

UE11 – Pharmacogénétique et modélisation – Cours n°6 06/03/19 M.-A. Landau Lorient	RT : Aude Grangé RL : Quentin Némorin
--	--

Pharmacogénétique des anticoagulants

Plan :

- I. **Historique de la vitamine K et des AVK**
- II. **Les anticoagulants**
- III. **Variabilité inter-individuelle**
 - A. **Les facteurs génétiques principaux**
 - B. **Les autres facteurs.**
- IV. **Pour ou contre le génotypage ?**
- V. **Résistance aux AVK**
- VI. **Pharmacogénétique des anticoagulants directs**

Mot du RT :

Pour la petite histoire, la prof ne s'est pas pointée en cours le 6 mars, nous laissant la vingtaine d'autres élèves et moi perplexes. Le cours a donc été reporté au vendredi 15 mars. Le vendredi 15 mars, la prof s'est pointée mais nous n'étions que 3 (dont la RT et le RL) dans l'amphi. La prof a alors refusé de nous faire cours, proclamant qu'« on ne peut pas travailler dans ces conditions-là, que l'APHP ferait mieux de supprimer les postes des universitaires pour faire des économies puisqu'il n'y a plus personne en cours », et qu'elle allait voir Odile Harbon pour demander des explications, après nous avoir demandé si le cours de l'année dernière était sur le moodle. Elle est partie voir Odile et n'est jamais revenue dans l'amphi. On a donc repris le cours de l'année dernière sur le moodle et amélioré la ronéo de l'année dernière. On ne sait pas vraiment si ce cours est quand même au programme, mais dans le doute...

I. Historique de la vitamine K et de l'anti-vitamine K

1930 : Des expériences sont faites par **Dam** sur des poulets nourris avec une alimentation dépourvue de cholestérol. Résultat : les poulets meurent d'hémorragies. Cependant en remettant du cholestérol dans l'alimentation les hémorragies ne se sont pas stoppées. Dam s'est donc dit qu'il devait y avoir un composé liposoluble qui jouait un rôle sur la consistance du sang.

1935 : Identification de la **vitamine K**, (« k » pour coagulation en danois) identifiée comme une « vitamine liposoluble indispensable à la coagulation ».

1936 : **Purification** à partir de la luzerne par Dam.

1939 : **E. Doisy** réalise la **synthèse chimique** de la vitamine K. Ces découvertes ont donné lieu à un prix Nobel en **1943** pour Doisy et Dam.

Structure de la vitamine K : noyau naphthoquinone substitué par un groupement méthyle en position 2 et une chaîne aliphatique en position 3 (pour K1 et K2).

K1 : vitamine apportée par l'alimentation, présente dans les végétaux.

K2 : synthétisée par les bactéries dans la flore intestinale.

K3 : vitamine de synthèse, au départ utilisée en thérapeutique mais vite abandonnée pour des problèmes de tolérance.

De l'inhibition de la vitamine K aux anticoagulants :

1920 : Des scientifiques observent des hémorragies dans des troupeaux ayant consommé du **trèfle doux** (mélilot) avarié. A partir de ce mélilot, est isolée la **bishydroxycoumarine** qui était à l'origine des hémorragies.

1940 : Purification et **synthèse du dicoumarol** par Karl Paul Link, un analogue de la bishydroxycoumarine. Il a ainsi synthétisé une centaine d'analogues du dicoumarol pour finalement arriver à la **warfarine** (**WARF** : société qui l'a développé, -arine car dérivé de la bishydroxycoumarine) qui a été développé au départ comme raticide lorsqu'on a découvert ses propriétés anticoagulantes. Quelques temps plus tard la warfarine est utilisée chez l'homme et c'est notamment le président Eisenhower qui reçu le premier traitement à la warfarine en 1955. A partir de là la warfarine a connu son success story, plusieurs millions de personnes recevant ce traitement dans le monde. La warfarine est de nos jours encore très utilisée.

