

TEZĂ DE DOCTORAT

Particularități farmacogenetice ale tratamentului anticoagulant oral

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Anca Dana Buzoianu

Doctorand

Florentina Claudia Militaru



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Farmacogenetica și influența sa asupra metabolismului medicamentelor	17
2. Anticoagulantele orale	25
3. Influența polimorfismelor genelor CYP2C9 și VKORC1 asupra eficacității și siguranței tratamentului anticoagulant oral	29
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	37
2. Metodologie generală	39
3. Studiul 1 - Impactul polimorfismelor genelor CYP2C9 și VKORC1 asupra dozei de anticoagulant oral	45
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru	46
3.3. Material și metodă	46
3.4. Rezultate	48
3.5. Discuții	55
3.6. Concluzii	59
4. Studiul 2 - Influența polimorfismelor genelor CYP2C9 și VKORC1 asupra timpului necesar atingerii INR terapeutic la pacienții tratați cu acenocumarol	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru	62
4.3. Material și metodă	62
4.4. Rezultate	64
4.5. Discuții	69
4.6. Concluzii	72
5. Studiul 3 - Factorii determinanți ai riscului hemoragic în timpul tratamentului cu acenocumarol	73
5.1. Introducere	73
5.2. Ipoteza de lucru	74
5.3. Material și metodă	74
5.4. Rezultate	77
5.5. Discuții	80
5.6. Concluzii	82
6. Studiul 4 - Corelații genotip-fenotip la pacienții tratați cu acenocumarol	83
6.1. Introducere	83
6.2. Ipoteza de lucru	84
6.3. Material și metodă	85
6.4. Rezultate	86
6.5. Discuții	93
6.6. Concluzii	95
7. Concluzii generale	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte-cheie: farmacogenetică, acenocumarol, variabilitatea răspunsului la tratament, polimorfisme genetice CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, INR.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Diversitatea genetică are o contribuție importantă atât în ceea ce privește susceptibilitatea apariției unei boli, cât și în ceea ce privește răspunsul la tratament.

Farmacogenetica și farmacogenomica încearcă să stabilească influența factorilor genetici asupra eficacității și apariției reacțiilor adverse ale medicamentelor. Este de așteptat ca tratamentul personalizat, în funcție de profilul genetic individual al pacientului, să fie introdus cât mai curând în practica clinică.

Marea variabilitate interindividuală și interetnică în ceea ce privește răspunsul terapeutic poate fi pusă, cel puțin parțial, pe seama polimorfismelor genetice. Cel mai frecvent, aceste polimorfisme sunt de genul SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), modificări minime ale informației genetice prezente la peste 1% din populație, variante considerate a fi normale, dar care totuși în anumite condiții, pot să aibă răsunet în plan fenotipic.

Anticoagulantele orale, cum sunt warfarina și acenocumarolul, sunt medicamente larg utilizate pentru prevenirea și tratamentul bolilor tromboembolice și fac parte din categoria celor mai prescrise medicamente. Ele sunt caracterizate printr-un indice terapeutic mic și o variabilitate interindividuală a răspunsului la tratament. Complicațiile posibile ale tratamentului cu anticoagulante orale cuprind hemoragiile severe sau lipsa eficacității care rezultă fie dintr-o anticoagulare excesivă, fie dintr-un nivel insuficient al anticoagulării.

Pentru mult timp, factorii de mediu au fost considerați ca principalii responsabili pentru variațiile interindividuale ale răspunsului la tratamentul anticoagulant oral. Printre acești factori se numără: caracteristicile pacientului (vârstă, sex, indice de masă corporală), aportul alimentar în vitamina K, comorbiditățile (insuficiență hepatică, insuficiență renală severă, insuficiență cardiacă, bolile tiroidei etc.), patologii intercurrente acute (febră, sepsis, decompensarea insuficienței cardiace, diaree etc.) și tratamentele concomitente.

Alături de factorii demografici și de mediu, au fost identificate polimorfisme genetice care explică o parte din variabilitatea individuală a răspunsului la tratamentul anticoagulant oral.

În februarie 2004, două echipe au publicat în același număr din revista *Nature* identificarea genei codante pentru subunitatea C1 a vitaminei K epoxi-reductaza (VKORC1). Gena pentru VKORC1 este situată pe cromozomul 16 și codifică o reductază di-tiol-dependentă care transformă vitamina K epoxi în vitamina K quinonă. Această enzimă pare să fie una din enzimele țintă ale anticoagulantelor orale. Inhibiția ireversibilă a enzimei VKORC1 de către anticoagulantele orale blochează regenerarea vitaminei K, rezultând factori procoagulanți nefuncționali.

Polimorfismele genei *VKORC1* sunt grupate în 4 haplotipuri majore. Haplotipul *VKORC1**2 este cel mai important în relație cu variabilitatea răspunsului la anticoagulante orale și cu riscul de anticoagulare excesivă. Marca haplotipului *VKORC1**2 este reprezentată de către polimorfismul *c.G-1639A*, situat la nivelul promoter-ului genei *VKORC1*, prezența lui semnaland o cantitate mai scăzută de vitamina K activă, prin perturbarea mecanismului său de reciclare via epoxid-reductaza.

Acenocumarolul este inactivat prin hidroxilare de către CYP2C9, motiv pentru care indivizii purtători ai cel puțin unei alele defective CYP2C9*2, dar în special CYP2C9*3 (alela asociată cu activitate enzimatică CYP2C9 doar de 5%) sunt susceptibili la anticoagulare excesivă la doze medii de acenocumarol. Se pare că până la 14% din variabilitatea privind răspunsul și doza optimă de acenocumarol poate fi explicată prin polimorfismele CYP2C9*2 și mai ales CYP2C9*3.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ținând cont de dificultatea în utilizarea anticoagulantelor orale și, în consecință, de riscul de hemoragii sau de ineficacitate a tratamentului, am considerat utilă abordarea aspectelor farmacogenetice ale variabilității răspunsului la tratamentul anticoagulant oral.

Metodologie generală : au fost incluși în studiu 301 pacienți (146 M, 155 F) tratați cu acenocumarol, care au fost urmăriți în Clinica Medicală V și Institutul Inimii din Cluj-Napoca, în perioada 2009-2011.

