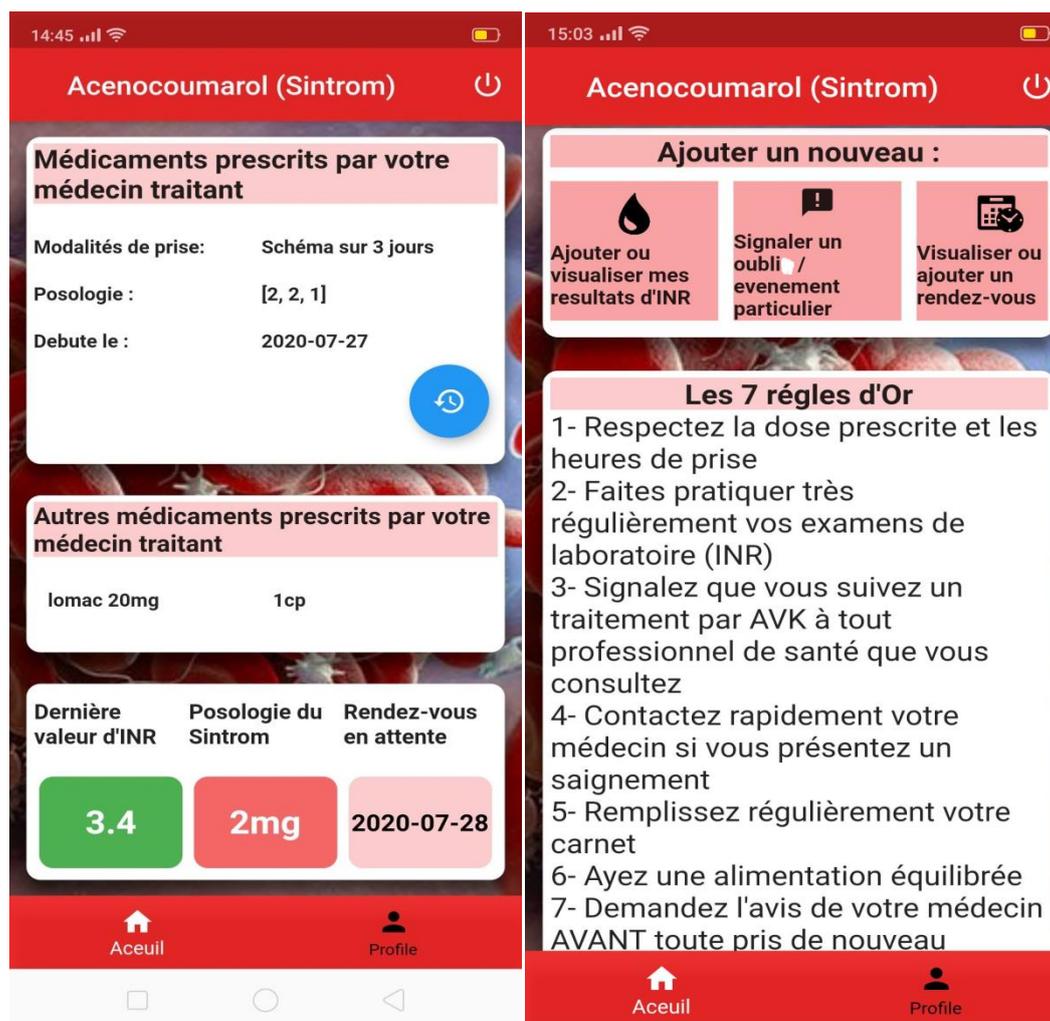


Figure 62: Capture d'écran de la page d'accueil du patient.

Gestion des résultats des dosages d'INR par le patient

Lorsque le patient clique sur : ajouter ou visualiser mes résultats d'INR, une fenêtre s'ouvre lui permettant de mentionner lui-même le résultat du dosage de l'INR ainsi que la date du dosage (Figure 63).

Le résultat du dosage de l'INR mentionné par le patient s'affiche automatiquement chez son médecin.

L'idée est de rendre l'application la partie dynamique complétée par le patient plus interactive.

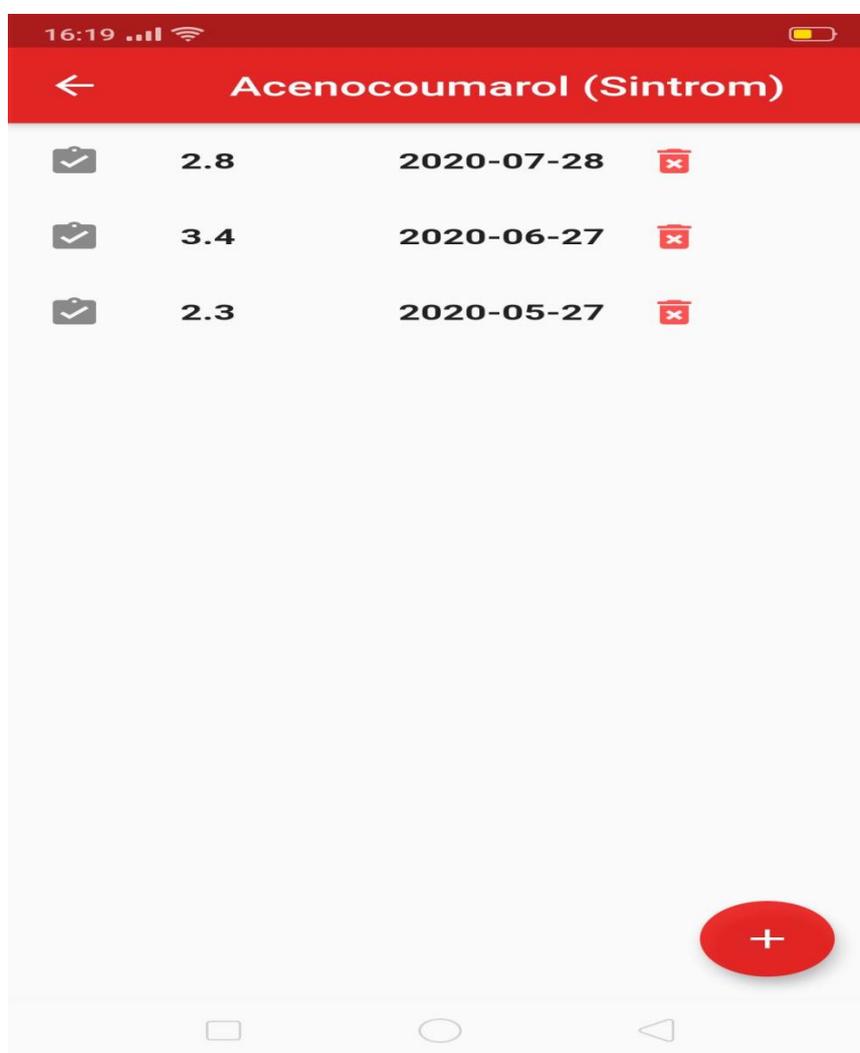


Figure 63 : Capture d'écran de la fenêtre de gestion de l'INR.

3.4. Page d'accueil du médecin

La page d'accueil du médecin comporte le nombre de patients et leurs noms (Figure 64).

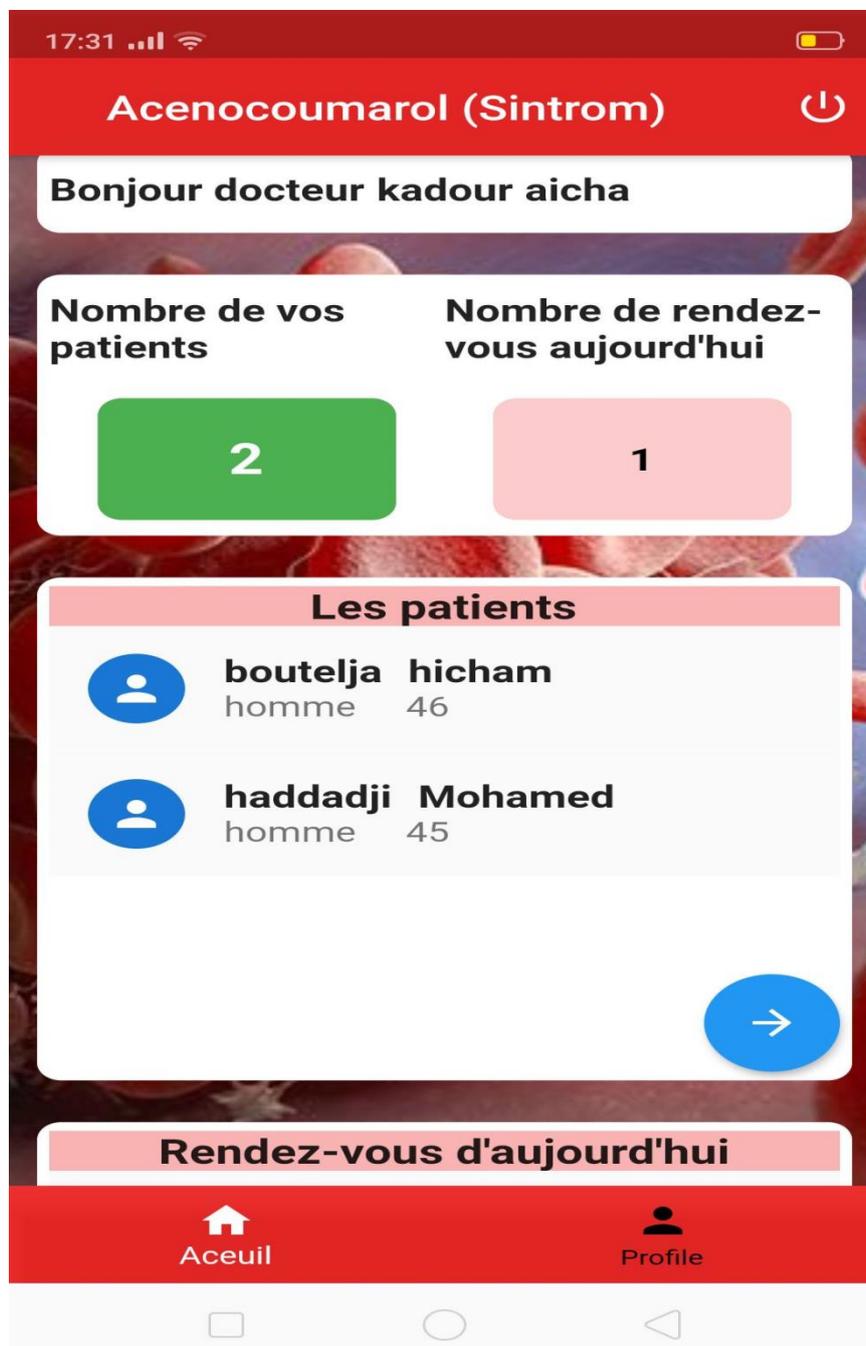


Figure 64: Capture d'écran de la page d'accueil du médecin.

Le médecin traitant peut accéder directement aux informations nécessaires concernant son patient (âge, IMC, dernière valeur d'INR, événements) (Figure 65).



Figure 65: Capture d'écran du profil du patient observé par le médecin.

3.5. Posologie de l'Acénocoumarol proposée par le médecin

Après chaque dosage, si celui-ci est en dehors de la cible, le médecin peut être amené à modifier la posologie de l'Acénocoumarol pour son patient (pour limiter les déplacements inutiles). Le plus souvent, le schéma proposé sera sur 1, 2 ou 3 jours. Nous avons, donc proposé un système assez simple pour définir ce nouveau schéma ainsi que la date à partir de laquelle il doit être débuté (figure 66).



Figure 66: Capture d'écran sur le schéma posologique d'Acénocoumarol.

Le médecin peut également prescrire d'autres médicaments (Figure 67).



Figure 67: Capture d'écran des médicaments prescrits par le médecin.

3.6. Pharmacogénétique de l'Acénocoumarol

Enfin, nous avons intégré la formule de l'algorithme élaboré par notre étude dans l'application afin d'aider le médecin traitant à choisir la posologie d'Acénocoumarol nécessaire pour son patient (Figure 68).



Figure 68: Capture d'écran de la posologie prédite par l'algorithme pharmacogénétique.

Discussion

L'optimisation de la posologie d'Acénocoumarol reste un défi pour les cliniciens. Au cours de ce travail, différents aspects (cliniques, biologiques et pharmacogénétiques) ont été étudiés afin de développer un algorithme pharmacogénétique prédictif de la posologie d'équilibre d'Acénocoumarol.

Pour développer l'algorithme, nous avons évalué l'influence des facteurs génétiques et non génétiques sur la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.

La dose d'équilibre

Contrairement à l'INR, la dose d'équilibre est un marqueur à long terme de la réponse à l'Acénocoumarol. En raison d'une importante variabilité interindividuelle, la dose d'équilibre est différente d'un patient à un autre.

Dans notre échantillon, la dose d'équilibre varie d'un facteur de 16 et la moyenne était de 2.96mg/jour±1.94. Cette valeur est comparable à celle retrouvée dans la population tunisienne [19] et marocaine [170]. Néanmoins, elle est supérieure par rapport à la population Argentine [171].

La dose d'équilibre dans différentes populations est représentée dans le tableau 28.

Tableau 28 : Dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol dans de différentes populations.

Pays	Dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol (mg)	Références
Algérie	2,96±1,94	La présente étude
Tunisie	3,1 ± 1,46	[19]
Maroc	3,22 ± 1,71	[170]
Liban	2,57 ± 1,71	[172]
Espagne	2,16 ± 0,042	[173]
Bulgarie	2,93 ± 2,22	[26]
Russie	2,93 ± 1,07	[174]
Slovaquie	4 ± 1,71	[175]
Argentine	1,57 ± 0,71	[171]
Inde	2,48 ± 1,01	[176]

Les facteurs non génétiques influençant la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol et statistiquement significatifs

L'âge

Dans notre étude, l'âge moyen des patients était de 54.5 ± 16 ans. Plus de 60% de ces patients avait moins de 65 ans.

Nos résultats concordent avec l'étude menée par Smires et collaborateurs [20], réalisée sur une cohorte de 114 patients marocains où l'âge moyen était de 50 ans \pm 15, et ceux de Ajemi et collaborateurs chez la population tunisienne avec un âge moyen de 58.24 ± 17.65 [19].

Au regard des chiffres, il est clair que notre population d'étude est relativement jeune, par rapport à la population européenne, dont l'âge moyen est de 67,6 ans. Cette différence est expliquée par le vieillissement de la population occidentale [117].

Notre étude a mis en évidence l'importance du facteur « âge », dans la détermination de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol. Effectivement, les résultats obtenus ont montré qu'il existe une corrélation négative ($r = -0.26$; $p = 0.004$) entre la dose d'équilibre d'Acénocoumarol et l'âge des patients, ce qui affirme que la dose d'équilibre diminue avec l'avancement de l'âge.