II. Les anticoagulants

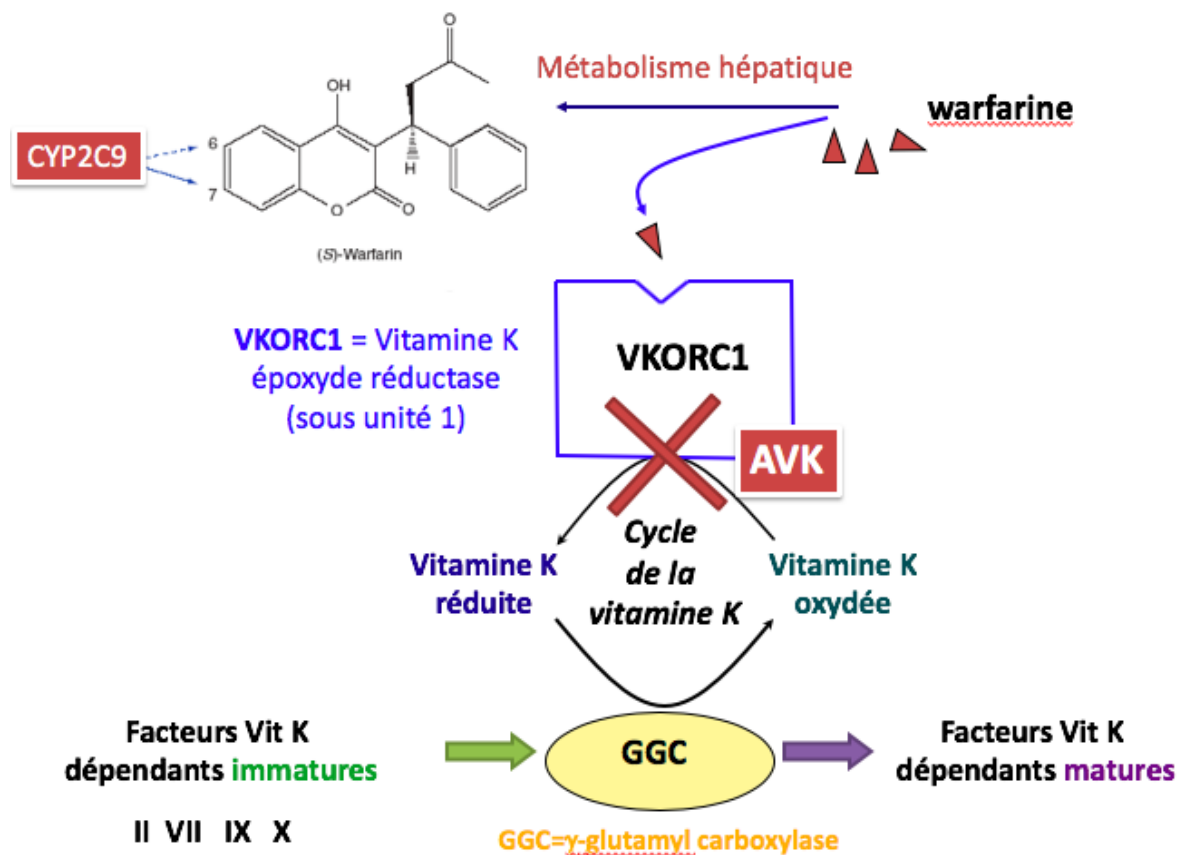
Comment les anti-vitamine K exercent-ils leur action pharmacodynamique ?

Cette explication est à étendre aux autres anticoagulants (acénocoumarol et la fluindione).

- **Métabolisme** : La warfarine est métabolisée dans le foie par le **CYP2C9** (un cytochrome P450 spécifique de cette warfarine) en un composé **inactif** (hydroxylé). Une baisse de l'activité du CYP2C9 provoque donc une augmentation de l'activité de la warfarine.

- **Pharmacodynamie** : Le foie synthétise des **facteurs de la coagulation**, en l'occurrence dans la cascade de la coagulation, ce sont les facteurs 2, 7, 9, 10 qu'on dit vitamine-K dépendants. Ces facteurs de coagulation ont besoin d'être maturés par gamma-carboxylation grâce à la gamma-glutamyl-carboxylase (GGC). Or cette GGC utilise comme **cofacteur la vitamine K réduite**. Et c'est là que **la warfarine, qui inhibe la vitamine K époxyde réductase (VKORC1)** intervient : elle va bloquer la régénération de la vitamine K, et empêche ainsi la GGC d'agir. Ainsi la warfarine va bloquer la maturation des facteurs de la coagulation.

- **BILAN** : La warfarine empêche la régénération de la vitamine K.



Ces AVK, même s'ils sont un peu en perte de vitesse par rapport aux nouveaux médicaments présents sur le marché, concernent plusieurs centaines de milliers de patients en France. Ce chiffre descend progressivement : on était à un million il y a deux trois ans, on doit être à 800 000 environ maintenant. Les antagonistes de la vitamine K sont d'un point de vue épidémiologique un problème de santé publique car ils représentent la **première cause d'iatrogénie** : 900 000 patients traités en France, plus de 5000 décès par an, 17 000 hospitalisations.