Criteriile de includere: Au fost luați în studiu pacienți cu vârsta peste 18 ani, care au semnat formularul de consimțământ informat și care au fost tratați cu acenocumarol pentru una sau mai multe din următoarele situații clinice: 1. Tromboflebită profundă a membrilor inferioare (TVP) ± tromboembolism pulmonar (TEP); 2. Fibrilație atrială persistentă sau permanentă (FIA) ; 3. Proteză valvulară

Criteriile de excludere: pacienți cu vârsta sub 18 ani; pacienții cu speranță de viață mai mică de un an din cauza comorbidităților; pacienții care nu au semnat consimțământul informat; prezența contraindicațiilor tratamentului anticoagulant; sarcina.

Variabile cuantificate:

1. Date generale: vârsta, sexul, mediul de proveniență al pacientului: urban sau rural

2. Date clinice:

- *diagnosticul:* TVP, EP, FIA, proteză valvulară

- *medicația concomitentă*

- *doza de anticoagulant oral pe săptămână, exprimată în mg*

- *valorile INR*, considerându-se INR terapeutic pentru valori situate între 2 și 3, INR supraterapeutic pentru valori peste 3 și INR subterapeutic pentru valori sub 2. În cazul pacienților cu proteze valvulare INR-ul terapeutic a fost considerat pentru valori cuprinse între 3,5 și 4,5.

3. Date genetice: polimorfisme CYP2C9*2 și CYP2C9*3 (heterozigoți sau homozigoți); genotipul VKORC1

Determinarea genotipului. Genotiparea pentru alelele CYP2C9*2, CYP2C9*3 și VKORC1*2 s-a realizat folosind metoda PCR-RFLP (Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism).

Analiza statistică. Înregistrarea datelor s-a făcut cu ajutorul programului Microsoft Excel XP. Analiza statistică a fost realizată cu programul SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versiunea 17.

Studiul 1. Impactul polimorfismelor genelor CYP2C9 și VKORC1 asupra dozei de anticoagulant oral

Ipoteza de lucru: unele polimorfisme ale genelor implicate în metabolizarea și mecanismul de acțiune al ACO influențează răspunsul terapeutic la acestea, din punct de vedere al eficacității și al toxicității. Am studiat influența polimorfismelor genelor CYP2C9 și VKORC1 asupra dozei necesare obținerii eficacității terapeutice, cu risc minim de hemoragii.

Material și metodă: Au fost incluși în studiu 301 pacienți (146 M, 155 F) tratați cu acenocumarol. Pacienții au fost împărțiți în trei loturi: pacienți care au primit acenocumarol în **doză mică** (≤ 7 mg/săptămână), **medie** (> 7 mg și ≤ 28 mg/săptămână) sau **mare** (> 28 mg/săptămână).

Analiza statistică: Regresia logistică multinomială a fost utilizată pentru a studia influența anumitor factori (vârstă, sex, medicație concomitentă, genotipul CYP2C9, polimorfismul c.-1639G>A al VKORC1) asupra probabilității ca un pacient să primească doză mică, medie sau mare de acenocumarol.

Rezultate: Doza minimă săptămânală de acenocumarol administrată a fost 2 mg, iar cea maximă a fost 49 mg. Doza medie de acenocumarol a fost 17,3 mg/săptămână, iar mediana a fost de 16 mg/săptămână. Valorile dozei săptămânale de acenocumarol au fost distribuite non-normal, ceea ce a determinat utilizarea testelor non-parametrice pentru analiza statistică, care a luat în calcul aceste valori (test Kolmogorov-Smirnov; $p < 0,05$).

Doza de acenocumarol nu a fost diferită semnificativ la bărbați față de femei (test Mann-Whitney; $p = 0,06$).

Am obținut o corelație negativă înalt semnificativă statistic între *vârstă și doza săptămânală* de acenocumarol (corelație Spearman; $r = -0,339$; $p < 0,001$). Această corelație și-a păstrat semnificația statistică și când am luat în calcul următoarele variabile: *sex* (corelație parțială; $r = -0,342$; $p < 0,001$); *tratament cu IPP* (corelație parțială; $r = -0,349$; $p < 0,001$), *spironolactonă* (corelație parțială; $r = -0,342$; $p < 0,001$), *statine* (corelație parțială; $r = -0,361$; $p < 0,001$), *prezența alelei CYP2C9*2* (corelație parțială; $r = -0,353$; $p < 0,001$), *alela CYP2C9*3* (corelație parțială; $r = -0,344$; $p < 0,001$), *polimorfismul c.-1639G>A al VKORC1*2* (corelație parțială; $r = -0,370$; $p < 0,001$).

Tratamentul concomitent cu IPP, spironolactonă sau statine nu a influențat apartenența pacienților la unul din cele trei loturi.

Alela CYP2C9*2 a fost prezentă la 63 (20,2%) pacienți, iar CYP2C9*3 a fost găsită la 51 (16,9%) cazuri. Frecvența alelei CYP2C9*2 nu a fost statistic semnificativ diferită între loturile de pacienți (test χ^2 ; $p = 0,36$).

Procentul alelei CYP2C9*3 a diferit statistic semnificativ între cele trei grupuri (test χ^2 ; $p = 0,03$).

Când prezența oricărei alele CYP2C9 a fost luată în considerație, am determinat o asocieră între acestea și dozele terapeutice reduse de acenocumarol (test χ^2 ; $p = 0,03$).

Frecvența genotipurilor polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1 a fost : GG - 32,5%, GA - 50,7%, AA – 16,5%. Prezența unei alele A a crescut probabilitatea ca un pacient să primească doză mică de acenocumarol.

Rezultatele obținute prin aplicarea regresiei logistice multinomiale (categorie de referință – doza medie de acenocumarol) demonstrează faptul că alela CYP2C9*3 crește șansa ca un pacient să primească doză mică de acenocumarol (OR 3,4; p=0,006; 95% CI: 1,41-8,34).

Prezența genotipului GA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1 a crescut de 6,5 ori șansa pentru administrarea unei doze mici de acenocumarol (OR 6,5; p=0,01; 95% CI: 1,38-30,5).