La plupart des auteurs sont en accord sur l'implication de l'âge dans la variabilité de la réponse aux AVK [8] [19]. Ainsi, il a été démontré que la dose de la warfarine nécessaire pour obtenir une anticoagulation thérapeutique diminue de 8 à 17% par décennie [178] [13]. L'effet de l'âge sur la dose d'équilibre s'explique par la diminution du métabolisme hépatique, la clairance rénale et le facteur vitamine k dépendant.

Le tableau 29 représente un résumé des études montrant l'impact de l'âge sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol en fonction de différentes populations.

Tableau 29 : Effet de l'âge sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol selon les différentes populations.

Pays	Dose journalière d'équilibre d'Acénocoumarol (mg)	Age moyen (an)	P value	Références
Algérie	2,96mg/jour\pm1,94	54 ,5 \pm16	0.004	Présente étude
Tunisie	3,1 mg/jour \pm 1,94	58.24 \pm 17.65	<0.001	[19]
Maroc	3.27 mg/jour \pm 1,71	57 \pm 14	0,023	[170]
Liban	2,57 mg/jour \pm 1,71	68 \pm 13	< .0001	[172]
Sud de l'Inde	2,48 mg/jour \pm 1,01	39.9 \pm 12.11	>0.05	[176]
Granada	2 mg \pm 0,57	73 \pm 9	0.012	[179]

Le poids

Une corrélation statistiquement significative entre le poids des patients et la dose d'équilibre a été démontrée dans notre étude, expliquant en partie la variabilité de la réponse à l'Acénocoumarol ($r=0,23$; $p=0,017$). Par contre, nous n'avons pas décelé une corrélation statistiquement significative entre l'IMC et la dose d'équilibre.

Dans notre étude, les patients qui ont un poids faible ont nécessité des doses d'équilibres d'Acénocoumarol plus faible. Dans la littérature, l'influence du poids n'est pas aussi bien établie que le facteur « Age ». Néanmoins, plusieurs études ont confirmé l'effet significatif du poids sur la variabilité de la dose, notons que la majorité de ces études ont été effectuées sur la warfarine et non pas sur l'Acénocoumarol [10].

Co morbidité

Plusieurs comorbidités ont été recensées lors de notre étude. L'HTA était la principale pathologie associée avec un pourcentage de 37%.

Selon l'analyse univariée, il existe une association significative entre la présence de l'HTA et la dose d'équilibre d'Acénocoumarol. En effet, cette dernière diminue de 26% en présence de l'HTA ($p=0,024$).

De nombreuses études ont présenté l'HTA comme un facteur de risque de saignement pour les patients sous AVK, ce qui confirme nos résultats [180]. Cependant, il est difficile de trouver des données précises sur l'impact de l'HTA sur la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.

Les facteurs non génétiques influençant la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol et statistiquement non significatifs

Sexe

Dans notre étude, nous avons constaté une prédominance du sexe féminin avec un pourcentage de 57%, ce qui concorde avec les études effectuées en Maroc et en Tunisie [19] [170].

Quant à l'association du genre et la dose d'équilibre d'Acénocoumarol, nous n'avons pas trouvé une différence statistiquement significative.

Selon les données de la littérature, l'influence du genre sur la dose d'équilibre est controversée. En effet, certaines études montrent que les femmes nécessitent des doses plus faibles d'AVK [181] [182], tandis que d'autres ne montrent aucune différence homme-femme [183].

Le mécanisme de cette sensibilité des femmes au traitement par les AVK n'est pas clairement élucidé. Néanmoins, certains auteurs l'expliquent par des différences dans le métabolisme hépatique [184].

L'indication de l'Acénocoumarol et l'INR cible :

Dans notre série, 58% des indications ont été des maladies thromboemboliques veineuses représentées par ses deux entités cliniques: thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP). Nous avons regroupé les patients présentant à la fois une embolie pulmonaire et une thrombose veineuse profonde dans le groupe « maladie thromboembolique veineuse » pour réaliser l'étude statistique.

Il a été observé que les doses d'entretien d'Acénocoumarol requises pour toutes les indications étaient similaires. En effet, l'analyse univariée de la dose d'entretien journalière et la covariable pathologie ne retrouve pas de différence statistiquement significative ($p=0,407$). Nos résultats concordent avec la littérature [19] [170]. Cependant, l'étude menée au Maroc, a montré que la pathologie influence fortement la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol ($p<0,001$). Ils ont retrouvé une association inverse et contradictoire avec la littérature, en constatant que les patients atteints de thrombose veineuse profonde nécessitent des doses plus élevées d'Acénocoumarol [20].

La fourchette thérapeutique de l'INR varie et dépend complètement de la pathologie. Ainsi, 81% des patients de notre étude avait un INR inclus dans l'intervalle (2-3), ce qui correspond à la zone cible pour la maladie thromboembolique veineuse et la fibrillation auriculaire. Alors que, 19% avait un INR entre (2,5 -3,5) ce qui correspond à l'indication « remplacement valvulaire ». Par ailleurs, aucun INR cible entre (3-4) n'a été enregistré dans notre population d'étude.

Consommation de Tabac :

11% des patients de notre cohorte étaient des fumeurs réguliers. Nous n'avons pas noté une influence du facteur « Tabac » sur la dose d'équilibre. Ces résultats concordent avec la

littérature [19] [4]. Néanmoins, dans certaines études effectuées sur la warfarine, le tabac réduit l'effet anticoagulant [185].

En effet, une revue de littérature réalisée sur la warfarine a démontré que les fumeurs ont nécessité des doses plus élevées de la warfarine (12.13% ; $p < 0.001$) [186]. Cette interaction pharmacocinétique est due aux nombreux composants présents dans la fumée de tabac (benzopyrène, anthracène, phénanthrène) qui sont des inducteurs des cytochromes hépatiques 1A2 [187].

Notons qu'un seul algorithme publié sur l'Acénocoumarol a inclus ce critère [188].

Pratique de sport

Durant cette étude, seulement 5 patients pratiquaient du sport.

Nous n'avons pas mis en évidence une corrélation entre la dose d'équilibre et la pratique du sport. L'effectif pour ce critère était trop faible pour pouvoir conclure à une absence de corrélation.

A notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'impact de la pratique régulière d'activité physique sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol. Cependant, une étude réalisée sur la warfarine a démontré que les patients actifs nécessitaient une dose hebdomadaire moyenne plus élevée que les patients inactifs [189].

Comédication

Les AVK sont associés à un risque élevé d'interactions médicamenteuses, avec un grand nombre de molécules, telles que l'acide acétylsalicylique, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, des inducteurs enzymatiques du cytochrome P450 (alcool chronique, tabac, millepertuis) ou des inhibiteurs enzymatiques (miconazole) [190] [191].

Parmi les médicaments qui interagissent avec l'Acénocoumarol, nous avons constaté que l'Amiodarone occupait la première position. Ce dernier est un antiarythmique qui diminue le métabolisme de l'Acénocoumarol par inhibition du CYP2C9 [192].

L'usage concomitant de l'Amiodarone et l'Acénocoumarol est une pratique courante dans le traitement de la fibrillation auriculaire.

Dans notre étude, les patients sous amiodarone avaient besoin de doses d'équilibre plus faibles par rapport aux autres patients, mais l'association n'était pas statistiquement significative.

Nos résultats concordent avec l'étude de Ajemi *et al* [19] . Toutefois, dans la majorité des études, l'effet de l'Amiodarone est lié à une diminution de la dose d'Acénocoumarol [193] . D'ailleurs certains algorithmes prédictifs, l'intègre directement pour le calcul de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol [177] .

Les facteurs génétiques

Durant notre étude, les facteurs génétiques ont été identifiés comme les déterminants majeurs de la variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.

Nous avons génotypé quatre variant fonctionnels pour le gène *VKORC1*, deux pour le gène *CYP2C9* et un seul variant pour les gènes *CYP4F2* et *CALU*, afin d'analyser leur distributions génotypiques et alléliques dans la population de Sétif et d'étudier leur impact sur la variabilité de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.

Le gène *VKORC1*

Le gène *vkorc1* a été identifié en 2004. Les variations génétiques pour ce gène peuvent conduire selon leur nature et leur localisation sur le gène, soit à des résistances relativement peu fréquentes nécessitant des doses élevées, soit plus fréquemment à une hypersensibilité pouvant aboutir à des surdosage potentiellement grave conduisant à une réduction de posologie. Effectivement, le génotype *VKORC1* peut être utilisé pour stratifier les individus en sous-groupes nécessitant des doses plus ou moins élevées d'Acénocoumarol.

- Les polymorphismes génétiques fréquemment associés à une hypersensibilité sont : ***VKORC1*2*** (g.-1639 G>A) et ***VKORC1*intron1*** (c.1173C>T)
- Les polymorphismes génétiques fréquemment associés à une résistance sont : ***VKORC1*3*** (c.9041G>A) et ***VKORC1*4*** (c.6009 C>T)

Le polymorphisme du *VKORC1*2* (g.-1639 G>A)

Les résultats de notre étude ont montré que les porteurs du génotype double muté AA pour le polymorphisme *VKORC1 -1639G>A* sont des sujets hypersensibles. En effet, ils ont nécessité une diminution de 56% de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol, comparés aux sujets homozygotes sauvages GG. La diminution des doses à été également observée chez les individus hétérozygotes GA dans une moindre mesure (28%).

En 2005, Rieder et collaborateurs ont obtenu des résultats similaires aux nôtres, avec une diminution de la dose d'équilibre de la warfarine d'environ 50% pour le génotype double muté et 25% chez les hétérozygotes [28].

Le polymorphisme $VKORC1*2-1639G>A$ correspond à un site de régulation de la transcription du gène *VKORC1*, la présence de l'allèle muté A (allèle de sensibilité) étant associée à une diminution de l'activité transriptionnelle [194]. Par conséquent, les homozygotes pour l'allèle A aurait des niveaux plus bas d'expression de *VKORC1* et raisonnablement, il faudrait une dose plus faible d'Acénocoumarol.

La proportion de l'allèle muté A et de l'allèle sauvage G dans notre population étaient respectivement, 62% et 48%. Ces résultats sont proches de ceux retrouvés en Iran (56% et 44%) et en Egypte (54% et 46%) [195] [196].

Cependant, une distribution différente avec des taux plus importants de l'allèle muté A à été observée en Asie de l'Est (94% en Japon, 96% en Chine) et un pourcentage très faible en Afrique (6,2% au Ghana) [197] [198] [199].

Les allèles de sensibilité ont une distribution très hétérogène, elle varie d'une population à une autre. Les différences des fréquences alléliques du polymorphisme $VKORC1-1639G>A$ ont permis de comprendre les variations inter-populationnelles observées dans les doses d'AVK utilisées à l'équilibre. Ainsi, il a été démontré que les Asiatiques avaient une hypersensibilité pour la warfarine avec une dose moyenne quotidienne requise de 3,5 mg contre 6 mg/j pour les Caucasiens [200]. En conséquence, l'optimisation de la stratégie thérapeutique ne peut se faire sans tenir compte de cette composante inter-populationnelle.

Le polymorphisme du *VKORC1*intron1 (c.1173C>T)*

Nous avons constaté que les sujets porteurs du génotype homozygote double mutée TT ont nécessité une diminution de 29,5% de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol, par rapport aux porteurs du génotype sauvage CC. Cette différence n'était pas statistiquement significative. Cependant, les études publiées sur ce polymorphisme génétique ont retrouvé une différence significative. En effet, plusieurs publications ont montré l'impact de ce polymorphisme intronique sur la dose d'équilibre des AVK avec une diminution significative des doses nécessaires chez les patients homozygotes mutés TT [201] [19] [202] [170] [203] [204].

La proportion de l'allèle muté dans notre population était de 41 %. Nos résultats sont proches de ceux retrouvés chez la population marocaine (42 %) [170].

Le polymorphisme du *VKORC13 (c.9041G>A)**

D'après nos résultats, les porteurs du génotype homozygote double muté AA pour le *VKORC1**3 ont nécessité une augmentation de 10% de la dose d'équilibre par rapport aux porteurs du génotype sauvage. Nous pouvons donc qualifier les porteurs du génotype AA de sujets résistants. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature [205] [19].

La fréquence de l'allèle muté dans notre population était égale à 16%. Les fréquences alléliques pour ce polymorphisme sont extrêmement hétérogène, à titre d'exemple il a été retrouvé des fréquences particulièrement élevées en Inde (72 %) et très faible en Chine 4% [206]. Notons que les données de littérature sur la fréquence alléliques pour ce polymorphisme sont peu nombreuses.

Le mécanisme moléculaire de cette résistance n'est pas encore élucidé dans la littérature. Nous émettons l'hypothèse que ces mutations, en plus de générer des changements structurels dans la protéine *VKORC1*, peuvent induire des mécanismes compensatoires pour maintenir la coagulation du sang.

Le polymorphisme du *VKORC14 (c.6009 C>T)**

Nous avons constaté des résultats similaires à ceux du *VKORC1**3 (c.9041G>A). En effet, les porteurs du génotype muté TT requièrent une augmentation significative de 46% de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol, par rapport aux porteurs du génotype sauvage CC.

La fréquence allélique de l'allèle muté est de 15%. Cette dernière est relativement faible comparée avec la fréquence en Europe qui est de 30,7% [207].

Il aurait été intéressant également de comparer les fréquences alléliques avec celle de la région maghrébine, mais malheureusement les données ne sont pas disponibles.

Notons que le mécanisme de cette résistance n'est pas élucidé dans la littérature.

Le gène *CYP2C9*

Le polymorphisme du *CYP2C9* (c.430C>T)

CYP2C9 est la principale enzyme hépatique responsable du métabolisme de l'Acénocoumarol. Ces polymorphismes sont associés à une diminution de l'activité catalytique du *CYP2C9* comparé au type sauvage.

Nous avons observé une différence entre la dose d'équilibre d'Acénocoumarol pour les porteurs du génotype sauvage CC et le génotype homozygote muté TT. Les porteurs du génotype muté ont nécessité des doses plus faibles, cependant la différence n'était pas statistiquement significative ($p=0.38$).

De nombreuses études ont montré que les porteurs du génotype muté nécessitent des doses plus faibles [9] [93] [208].

La fréquence de l'allèle T dans notre étude était égale à 27%, ce pourcentage est relativement plus élevé comparé à la population caucasienne (19,1%). Nous suggérons que l'allèle T en position 430 du *CYP2C9* est très conservé dans notre population d'étude.

Le polymorphisme *CYP2C9*3*

Les patients porteurs du génotype homozygote muté CC ont nécessité une diminution des doses de l'ordre de 30%. Contrairement au polymorphisme *CYP2C9*2*, la différence de doses était statistiquement significative ($p=0.04$).

Le polymorphisme du *CYP2C9*3* semble avoir plus d'influence sur la dose d'Acénocoumarol comparée au *CYP2C9*2*. Ces données sont à interpréter avec prudence car selon certaines études l'allèle *CYP2C9*2* influence la dose d'Acénocoumarol tout autant que l'allèle *CYP2C9*3* [209].