Ces difficultés d'utilisation des AVK sont notamment dues :

- à leur **marge thérapeutique étroite** : la différence entre le sous dosage associé au risque thrombotique, et le surdosage associé au risque hémorragique, est faible.
- à une **importante variabilité** intra et interindividuelle.

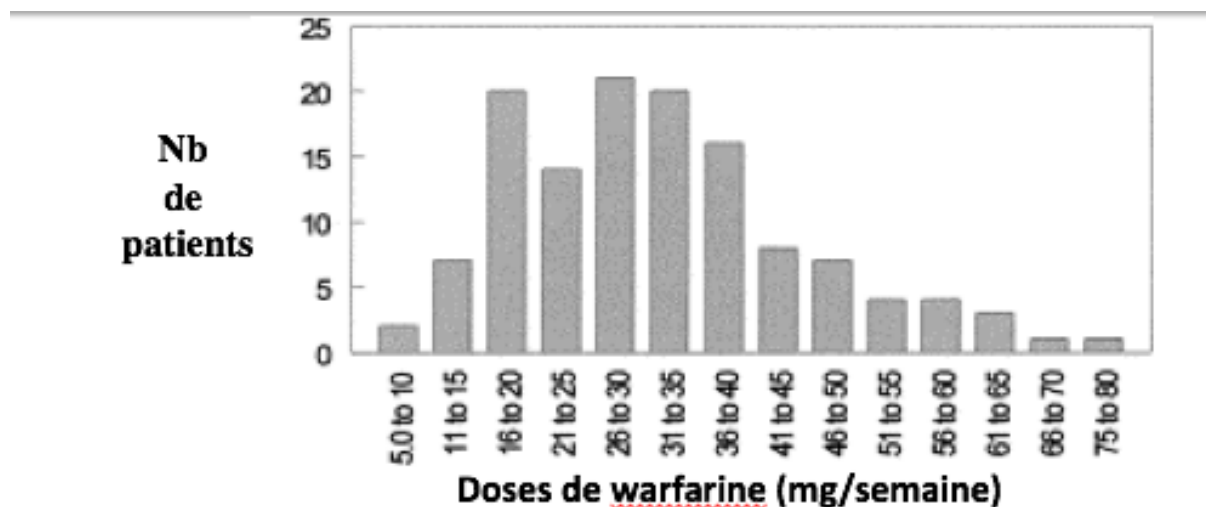
III. Variabilité inter-individuelle

Cette variabilité interindividuelle trouve sa source dans des facteurs génétiques et pharmacogénétiques, liés à des **variations** soit dans le **métabolisme** (CYP2C9), soit dans la **cible pharmacologique** des AVK, c'est-à-dire la VKORC1.

Illustration de cette variabilité interindividuelle :

A gauche, doses les plus faibles (5 à 10 mg par semaine) à droite, les plus élevées (presque 80 mg par semaine) : il y a un facteur 16 entre les doses les plus faibles et les doses les plus élevées. Les doses administrées correspondent aux doses qu'il faut donner à un patient pour obtenir le même INR (International Normalized Ratio, c'est un des indicateurs de la coagulation sanguine, normalement situé entre 2 et 3.).

Certains patients nécessitent 8 fois plus de doses que d'autres pour atteindre un INR donné.



Qu'est ce qui explique cette grande variabilité ?

- L'observance du patient (non spécifique aux AVK)
- Son alimentation (notamment des régimes végétariens qui apportent beaucoup de vitamine K peuvent entraîner une certaine résistance).
- Sa situation physiopathologique (atteintes hépatiques, rénales, etc.)
- Les **interactions médicamenteuses**, notamment les interactions avec CYP2C9 (non spécifique des AVK non plus)
- **Et les facteurs génétiques.**

Ces facteurs expliquent en partie les variabilités interindividuelles et influencent le risque : hémorragique pour les sujets qui nécessitent de faibles doses (sujets dits hypersensibles) et thrombotique pour ceux qui nécessitent de fortes doses (sujets dits résistants au traitement).

A. Les facteurs génétiques principaux

Variations du métabolisme :

Parmi les facteurs génétiques influençant la variabilité interindividuelle il y a le **polymorphisme du CYP2C9**. Il existe essentiellement 2 allèles variants responsables de variabilité dans les populations caucasiennes.