Prezența genotipului AA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1 a ridicat și mai mult probabilitatea ca un pacient să primească doză mică de acenocumarol (OR, 11,6; p=0,003; 95%CI: 2,26-59,58).

Pacienții cu vârsta peste 65 ani au avut o probabilitate crescută de 3,2 ori (OR) pentru administrarea unei doze reduse de acenocumarol (p=0,01; 95 CI 1,24-8,25) și un risc cu 76% mai mic pentru tratamentul cu o doză mare de acenocumarol (p=0,001; 95% CI 0,1-0,56).

Pacienții cu genotipul GA sau AA au avut șanse mai mici pentru plasarea în grupul pacienților cu doză mare de acenocumarol (OR, 0,2; p<0,001; 95CI%: 0,09-0,45; respectiv OR, 0,05; p=0,006; 95%CI: 0,007-0,43).

Studiul 2. Influența polimorfismelor genelor CYP2C9 și VKORC1 asupra timpului necesar atingerii INR terapeutic la pacienții tratați cu acenocumarol

Ipoteza de lucru: prin cunoașterea determinantilor răspunsului individual la tratamentul cu acenocumarol se poate anticipa efectul anticoagulantului asupra pacientului, luat ca și entitate distinctă.

Material și metodă: am inclus în studiu 105 pacienți, din care 51 (48,6%) femei și 54 (51,4%) bărbați tratați cu acenocumarol. Pe lângă variabilele cuantificate descrise în capitolul de metodologie generală, am notat și *timpul de atingere a INR-ului terapeutic*, exprimat în număr de zile, considerându-se numărul de zile necesare pentru a obține o valoare constantă a INR la trei determinări succesive pentru aceeași doză de acenocumarol. INR-ul țintă a fost situat între 2 și 3 (pentru pacienți cu tromboză venoasă profundă, embolie pulmonară, fibrilație atrială) respectiv între 3,5 și 4,5 (pacienți protezați valvular).

Analiza statistică: Am realizat o analiză multivariată care a constatat din construirea mai multor modele predictive folosind regresia Cox. Variabila timp-dependentă a fost reprezentată de timpul necesar pentru atingerea unui INR terapeutic, iar ca eveniment dependent am stabilit înregistrarea INR-ului terapeutic până în a 5-a zi de tratament anticoagulant.

Rezultate: Timpul mediu necesar pentru atingerea unui INR terapeutic a fost de 5 zile, cel minim de 1 zi și cel maxim 15 zile. Analiza statistică a timpului a arătat o distribuție non-normală (test Kolmogorov-Smirnov).

Nu am găsit o corelație semnificativă statistic (corelație Spearman $r=0,017$; $p=0,86$) între vârsta pacienților și timpul necesar atingerii unui INR terapeutic; patologia pentru care pacientul a primit tratament anticoagulant oral (TVP, FIA, proteză valvulară) nu a modificat numărul de zile necesare atingerii unui INR terapeutic (test Mann-Whitney; $p>0,05$);

tratamentul concomitent cu statine, amiodaronă, IPP sau spironolactonă nu a influențat timpul necesar atingerii țintei terapeutice (test Mann-Whitney; $p > 0,05$). Timpul necesar atingerii INR-ului terapeutic nu a fost corelat cu doza de acenocumarol săptămânală necesară anticoagularii eficiente (corelație Spearman; $p = 0,59$). Nici prezența alelei CYP2C9*2 sau CYP2C9*3 nu a influențat timpul necesar atingerii unui INR terapeutic (test Mann-Whitney; $p = 0,26$, respectiv $p = 0,87$).

Polimorfismul c.-1639G>A al VKORC1 a influențat semnificativ statistic timpul de atingere al țintei INR (test Kruskal-Wallis; $p = 0,03$). Am constatat și o prelungire a timpului necesar atingerii INR-ului terapeutic la pacienții la care s-au înregistrat valori ale INR supraterapeutic în perioada de tatonare a dozei de anticoagulant (test Mann-Whitney; $p = 0,003$).

Pentru a examina influența independentă a fiecărui parametru studiat asupra probabilității de atingere a INR-ului terapeutic în funcție de timpul necesar pentru aceasta, am utilizat o regresie Cox. Am stabilit ca eveniment dependent a 5-a zi de tratament anticoagulant. Prezența genotipului AA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1*2 crește de 1,9 ori (hazard ratio) probabilitatea ca pacientul să prezinte un INR terapeutic până în ziua 5 de tratament anticoagulant, față de prezența genotipului GG.

Existența unui INR supraterapeutic în perioada de debut al tratamentului anticoagulant determină o probabilitate cu 35% mai mică pentru ca un pacient să prezinte un INR terapeutic în ziua 5 de tratament anticoagulant.

Studiul 3. Factorii determinanți ai riscului hemoragic în timpul tratamentului cu acenocumarol

Ipoteza de lucru: riscul de hemoragie ar putea fi determinat atât de factori de mediu cât și de factori genetici. Astfel, am studiat influența vârstei, sexului, tratamentului concomitent, polimorfismele genelor CYP2C9 și/sau VKORC1 asupra apariției hemoragiilor la acești pacienți.

Material și metodă: au fost incluși în studiu 223 pacienți, din care 110 (49,3%) femei și 113 (50,7%) bărbați, tratați cu acenocumarol. Au fost notate *complicațiile hemoragice (majore, minore, banale)* apărute pe parcursul tratamentului anticoagulant oral

Rezultate: Complicații hemoragice s-au înregistrat la 11 pacienți (4,9%). În 4 (1,7%) cazuri au fost descrise hemoragii digestive inferioare, în 2 (0,8%) cazuri a apărut hemoptizia, în 2 (0,8%) cazuri s-a înregistrat hematuria, în 2 (0,8%) cazuri echimoze multifocale, iar în 1 (0,4%) caz s-a găsit hemoragie conjunctivală. Nici una din hemoragii nu a fost cu pericol letal.