La fréquence de l'allèle muté dans notre population était de 22%, ce qui représente une valeur très élevée par rapport à la fréquence allélique retrouvée chez les caucasiens (10%) [210]. Par ailleurs, une étude plus vaste et représentative demeure nécessaire pour mieux évaluer la fréquence allélique dans la population maghrébine.

Le polymorphisme 1347G>A du gène *CYP4F2*

Le cytochrome P450 4F2 (*CYP4F2*) a récemment été identifié dans des études de génome complet GWAS (*Genome Wide Association Study*) comme responsable d'une part de la variabilité dans la réponse à l'Acénocoumarol [211].

Durant notre étude, nous n'avons pas trouvé de différence de doses d'Acénocoumarol entre les porteurs des trois génotypes, ce qui confirme que la dose d'équilibre d'Acénocoumarol n'est probablement pas influencée par le polymorphisme du gène *CYP4F2 1347G>A*.

Ces résultats sont en accord avec les données rapportées par Kaplana et collaborateurs, qui ont démontré qu'il n'y avait pas d'association entre la variation de la dose d'Acénocoumarol et le polymorphisme du *CYP4F2* chez la population sud indienne [212].

Cependant, nos résultats sont contradictoires aux conclusions de plusieurs études précédentes qui ont publiées sur ce polymorphisme, notamment l'étude effectuée en Hongrie sur 977 patients, qui indique que les patients avec un génotype muté nécessitent des doses plus élevées de la warfarine [213].

Malgré une certaine association du polymorphisme du *CYP4F2* avec la posologie d'entretien à l'Acénocoumarol, sa contribution à la variabilité de dose selon plusieurs auteurs reste relativement faible, estimée entre 1.3% et 2.1% [214].

La fréquence allélique était de 9%, elle se rapproche des fréquences retrouvées en Afrique (7%) et en Amérique (9%). Cette faible fréquence, peut expliquer en partie la non influence sur la dose d'équilibre [212].

Le *CYP4F2* est une enzyme dont l'action sur le métabolisme de la vitamine K époxyde intervient avant l'étape réalisée par le *VKORC1*. La présence du génotype muté du *CYP4F2* a pour conséquence une activité enzymatique *CYP4F2* diminuée, ce qui conduit à une accumulation de la vitamine K époxyde, et donc à plus de substrat pour *VKORC1* (résistance à l'Acénocoumarol).

Le polymorphisme (c.29809A>G) du gène *CALU*

Tout comme pour le variant *CYP4F2*, notre étude a révélé que le polymorphisme *CALU* (c.29809A>G) semble n'avoir aucun effet significatif sur la variabilité de la dose journalière d'Acénocoumarol.

Bien que les études soient peu nombreuses, l'impact du polymorphisme *CALU* (c.29809A>G) sur les doses d'Acénocoumarol s'est avéré controversé [50]. Deux études menées respectivement dans la population égyptienne [215] et dans la population espagnole [216] rejoignent nos résultats, à savoir que ce polymorphisme génétique n'est pas associé avec la variabilité de la dose d'AVK.

Il a été constaté dans l'étude faite par Cadamuro sur 206 patients en Europe, que ce polymorphisme influence la dose d'Acénocoumarol, mais avec un impact généralement mineur [166].

La fréquence de l'allèle muté dans notre étude était de 21%, ce pourcentage est proche de celui retrouvé dans la population espagnole (27%) [45].

Le gène *CALU* code pour la protéine caluminine, cette dernière agit comme un inhibiteur gamma carboxylase. La présence du gène muté de la *CALU* est associée à une résistance à l'Acénocoumarol [217].

Elaboration de l'algorithme

Notre présent projet de recherche a pour but d'élaborer un algorithme pharmacogénétique prédictif de la posologie d'équilibre d'Acénocoumarol au profit des patients du service de cardiologie du CHU de Sétif. Cette approche prédictive par l'utilisation des données génétiques et cliniques **représente une première en Algérie.**

Dans notre étude, les résultats de la régression linéaire multiparamétriques pas à pas ont montré que les polymorphismes génétiques du *VKORC1-1639G>A* ainsi que celui du *VKORC1*3(c.9041G>A)*, étaient les seuls facteurs génétiques qui influençaient la dose d'équilibre.

En effet, lors de l'analyse uni variée, le polymorphisme du *CYP2C*3* avait une influence significative ($p=0,04$), mais lorsqu'on a effectué une analyse de régression multiple ce polymorphisme n'avait plus d'influence statistiquement significative.

Concernant les facteurs non cliniques, les résultats de l'analyse uni variée ont révélés que seuls les paramètres « âge et poids » influençaient la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.

Par contre, l'hypertension artérielle n'avait plus d'influence statistiquement significative.

D'après notre étude, les covariables qui ont permis d'expliquer une partie de la variabilité étaient le polymorphisme génétiques du *VKORC1-1639G>A*, qui a contribué seule à un pouvoir prédictif égale à 30,2% ce qui rend son influence majeur sur la dose d'équilibre de l'Acénocoumarol.

Ces résultats concordent avec de nombreuses études réalisées sur l'Acénocoumarol et la warfarine [201] [218] [219] [220] [221].

La part de variabilité expliquée par ce polymorphismes génétiques est différente d'une population a une autre. Une étude réalisée sur la warfarine composée de 3 groupes racial a démontré que le pourcentage de variabilité pour les asiatique, les noirs et les blancs était respectivement de 26.7%, 26.3% , et 48.5% [22].

Dans la présente étude, la part de variabilité interindividuelle de la dose d'équilibre d'Acénocoumarol expliqué par le polymorphisme du *VKORC1*3 (c.9041G>A)* était de 7%, nettement moindre comparée avec celui du *VKORC1*2* (30 ,2%).

Seulement deux algorithmes publiés sur l'Acénocoumarol ont intégré ces deux polymorphismes, celui de Ajemi et collaborateurset de Krishna Kuma. La part de variabilité expliquée par ce covariable algorithme était respectivement 4,5% et 23,9% [19] [223].

Les résultats de nos analyses appuient notre hypothèse concernant l'impact de la pharmacogénétique sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol. En effet, la contribution de la

pharmacogénétique dans notre modèle final est de 37,2%, elle est plus puissante que les facteurs non génétiques représentés par l'âge et le poids, dont la contribution est égale à 7,9%.

Ces résultats appuient également ceux rapportés dans d'autres études [224] [188] [225].

Selon notre modèle final, la combinaison des variables génétiques (*VKORC1-1639G>A*, *VKORC1 1173 C>T*) et non génétique, a pu expliquer jusqu'à 45,1% de la variabilité de doses journalière d'équilibre d'Acénocoumarol.

Le coefficient de détermination pour notre algorithme (R^2)= 45.1 %.

Le premier algorithme publié dans la littérature était celui de Kamali et collaborateurs en Angleterre, son coefficient de détermination est égale 20,4% [226]. Depuis, de nombreux algorithmes ont été publiés avec des coefficients de détermination pouvant atteindre jusqu'à 61%. Les différents algorithmes avec leurs coefficients de détermination sont représentés dans le tableau 30.

Cerezo-Manchado et collaborateurs ont développé chez la population espagnole un algorithme avec un R^2 d'environ 50%. Ce modèle est formé des variants *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2*, l'âge et l'IMC [227]. Chez la même population, un autre algorithme avec un déterminant prédictif R^2 le plus élevé (61%) à été développé par Borobia et collaborateurs [177]. Cet algorithme a comporté, en plus des paramètres du premier, le polymorphisme d'APOE (Apolipoprotéine E). Ceci démontre que, le fait d'intégrer plusieurs facteurs prédictifs dans un algorithme de prédiction de dose, augmenterait sa performance prédictive.

Nous pouvons constater que, le déterminants R^2 des modèles de régression multivariée est affectés par la nature et le nombre des variables indépendants qui les composent, ainsi que par la taille des échantillons explorés.

Tableau 30 : Récapitulatif des études ayant publiées différents algorithmes avec leurs coefficients de détermination

Auteurs et références	Pays	Paramètres non génétiques significativement associés Variance	Paramètres génétiques significativement associés	R ²	Algorithme
La présente étude	Algérie	Age Poids	VKORC1 -1639 G>A VKORC1*3	45,1%	Log Dose d'Acénocoumarol (mg/j)=0.599-0.147x(Génotype VKORC1*2)+0.074x(Génotype VKORC1*3)-0.003x (Age)+0.003x (Poids)
Elkhazradji 2018 [170]	Maroc	Age	VKORC1 -1639 G>A VKORC1 1173 C>T CYP2C9 Haplotype	35.9%	Log Dose (mg/semaine)= 1.925-0.108x (VKORC1 -1639 G>A) - 0.073x (VKORC1 1173 C>T)-0.093x (CYP2C9 Haplotype) - 0.003x (Age)
Ajim 2018 [19]	Tunisie	Age Poids Antibiotiques	CYP2C9*3 VKORC1*3 VKORC1*4 VKORC1*intron1 CALU CYP4F2	48.1%	Dose normalisée(mg/jour)=3.680-(0.036×âge+0.014×poids) +(0.633×ATB)-(0.428× CYP2C9*3)+(0.437× VKORC1*3)+(0.507×VKORC1*4)-(0.711×VKORC1*intron1)+(0.634× CALU)+ (0.582× CYP4F2).
Ragia et collaborateurs 2017 [228]	Grèce	Age Poids	CYP2C9*2 CYP2C9*3 VKORC1 -1639 G>A	53.9%	Dose mg/jour = antilog (0.555 - 0.034 × CYP2C9 - 0.160 × VKORC1 - 0.004 × age [annees] + 0.004 × poids [kg]), 1 pour CYP2C9*1/*1, 2 pour CYP2C9*1/*2, 3 pour CYP2C9*1/*3, 4 pour CYP2C9*2/*2 et 5 pour CYP2C9*2/*3. VKORC1 pour GG, 2 pour GA et trios pour AA.
Reni Tzveova et collaborateurs 2015[26]	Bulgarie	Age indications	VKORC-1639G>A CYP2C9*3	46.5%	-non disponible
Tudor Radu Pop et collaborateurs 2013[229]	Roumanie	Age Indice de masse corporel	VKORC-1639G>A CYP2C9*3 CYP2C9*2	35%	Log D=1.402 - [0.005 × âge]+(0.009 × IMC) - (0.094 si allèle CYP2C9*2 est présent) - (0.099 si CYP2C9*3 allèle est présent) - (0.135 si GA est présent) - (0.285 si génotype AA est présent)

Auteurs et références	Pays	Paramètres non génétiques significativement associés Variance	Paramètres génétiques significativement associés	R ²	Algorithme
Wolkanin-Bartnik, Jolanta 2013 [230]	Pologne	Age Poids Quantité de vitamine k Clérance de la créatinémie	VKORC-1639G>A	49%	Exp [1.79468 – 0.01373 age + 0.00422 poids + 0.00030589 vitamin K (mcg/jour) – 0.35744 si VKORC1 A/G, – 0.66085 si VKORC1 A/A, – 0.14129 si CYP2C9 non*1/*1, – 0.21131 is CrCl < 40 (ml/min)]
Markatos et collaborateurs 2008 [231]	Greque	Age	VKORC1 CYP2C9	55%	Dose=anti log [1.083-0.004 âge-0.188X VKORC1génotype-0.073 CYP2C9 génotype]
Cerezo-Manchado et collaborateurs 2013 [232]	Espagne	AGE Poids Taille	(VKORC1, CYP2C9*2 CYP2C9*3 CYP4F2 polymorphisms	48%	Non mentionné
Borobia et collaborateurs 2012 [177]	Espagne	Age, IMC, amiodarone	CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, APOE	61%	Non mentionné
Van Schie et collaborateurs 2011[225]	Netherlande	Age, Taille, Poids, Sexe, Amiodarone	CYP2C9 VKORC1	52,6%	Dose (mg/semaine) = 2.874 – 0 (si CYP2C9*1/*1) - 20.259 (si CYP2C9*1/*2) - 20.342 (si CYP2C9*1/*3)- 20.447 (si CYP2C9*2/*2)- 20.684 (si CYP2C9*2/*3) - 20.681 (si CYP2C9*3/*3) -20 (si VKORC1 CC) - 20.601 (si VKORC1 CT) 21.394 (si VKORC1 TT) - 20.015 x âge +0.026 (si femme) +0.011 x taille (cm) +0.008 x poids (kg)+20.345 (si l'Amiodarone est utilisé)
DhakchinamoorthiKrishna Kumar 2014 [223]	Inde	Age, et BMI	CYP2C9*2 CYP2C9*3 VKORC1G>A	61,5%	Log Dose(mg/jour))= 0.399- 0.005(age)+0.012(BMI)- 0.171(CYP2C9*2)0.072(CYP2C9*3)- 0.144(VKORC1G>A).

Auteurs et références	Pays	Paramètres non génétiques significativement associés Variance	Paramètres génétiques significativement associés	R ²	Algorithme
Angela Roco 2020 [46]	Chili	Age, indice de masse corporel Sexe INR initial.	<i>VKORC1</i> (rs9923231), <i>CYP2C9</i> *2 (rs1799853) <i>CYP2C9</i> *3 (rs1057910)	49.99%	Log Dose mg/semaine = 3.081 + (0.167 × homme) - (age × 0.081) - (INRinitial × 0.55) + (imc × 0.013) - (CYP2C9*1/*2 × 0.107) - (CYP2C9*1/*3 × 0.323) - (CYP2C9*3/*3 × 0.746) - (VKORC1 G/A × 0.270) - (VKORC1 A/A × 0.701).
Rathore et collaborateurs 2012 [21]	Inde	Age, Taille, BSA, Sexe, Consommation du tabac Indication Poids	CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, GGCX	41,4%	(mg/jour) = 3.082 - 0.013(1 pour fumeur et 0 pour non fumeur) - 0.433 (sexe, 1 pour homme et 0 pour femme) - 0.004(âge en années) + indication(0.327 pour et - 0.092 pour AVR) + 0.026(taille en cm) + 0.151(poids en Kg) - 7.660(IMC en cm ²) - 0.862(VKORC1 GA) - 2.257(VKORC1 AA) - 0.049(CYP2C9*2 CT) - 0.456(CYP2C9*3 AC) + 0.449(CYP4F2 GA) + 0.230(CYP4F2 AA) + 0.245(GGCX CG) + 1.055(GGCX GG)
Hoi Y. Tong 2016 [24]	Espagne	age, poids, usage de l'amiodarone, status inducteur d'enzyme fourchette thérapeutique de l'INR	<i>CYP2C9</i> *2 (rs1799853) <i>CYP2C9</i> *3 (rs1057910) <i>VKORC1</i> (rs9923231) et <i>CYP4F2</i> (rs2108622).	52,8%	Log Dose (mg/semaine) = 3.181 - 0.111 (si <i>CYP2C9</i> *1/*2) - 0.323 (si <i>CYP2C9</i> *1/*3) - 0.691 (si <i>CYP2C9</i> *3/*3) - 0.302 (si <i>VKORC1</i> AG) - 0.727 (si <i>VKORC1</i> AA) + 0.214(CYP4F2 MM)* - 0.010age (année) + 0.005 * poids (kg) - 0.337 (si amiodarone est utiliser) + 0.070(médicament inducteurs du CYP2C9) + 0.086 (si fourchette thérapeutique de l'INR entre 2,5-3.5)

Il est important de démontrer la justesse des algorithmes pharmacogénétiques de prédiction des doses d'Acénocoumarol avant d'instaurer l'individualisation des traitements dans la pratique clinique réelle.