<u>Variants alléliques</u>	<u>Fréquence Allélique</u>	<u>Activité</u>
CYP2C9*1	0,79-0,86	100 %
CYP2C9*2 (Cys144Arg)	0,08-0,19	12 %
CYP2C9*3 (Leu359Ileu)	0,06-0,1	5 %

} Populations **caucasiennes**

NB : L'allèle de référence est noté CYP2C9*1 = homozygote sauvage. CYP2C9*2 et CYP2C9*3 sont les 2 variants alléliques responsables du polymorphisme du CYP2C9.

Le **changement d'acide aminé** entraîne une capacité métabolique moindre (encore moins pour CYP2C9*3 que pour CYP2C9*2) par rapport aux individus porteurs de l'allèle sauvage : ce sont des patients dits métaboliques lents qui ont une **activité enzymatique diminuée** : le **risque hémorragique est augmenté** chez les patients présentant ces polymorphismes.

Dans les populations asiatiques, le CYP2C9*2 est beaucoup moins fréquent. En France, on estime que au moins 40% est au moins porteuse d'un allèle variant du CYP2C9.

Les variants du CYP2C9 modifient les doses à l'équilibre : dans le groupe de référence, la posologie journalière est autour de 5 mg d'anticoagulants. Chez les porteurs homozygotes (*2/*2 ou *3/*3) la posologie journalière est réduite. Il y'a donc une nécessité à **réduire les doses** chez ces patients.

Variation de la cible pharmacologique :

Parmi les facteurs génétiques influençant la variabilité interindividuelle il y a également le **polymorphisme de l'enzyme VKORC1**, découvert plus tardivement (2004). Il existe un polymorphisme dans le **promoteur** de VKORC1.

Cela a été mis en évidence par une administration d'une même dose d'acénocoumarol à 200 volontaires sains présentant différents promoteurs de VKORC1 et par la **mesure du taux de facteur VII restant** (vitamine K dépendant) avant et 24h après la prise. Les taux étaient différents chez les patients ayant un promoteur sauvage et ceux ayant un promoteur muté.

On observait même un **effet gène dose-dépendant** particulièrement marqué : les sujets présentant deux allèles variants avaient une quantité de facteur VII restante encore moins importante. On retrouve les mêmes résultats dans une étude similaire utilisant de la warfarine.

En cumulant la part de variabilité liée au polymorphisme CYP2C9 (touchant le **métabolisme**) et celle liée au polymorphisme VKORC1 (touchant la **cible pharmacologique**) on arrive à expliquer **50%** de la variabilité interindividuelle.

NB : Le volontaire sain permet d'avoir une vision des conséquences d'un polymorphisme plus claire et objective que dans la vraie vie (pas de médicaments associés, pas de comorbidités...).

Peu après, une étude a montré que l'on pouvait classer les patients en 2 groupes :

- Les sujets à fortes doses de warfarine
- Les sujets à faibles doses de warfarine

Cette différence est permise par **l'analyse de la séquence du promoteur** (si CGA → faible dose, si CGG → forte dose) qui représente donc un **marqueur génétique** très important.

Les chercheurs ont ensuite essayé de savoir si ces 2 gènes (CYP2C9 et VKORC1) étaient les seuls facteurs génétiques de la variabilité génétique face aux anticoagulants. Pour répondre à cela, une GWAS (=génomome wide association study = analyse complète des polymorphismes du génome afin d'étudier leurs corrélations avec des traits phénotypiques) a été faite sur une population de personnes prenant de la warfarine. Une GWAS utilise des puces à ADN et permet d'étudier 500 000 - 600 000 polymorphismes en même temps.

Résultat : Cette GWAS a mis en évidence **un polymorphisme** au niveau du **CYP4F2** (un cytochrome P450 spécifique de la vitamine K) qui ne métabolise pas la warfarine mais qui **fait sortir la vitamine K du cycle de la vitamine K** (il métabolise donc la vitamine K). Le variant entraîne une perte d'activité du CYP4F2 et comme cette enzyme permet la sortie de la vitamine K du cycle, si elle est moins active, il y a plus de vitamine K disponible. Ainsi les doses d'anticoagulants nécessaires chez les porteurs de ce polymorphisme sont supérieures aux patients ne l'ayant pas.