Pentru a examina influența independentă a fiecărui parametru studiat asupra riscului de apariție a complicațiilor hemoragice am construit un model predictiv folosind regresia logistică multiplă. Am obținut o valoare Nagelkerke R^2 de 0,278 și una Cox & Snell R^2 0,09. Modelul propus explică 9% din probabilitatea ca un pacient să prezinte complicații hemoragice. Dintre parametrii introduși în cadrul regresiei, doar pentru INR-ul supraterapeutic am obținut o semnificație statistică. Astfel, prezența unui INR supraterapeutic crește riscul de apariție a complicațiilor hemoragice de 3,1 ori.

Studiul 4. Corelații genotip-fenotip la pacienții tratați cu acenocumarol

Ipoteza de lucru: prin cunoașterea determinanților răspunsului la tratamentul cu acenocumarol, respectiv valorile INR, se poate aplica încă de la începutul terapiei un tratament personalizat, croit pe pacient. Am urmărit să stabilim o corelație genotip-fenotip la pacienții tratați cu ACO și am studiat factorii genetici care ar putea influența valorile INR în perioada de inițiere a tratamentului cu acenocumarol.

Material și metodă: am inclus în studiu 131 pacienți, din care 70 (53,4%) femei și 61 (46,6%) bărbați tratați cu acenocumarol.

Rezultate: Valorile primului INR (INR1) înregistrat la internare, înaintea începerii tratamentului anticoagulant au fost distribuite normal (test Kolmogorov-Smirnov; $p > 0,05$). Valoarea minimă a fost 0,81, cea maximă 1,64, cea medie $1,13 \pm 0,16$, iar mediana a fost 1,12. Valorile INR-ului înregistrat în ziua a 3-a de tratament anticoagulant oral (INR3) au fost distribuite non-normal (test Kolmogorov-Smirnov; $p < 0,05$). Valoarea minimă a fost 0,88, cea maximă 5,99, cea medie $2,2 \pm 0,97$, iar cea mediană 1,91. Aplicarea unui test Wilcoxon a arătat diferențe înalt semnificative statistic între valorile INR1 și INR3 ($p < 0,001$). Am calculat diferențele dintre valorile INR3 și INR1 (INRDIF) și am obținut o valoare minimă de 0, maximă de 4,49, medie de 1,07 și mediană 0,76.

Aplicand corelația Spearman, am constatat ca vârsta nu influențează INR3 ($r = 0,027$; $p = 0,75$).

Nu am găsit o asociere între INR3 și: sexul pacienților (test Mann-Whitney; $p = 0,56$); tratamentul concomitent cu IPP (test Mann-Whitney; $p = 0,23$); spironolactonă (test Mann-Whitney; $p = 0,75$); statine (test Mann-Whitney; $p = 0,47$); prezența alelei CYP2C9*2 (test Mann-Whitney; $p = 0,62$); existența alelei CYP2C9*3 (test Mann-Whitney; $p = 0,4$). Am demonstrat existența unei diferențe semnificative statistic între valorile INR3 la pacienții cu genotipul AA și cei cu genotipul GG al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1*2 (test Kruskal-Wallis; $p = 0,01$).

Pentru a evalua o posibilă influență a vârstei asupra INRDIF am aplicat o corelație Spearman, constatând lipsa acesteia ($r = 0,026$; $p = 0,77$). Nu am găsit o asociere între INRDIF și: sexul pacienților (test Mann-Whitney; $p = 0,64$); tratamentul concomitent cu IPP (test Mann-Whitney; $p = 0,09$), spironolactonă (test Mann-Whitney; $p = 0,36$), statine (test Mann-Whitney; $p = 0,62$), prezența alelei CYP2C9*2 (test Mann-Whitney; $p = 0,68$), existența alelei CYP2C9*3 (test Mann-Whitney; $p = 0,69$).

Am demonstrat existența unei diferențe semnificative statistic între valorile INRDIF la pacienții cu genotipul AA și cei cu genotipul GA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1*2 (test Kruskal-Wallis $p = 0,01$).

Pentru a evalua efectul concomitent al parametrilor studiați asupra INRDIF am aplicat o regresie liniară multiplă folosind valorile INRDIF ca și variabilă dependentă. Singura variabilă care a influențat independent INRDIF a fost polimorfismul c.-1639G>A al VKORC1*2 ($p = 0,001$).

În etapa următoare am împărțit lotul în trei categorii în funcție de valorile INR3: 39 pacienți cu INR subterapeutic (29,8%), 70 pacienți cu INR terapeutic (53,4%) și 22 pacienți cu INR supraterapeutic (16,8%).

Vârsta pacienților nu a fost diferită în cele trei grupuri (test Kruskal- Wallis; $p=0,92$). Nu am obținut diferențe semnificative între grupuri în ceea ce privește: sexul pacienților (test χ^2 ; $p=0,66$), tratamentul concomitent cu inhibitori de pompă de protoni (test χ^2 ; $p=0,76$), spironolactonă (test χ^2 ; $p=0,47$), statine (test χ^2 ; $p=0,62$), prezența alelei CYP2C9*2 (test χ^2 ; $p=0,97$), alela CYP2C9*3 (test χ^2 ; $p=0,2$). Ponderea genotipurilor polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1*2 a fost diferită în cele trei subploturi (test χ^2 ; $p=0,025$).

Analiza influenței parametrilor studiați asupra probabilității ca un pacient să prezinte un INR3 supraterapeutic, subterapeutic sau terapeutic a fost realizată prin utilizarea unei regresii logistice multinomiale. Am folosit ca variabilă dependentă de referință grupul pacienților cu INR3 subterapeutic.

Prezența genotipului AA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1*2 a crescut de 15,7 ori riscul ca un pacient să prezinte INR supraterapeutic după 2 zile de tratament cu 4 mg de acenocumarol.

Prezența genotipului GA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1*2 a crescut doar de 4,8 ori riscul ca un pacient să prezinte INR supraterapeutic după 2 zile de tratament cu 4 mg de acenocumarol.