Bien que plusieurs algorithmes pharmacogénétiques de prédiction des doses d'Acénocoumarol aient été publiés, peu d'études se sont intéressées à la validité de ces algorithmes en pratique clinique réelle.

Notre étude est, à notre connaissance, la première à évaluer la validité réelle d'un algorithme pharmacogénétique de prédiction de doses d'Acénocoumarol dans la région du Maghreb. Nous avons évalué la validité de notre algorithme sur 19 patients non sélectionnés du service de cardiologie du CHU Sétif.

Nous avons décelé une forte corrélation statistiquement significative entre la dose prédite et la dose observé ($r= 0,653$ et $p=0,002$). Ce résultat est comparable avec l'algorithme de Borbia ou $r=0,648$ et nettement plus supérieur que celui de Krishna Kumar ($r=0.07$) [177] [223].

Par contre notre coefficient de corrélation était nettement plus inférieur par rapport à celui de l'algorithme Eupact ($r=0,706$) [234].

La précision pour notre algorithme a été évalué par le biais de l'erreur absolue moyenne qui était de 1.057 (95 % CI 1.037-1.078) mg/j une valeur positive ce qui démontre que notre algorithme a une tendance de sur estimation des dose d'équilibre d'Acénocoumarol.

L'erreur absolue moyenne fournie par notre algorithme est inférieur à celle de l'algorithme de Krishna Kumar (3.42) et supérieur à celle de l'algorithme de Rathore. Nous pouvons alors dire que la précision de notre algorithme est moyenne [233] [188].

A ce jour, l'algorithme prédictif de posologie de l'Acénocoumarol le mieux valide dans le monde reste celui de l'Eupact, ce dernier permet de déterminer la dose d'Acénocoumarol avec une grande précision.

Pour avoir une meilleure idée de la validité clinique de l'algorithme élaboré lors de ce projet, nous avons décidé d'évaluer la proportion de sujets pour lesquels les doses prédites étaient soit sous-estimées, idéales ou surestimées, par rapport aux vraies doses thérapeutiques des patients. Ainsi, en ce qui a trait à la catégorie des doses sous-estimées, il semble que notre

l'algorithme génère un pourcentage de doses prédites sous estimées (0 %) ce qui montre que notre algorithme est idéal pour les patients nécessitant des doses d'équilibre élevées.

La dose prédite par notre algorithme a été adéquate (avec un écart $\leq 15\%$) pour 89,5% des patients de notre cohorte de validation, en comparaison avec les 40 à 50% obtenus avec d'autres modèles qui n'atteignent que 60% pour les cohortes de validations [177] [62].

Notre algorithme pharmacogénétique a proposé des doses surestimées chez 10,5% des patients de la cohorte de validation. Ce pourcentage est inférieur à celui de Enrique Jiménez-Varoa (30%) [235].

En résumé, notre modèle pharmacogénétique a montré une plus grande précision dans la prédiction et la classification correcte des patients.

À notre connaissance, ce travail présente la première étude effectuée en Algérie qui a conduit au développement d'un algorithme pharmacogénétique prédictif de posologie pour un médicament.

Ce présent projet, possède des qualités authentiques relatives à l'ampleur des données génétiques et épidémiologiques obtenues.

En premier lieu, puisque notre étude était de nature prospective, nous avons colligé des données en temps réel pour de multiples variables, facteurs qui n'étaient pas souvent pris en considération (activité sportive, statut de fumeur) dans d'autres études publiées sur la pharmacogénétique de l'Acénocoumarol.

Un autre point fort concerne les données génétiques ; En effet, le fait que nous avons génotypé tous les patients pour 8 SNPs, non seulement pour les polymorphismes du *CYP2C9* et du *VKORC1*, mais également évalué l'association entre des variant de gènes candidats du *CYP4F2* et *CALU* sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol.

Nous avons réalisé une revue de littérature détaillée pour choisir les polymorphismes qui pourraient être associés à la dose d'équilibre d'Acénocoumarol ce qui constitue une force majeure de notre étude.

Enfin, un point particulièrement important consiste au fait d'avoir développé une application androïde (Acénocoumarol Doising) intégrant l'équation de régression obtenue par notre étude. L'application a été conçue pour améliorer la gestion de l'Acénocoumarol.

En effet, l'incorporation du concept m-santé (m health) par le biais de l'application androïde « Acénocoumarol doising » semble être une réelle opportunité, à la fois pour améliorer l'anticoagulation à l'égard de certaines pathologies et le suivi des patients atteints de maladies chroniques, mais aussi pour renforcer la relation patient-professionnels de santé et optimiser la gestion du parcours de santé du patient dans un établissement de santé ou à son domicile, en l'intégrant pleinement dans la stratégie des soins

Principales limites de notre travail :

Certaines limitations à notre étude méritent d'être mentionnées :

- ✓ Un nombre limité de patients : nous le justifions par l'absence de cliniques d'anticoagulation.
- ✓ Un biais de désirabilité sociale a pu être introduit dans nos analyses étant donné que certaines variables telles que les informations sur la consommation d'alcool étaient récoltées uniquement à l'aide de questionnaires.
- ✓ Nous n'avons pas pu évaluer adéquatement l'impact de l'ethnie sur les doses d'équilibre d'Acénocoumarol, car tous les patients de notre étude étaient des caucasiens, la généralisabilité de nos résultats peut se limiter uniquement aux individus ayant des caractéristiques semblables aux patients de notre étude.
- ✓ Une limite légale concernant l'hébergement des données (patients et cliniciens) obtenus à partir de l'application androïde (Acénocoumarol Doising). Une seule option s'offre à nous est de demander un agrément pour Héberger nous-mêmes nos données : cette option s'avère totalement illusoire dans le cadre d'un projet de thèse.

Conclusion et perspectives

Lors de ce travail, nous avons évalué l'impact des paramètres génotypiques et phénotypiques qui peuvent influencer l'obtention de la dose d'équilibre optimale d'Acénocoumarol, en situation réelle. À travers ces données nous avons démontré la grande variabilité inter populationnelle observés dans la dose d'équilibre d'Acénocoumarol et dans les distributions génotypiques et alléliques.

L'algorithme pharmacogénétique développé lors de notre étude permet aux cliniciens d'entrer les variables dont ils disposent sur un patient, via une interface très simple, et ainsi d'ajuster dès l'initiation du traitement la dose d'Acénocoumarol. Il pourrait aider à prévoir et à prévenir les effets indésirables en réduisant le temps nécessaire pour définir la dose d'équilibre optimale.

La pharmacogénétique de l'Acénocoumarol représente un bon exemple d'application de la médecine personnalisée. En effet, l'introduction des données pharmacogénétiques est un enjeu crucial pour mieux définir les populations à risque qui répondront d'avantage à des nouveaux traitements qui seront ciblés et coûteux, tels que les anticoagulants oraux directes.

Dans cette période particulière du Covid-19 que nous vivons, l'application androïde (Acénocoumarol Doising) se révèle très pratique. En effet, elle amènera les patients à être plus responsables en ce qui concerne leur santé et leurs soins et elle renforcera la relation clinicien-patient.

Enfin, notre étude constitue un grand pas vers l'amélioration du rapport bénéfice/risque de l'Acénocoumarol en Algérie, dans un contexte, de médecine personnalisée et participative.

Notre étude a mis en évidence l'intérêt de la pharmacogénétique en ce qui concerne la prédiction des doses d'Acénocoumarol en situation clinique réelle. Cependant, l'intérêt pharmacoéconomique du génotypage dans la prise en charge des malades traités par AVK reste actuellement controversé. En effet, il reste à définir dans les prochaines années quels sont les « tests pharmacogénétiques » cliniquement pertinents à rembourser et promouvoir. À ce sujet, mentionnons qu'un projet de recherche (PRFU) est présentement en cours.

Notre étude a mis en évidence la validité de notre algorithme pharmacogénétique, toutes fois d'autres travaux sont nécessaires pour évaluer notre algorithme. En effet, si cet algorithme a été élaboré seulement à partir de 100 patients du service de cardiologie du CHU Sétif, il serait intéressant de répliquer cette étude sur une population très représentative, dans les différentes régions de notre pays, afin d'améliorer le pouvoir prédictif du présent algorithme. Cela va nécessiter, l'utilisation des techniques sophistiquées telles le séquençage à haut débit, et une plus grande collaboration entre les cliniciens et les pharmacogénéticiens.

A travers l'application « Acenocoumarol Doising », nous avons réussi à instaurer une stratégie de suivi thérapeutique approprié à l'Acénocoumarol, basée sur la coordination, la coopération et la communication au sein de la triade formée par le laboratoire d'analyse, les cliniciens et le patient. Les sources de données générées par cette application serviront sans doute à alimenter d'autres bases de données. En effet, les applications mobiles dans le domaine de la santé constituent une source incontournable pour la captation de données. Bien exploitées et traitées, ces données sont une mine d'or d'informations pour la santé publique et la recherche médicale.

Références bibliographiques



- [1] Archambault DP. ACTUALITE DES ANTICOAGULANTS 2017:29.
- [2] Pirmohamed M, Kamali F, Daly AK, Wadelius M. Oral anticoagulation: a critique of recent advances and controversies. *Trends in Pharmacological Sciences* 2015;36:153–63. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.01.003>.
- [3] Barnes GD, Lucas E, Alexander GC, Goldberger ZD. National Trends in Ambulatory Oral Anticoagulant Use. *The American Journal of Medicine* 2015;128:1300-1305.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.05.044>.
- [4] www.ansm.santé.fr.
- [5] Shehab N, Lovegrove MC, Geller AI, Rose KO, Weidle NJ, Budnitz DS. US Emergency Department Visits for Outpatient Adverse Drug Events, 2013-2014. *JAMA* 2016;316:2115. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.16201>.
- [6] Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of Warfarin Elimination and its Clinical Implications: *Clinical Pharmacokinetics* 2001;40:587–603. <https://doi.org/10.2165/00003088-200140080-00003>.
- [7] Visser L, van Schaik R, van Vliet M, Trienekens P, De Smet P, Vulto A, et al. The risk of bleeding complications in patients with cytochrome P450 CYP2C9*2 or CYP2C9*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon. *Thromb Haemost* 2004;92:61–6. <https://doi.org/10.1160/TH03-12-0741>.
- [8] 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines - American College of Cardiology. <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/journal-scans/2014/03/17/13/59/2014-aha-acc-guideline-for-the-management-of-patients-with-vhd> (accessed April 14, 2020).
- [9] WHO INTERNATIONAL STANDARD THROMBOPLASTIN, RABBIT, PLAIN :3.
- [10] Les anticoagulants en France en 2014 : état des lieux , synthèse et surveillance 2014:78.
- [11] Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral Anticoagulant Therapy. *Chest* 2012;141:e44S-e88S. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2292>.
- [12] Jia L, Wang Z, Men J, Cai H, Wei M. Polymorphisms of VKORC1 and CYP2C9 are associated with warfarin sensitivity in Chinese population. *TCRM* 2017;Volume 13:421–5. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S130198>.
- [13] Al-Mahayri ZN, Al Jaibeji HS, Saab Y, Soliman K, Al-Gazali L, Patrinos GP, et al. VKORC1 variants as significant predictors of warfarin dose in Emiratis. *Pharmgenomics Pers Med* 2019;12:47–57. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S187350>.
- [14] Ruaño G, Thompson PD, Villagra D, Bower B, Kocherla M, Yazdanpanah G, et al. High carrier prevalence of combinatorial CYP2C9 and VKORC1 genotypes affecting warfarin dosing. [Http://DxDoiOrg/102217/1741054153225](http://DxDoiOrg/102217/1741054153225) 2008. <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/17410541.5.3.225> .

- [15] Farzamikia N, Sakhinia E, Afrasiabirad A. Pharmacogenetics-Based Warfarin Dosing in Patients With Cardiac Valve Replacement: The Effects of CYP2C9 and VKORC1 Gene Polymorphisms. *Lab Med* 2018;49:25–34. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx072>.
- [16] Christopher R. Significance of CYP4F2 polymorphism on oral anticoagulation therapy with acenocoumarol in South Indian patients with mechanical heart valves. *Meta Gene* 2019;20:100564. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100564>.
- [17] Li, JH., Ma, GG., Zhu, SQ. et al. Correlation between single nucleotide polymorphisms in CYP4F2 and warfarin dosing in chinese valve replacement patients. *J Cardiothorac Surg* 7, 97 (2012). <https://doi.org/10.1186/1749-8090-7-97>
- [18] Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, Haltmayer M, et al. Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:253–60. <https://doi.org/10.1007/s00228-009-0768-7>.
- [19] Ajmi M, Omezzine A, Achour S, Amor D, Hamdouni H, Ismaïl FBF, et al. Influence of genetic and non-genetic factors on acenocoumarol maintenance dose requirement in a Tunisian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2018;74:711–22. <https://doi.org/10.1007/s00228-018-2423-7>.
- [20] Smires FZ, Habbal R, Moreau C, Assaidi A, Loriot MA, Nadifi S. Effect of different genetics variants: CYP2C9*2, CYP2C9*3 of cytochrome P-450 CYP2C9 and 1639G>A of the VKORC1 gene; On acenocoumarol requirement in Moroccan patients. *Pathologie Biologie* 2013;61:88–92. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.002>.
- [21] Abdelhak Elkhazraji, El Arbi Bouaiti, Hassan Boulahyaoui, Christiana philippa Nahmtchougli, Hafid Zahid, Mounia Bensaid, Azeddine Ibrahimi, Nezha Messaoudi, Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, and GGCX gene variants and patient characteristics on acenocoumarol maintenance dose: Proposal for a dosing algorithm for Moroccan patients, *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2018, Volume 12, Issue 2, Pages 68-76. <https://doi.org/10.5582/ddt.2017.01063>,
- [22] Eckman MH. Cost-Effectiveness of Using Pharmacogenetic Information in Warfarin Dosing for Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Ann Intern Med* 2009;150:73. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-2-200901200-00005>.
- [23] Martes-Martinez C, Méndez-Sepúlveda C, Millán-Molina J, French-Kim M, Marín-Centeno H, Rivera-Miranda GC, et al. Cost-Utility Study of Warfarin Genotyping in the VACHS Affiliated Anticoagulation Clinic of Puerto Rico 2018:16.
- [24] Tong HY, Dávila-Fajardo CL, Borobia AM, Martínez-González LJ, Lubomirov R, Perea León LM, et al. A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population. *PLoS ONE* 2016;11:e0150456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150456>.
- [25] Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009;360:753–64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0809329>.