Mais le CYP4F2 influence beaucoup moins la dose à l'équilibre que les autres facteurs génétiques vus précédemment. En effet, ce polymorphisme explique entre 4 et 5 % de la variabilité interindividuelle.

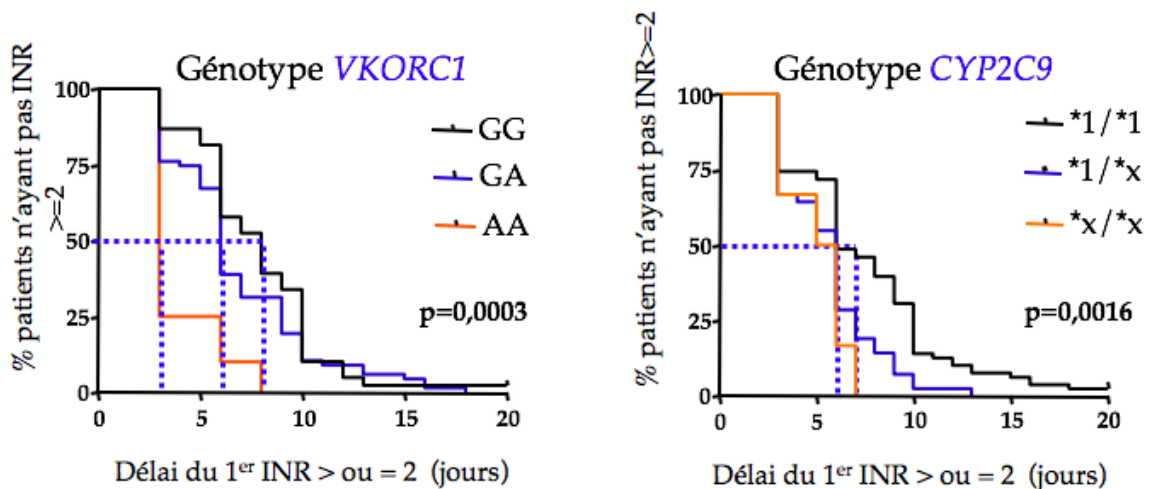
B. Autres facteurs

Les facteurs génétiques vus précédemment influencent la réponse à la warfarine, mais au-delà du risque thrombotique ces facteurs influencent également **le temps de réponse** à la warfarine. On se pose également la question si celle-ci est la même chez le sujet âgé.

i. La réponse précoce

On a fait une étude sur **des sujets âgés** (la population des plus de 75 ans est importante à étudier car ce sont gros consommateurs de médicaments et notamment d'AVK) ayant tous initié leur traitement de la même façon, à la même dose. Après quelques jours les doses ont été ajustées : on a alors étudié sur des courbes de survie le délai d'obtention du premier INR supérieur ou égal à 2. Il est apparu que **les porteurs d'allèles mutent (homozygotes) VKORC1 et/ou CYP2C9 ont un délai raccourci**.

Délai d'obtention du premier INR ≥ 2



Le délai du premier INR ≥ 2 est significativement raccourci chez les patients porteurs d'allèles mutés VKORC1 et/ ou CYP2C9

Seuls les génotypes VKORC1 et CYP2C9 influencent ce délai

À J3 on remarque que seul le génotype VKORC1 a un effet sur l'INR : les patients homozygotes mutés (donc hypersensibles) avaient une valeur d'INR à J3 plus élevée que les hétérozygotes, qui avaient eux-mêmes une valeur plus élevée que les homozygotes sauvages.

Attention : L'étude a montré que seuls les génotypes VKORC1 et CYP2C9 influencent ce délai.

Étude chez des enfants en bas âge : mêmes résultats.

ii. Dose à l'équilibre

On a ensuite étudié l'influence des facteurs génétiques sur la **dose à l'équilibre** (= dose de médicament entrant égale à la dose sortante dans le même intervalle de temps). Cette étude est faite également sur une population gériatrique (au moins 5 médicaments, au moins deux pathologies associées).

Les personnes ayant un polymorphisme VKORC1 et/ou CYP2C9 atteignent plus rapidement la dose à l'équilibre. En revanche le polymorphisme CYP4F2 a un effet beaucoup plus léger sur la dose à l'équilibre. L'impact sur la dose à l'équilibre dépend encore du nombre d'allèles variants. L'**effet cumulatif** des différents allèles mutés et des différents paramètres (comme l'âge, le poids, etc.) permet d'expliquer 70 % de la variabilité interindividuelle : **les effets des variants s'additionnent.**

Remarque : on avait un peu moins d'effet sur une population pédiatrique par rapport à une population âgée.