Concluzii generale

1. Pacienții purtători ai alelei CYP2C9*3 au necesitat doze scăzute de acenocumarol.
2. Prezența alelei CYP2C9*2 la pacienții heterozigoți nu a influențat apartenența pacienților la unul din cele trei grupuri de doze (mică, medie sau mare).
3. Pacienții purtători ai genotipului AA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1 au necesitat doze mai mici de acenocumarol.
4. Pacienții cu vârstă mai mare de 65 ani au o probabilitate înalt semnificativă statistic să primească o doză de ACO mai mică de 7 mg/săptămână pentru menținerea unui INR terapeutic.
5. Medicația concomitentă și sexul pacienților nu au influențat doza săptămânală de acenocumarol.
6. Determinanții majori ai dozei de anticoagulant oral necesare pentru menținerea INR terapeutic sunt: polimorfismele genelor VKORC1, CYP2C9 și vârsta pacienților.
7. Factorii socio-demografici, tratamentul concomitent, doza de acenocumarol - nu au influențat timpul de atingere a INR-ului terapeutic.
8. Prezența alelelor CYP2C9*2 sau CYP2C9*3 nu a influențat timpul necesar atingerii unui INR terapeutic.
9. Prezența genotipului AA al polimorfismului c.-1639G>A al VKORC1*2 crește de 1,9 ori probabilitatea ca pacientul să prezinte un INR terapeutic până în ziua 5 de tratament anticoagulant.
10. Timpul necesar atingerii INR-ului terapeutic este prelungit la pacienții la care s-au înregistrat valori ale INR supraterapeutice în perioada dinaintea atingerii INR-ului terapeutic, față de cei care nu au avut valori crescute ale INR.

11. Frecvența hemoragiilor a fost de 4.9%, toate hemoragiile înregistrate fiind din categoria celor minore.

12. Riscul de hemoragii la pacienții tratați cu acenocumarol nu este crescut de vârsta înaintată sau de tratamentul concomitent cu spironolactonă sau statine.

13. Prezența polimorfismelor CYP2C9*2, CYP2C9*3 și VKORC1*2 nu a fost asociată cu creșterea riscului de apariție a hemoragiilor.

19. Prezența INR-ului supratераpeutic s-a corelat semnificativ cu apariția hemoragiilor.

20. Nu s-a constatat prezența unei legături semnificative statistic între tratamentul concomitent cu statine, IPP sau spironolactonă și valorile INR3 sau INRDIF la pacienții sub tratament cu acenocumarol.

21. Polimorfismele CYP2C9*2 și CYP2C9*3 nu au avut impact asupra valorilor INR determinat la 3 zile după debutul tratamentului cu acenocumarol.

22. Polimorfismul AA al VKORC1 a influențat valoarea INR3 și a INRDIF, crescând riscul ca pacienții să prezinte INR supratераpeutic

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza este originală prin următoarele realizări:

1. S-a cercetat relația dintre polimorfismele genelor CYP2C9, VKORC1 și doza de anticoagulant oral necesară pentru obținerea unui INR terapeutic, studiu care nu a mai fost realizat la noi în țară.

2. Rezultatele obținute creează premise pentru optimizarea schemei terapeutice individuale, în funcție de constelația genetică a pacientului, care să asigure minimalizarea efectelor adverse asociate terapiei cu acenocumarol.

3. Demonstrează oportunitatea introducerii screening-ului pentru polimorfismele CYP2C9, VKORC1 înainte de inițierea tratamentului cu acenocumarol.

4. A evidențiat efectul prezenței polimorfismelor CYP2C9*2, CYP2C9*3 și VKORC1 asupra timpului de atingere a INR-ului terapeutic.

5. A definit un nou parametru - diferența între valoarea INR din ziua a treia de tratament și valoarea INR inițial (INRDIF)- ca expresie a corelației genotip-fenotip.

6. A evidențiat efectul prezenței polimorfismelor CYP2C9*2 și CYP2C9*3 asupra valorilor INR3 și INRDIF.

7. A studiat relația dintre prezența polimorfismului VKORC1 și valorile INR3 și INRDIF.

PhD THESIS

Pharmacogenetic particularities of the treatment by oral anticoagulants

Scientific supervisor

Prof. Dr. Anca Dana Buzoianu

PhD Student

Florentina Claudia Militaru



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE	
1. Pharmacogenetics and its influence on drugs' metabolism	17
2. Oral anticoagulants	25
3. The influence of CYP2C9 and VKORC1 genes' polymorphisms on the efficacy and safety of the oral anticoagulant treatment	29
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/objectives	37
2. General methodology	39
3. Study 1 – The impact of CYP2C9 and VKORC1 genes' polymorphisms on the dose of oral anticoagulant	45
3.1. Introduction	45
3.2. Work hypothesis	46
3.3. Materials and method	46
3.4. Results	48
3.5. Discussion	55
3.6. Conclusions	59
4. Study 2 – The influence of CYP2C9 and VKORC1 genes' polymorphisms on the time to reach the therapeutic INR in acenocumarol treated patients	61
4.1. Introduction	61
4.2. Work hypothesis	62
4.3. Materials and method	62
4.4. Results	64
4.5. Discussion	69
4.6. Conclusions	72
5. Study 3 - Determinants of hemorrhagic risk during acenocumarol treatment	73
5.1. Introduction	73
5.2. Work hypothesis	74
5.3. Materials and method	74
5.4. Results	77
5.5. Discussion	80
5.6. Conclusions	82
6. Study 4 - Genotype-phenotype correlations in acenocumarol treated patients	83
6.1. Introduction	83
6.2. Work hypothesis	84
6.3. Materials and method	85
6.4. Results	86
6.5. Discussion	93
6.6. Conclusions	95
7. General conclusions	97
8. Originality an innovative contributions of the thesis	99
REFERENCES	101

Key-words: pharmacogenetics, acenocumarol, treatment response variability, genetic polymorphisms, CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, INR.

ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE

Genetic diversity has an important contribution to the susceptibility to develop a disease, as well as to the response to treatment.

Pharmacogenetics and pharmacogenomics try to delineate the influence of genetic factors on the efficacy and on the occurrence of adverse reactions to medication. Personalized treatment, adjusted to the individual genetic profile of the patient is expected to be soon introduced in the clinical practice.

Genetic polymorphisms account, at least in part, for the great interindividual and interethnic variability regarding the therapeutic response. Most frequently these polymorphisms are SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), which are minimal modifications of the genetic information, present in over 1% of the population. They are considered normal variants but under certain circumstances they can express themselves phenotypically.