- [26] Tzveova R, Dimitrova-Karamfilova A, Saraeva R, Solarova T, Naydenova G, Petrova I, et al. Estimation and validation of acenocoumarol dosing algorithms in Bulgarian patients with cardiovascular diseases. *Personalized Medicine* 2015;12:209–20. <https://doi.org/10.2217/pme.14.80>.
- [27] Mueller RL, Scheidt S. History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. *Circulation* 1994. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.1.432>
- [28] VIDAL-AVK https://www.vidal.fr/recommandations/1511/avk_traitement_par/a_savoir/ (accessed August 11, 2020).
- [29] Ufer M. Comparative Pharmacokinetics of Vitamin K Antagonists: Warfarin, Phenprocoumon and Acenocoumarol. *Clinical Pharmacokinetics* 2005;44:1227–46. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544120-00003>.
- [30] Lin Y, Shen X, Yuan Q, Yan Y. Microbial biosynthesis of the anticoagulant precursor 4-hydroxycoumarin. *Nat Commun* 2013;4:2603. <https://doi.org/10.1038/ncomms3603>.
- [31] Ea S, Pj A, Ha W, F K. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) polymorphism influences the anticoagulation response subsequent to vitamin K intake: a pilot study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2008;6. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03003.x>.
- [32] Ma L, P B. [Vitamin K epoxide reductase: Fresh blood for oral anticoagulant therapies]. *La Revue de Medecine Interne* 2006;27. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2006.09.004>.
- [33] Inhibiteurs de la synthèse des facteurs vitamine K dépendants (AVK) . <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/inhibiteurs-de-la-synthese-des-facteurs-vitamine-k-dependants-avk> (accessed August 15, 2020).
- [34] Hardmann JG, Limbird LE, Gilman AG. Goodman & Gilman’s *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11 ed; 2006.
- [35] Godbillon J, Richard J, Gerardin A, Meinertz T, Kasper W, Jähnchen E. Pharmacokinetics of the enantiomers of acenocoumarol in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1981;12:621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1981.tb01280.x>.
- [36] Saraeva RB, Paskaleva ID, Doncheva E, Eap CB, Ganev VS. Pharmacogenetics of acenocoumarol: CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and dose requirements. *J Clin Pharm Ther* 2007;32:641–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2007.00870.x>.
- [37] VIDAL - SINTROM 4 mg cp quadriséc - Pharmacocinétique n.d. <https://www.vidal.fr/Medicament/sintrom-15070-pharmacocinetique.htm> (accessed September 19, 2020).
- [38] VIDAL - AVK (traitement par) [Internet]. VIDAL; 2020. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/Medicament/previscan-13706pharmacodynamie.htm> n.d.

https://www.vidal.fr/recommandations/1511/avk_traitement_par/a_savoir/ (accessed September 17, 2020).

[39] Siguret V, Pautas E, Gouin-Thibault I. Warfarin therapy: influence of pharmacogenetic and environmental factors on the anticoagulant response to warfarin. *Vitam Horm* 2008;78:247–64. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)00012-X).

[40] Debray M, Pautas E, Couturier P, Franco A, Siguret V. Anticoagulation orale en pratique gériatrique. *La Revue de Médecine Interne* 2003;24:107–17. [https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(02\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0248-8663(02)00020-6).

[41] Redwood M, Taylor C, Bain BJ, Matthews JH. The Association of Age with Dosage Requirement for Warfarin. *Age Ageing* 1991;20:217–20. <https://doi.org/10.1093/ageing/20.3.217>.

[42] Self TH, Wallace JL, Sakaan S, Sands CW. Effect of Body Weight on Dose of Vitamin K Antagonists. *South Med J*. 2015 Oct;108(10):637-43. doi: 10.14423/SMJ.00000000000000356.

[43] Ww N, S D, Cv D, L L, Le F, P W, et al. International normalized ratio stability in warfarin-experienced patients with nonvalvular atrial fibrillation. *American Journal of Cardiovascular Drugs : Drugs, Devices, and Other Interventions* 2015;15. <https://doi.org/10.1007/s40256-015-0120-9>.

[44] Waterman AD, Milligan PE, Bayer L, Banet GA, Gatchel SK, Gage BF. Effect of warfarin nonadherence on control of the International Normalized Ratio. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2004;61:1258–64. <https://doi.org/10.1093/ajhp/61.12.1258>.

[45] Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *The American Journal of Medicine* 2004;116:651–6. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.12.036>.

[46] Ek R, Fr R, Fj VDM. Daily vitamin K supplementation improves anticoagulant stability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2007;5. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02715.x>.

[47] Leblanc C, Dubé M-P, Presse N, Dumas S, Nguyen M, Rouleau-Mailloux É, et al. Avoidance of Vitamin K–Rich Foods Is Common among Warfarin Users and Translates into Lower Usual Vitamin K Intakes. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 2016;116:1000–7. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2015.12.023>.

[48] Les Anticoagulants en France en 2014. Agence Nationale de Sécurité du Médicament: p. 40 .

[49] Thésaurus des interactions médicamenteuses. . Agence Nationale de Sécurité du Médicament, 2016: p. 31-35.

[50] https://www.lecrat.fr/spip.php?page=article&id_article=694 (accessed September 20, 2020).

[51] Quoi de neuf concernant les Antivitamines K ? - Point d'information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé .

- <https://www.ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Quoi-de-neuf-concernant-les-Antivitamines-K-Point-d-information> (accessed September 20, 2020).
- [52] The International Normalized Ratio: How well do we understand this measurement? | AACC.org n.d. <https://www.aacc.org/community/aacc-academy/publications/scientific-shorts/2012/the-international-normalized-ratio-how-well-do-we-understand-this-measurement> (accessed September 20, 2020).
- [53] ANSM. Rapport de l'Agence française de sécurité des médicaments et des produits de santé30/11/2018.
- [54] Cios DA, Baker WL, Sander SD, Phung OJ, Coleman CI. Evaluating the impact of study-level factors on warfarin control in U.S.-based primary studies: a meta-analysis. *Am J Health Syst Pharm* 2009;66:916–25. <https://doi.org/10.2146/ajhp080507>.
- [55] Reynolds MW, Fahrback K, Hauch O, Wygant G, Estok R, Cella C, et al. Warfarin Anticoagulation and Outcomes in Patients With Atrial Fibrillation. *Chest* 2004;126:1938–45. <https://doi.org/10.1378/chest.126.6.1938>.
- [56] Costa GL de B, Lamego RM, Colosimo EA, Valacio RA, Moreira M da CV. Identifying Potential Predictors of High-Quality Oral Anticoagulation Assessed by Time in Therapeutic International Normalized Ratio Range: A Prospective, Long-Term, Single-Center, Observational Study. *Clinical Therapeutics* 2012;34:1511–20. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.06.002>.
- [57] Léger S, Allenet B, Calop J, Bosson JL. Éducation thérapeutique des patients sous anticoagulants oraux pour maladie thromboembolique veineuse : description du programme Educ'AVK. *Journal des Maladies Vasculaires* 2004;29:145–51. [https://doi.org/10.1016/S0398-0499\(04\)96736-4](https://doi.org/10.1016/S0398-0499(04)96736-4).
- [58] Detournay B. Coût direct des AVK en France. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* 2016;8:174–9. [https://doi.org/10.1016/S1878-6480\(16\)30332-9](https://doi.org/10.1016/S1878-6480(16)30332-9).
- [59] http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/107/Chapitre_4.html (accessed September 21, 2020).
- [60] Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *The Lancet* 2000;356:1667–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03167-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03167-6).
- [61] Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N Engl J Med* 2003;348:538–49. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020526>.
- [62] Frazer, K.A., et al., Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 2009. 10(4): p. 241.
- [63] Dávila-Fajardo CL, Díaz-Villamarín X, Antúnez-Rodríguez A, Fernández-Gómez AE, García-Navas P, Martínez-González LJ, et al. Pharmacogenetics in the Treatment of Cardiovascular Diseases and Its Current Progress Regarding Implementation in the Clinical Routine. *Genes* 2019;10:261. <https://doi.org/10.3390/genes10040261>.
- [64] David J Elliot S. Identification of the human cytochromes P450 catalysing the rate-limiting pathways of gliclazide elimination. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2007;64:450. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02943.x>.

- [65] Kimura, S., et al., cDNA and amino acid sequences of two members of the human P450IIC gene subfamily. *Nucleic Acids Res*, 1987. 15(23): p. 10053-4.
- [66] Meehan, R., et al., Human cytochrome P-450 PB-1: a multigene family involved in mephenytoin and steroid oxidations that maps to chromosome 10. *American journal of human genetics*, 1988. 42(1): p. 26.
- [67] Fu Z, Zhu Q, Ma Y, Huang D, Pan S, Xie X, et al. Diplotypes of CYP2C9 gene is associated with coronary artery disease in the Xinjiang Han population for women in China. *Lipids in Health and Disease* 2014;13. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-143>.
- [68] Hazel Xiaohui Ang, Sze Ling Chan, Levana L Sani, Clarissa Bernice Quah, Liam R Brunham, Boon Ooi Patrick Tan, Michael D Winther. (2017) Pharmacogenomics in Asia: a systematic review on current trends and novel discoveries. *Pharmacogenomics* 18:9, pages 891-910.
- [69] We E, Mv R. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, NY)* 1999;286. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.487>.
- [70] <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm> .
- [71] Dj S, Rl H, Kr H, G D, Th R, Wf T, et al. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics* 1997;7. <https://doi.org/10.1097/00008571-199710000-00004>.
- [72] Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet (London, England)* 1999;353. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04474-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04474-2).
- [73] Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2017;102. <https://doi.org/10.1002/cpt.690>.
- [74] Hong-GuangXie, Hc P, Rb K, Cm S. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002;54. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00076-5](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00076-5).
- [75] Liu Y, Jeong H-Y, Takahashi H, Drozda K, Patel SR, Shapiro NL, et al. Decreased Warfarin Clearance with the CYP2C9 R150H (*8) Polymorphism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2012;91. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.269>.
- [76] Niinuma, Y., Saito, T., Takahashi, M. et al. Functional characterization of 32 CYP2C9 allelic variants. *Pharmacogenomics J* 14, 107–114 (2014). <https://doi.org/10.1038/tpj.2013.22>
- [77] Rettie AE, Farin FM, Beri NG, Srinouanprachanh SL, Rieder MJ, Thijssen HH. A case study of acenocoumarol sensitivity and genotype-phenotype discordancy explained by combinations of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2006;62:617. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02688.x>.
- [78] Takahashi, Harumi Wilkinson, Grant R, Nutescu. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in

maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans, *Pharmacogenetics and Genomics*: February 2006 - Volume 16 - Issue 2 - p 101-110 doi: 10.1097/01.fpc.0000184955.08453.a8

[79] Takahashi, Harumi, et al. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenetics and Genomics* 2016;16. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000184955.08453.a8>.

[80] Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *The Lancet* 1999;353:717–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04474-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04474-2).

[81] Timothy S. Tracy, J. Matthew Hutzler, Robert L. Haining, Allan E. Rettie, Matthew A. Hummel and Leslie J. Dickmann. Polymorphic variants (CYP2C9*3 and CYP2C9*5) and the F114L active site mutation of CYP2C9: effect on atypical kinetic metabolism profiles. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 2002;30. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.4.385>.

[82] Y Liu , H Jeong, H Takahashi, K Drozda, S R Patel, N L Shapiro, E A Nutescu, L H Cavallari, et al. Decreased warfarin clearance associated with the CYP2C9 R150H (*8) polymorphism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2012;91. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.269>.

[83] Daly AK, Rettie AE, Fowler DM, Miners JO. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations†. *Journal of Personalized Medicine* 2018;8. <https://doi.org/10.3390/jpm8010001>.

[84] Niinuma, Y., Saito, T., Takahashi, M. et al. Functional characterization of 32 CYP2C9 allelic variants. *Pharmacogenomics J* 14, 107–114 (2014). <https://doi.org/10.1038/tpj.2013.22>.

[85] Hernandez W, Gamazon ER, Aquino-Michaels K, Patel S, O'Brien TJ, Harralson AF, et al. Ethnicity-Specific Pharmacogenetics: The Case of Warfarin In African Americans. *The Pharmacogenomics Journal* 2014;14:223. <https://doi.org/10.1038/tpj.2013.34>.

[86] Jarrar YB, Lee S-J. Molecular functionality of CYP2C9 polymorphisms and their influence on drug therapy. *Drug Metabolism and Personalized Therapy* 2014;29:211–20. <https://doi.org/10.1515/dmdi-2014-0001>.

[87] R. Leila Reynald, Stefaan Sansen, C. David Stout, Ef J. Structural characterization of human cytochrome P450 2C19: active site differences between P450s 2C8, 2C9, and 2C19. *The Journal of Biological Chemistry* 2012;287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424895>.

[88] Shukla T, Reddy SC, Korrapatti S, Munpally SK, Tripathi R, Dikshit V, et al. A novel VKORC1 promoter mutation found causing warfarin resistance, along with –1639G>A promoter mutation—A pilot study on the genetic variation in patients on warfarin therapy in South India. *Biomarkers and Genomic Medicine* 2013;5:147–56. <https://doi.org/10.1016/j.bgm.2013.05.001>.

[89] Moreau C, Siguret V, Loriot M-A. Antivitamines K : pharmacologie et pharmacogénétique. *EMC - Biologie médicale* 2011;6:1–9. [https://doi.org/10.1016/S2211-9698\(11\)71437-6](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(11)71437-6).