BILAN :

Aujourd'hui une partie de la réponse a une origine inconnue. Cependant dans la plupart des populations, la part **génétique** est prépondérantes dans la réponse aux AVK.

iii. Risque hémorragique

Une étude avec 250 cas/259 contrôles a montré **l'influence de l'allèle CYP2C9*3** sur le risque **hémorragique** même après une phase d'initiation du traitement supérieure à 30 jours. Cela a soulevé la question de l'intérêt du génotypage, non seulement avant l'initiation du traitement, mais également à long terme, après plusieurs semaines/mois de traitement car comme on l'a vu l'allèle CYP2C9*3 continue à influencer la réponse face au médicament même après 30 jours de traitement (= lorsque le patient a atteint l'INR voulu), contrairement à VKORC1.

On se pose donc la question de l'intérêt de génotype des patients qui ont un INR qui fluctue.

IV. Pour ou contre le génotypage ?

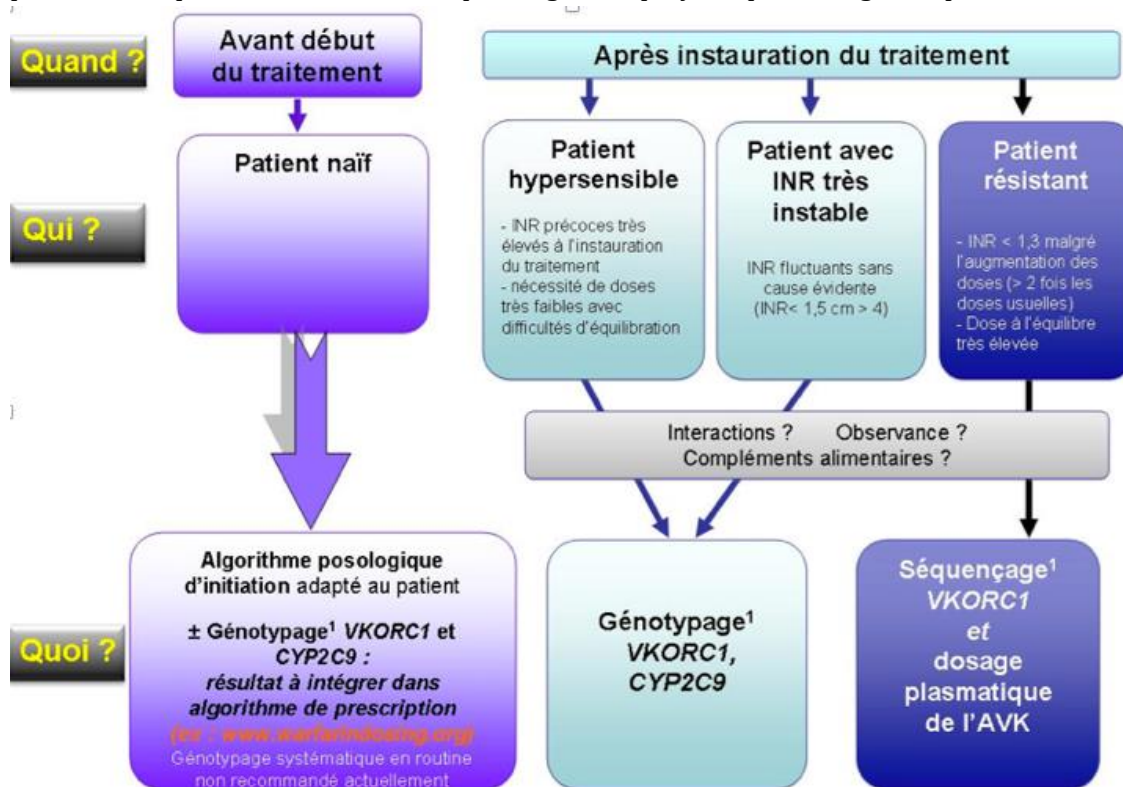
Les arguments pour :

- La prédiction de la dose à l'équilibre est meilleure
- L'influence des variants alléliques est clairement démontrée
- Il existe des outils simples comme le site warfarindosing qui s'aide d'algorithmes pour prédire la réponse au traitement. Ce site permet de modéliser la **dose à l'équilibre** en fonction des différents facteurs (âge, sexe, ethnie, origine, poids, taille, type de CYP2C9, type de VKORC1, etc.
- Il y a possibilité d'ajuster la posologie en fonction du patient
- Ainsi on diminue les hospitalisations (démontré par des études) : on a 1/3 des hospitalisations et 1/3 des thromboses/saignements en moins.
- Le génotypage est aujourd'hui peu coûteux et rapide
- Économiquement (et psychologiquement) favorable : le génotypage coûtera moins cher au patient que de se faire hospitaliser. Les biologistes, ne recommandent pas le génotypage « automatique » mais insistent à génotyper les sujets à risque hémorragique élevé en cas d'INR élevé ou en cas d'instabilité de la réaction sous de faibles doses.