Oral anticoagulants, as Warfarin and Acenocumarol, are drugs largely used for the prevention and treatment of thromboembolic diseases and belong to the category of the most prescribed drugs. They are characterized by a low therapeutic index and a great interindividual variability of the therapeutic response. Potential complications of oral anticoagulant treatment include severe hemorrhages or lack of efficacy, coming either from excessive, or from insufficient anticoagulation.

For a long time environmental factors were considered as the main responsables for the interindividual variations of the response to oral anticoagulant treatment. Among these factors we can cite: patient's characteristics (age, sex, body mass index), K vitamin alimentary intake, comorbidities (hepatic failure, severe renal failure, heart failure, thyroid's diseases and others), acute intercurrent diseases (fever, sepsis, heart failure decompensation, diarrhea) and concomitant treatments.

Along with demographic and environmental factors, genetic polymorphisms were identified, explaining a part of the individual variability of oral anticoagulant treatment response.

In February 2004 two research teams published in the same issue of *Nature* the identification of the gene coding for C1 subunit of Vitamin K epoxi-reductase (VKORC1). VKORC1 gene is located on chromosome 16 and it encodes a di-thiol-dependant reductase which transforms epoxi K vitamin in quinone K vitamin. This enzyme seems to be one of the target enzymes of oral anticoagulants. Reversible inhibition of VKORC1 enzyme by oral anticoagulants blocks the regeneration of K vitamin, resulting in non-functional procoagulant factors.

VKORC1 gene's polymorphisms are grouped in 4 major haplotypes. VKORC1*2 is the most important haplotype related with the variability of the response to oral anticoagulants and with the risk of excessive anticoagulation. *c.G-1693A* polymorphism, located on VKORC1 gene's promoter, is the mark of VKORC1*2 haplotype, its presence indicating a smaller quantity of active vitamin K, through the impairment of its recycling via epoxid-reductase.

Acenocumarol is inactivated through hydroxylation by CYP2C9, therefore carriers of at least one defective CYP2C9*2, and mainly CYP2C9*3 allele (associated with only 5% CYP2C9 enzymatic activity) are prone to excessive anticoagulation at medium Acenocumarol doses.

PERSONAL CONTRIBUTION

Because of the difficulties in the use of oral anticoagulants and the consecutive risk of hemorrhage or treatment inefficacy, we considered useful to address the pharmacogenetic aspects of the variability of the response to oral anticoagulant treatment.

General methodology: 301 patients (146 M, 155 F) treated by Acenocumarol were included. Patients were followed in the 5th Medical Clinic and in the Heart Institute in Cluj-Napoca (Romania) between 2009 and 2011.

Inclusion criteria: Patients were included if they were aged over 18 yrs, had signed the informed consent, and were treated by Acenocumarol for one or more of the following clinical conditions: 1. Acute deep venous thrombosis (DVT) of the lower limbs ± pulmonary embolism (PE); 2. Atrial fibrillation (AF); 3. Prosthetic heart valve.

Exclusion criteria: patients aged under 18 yrs, life expectancy less than a year because of comorbidities; not having signed the informed consent; contraindications for oral anticoagulant; pregnancy.

Quantified variables:

1. Generale data: age, sex, urban or rural milieu

2. Clinical data:

- *diagnosis:* DVT, PE, AF, prosthetic valve

- *concomitant medication*

- *oral anticoagulant dose/week* (in mg)

- *INR values*, considering therapeutic INR at values between 2 and 3, INR supratherapeutic at values over 3 and subtherapeutic INR at values lower than 2. In the setting of patients having prothetic valves INR was considered therapeutic at values comprised in the interval 3.5-4.5.

3. Genetic data: CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms (heterozygous or homozygous); VKORC1 genotype

Genotyping for the CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1*2 alleles was done using the PCR-RFLP (Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) method.

Statistical analysis. Data were recorded using Microsoft Excel XP software. Statistical analysis was done with SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software - version 17.

Study 1. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genes' polymorphisms on the dose of oral anticoagulant.

Work hypothesis: certain polymorphisms of the genes involved in the metabolism and the mechanism of action of oral anticoagulants (OA) influence the therapeutic response, concerning efficacy and toxicity. We studied the influence of CYP2C9 and VKORC1 genes' polymorphisms on the dose needed to obtain therapeutic efficacy, with a minimal hemorrhagic risk.

Materials and method: 301 patients (146 M, 155 F) treated by Acenocumarol were included. They were assigned to 3 groups: patients receiving a **low dose** of Acenocumarol (≤ 7 mg/week), a **medium dose** (> 7 mg and ≤ 28 mg/week) or a **high dose** (> 28 mg/week).

Statistical analysis: Multinomial logistic regression was used to study the influence of several factors (age, sex, concomitant medication, CYP2C9 genotype, polymorphism c.-1639G>A of VKORC1) on the probability that a patient receive a low, medium or high dose of Acenocumarol.

Results: The lowest weekly dose of Acenocumarol was 2 mg, the highest dose was 49 mg. The average Acenocumarol dose was 17.3 mg/week and the median was 16 mg/week. Weekly Acenocumarol dose values were non-normally distributed, requiring the use of non-parametric tests for their statistical analysis (Kolmogorov-Smirnov test; $p < 0.05$).

Acenocumarol dose did not differ significantly in men vs. women (Mann-Whitney test; $p = 0.06$).

We found a negative correlation, statistically highly significant, between the *age* and the *weekly Acenocumarol dose* (Spearman correlation; $r = -0.339$; $p < 0.001$). This correlation remained statistically significant even when we took into account the following variables: *sex* (partial correlation; $r = -0.342$; $p < 0.001$), *PPI treatment* (partial correlation; $r = -0.349$; $p < 0.001$), *Spironolactone* (partial correlation; $r = -0.342$; $p < 0.001$), *statins* (partial correlation; $r = -0.361$; $p < 0.001$), *presence of CYP2C9*2 allele* (partial correlation; $r = -0.353$; $p < 0.001$), *CYP2C9*3 allele* (partial correlation; $r = -0.344$; $p < 0.001$), *polymorphism c.-1639G>A of VKORC1*2* (partial correlation; $r = -0.370$; $p < 0.001$).