- [90] Valentina Franco & Emilio Perucca (2015) CYP2C9 polymorphisms and phenytoin metabolism: implications for adverse effects, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 11:8, 1269-1279, DOI: 10.1517/17425255.2015.1053463.
- [91] Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V. et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537–541 (2004). <https://doi.org/10.1038/nature02214>.
- [92] Li, T., Chang, CY., Jin, DY. et al. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427, 541–544 (2004). <https://doi.org/10.1038/nature02254>
- [93] Bodin L. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 2005;106:135–40. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0341>.
- [94] McVean, G. et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491. <https://doi.org/10.1038/nature11632>.
- [95] D'Andrea G, D'Ambrosio R, Margaglione M. Oral anticoagulants: Pharmacogenetics. *Blood Reviews* 2008;22:127–40. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2007.11.004>.
- [96] Rieder MJ. Pharmacogenetics of warfarin treatment for potential clinical application. *Curr Cardio Risk Rep* 2007;1:420–6. <https://doi.org/10.1007/s12170-007-0069-6>.
- [97] Hirani V, Yarovoy A, Kozeska A, Magnusson RP, Lasker JM. EXPRESSION OF CYP4F2 IN HUMAN LIVER AND KIDNEY: ASSESSMENT USING TARGETED PEPTIDE ANTIBODIES. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008;478:59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.06.025>.
- [98] Zhang, Jieying Eunice, Jorgensen, Andrea et al .Effects of CYP4F2 genetic polymorphisms and haplotypes on clinical outcomes in patients initiated on warfarin therapy, *Pharmacogenetics and Genomics: October 2009 - Volume 19 - Issue 10 - p 781-789* doi: 10.1097/FPC.0b013e3283311347
- [99] Kikuta Y, Miyauchi Y, Kusunose E, Kusunose M. Expression and molecular cloning of human liver leukotriene B4 omega-hydroxylase (CYP4F2) gene. *DNA Cell Biol* 1999;18:723–30. <https://doi.org/10.1089/104454999315006>.
- [100] Woo-Young Kim, Su-Jun Lee et al. Identification of novel CYP4F2 genetic variants exhibiting decreased catalytic activity in the conversion of arachidonic acid to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE). *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 2018;131. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.02.003>.
- [101] David E. Stec, Richard J. Roman et al. Functional polymorphism in human CYP4F2 decreases 20-HETE production. *Physiological Genomics* 2007;30. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00003.2007>.
- [102] Ward, Natalie C, Croft, Kevin D, Puddey, Ian B,Phillips, Michael,van Bockxmeer et al. The effect of a single nucleotide polymorphism of the CYP4F2 gene on blood pressure and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid excretion after weight loss, *Journal of Hypertension: July 2014 - Volume 32 - Issue 7 - p 1495-1502* doi: 10.1097/HJH.0000000000000208

- [103] Bardowell SA, Stec DE, Parker RS. Common Variants of Cytochrome P450 4F2 Exhibit Altered Vitamin E- ω -Hydroxylase Specific Activity. *The Journal of Nutrition* 2010;140:1901. <https://doi.org/10.3945/jn.110.128579>.
- [104] Danese E, Montagnana M, Johnson JA, Rettie AE, Zambon CF, Lubitz SA, et al. Impact of the CYP4F2 p.V433M Polymorphism on Coumarin Dose Requirement: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92:746–56. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.184>.
- [105] Onkar Singh, Edwin Sandanaraj, Koilan Subramanian et al. Influence of CYP4F2 rs2108622 (V433M) on warfarin dose requirement in Asian patients. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2011;26. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-080>.
- [106] Glurich I, Berg RL, Burmester JK. Does CALU SNP rs1043550 Contribute Variability to Therapeutic Warfarin Dosing Requirements? *Clinical Medicine & Research* 2013;11:73–9. <https://doi.org/10.3121/cmr.2013.1130>.
- [107] Réginald Philippe, Fabrice Antignyet al. Calumenin contributes to ER-Ca²⁺ homeostasis in bronchial epithelial cells expressing WT and F508del mutated CFTR and to F508del-CFTR retention. *Cell Calcium* 2017;62. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.011>.
- [108] Scott SA, Patel M, Martis S, Lubitz SA, Zee S van der, Yoo C, et al. Copy number variation and warfarin dosing: evaluation of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, GGCX and CALU. *Pharmacogenomics* 2012;13:297. <https://doi.org/10.2217/pgs.11.156>.
- [109] D Voora, D C Koboldt, , C R King, et al. A polymorphism in the VKORC1 regulator calumenin predicts higher warfarin dose requirements in African Americans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2010;87. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.291>.
- [110] Nakagawa T, Kishino S, Itoh S, Sugawara M, Miyazaki K. Differential binding of disopyramide and warfarin enantiomers to human α 1-acid glycoprotein variants. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2003;56:664. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01909.x>.
- [111] Liu J, Guan H, Zhou L, Cui Y, Cao W, Wang L. Impact of gene polymorphism on the initiation and maintenance phases of warfarin therapy in Chinese patients undergoing heart valve replacement. *American Journal of Translational Research* 2019;11:2507.
- [112] Zaza G, Granata S, Tomei P, Gassa AD, Lupo A. Personalization of the Immunosuppressive Treatment in Renal Transplant Recipients: The Great Challenge in “Omics” Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16:4281. <https://doi.org/10.3390/ijms16024281>.
- [113] Kearon C, Ginsberg JS, Kovacs MJ, Anderson DR, Wells P, Julian JA, et al. Comparison of low-intensity warfarin therapy with conventional-intensity warfarin therapy for long-term prevention of recurrent venous thromboembolism. *The New England Journal of Medicine* 2003;349. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035422>.
- [114] Natalie C Ward, Kevin D Croft, Ian B Puddey, et al. Cytochrome P450 polymorphisms are associated with reduced warfarin dose. *Surgery* 2000;128. <https://doi.org/10.1067/msy.2000.107283>.

- [115] Kaminsky, L.S., Zhang, Z.Y., 1997. Human p450 metabolism of warfarin. *Pharmacology and Therapeutics* 73 (1), 67-74 .
- [116] Huang W, Lin YS, McConn DJ, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N, et al. EVIDENCE OF SIGNIFICANT CONTRIBUTION FROM CYP3A5 TO HEPATIC DRUG METABOLISM. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1434–45. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001313>.
- [117] Yuping Chen, Stephen S, Ferguson, Masahiko Negishi. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004;308. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.058818>.
- [118] Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, Saric J, Fabre J-M, Maurel P, et al. Interleukin 1 β inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology* 2004;40:951–60. <https://doi.org/10.1002/hep.20387>.
- [119] Eriko Shikata, Ichiro Ieiri, Shingo Ishiguro, et al. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 2004;103. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3043>.
- [120] F M van 't Hooft, A Silveira, P Tornvall, et al. Two common functional polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. *Blood* 1999;93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10233895/> (accessed October 20, 2020).
- [121] Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine* 2005;257:209–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01444.x>
- [122] Watala, C., J. Golanski, and P. Kardas, Multivariate relationships between international normalized ratio and vitamin K-dependent coagulation-derived parameters in normal healthy donors and oral anticoagulant therapy patients. *Thrombosis Journal*, 2003. 1(1): p. 7.
- [123] Ji, Misuk , Yoon, Sang Nam , et al .Protein S deficiency with a PROS1 gene mutation in a patient presenting with mesenteric venous thrombosis following total colectomy, *Blood Coagulation & Fibrinolysis*: October 2011 - Volume 22 - Issue 7 - p 619-621 doi: 10.1097/MBC.0b013e32834a0421.
- [124] Kohnke, H., Scordo, M.G., Pengo, V. et al. Apolipoprotein E (APOE) and warfarin dosing in an Italian population. *Eur J Clin Pharmacol* 61, 781–783 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00228-005-0982-x>
- [125] Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005;45. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095920>.
- [126] K. L. Berkner ,K. W. Runge. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2004;2. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00968.x>.

- [127] Songpatanasilp T, Chailurkit L, Chantprasertyothin S, Ongphiphadhanakul B, Taechakraichana N. Effect of GGCX gene polymorphism on the responses of serum undercarboxylated osteocalcin and bone turnover markers after treatment with vitamin K2 (menatetrenone) among postmenopausal Thai women. *J Bone Miner Metab* 2011;29:606–14. <https://doi.org/10.1007/s00774-011-0263-y>.
- [128] Patrice Hernert, *Les algorithmes*, Paris, Presses universitaires de France, coll. « Que sais-je ? », 2002, 128 p. (ISBN 978-2-13-053180-7, OCLC 300211244), p. 5.
- [129] Confais J, Guen ML. PREMIERS PAS en REGRESSION LINEAIRE avec SAS* 2006:144.
- [130] Yadolah Dodge et Valentin Rousson, *Analyse de régression appliquée*, Dunod, 2004.
- [131] <https://www.math.univ-toulouse.fr/~besse/Wikistat/pdf/st-l-inf-regsim.pdf>.
- [132] Prof L Poller, DSc, CR Shiach, MD, et al. Multicentre randomised study of computerised anticoagulant dosage. European Concerted Action on Anticoagulation. *Lancet* (London, England) 1998;352. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)04147-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)04147-6).
- [133] Fennerty A, Dolben J, Thomas P, Backhouse G, Bentley DP, Campbell IA, et al. Flexible induction dose regimen for warfarin and prediction of maintenance dose. *British Medical Journal (Clinical Research Ed)* 1984;288:1268. <https://doi.org/10.1136/bmj.288.6426.1268>.
- [134] Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, et al. Use of Pharmacogenetic and Clinical Factors to Predict the Therapeutic Dose of Warfarin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2008;84:326–31. <https://doi.org/10.1038/clpt.2008.10>.
- [135] Klein TE, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009;360:753-764 . <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0809329>
- [136] Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, et al. A Randomized Trial of Genotype-Guided Dosing of Warfarin. [Http://DxDoiOrg/101056/NEJMoa1311386](http://DxDoiOrg/101056/NEJMoa1311386) 2013. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311386>.
- [137] Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, et al. A Pharmacogenetic versus a Clinical Algorithm for Warfarin Dosing. [Http://DxDoiOrg/101056/NEJMoa1310669](http://DxDoiOrg/101056/NEJMoa1310669) 2013. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1310669>.
- [138] Pengo V, Zambon C-F, Fogar P, Padoan A, Nante G, Pelloso M, et al. A Randomized Trial of Pharmacogenetic Warfarin Dosing in Naïve Patients with Non-Valvular Atrial Fibrillation. *PLOS ONE* 2015;10:e0145318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145318>.
- [139] You JH, Chan FW, Wong RS, Rs W, G C. The potential clinical and economic outcomes of pharmacogenetics-oriented management of warfarin therapy - a decision analysis. *Thrombosis and Haemostasis* 2004;92. <https://doi.org/10.1160/TH04-03-0161>.
- [140] McWilliam A, Lutter R, Nardinelli C. Healthcare impact of personalized medicine using genetic testing: an exploratory analysis for warfarin. [Http://DxDoiOrg/102217/1741054153279](http://DxDoiOrg/102217/1741054153279) 2008. <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/17410541.5.3.279> .

- [141] Verhoef, T., Redekop, W., Langenskiold, S. et al. Cost-effectiveness of pharmacogenetic-guided dosing of warfarin in the United Kingdom and Sweden. *Pharmacogenomics J* 16, 478–484 (2016). <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.41>
- [142] Verhoef TI, Redekop WK, Boer A de, Zee AHM der, group on behalf of the E-P. Economic evaluation of a pharmacogenetic dosing algorithm for coumarin anticoagulants in The Netherlands. <Http://DxDoiOrg/102217/Pgs14149> 2015. <https://doi.org/10.2217/pgs.14.149>
- [143] Genelex, Pharmacogenetics: personalizing medicine today! . Dans : Health and DNA [site Web]. Seattle (WA): Genelex. Accessible au : <<<http://www.healthanddna.com/professional/pharmacogenetics.html#2c9>>>2007 .
- [144] Mitchell J. Increasing the cost-effectiveness of telemedicine by embracing e-health. *Journal of Telemedicine and Telecare*. 2000 ;6 Suppl 1:S16-9. DOI: 10.1258/1357633001934500.
- [145] Commission européenne. La e-santé en europe. Les dossiers européens. Mai-juin 2009, 49 p.
- [146] Assemblée des régions d'europe . Assemblée des régions d'europe . L'e-santé dans les régions réseau e-santé de l'are. Consulté le 25 mars 2020 sur <Http://www.aer.eu/fr/centre-de-connaissance/expertise-thematique-themesmajeurs/sante/e-sante.html>.
- [147] World Health Organization. mHealth. New horizons for health through mobile technologies : second global survey on eHealth. Geneva: WHO; 2011. www.who.int/goe/publications/goe_mhealth_web.pdf .
- [148] Benoit brouard. E-santé : intérêt dans la prise en charge des pathologies chroniques evaluation des applications mobiles de santé en oncologie et proposition de nouveaux outils. Paris : s.n., 2014. Thèse de docteur en pharmacie.
- [149] CNIL européennes groupe de travail « article 29 » sur la protection des données. Avis 02/2013 sur les applications destinées aux dispositifs intelligents. Commission européenne. 2013.
- [150] Aungst TD, clauson KA, Misra S, Lewis TL, Husain I - « How to identify, assess and utilize mobile medical applications in clinical practice» - 2014 .
- [151] Hélène caillault. Atelier thematique : applications pour tablettes et smartphones. Paris : cemg lille, 2014. Résumé congrès.
- [152] Fabrice vezin. Lemonedelasante. 180 supports digitaux proposés par la pharma. [en ligne] mars 2015. Consulté le 25 juin2020 sur <Https://lemondedelaesante.wordpress.com/2015/03/16/180-supports-digitaux-propoespar-la-pharma/> .
- [153] Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. Patient empowerment and health care [Internet]. World Health Organization; 2009 [cité 30 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144022/> 49 .

- [154] Gauthier J. Santé mobile : va--t--elle améliorer notre système de soins ? 7 juin 2016;172.
- [155] FDA C for D and R. Mobile Medical Applications [Internet]. [consulté 30 mars 2020]. Disponible sur : <https://www.fda.gov/MedicalDevices/DigitalHealth/MobileMedicalApplications/default.htm#b>.
- [156] Conseil constitutionnel. Loi n° 2004-810 du 13 août 2004 relative à l'assurance maladie. 12 août 2004, journal officiel France.
- [157] HAS. Vers une évolution de la certification des sites santé. Haute autorité de santé. S.l. : http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1590507/fr/vers-une-evolution-de-la-certificationdes-sites-sante, 2013. Communiqué de presse.
- [158] Morgan CL, McEwan P, Tukiendorf A, Robinson PA, Clemens A, Plumb JM. Warfarin treatment in patients with atrial fibrillation: Observing outcomes associated with varying levels of INR control. *Thrombosis Research* 2009;124:37–41. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.09.016>.
- [159] Adamuro, J., Dieplinger, B., Felder, T. et al. Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol* 66, 253–260 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00228-009-0768-7>
- [160] Moridani M, Fu L, Selby R, Yun F, Sukovic T, Wong B, Cole DE. Frequency of CYP2C9 polymorphisms affecting warfarin metabolism in a large anticoagulant clinic cohort. *Clin Biochem.* 2006 Jun;39(6):606-12. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.01.023.
- [161] Scott SA, Edelmann L, Kornreich R, Desnick RJ. Warfarin pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 genotypes predict different sensitivity and resistance frequencies in the Ashkenazi and Sephardi Jewish populations. *Am J Hum Genet.* 2008 Feb;82(2):495-500. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.10.002. Epub 2008
- [162] Ringen MK, Haug KB, Grimholt RM, Stormo C, Narum S, Opdal MS, Fosen JT, Piehler AP, Johansen PW, Seljeflot I, Berg JP, Brørs O. Genetic variation of VKORC1 and CYP4F2 genes related to warfarin maintenance dose in patients with myocardial infarction. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:739751. doi: 10.1155/2011/739751
- [163] Qayyum A, Najmi MH, Mansoor Q, Irfan M, Naveed AK, Hanif A, et al. Frequency of Common VKORC1 Polymorphisms and Their Impact on Warfarin Dose Requirement in Pakistani Population: Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 2016. <https://doi.org/10.1177/1076029616680478>
- [164] Bejarano-Achache I, Levy L, Mlynarsky L, Bialer M, Muszkat M, Caraco Y. Effects of CYP4F2 polymorphism on response to warfarin during induction phase: a prospective, open-label, observational cohort study. *Clin Ther.* 2012 Apr;34(4):811-23. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.02.009.
- [165] González-Conejero R, Corral J, Roldán V, Ferrer F, Sánchez-Serrano I, Sánchez-Blanco JJ, Marín F, Vicente V. The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *J Thromb Haemost.* 2007 Aug;5(8):1701-6. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02630.x.