Les arguments contre :

- L'absence d'études pharmaco-économiques
- Nomogrammes standard : efficaces chez >60% patients
- Pas d'algorithme simple d'emploi
- Tests génétiques pas toujours accessibles : délai d'obtention du résultat
- Le génotypage a tout de même un coût (plus vrai aujourd'hui)
- Impact psychologique
- **Présence d'études contradictoires** sur l'intérêt du génotypage dans le cas de patients à risque hémorragiques *faibles* et sur l'influence du génotypage sur le temps passé à l'équilibre. Dans ces trois études on a d'un côté administré un traitement standard suivant un algorithme clinique basé sur le poids et l'âge du patient et de l'autre côté on a donné un traitement choisi selon le génotypage du patient. Mais les patients sont d'origines différentes et les critères évalués étaient légèrement différents. L'étude américaine (1000 personnes) est plus en défaveur d'un génotypage contrairement à l'étude européenne (500 personnes).

Dans le cadre d'une autre étude il y a eu production d'un arbre décisionnel qui explique qu'avant le début du traitement chez un patient naïf, il n'y a pas à génotyper de manière systématique mais qu'après instauration du traitement en fonction de la réponse observée, on peut génotyper. Cela permet d'adapter le traitement et la posologie aux polymorphismes génétiques.



V. Résistance aux AVK

Pour les patients résistants aux traitements, on propose aujourd'hui une analyse du gène **VKORC1** (publication de la séquence de VKORC1 en 2004.) VKORC1 est une enzyme membranaire du réticulum endoplasmique qui peut subir des mutations à différents endroits : il existe **4 mutations faux sens rares hétérozygotes** d'acides aminés dans le gène VKORC1 qui entraînent une **diminution de l'activité VKOR** ce qui a pour conséquence une diminution de la sensibilité à la warfarine et donc des patients résistants. On peut catégoriser les patients en fonction de leur niveau de résistance : modérée, majeure, sévère (l'INR cible n'est jamais atteint).

VI. Pharmacogénétique des anticoagulants directs

LE DABIGATRAN :

Le DABIGATRAN agit sur un facteur de la coagulation : **il a une action directe et va inhiber le facteur 2**. Il s'agit un anticoagulant oral, administré sous forme de pro-drogue (Dabigatran etexilate) et converti en dérivé actif par l'estérase CES1. Son **absorption intestinale** se fait par la **P-glycoprotéine** (codée par le gène ABCB1), protéine d'efflux qui agit comme une barrière.

Les chercheurs ont voulu savoir dans une étude de non-infériorité américaine spécifique des gènes ABCB1 et CES1, s'il existait également des polymorphismes modifiant l'action du Dabigatran et ils n'ont finalement trouvé qu'un seul facteur génétique modifiant le risque d'hémorragie : les gènes CES1 et ses différents polymorphismes. Ces différents polymorphismes influencent surtout la survenue de saignements mineurs.

L'APIXABAN :

L'APIXABAN, commercialisé un peu après le Dabigatran, est un **anticoagulant direct qui va cibler le facteur 10**.

Une étude a été publiée l'année dernière sur une série de patients japonais avec fibrillation auriculaire recevant l'Apixaban et ils ont regardé un certain nombre de polymorphismes génétiques. L'Apixaban est métabolisé au niveau hépatique, contrairement au Dabigatran, par un cytochrome P450 (notamment le **CYP3A4 et le CYP3A5**), il est absorbé au niveau intestinal par des **transporteurs notamment par ABCB1 et par ABCG2**. Les résultats ont montré qu'aucun des variants d'ABCB1 n'ont influencé les concentrations plasmatiques d'Apixaban alors qu'un effet relativement important a été détecté chez les variants ABCG2 (effets plus limités chez les hétérozygotes).

On peut noter que pour le cytochrome P450 l'allèle variant est beaucoup plus présent que pour l'allèle sauvage.