Concomitant treatment by PPI, Spironolactone or statins did not influence patients' assignment to one of the three groups.

CYP2C9*2 allele was present in 63 patients (20.2%) and CYP2C9*3 was found in 51 cases (16.9%). The frequency of CYP2C9*2 allele did not differ significantly among the groups of patients (χ^2 test; $p = 0.36$).

The frequency of CYP2C9*3 significantly differed among the three groups (χ^2 test; $p = 0.03$).

Considering the presence of any CYP2C9 allele, we determined an association between these and low Acenocumarol therapeutic doses (χ^2 test; $p = 0.03$).

The frequency of the genotypes of c.-1639G>A VKORC1 polymorphism was as follows: GG – 32.5%, GA – 50.7%, AA – 16.5%. The presence of an A allele increased the probability that a patient receive a low Acenocumarol dose.

The results obtained through the application of a multinomial logistic regression (reference category – medium Acenocumarol dose) prove that the CYP2C9*3 allele increased the chance that a patient receives a low Acenocumarol dose (OR 3.4; $p=0.006$; 95% CI: 1.41-8.34).

The presence of GA genotype of c.-1639G>A polymorphism of VKORC1 increased by 6.5 fold the chance for a low Acenocumarol dose (OR 6.5; $p=0.01$; 95% CI: 1.38-30.5).

The presence of AA genotype of c.-1639G>A polymorphism of VKORC1 increased even more the probability for a patient to get a low Acenocumarol dose (OR 11.6; $p=0.003$; 95% CI: 2.26-59.58).

Patients aged over 65 yrs had a 3.2 fold (OR) higher probability of a low Acenocumarol dose ($p=0.01$; 95%CI 1.24-8.25) and a risk lower by 76% to get a high Acenocumarol dose ($p=0.001$; 95% CI 0.1-0.56).

Patients having GA or AA genotype had lower chances to be assigned to the high Acenocumarol dose (OR 0.2; $p<0.001$; 95CI%: 0.09-0.45; respectively OR 0.05; $p=0.006$; 95% CI: 0.007-0.43).

Study 2. The influence of CYP2C9 and VKORC1 genes' polymorphisms on the time to reach the therapeutic INR in Acenocumarol treated patients

Work hypothesis: by acknowledging the determinants of the individual response at Acenocumarol treatment it is possible to anticipate the effect of the anticoagulant on the patient, as a separate entity.

Materials and method: we included 105 Acenocumarol treated patients, 51 women (48.6%) and 54 men (51.4%). Apart from the quantified variables described in the general methodology chapter, we also noted the *time to reach the therapeutic INR*, expressed in days, considering the number of days to obtain a constant INR at three consecutive determinations using the same Acenocumarol dose. Target INR was between 2 and 3 for the DVT, PE and AF patients and between 3.5 and 4.5 for the patients having prosthetic heart valves, respectively.

Statistical analysis: We realized a multivariate analysis by creating several predictive models using Cox regression. The time-dependent variable was the time to reach the therapeutic INR and the dependent event was to reach the therapeutic INR until the fifth day of oral anticoagulant treatment.

Results: Average time necessary to reach the therapeutic INR was 5 days, with a minimum of 1 day and a maximum of 15 days. Statistical analysis of the time to reach therapeutic INR showed a non-normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test).

We did not find a statistically significant correlation (Spearman's correlation $r=0.017$; $p=0.86$) between patients' age and the time to reach the therapeutic INR; the pathology requiring the oral anticoagulant treatment (DVT, AF, prosthetic valve) did not modify the number of days necessary to reach the therapeutic INR (Mann-Whitney test; $p>0.05$); concomitant treatment with statins, Amiodarone, PPI or Spironolactone did not influence the time to reach the therapeutic target (Mann-Whitney test; $p>0.05$). The time to reach the therapeutic INR did not correlate with the weekly Acenocumarol dose necessary for an efficient anticoagulation (Spearman's correlation; $p=0.59$). The presence of the CYP2C9*2 or

CYP2C9*3 allele did not influence the time to reach therapeutic INR either (Mann-Whitney test; $p=0.26$, respectively $p=0.87$).

The polymorphism c.-1639G>A of VKORC1 significantly influenced the time to reach the therapeutic INR (Kruskal-Wallis test; $p=0.03$). We also found a prolongation of the time to reach therapeutic INR in patients in whom we recorded suprathreshold INR values during the anticoagulant dose search phase (Mann-Whitney test; $p=0.003$).

In order to assess the independent influence of each studied parameter on the probability to reach the therapeutic INR as a function of the time needed for this, we used the Cox regression. We set as the dependent event the fifth day of anticoagulant treatment. The presence of AA genotype of the c.-1639G>A polymorphism of VKORC1*2 increases by a 1.9 factor (hazard ratio) the probability that a patient reaches the therapeutic INR until the fifth day of anticoagulant treatment, compared to the presence of GG genotype.

Finding a suprathreshold INR during the period of initiation of the treatment determines a probability lower by 35% for a patient to have a therapeutic INR in the fifth day of anticoagulant treatment.

Study 3. Determinants of hemorrhagic risk during Acenocumarol treatment

Work hypothesis: hemorrhagic risk could be determined by environmental factors, as well as by genetic factors. Thus we studied the influence of age, sex, concomitant treatment, polymorphisms of CYP2C9 and/or VKORC1 genes on the occurrence of hemorrhage in these patients

Materials și method: 223 Acenocumarol treated patients were included in this study – 110 women (49.3%) and 113 men (50.7%). The *hemorrhagic complications (major, minor, casual)* occurring during the oral anticoagulant therapy were recorded.

Results: Hemorrhagic complications were recorded in 11 patients (4.9%). In 4 cases (1.7%) lower gastrointestinal tract hemorrhages were diagnosed, in 2 cases (0.8%) hemoptysis was recorded, in 2 cases (0.8%) hematuria, in 2 cases (0.8%) multifocal ecchymoses and in 1 case (0.4%) conjunctival hemorrhage was found. None of the hemorrhages was life-threatening.