- [166] Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, Haltmayer M, et al. Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:253–60. <https://doi.org/10.1007/s00228-009-0768-7>.
- [167] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005;106:2329–33. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1108>.
- [168] Anton AI, Cerezo-Manchado JJ, Padilla J, Perez-Andreu V, Corral J, Vicente V, et al. Novel Associations of VKORC1 Variants with Higher Acenocoumarol Requirements. *PLoS ONE* 2013;8:e64469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064469>.
- [169] Scott SA, Edelmann L, Kornreich R, Desnick RJ. Warfarin Pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 Genotypes Predict Different Sensitivity and Resistance Frequencies in the Ashkenazi and Sephardi Jewish Populations. *The American Journal of Human Genetics* 2008;82:495–500. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.002>.
- [170] Abdelhak Elkhazraji, El Arbi Bouaiti Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, and GGCX gene variants and patient characteristics on acenocoumarol maintenance dose: Proposal for a dosing algorithm for Moroccan patients, *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2018, Volume 12, Issue 2, Pages 68-76. <https://doi.org/10.5582/ddt.2017.01063>.
- [171] Vázquez, Carolina, Orlova, María, Scibona, Paul, et al. Clinical and genetic factors influencing acenocoumarol dosing, *Blood Coagulation & Fibrinolysis*: September 2018 - Volume 29 - Issue 6 - p 496-500 doi: 10.1097/MBC.0000000000000746.
- [172] Esmerian MO, Mitri Z, Habbal M-Z, Geryess E, Zaatari G, Alam S, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 Polymorphisms on Warfarin and Acenocoumarol in a Sample of Lebanese People. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2011;51:1418–28. <https://doi.org/10.1177/0091270010382910>.
- [173] Tong HY, Dávila-Fajardo CL, Borobia AM, Martínez-González LJ, Lubomirov R, Perea León LM, et al. (2016) A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population. *PLoS ONE* 11(3): e0150456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150456>.
- [174] Sychev DA, Rozhkov AV, Kazakov RE, Ananichuk AV. The impact of CYP4F2, ABCB1, and GGCX polymorphisms on bleeding episodes associated with acenocoumarol in Russian patients with atrial fibrillation. *Drug Metabolism and Personalized Therapy* 2016;31. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2016-0014>.
- [175] Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, Sadowski J, Undas A. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: A potential role of CYP4F2 and GGCX polymorphisms. *Thrombosis Research* 2014;134:604–9. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.06.022>.
- [176] Kalpana SR, Bharath G, Manjunath CN, Christopher R. Influence of VKORC1 and CYP2C9 Polymorphisms on Daily Acenocoumarol Dose Requirement in South Indian Patients With Mechanical Heart Valves. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017;23:876–82. <https://doi.org/10.1177/1076029616655617>.

- [177] Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, Muñoz-Romo R, et al. An Acenocoumarol Dosing Algorithm Using Clinical and Pharmacogenetic Data in Spanish Patients with Thromboembolic Disease. *PLoS ONE* 2012;7:e41360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041360>.
- [178] Wynne H, Cope L, Kelly P, et al. The influence of age, liver size and enantiomer concentrations on warfarin requirements. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1995 Sep;40(3):203-207.
- [179] Jiménez-Varo E, Cañadas-Garre M, Henriques CI, Pinheiro AM, Gutiérrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernández MÁ. Pharmacogenetics role in the safety of acenocoumarol therapy. *Thromb Haemost* 2014;112:522–36. <https://doi.org/10.1160/TH13-11-0941>.
- [180] Hirsh J, Guyatt G, Albers GW, Schünemann HJ. The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy: Evidence-Based Guidelines. *CHEST* 2004;126:172S-173S. https://doi.org/10.1378/chest.126.3_suppl.172S.
- [181] Roco A, Nieto E, Suárez M, Rojo M, Bertoglia MP, Verón G, et al. A Pharmacogenetically Guided Acenocoumarol Dosing Algorithm for Chilean Patients: A Discovery Cohort Study. *Front Pharmacol* 2020;11:325. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00325>.
- [182] Liew C-L, Yen J-H, Liu A-B, Liu IY. Sex differences in the effective warfarin dosage in Han and aboriginal Taiwanese patients with the VKORC1-1639AA genotype. *Tzu Chi Medical Journal* 2013;25:213–7. <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2013.06.005>.
- [183] Levine MN, Raskob G, Beyth RJ, Kearon C, Schulman S. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004 Sep;126(3 Suppl):287S-310S. doi: 10.1378/chest.126.3_suppl.287S.
- [184] Giuseppe M.C. Rosano, Basil Lewis, Stefan Agewall, Sven Wassmann, Cristiana Vitale, Harald Schmidt, Heinz Drexel, Atul Patak, Christian Torp-Pedersen, Keld Per Kjeldsen, Juan Tamargo, Gender differences in the effect of cardiovascular drugs: a position document of the Working Group on Pharmacology and Drug Therapy of the ESC, *European Heart Journal*, Volume 36, Issue 40, 21 October 2015, Pages 2677–2680, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv161>
- [185] Wattanachai, N., Kaewmoongkun, S., Pussadhamma, B. et al. The impact of non-genetic and genetic factors on a stable warfarin dose in Thai patients. *Eur J Clin Pharmacol* 73, 973–980 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00228-017-2265-8>
- [186] Nathisuwan S, Dilokthornsakul P, Chaiyakunapruk N, Morarai T, Yodting T, Piriyanachanusorn N. Assessing evidence of interaction between smoking and warfarin: a systematic review and meta-analysis. *Chest*. 2011 May;139(5):1130-1139. doi: 10.1378/chest.10-0777.
- [187] Schaffer SD, Yoon S, Zadezensky I. A review of smoking cessation: potentially risky effects on prescribed medications. *J Clin Nurs*. 2009 Jun;18(11):1533-40. doi: 10.1111/j.1365-2702.2008.02724.x.

- [188] Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, Mittal B. Therapeutic Dosing of Acenocoumarol: Proposal of a Population Specific Pharmacogenetic Dosing Algorithm and Its Validation in North Indians. *PLoS ONE* 2012;7:e37844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037844>.
- [189] Rouleau-Mailloux É, Shahabi P, Dumas S, Feroz Zada Y, Provost S, Hu J, et al. Impact of regular physical activity on weekly warfarin dose requirement. *J Thromb Thrombolysis* 2016;41:328–35. <https://doi.org/10.1007/s11239-015-1248-9>.
- [190] Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL; American Heart Association; American College of Cardiology Foundation. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1692-711. doi: 10.1161/01.CIR.0000063575.17904.4E.
- [191] Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, McDonald H, Douketis JD, Crowther M, Wells PS. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch Intern Med*. 2005 May 23;165(10):1095-106. doi: 10.1001/archinte.165.10.1095.
- [192] Celio J, Gauthier R, Alatri A, Berger J. Les interactions médicamenteuses avec l'acénocoumarol .*PharmaJournal* 9 | 2018
- [193] Gschwind L, Rollason V, Lovis C, Boehlen F, Bonnabry P, Dayer P, Desmeules JA. Identification and weighting of the most critical "real-life" drug-drug interactions with acenocoumarol in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013 Mar;69(3):617-27. doi: 10.1007/s00228-012-1358-7.
- [194] Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, Lu MJ, Hung CR, Wei CY, Chen CH, Wu JY, Chen YT. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet*. 2005 Jul 1;14(13):1745-51. doi: 10.1093/hmg/ddi180.
- [195] Namazi S, Azarpira N, Hendijani F, Khorshid MB, Vessal G, Mehdipour AR. The impact of genetic polymorphisms and patient characteristics on warfarin dose requirements: a cross-sectional study in Iran. *Clin Ther*. 2010 Jun;32(6):1050-60. doi: 10.1016/j.clinthera.2010.06.010.
- [196] Bazan, N.S., Sabry, N.A., Rizk, A. et al. Factors affecting warfarin dose requirements and quality of anticoagulation in adult Egyptian patients: role of gene polymorphism. *Ir J Med Sci* 183, 161–172 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11845-013-0978-y>
- [197] Yoshizawa M, Hayashi H, Tashiro Y, Sakawa S, Moriwaki H, Akimoto T, Doi O, Kimura M, Kawarasaki Y, Inoue K, Itoh K. Effect of VKORC1-1639 G>A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients. *Thromb Res*. 2009 Jun;124(2):161-6. doi: 10.1016/j.thromres.2008.11.011.
- [198] Zhang J, Chen Z, Chen C. Impact of CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 genetic polymorphisms on maintenance warfarin dosage in Han-Chinese patients: A systematic review and meta-analysis. *Meta Gene*. 2016;9:197-209. Published 2016 Jul 5. doi:10.1016/j.mgene.2016.07.002
- [199] Kudzi W, Ahorhorlu SY, Dzudzor B, Olayemi E, Nartey ET, Asmah RH. Genetic polymorphisms of patients on stable warfarin maintenance therapy in a Ghanaian

population. *BMC Res Notes*. 2016;9(1):507. Published 2016 Dec 9. doi:10.1186/s13104-016-2306-x

[200] Geisen C, Watzka M, Sittinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, et al. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005. <https://doi.org/10.1160/TH05-04-0290>.

[201] You JH, Wong RS, Waye MM, Mu Y, Lim CK, Choi KC, Cheng G. Warfarin dosing algorithm using clinical, demographic and pharmacogenetic data from Chinese patients. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Jan;31(1):113-8. doi: 10.1007/s11239-010-0497-x. PMID: 20585834.

[202] D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005;105:645–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2111>.

[203] Wang D, Chen H, Momary KM, Cavallari LH, Johnson JA, Sadée W. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1013-21. doi: 10.1182/blood-2008-03-144899

[204] Reitsma PH, Heijden JF van der, Groot AP, Rosendaal FR, Büller HR. A C1173T Dimorphism in the VKORC1 Gene Determines Coumarin Sensitivity and Bleeding Risk. *PLOS Medicine* 2005;2:e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020312>.

[205] Kringen MK, Haug KB, Grimholt RM, et al. Genetic variation of VKORC1 and CYP4F2 genes related to warfarin maintenance dose in patients with myocardial infarction. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:739751. doi:10.1155/2011/739751

[206] Sehgal T, Hira JK, Ahluwalia J, Das R, Vijayvergiya R, Rana SS, et al. High prevalence of VKORC1*3 (G9041A) genetic polymorphism in north Indians: A study on patients with cardiac disorders on acenocoumarol. *DD&T* 2015;9:404–10. <https://doi.org/10.5582/ddt.2015.01066>.

[207] Sipeky C, Melegh B. K-vitamin-epoxidreduktáz gén haplocsoport-meghatározása: egy újabb elem az antikoaguláns terápia optimalizálásában [Haplogroup analysis of vitamin-K epoxide reductase (VKORC1) gene: novel element in the optimization of anticoagulant therapy]. *Orv Hetil*. 2008 Sep 28;149(39):1839-44. Hungarian. doi: 10.1556/OH.2008.28456.

[208] Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2005;77:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.08.009>.

[209] Visser LE, van Vliet M, van Schaik RH, Kasbergen AA, De Smet PA, Vulto AG, Hofman A, van Duijn CM, Stricker BH. The risk of overanticoagulation in patients with cytochrome P450 CYP2C9*2 or CYP2C9*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon. *Pharmacogenetics*. 2004 Jan;14(1):27-33. doi: 10.1097/00008571-200401000-00003. PMID: 15128048.

[210] Razavi FE, Zarban A, Hajipoor F, Naseri M. The allele frequency of CYP2C9 and VKORC1 in the Southern Khorasan population. *Res Pharm Sci*. 2017;12(3):211-221. doi:10.4103/1735-5362.207202.

- [211] Pérez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, Vicente V, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood* 2009;113:4977–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-176222>.
- [212] Kalpana S R, Bharath G, Simran Jain, Rita Christopher, Significance of CYP4F2 polymorphism on oral anticoagulation therapy with acenocoumarol in South Indian patients with mechanical heart valves, *Meta Gene*. Volume 20, 2019, 100564, ISSN 2214-5400. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100564>.
- [213] Csilla Sipeky, Agnes Weber, Bela I. Melegh, Petra Matyas, Ingrid Janicsek, Renata Szalai, Istvan Szabo, Reka Varnai, Greta Tarlos, Alma Ganczer, Bela Melegh. Interethnic variability of CYP4F2 (V433M) in admixed population of Roma and Hungarians, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 40, Issue 1, 2015, Pages 280-283, ISSN 1382-6689. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.05.008>.
- [214] Danese E, Montagnana M, Johnson JA, Rettie AE, Zambon CF, Lubitz SA, et al. Impact of the CYP4F2 p.V433M Polymorphism on Coumarin Dose Requirement: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2012;92:746. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.184>.
- [215] Zohir N, Afifi R, Ahmed A, Aly Z, Elsobekey M, Kareem H, et al. Role of CYP2C9, VKORC1 and Calumenin Genotypes in Monitoring Warfarin Therapy: An Egyptian Study. *Clinical Science* 2013:7.
- [216] González-Conejero R, Corral J, Roldán V, Ferrer F, Sánchez-Serrano I, Sánchez-Blanco JJ, et al. The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *J Thromb Haemost* 2007;5:1701–6. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02630.x>.
- [217] Glurich I, Berg RL, Burmester JK. Does CALU SNP rs1043550 Contribute Variability to Therapeutic Warfarin Dosing Requirements? *Clin Med Res* 2013;11:73–9. <https://doi.org/10.3121/cmr.2013.1130>.
- [218] Ramón Montes ,Estefanía Ruiz de Gaona ,Miguel Ángel Martínez-González ,Ignacio Alberca ,José Hermida. The c.-1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients - Montes - 2006 - *British Journal of Haematology* - Wiley OnlineLibrary. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06007.x>
- [219] Kovac, Mirjana , Maslac, Aleksandar R, Rakicevic, Ljiljana Bb; Radojkovic, Dragica Pb The c.-1639G>A polymorphism of the VKORC1 gene in Serbian population: retrospective study of the variability in response to oral anticoagulant therapy, *Blood Coagulation & Fibrinolysis*: September 2010 - Volume 21 - Issue 6 - p 558-563 doi: 10.1097/MBC.0b013e32833c2988
- [220] Huang, TS., Zhang, L., He, Q. et al. DNA sensors to assess the effect of VKORC1 and CYP2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirement in Chinese patients with atrial fibrillation. *Australas Phys Eng Sci Med* 40, 249–258 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13246-016-0519-x>