CONCLUSION GENERALE

**Phases de Développement
Du Médicament**

**Utilisation
en routine clinique**



Bon usage de la pharmacogénétique va permettre:

Meilleure adéquation malade-traitement

Moins d'effets secondaires

Traitement plus efficace et à moindre coût

Fiche récapitulative: Pharmacogénétique des anticoagulants oraux

Historique : Découverte des propriétés hémorragiques du mélilot : isolation de la bishydroxycoumarine, puis synthèse d'analogues comme la dicoumarine, et enfin la warfarine (à partir d'un raticide).

Warfarine = anticoagulant le plus utilisé dans le monde. Métabolisé dans le foie par CYP2C9 en un composé inactif. La warfarine inhibe sélectivement la VKORC1 qui intervient dans la maturation des facteurs de coagulation vitamine K dépendant, la warfarine empêche donc la régénération de la vitamine K. Cependant **antagonistes vitK = 1^{ère} cause d'iatrogénie** (marge thérapeutique étroite et variabilité intra et interindividuelle importante).

L'INR nous renseigne sur la variabilité interindividuelle, causée par : l'observance, l'alimentation, la situation physiopathologique, les interactions médicamenteuses et les facteurs génétiques.

Tout d'abord, **polymorphisme du CYP2C9** (*1 = sauvage, *2 et 3 = variants). Les polymorphismes CYP2C9*2 et 3 donnent des patients métaboliques lents à risque hémorragique augmentée. **Les polymorphismes de la VKORC1** sont aussi importants. A elles deux ces variabilités génétiques expliquent 50% de la variabilité interindividuelle. Les polymorphismes du CYP4F2 influencent aussi la dose à l'équilibre (les porteurs de variants font moins sortir la VitK du cycle et nécessitent de plus fortes doses d'anticoagulants) mais bien moins que les variants de CYP2C9 et VKORC1.

Le temps de réponse est influencé par ces polymorphismes :

- La réponse précoce : délai raccourci pour atteindre un INR > ou égal à 2 si polymorphisme CYP2C9 et/ou VKORC1 présent.
- Dose à l'équilibre : dose à l'équilibre atteinte plus rapidement lors de présences de polymorphismes VKORC1 et/ou CYP2C9. Comme pour la réponse précoce l'effet est **gènes dépendants et dépend du nombre de variants**.
- Le risque hémorragique : Risque influencé principalement par le CYP2C9*3, qui continue à jouer un rôle dans la réponse aux anticoagulants même après 30 jours. Question de l'intérêt de génotyper les patients qui ont un INR instable.

Le génotypage :

Des arguments pour : la prédiction de la dose à l'équilibre est meilleure, l'influence des variants alléliques est clairement démontrée, outils simples comme le site *warfarin dosing* qui s'aide d'algorithmes pour prédire la réponse au traitement, il y a possibilité d'ajuster la posologie en fonction du patient, on diminue les hospitalisations, le génotypage est aujourd'hui peu coûteux et rapide, économiquement (et psychologiquement) favorable.

Des arguments contre : L'absence d'études pharmaco-économiques, nomogrammes standard : efficaces chez >60% patients, pas d'algorithme simple d'emploi, tests génétiques pas toujours accessibles, le génotypage a tout de même un coût (mais plus vrai aujourd'hui), impact psychologique, présence d'études contradictoires.

La résistance aux AVK : Il existe 4 mutations faux sens rare de VKORC1 qui diminuent de façon importante son activité. Il en résulte une résistance à la warfarine (modérée, majeure, sévère quand l'INR cible n'est jamais atteint). On propose à ces patients une analyse du gène VKORC1 pour caractériser la mutation.

Anticoagulants directs = ciblent directement les facteurs de la coagulation. Deux exemples :

Le Dabigatran : inhibe le facteur II. C'est une pro-drogue converti en dérivé actif par CES1 et dont l'absorption intestinal se fait via la P-glycoprotéine (protéine d'efflux codée par le gène ABCB1). Seuls les polymorphismes de CES1 influenceraient le risque d'hémorragie (de façon mineure).

L'Apixaban : inhibe le facteur X. Métabolisé par des cytochromes P450 (CYP 3A4 et 3A5 en particulier) et absorbé par des transporteurs de ABCB1 et ABCG2 dans l'intestin. Les polymorphismes d'ABCG2 ont un effet plus important sur la concentration plasmatique.