- [221] Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *The Lancet* 1999;353:717–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04474-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04474-2).
- [222] Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee M-TM, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood* 2010;115:3827–34. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-255992>.
- [223] Krishna Kumar, D., Shewade, D.G., Lorient, MA. et al. An acenocoumarol dosing algorithm exploiting clinical and genetic factors in South Indian (Dravidian) population. *Eur J Clin Pharmacol* 71, 173–181 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00228-014-1791-x>
- [224] Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJR, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009;113:784–92. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-149070>.
- [225] van Schie RMF, Wessels JAM, le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, van der Meer FJM, et al. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *European Heart Journal* 2011;32:1909–17. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr116>.
- [226] Farhad Kamali, Munir Pirmohamed. The future prospects of pharmacogenetics in oral anticoagulation therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2006;61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02679.x>.
- [227] Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Antón AI, Pérez-Andreu V, Garcia-Barberá N, Martínez AB, et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb Haemost* 2013;109:146–53. <https://doi.org/10.1160/TH12-08-0631>.
- [228] Ragia G, Kolovou V, Kolovou G, Konstantinides S, Maltezos E, Tavridou A, et al. A novel acenocoumarol pharmacogenomic dosing algorithm for the Greek population of EU-PACT trial. *Pharmacogenomics* 2017;18:23–34. <https://doi.org/10.2217/pgs-2016-0126>.
- [229] Pop, T.R., Vesa, Ş.C., Trifa, A.P. et al. An acenocoumarol dose algorithm based on a South-Eastern European population. *Eur J Clin Pharmacol* 69, 1901–1907 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00228-013-1551-3>
- [230] Wolkanin -Bartnik, Jolanta Pogorzelska, Hanna Szperl, et al. Impact of genetic and clinical factors on dose requirements and quality of anticoagulation therapy in Polish patients receiving acenocoumarol: dosing calculation algorithm, *Pharmacogenetics and Genomics*: November 2013 - Volume 23 - Issue 11 - p 611-618 doi: 10.1097/FPC.0000000000000004
- [231] Markatos CN, Grouzi E, Politou M, Gialeraki A, Merkouri E, Panagou I, et al. *VKORC1* and *CYP2C9* allelic variants influence acenocoumarol dose requirements in Greek patients. *Pharmacogenomics* 2008;9:1631–8. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.11.1631>.
- [232] Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Antón A, Perez-Andreu V, Garcia-Barberá N, Martínez AB, et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb Haemost* 2013;109:146–53. <https://doi.org/10.1160/TH12-08-0631>.
- [233] Krishna Kumar, D., Shewade, D.G., Lorient, MA. et al. An acenocoumarol dosing algorithm exploiting clinical and genetic factors in South Indian (Dravidian) population. *Eur J Clin Pharmacol* 71, 173–181 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00228-014-1791-x>

[234] Schie RM van, Khedr N el, Verhoef TI, Teichert M, Stricker BH, Hofman A, et al. Validation of the acenocoumarol EU-PACT algorithms: similar performance in the Rotterdam Study cohort as in the original study. [Http://DxDoiOrg/102217/Pgs12101](http://DxDoiOrg/102217/Pgs12101) 2012. <https://doi.org/10.2217/pgs.12.101>.

[235] Jiménez-Varo E, Cañadas-Garre M, Garcés-Robles V, Gutiérrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernández MÁ. Extrapolation of acenocoumarol pharmacogenetic algorithms. *Vascul Pharmacol* 2015;74:151–7. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.06.010>.

Annexes

Fiche de surveillance d'un traitement par antivitamine K

Service : cardiologie. Numéro de téléphone :

Médecin traitant:

Patient

Nom/Prénom / Numéro de téléphone

Adresse : Date de naissance / /

Genre : Femm Homme

Taille : (cm) Poids (kg): IMC (kg/m²)
.....

Acenocoumarol

Indication : Date du début de traitement :

INR cible : zone thérapeutique de l'INR:(.....)

Durée de traitement par l Acénocoumarol

Pathologie associée:

HTA: o Oui o Non insuffisance cardia que: o Oui o Non

Diabète type I o Oui o No Diabète type II o Oui o No

Insuffisance rénale chronique : o Oui o Non SI OUI Créatininémie (mg/L) :

Hyperthyroïdie: o Oui o Non hypothyroïdie : o Oui o Non

Autres pathologies:

POSOLOGE DE L ACENOCOUMAROL ET VALEURS D'INR:

Date	Posologie de l'acenocoumarol	Valeurs d'INR

TRAITEMENTS CONCOMITANTS : voir le verso de la page

Sétif le / /

Consentement pour la réalisation de l'analyse de pharmacogénétique

Après lecture de la Lettre d'information, je déclare :

1. Accepter que soit réalisé un prélèvement sanguin afin d'analyser sur mon ADN des polymorphismes de gènes en rapport avec mon traitement.
2. Accepter que mon ADN soit conservé pour une durée minimale de 10 ans, afin d'éventuellement explorer à l'avenir de nouveaux polymorphismes en rapport avec mon traitement.
3. Avoir été informé(e) de la nature des informations transmises (éventuellement effets du traitement), de la finalité de ces analyses (contrôle du traitement) et des personnes destinataires de ces données
4. Avoir reçu toutes les réponses souhaitées à mes questions.
5. Consentir au recueil, à la saisie et au traitement des données me concernant, par des personnes tenues au secret professionnel. J'ai noté que les résultats de mes analyses resteront strictement confidentiels. Je n'en autorise la consultation qu'aux personnes qui collaborent à ces analyses.

Je soussigné(e)

Nom d'usage

.....

Nom de naissance

.....

Prénom

.....

Né(e)

le

...

déclare avoir pris connaissance de la Lettre d'information et accepte par la présente que soit analysé et conservé un extrait de mon ADN.

Fait à, le / /

Le patient :

Signature du patient adulte



Document établi en double exemplaire dont un remis au patient

Méthode d'extraction de l'ADN au NaCl

Principe :

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associés sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par le rapport de la DO à 260nm sur la DO à 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1,5 à 2. (Miller S.A, Dykes D.D.et Polesky H.F. (1988) Nucleic acid research 16 (3) 1215).

1. Isolement des leucocytes à partir du sang total :

- Dans un tube Flacon de 50 ml, mettre le sang (5 ml) et compléter à 25 ml avec du Tris EDTA (TE) 20 : 5,
- Laisser au congélateur pendant 10 min à -18 C°,
- Centrifuger pendant 10 min à 3900 tours/min,
- Déverser prudemment le surnageant afin de conserver le culot leucocytaire au fond du tube.
- Ajouter au culot le TE20 : 5 jusqu'à 25 ml,
- Laisser au congélateur pendant 10 min à -18 C°,
- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes,
- Déverser prudemment le surnageant et garder le culot leucocytaire obtenu.

***NB :** si on veut s'arrêter à ce niveau, on met le culot de leucocytes obtenu dans un tube nunc (epENDORF) de 15 ml avec du TE 10 :1 et le conserver à -20 C° pendant plus d'un an pour une extraction ultérieure.*

2. Lyse des leucocytes, digestion des protéines associées à l'ADN et sa libération :

- Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml,
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, pH 8,2) en dilacérant le culot avec une pastelle stérile,
- Ajouter 200 µl du détergent anionique SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 10%, permettant la lyse des leucocytes, l'inhibition des nucléases, la dénaturation des protéines et l'activation de la protéinase K,
- Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml, qui digérera les protéines associées à l'ADN, afin de permettre sa libération,
- Placer les tubes sous agitation pendant une nuit à 37 C°,

- Mettre, le lendemain, les tubes au congélateur pendant 10 min à -18 C° pour refroidir leurs contenus.

3. Extraction et purification de l'ADN :

- Ajouter 1 ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main,
- Laisser au congélateur pendant 5 min à 18 C° afin d'accélérer la précipitation des protéines,
- Centrifuger pendant 15 min à 2500 tours/min,

4. Précipitation de l'ADN :

- Transvaser le surnageant dans un tube Flacon de 15 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme (laisser éventuellement pendant 30 min à -20 C° si la pelote ne se forme pas),
- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70 % dans un tube nunc stérile.

5. Solubilisation de l'ADN pur :

- Ajouter entre 300 à 1000µl d'eau distillée selon la grosseur de la pelote d'ADN et la concentration souhaitée,
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à +4°C jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

Résultats du dosage de l'ADN

Numéro de l'ADN	Concentration obtenu ug/ml	Numéro de l'ADN	Concentration obtenu ug/ml	Numéro de l'ADN	Concentration obtenu ug/ml
1	578	44	693	87	965
2	789	45	321	88	541
3	978	46	256	89	439
4	1000	47	423	90	498
5	900	48	369	91	477
6	621	49	149	92	493
7	1000	50	298	93	456
8	287	51	289	94	469
9	900	52	246	95	846
10	369	53	296	96	987
11	745	54	276	97	951
12	896	55	296	98	946
13	654	56	249	99	1411
14	398	57	1001	100	987
15	1105	58	296	101	963
16	931	59	869	102	914
17	735	60	692	103	798
18	791	61	937	104	564
19	862	62	789	105	399
20	741	63	896	106	498
21	487	64	796	107	741
22	562	65	742	108	897
23	745	66	536	109	891
24	896	67	741	110	473
25	269	68	487	111	930
26	798	69	562	112	563
27	596	70	745	113	793
28	459	71	896	114	897
29	623	72	269	115	297
30	741	73	798	116	745
31	841	74	874	117	968
32	369	75	698	118	896
33	512	76	714	119	749
34	398	77	798		
35	743	78	695		
36	891	79	745		
37	956	80	269		
38	426	81	756		
39	268	82	811		
40	654	83	951		
41	239	84	745		
42	746	85	689		
43	741	86	741		

Résumés

Développement d'un algorithme pharmacogénétique prédictif de la posologie d'Acénocoumarol au niveau du CHU Sétif.

Résumé

L'Acénocoumarol est l'unique anticoagulant oral de la famille des AVK disponible en Algérie. Cependant, sa gestion représente un problème majeur de santé publique du fait d'une marge thérapeutique étroite pouvant conduire à des accidents hémorragiques graves. En effet, le nombre d'accidents liés à l'Acénocoumarol, au niveau du CHU de Sétif est important. Parmi les initiatives développées pour tenter d'améliorer cet état de fait est l'identification des facteurs génétiques à l'origine de la grande variabilité interindividuelle. Quasiment aucune donnée n'était disponible sur la part des facteurs pharmacogénétiques dans la variabilité de la réponse à l'Acénocoumarol dans la population de Sétif.

Notre travail a pour objectif principal de développer et de valider un algorithme pharmacogénétique prédictif de la posologie d'Acénocoumarol dans la population de Sétif en étudiant les fréquences alléliques de huit polymorphismes : *VKORC1*2*, *VKORC1*3*, *VKORC1*4*, *VKORC1 intron1*, *CYP2C9*2*, *CYP2C9 *3*, *CYP4F2*3* et *CALU*, afin de développer une application androïde pour améliorer la gestion du traitement par l'Acénocoumarol (Acénocoumarol Doising).

L'objectif secondaire est d'évaluer l'impact des variations génétiques sur la dose d'équilibre d'Acénocoumarol au service de cardiologie du CHU Sétif.

Méthodes : il s'agit d'une étude transversale à recueil prospectif. Elle a porté sur 119 patients du service de cardiologie du CHU Sétif, sous Acénocoumarol pour diverses indications avec des INR stables. L'ADN des patients a été extrait à partir des leucocytes sanguins puis génotypes pour huit SNPs par la PCR-RFLP. Une analyse de régression linéaire multiparamétrique a été réalisée pour générer l'algorithme.

Résultats : L'algorithme pharmacogénétique développé permet d'expliquer 45.1% de la variabilité de la dose d'équilibre journalière d'Acénocoumarol avec une erreur absolue moyenne (MAE) égale à : 1.057 [1.037-1.078]. Les deux polymorphismes génétiques impactant la réponse à l'Acénocoumarol sont le SNP *VKORC1*2* (rs9923231) et *VKORC1*3* (rs7294). L'application «Acénocoumarol Doising» a été développée par la nouvelle technologie Flutter en intégrant l'algorithme pharmacogénétique.

Conclusion : Nous avons conçu un algorithme pharmacogénétique prédictif de la posologie d'Acénocoumarol, spécifique pour la population de Sétif. Il pourrait devenir une base de référence pour le développement de la médecine personnalisée en Algérie.

Mots clés : Acénocoumarol, Algorithme, *VKORC1*, *CYP2C9*, application mobile.

Auteur : BOUHEDADJA Zahia.

Courriel : bouhedadjazahia@hotmail.fr.

Development of a pharmacogenetic algorithm predicting the dosage of Acenocoumarol at the CHU Setif

Summary

Acenocoumarol is the only oral anticoagulant in the AVK family in Algeria. However, its management represents a major public health problem because of a narrow therapeutic margin that can lead to serious hemorrhagic accidents. Indeed, the number of accidents related to Acenocoumarol, at the University Hospital of Setif is significant. Among the initiatives developed to try to improve this state of affairs is the identification of genetic factors at the origin of the great inter-individual variability. Almost no data were available on the share of pharmacogenetic factors in the variability of the response to Acenocoumarol in the Setif population.

Our main objective is to develop and validate a predictive pharmacogenetic algorithm of the dosage of Acenocoumarol in the Setif population by studying allelic frequencies of eight polymorphisms: VKORC1*2, VKORC1*3, VKORC1*4, VKORC1 intron1, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP4F2*3 and CALU, to develop an android application to improve treatment with Acenocoumarol (Acenocoumarol Dosing).

The secondary objective is to evaluate the impact of genetic variations on the equilibrium dose of Acenocoumarol in the cardiology department of CHU Sétif.

Methods: This is a prospective transversal study. It involved 119 patients from the cardiology department of CHU Setif, under Acenocoumarol for various indications with stable INR. Patients' DNA was extracted from blood leukocytes and genotypes for eight SNPs by PCR-RFLP. A multiparametric linear regression analysis was performed to generate the algorithm.

Results: The pharmacogenetic algorithm developed explains 45.1% of the variability of the daily equilibrium dose of Acenocoumarol with an average absolute error (MAE) equal to: 1.057 [1.037-1.078]. The two genetic polymorphisms impacting the response to Acenocoumarol are SNP VKORC1*2 (rs9923231) and VKORC1*3 (rs7294). The application <<Acenocoumarol Dosing>> was developed by the new Flutter technology by integrating the pharmacogenetic algorithm.

Conclusion: We developed a pharmacogenetic predictive algorithm for the dosage of Acenocoumarol specific to the Setif population. It could become a reference base for the development of personalized medicine in Algeria.

Keywords: Acenocoumarol, Algorithm, VKORC1, CYP2C9, INR, mobile application.

Author : BOUHEDADJA Zahia

Email : bouhedadjahia@hotmail.fr