In order to assess the independent influence of each studied parameter on the risk of occurrence of hemorrhagic complications we built a predictive model using a multiple logistic regression. We found a Nagelkerke R^2 value of 0.278 and a Cox & Snell R^2 value of 0.09. The proposed model explains 9% of the probability of a patient to have hemorrhagic complications. Out of the parameters tested in the regression it was only for the suprathreshold INR that statistical significance was found. Thus, the presence of a suprathreshold INR increases the risk of hemorrhagic complications by a 3.1 factor.

Study 4. Genotype-phenotype correlations in Acenocumarol treated patients

Work hypothesis: by knowing the determinants of the response to Acenocumarol treatment, i.e. the INR values, it is possible to apply since the beginning a personalized treatment, tailored to the patient. We aimed to establish a genotype-phenotype correlation in patients treated by OA and we studied the genetic factors which could influence INR values during the initiation phase of Acenocumarol treatment.

Materials și method: 131 Acenocumarol treated patients were included in this study – 70 women (53.4%) and 61 men (46.6%).

Results: The values of the first INR (INR1), recorded upon admission, before starting anticoagulant treatment, were distributed normally (Kolmogorov-Smirnov test; $p > 0.05$). The lowest value was 0.81, the highest 1.64, the average 1.13 ± 0.16 and the median 1.12. INR values recorded in the 3rd day of treatment by oral anticoagulant (INR3) were non-normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test; $p < 0.05$). The lowest value was 0.88, the highest 5.99, the average 2.2 ± 0.97 and the median 1.91. Wilcoxon test showed highly significant differences between INR1 and INR3 ($p < 0.001$). We calculated the difference between INR3 and INR1 (INRDIF) and obtained a minimal value of 0, a maximal one of 4.49, an average of 1.07 and a median of 0.76.

Applying Spearman's correlation we found out that age had no influence on INR3 ($r = 0.027$; $p = 0.75$).

No association was found between INR3 and the following: patients' sex (Mann-Whitney test; $p = 0.56$); concomitant treatment by PPI (Mann-Whitney test; $p = 0.23$), Spironolactone (Mann-Whitney test; $p = 0.75$), statins (Mann-Whitney test; $p = 0.47$); presence of CYP2C9*2 allele (Mann-Whitney test; $p = 0.62$); presence of CYP2C9*3 allele (Mann-Whitney test; $p = 0.4$). We were able to prove a statistically significant difference between the values of INR3 in patients displaying AA genotype and those having GG genotype of the polymorphism c.-1639G>A of VKORC1*2 (Kruskal-Wallis test; $p = 0.01$).

Using Spearman's correlation we found no influence of age on INRDIF ($r = 0.026$; $p = 0.77$). No association was found between INRDIF and the following: patients' sex (Mann-Whitney test; $p = 0.64$); concomitant treatment by PPI (Mann-Whitney test; $p = 0.09$), Spironolactone (Mann-Whitney test; $p = 0.36$), statins (Mann-Whitney test; $p = 0.62$), presence of CYP2C9*2 allele (Mann-Whitney test; $p = 0.68$), presence of CYP2C9*3 allele (Mann-Whitney test; $p = 0.69$).

We were able to prove the existence of a statistically significant difference between INRDIF values in patients having AA genotype and those having GA genotype of the polymorphism c.-1639G>A of VKORC1*2 (Kruskal-Wallis test; $p = 0.01$).

In order to assess the concomitant effect of the studied parameters on INRDIF we applied a multiple linear regression using INRDIF values as dependent variable. The only variable that influenced independently INRDIF was the c.-1639G>A polymorphism of VKORC1*2 ($p = 0.001$).

In the next phase we subdivided the group in three categories, according to INR3 values: 39 patients having subtherapeutic INR (29.8%), 70 patients having therapeutic INR (53.4%) and 22 patients having supratherapeutic INR (16.8%).

Patients' age was not different in the three groups (Kruskal-Wallis test; $p = 0.92$). No significant differences were found between the groups concerning the following: patients' sex (χ^2 test; $p = 0.66$), concomitant treatment by proton pump inhibitors (χ^2 test; $p = 0.76$), Spironolactone (χ^2 test; $p = 0.47$), statins (χ^2 test; $p = 0.62$), presence of CYP2C9*2 allele (χ^2 test; $p = 0.97$), CYP2C9*3 allele (χ^2 test; $p = 0.2$). The proportion of the genotypes of c.-1639G>A genotype of VKORC1*2 was different in the three groups (χ^2 test; $p = 0.025$).

The analysis of the influence of the studied parameters on the probability for a patient to have an INR in the supratherapeutic, subtherapeutic or therapeutic range was realized using a

multinomial logistic regression. We used the group of patients having subtherapeutic INR as the reference dependent variable.

The presence of AA genotype of c.-1639G>A polymorphism of VKORC1*2 increased by a 15.7 factor the risk that a patient has suprathreshold INR after 2 days of treatment by 4 mg of Acenocumarol.

The presence of GA genotype of c.-1639G>A polymorphism of VKORC1*2 increased by only a 4.8 factor the risk that a patient has suprathreshold INR after 2 days of treatment by 4 mg of Acenocumarol.

General conclusions

1. The carriers of CYP2C9*3 allele required low Acenocumarol dose.
2. Presence of CYP2C9*2 allele in heterozygous patients did not influence the assignment of patients to one of the three groups of doses (low, medium or high).
3. Carriers of AA genotype of c.-1639G>A polymorphism of VKORC1 required lower doses of Acenocumarol.
4. Patients aged over 65 years have a highly significant probability to receive an OA dose lower than 7 mg/week in order to maintain a therapeutic INR.
5. Concomitant medication and patients' sex did not influence weekly Acenocumarol dose.
6. The major determinants of oral anticoagulant dose necessary to maintain a therapeutic INR are: VKORC1 and CYP2C9 genes' polymorphisms and patients' age.
7. Social and demographic factors, concomitant treatment, Acenocumarol dose – did not influence the time to reach therapeutic INR.
8. Presence of CYP2C9*2 or CYP2C9*3 did not influence the time necessary to reach a therapeutic INR
9. The presence of AA genotype of c.-1639G>A polymorphism of VKORC1*2 increases 1.9 fold the probability that the patient has a therapeutic INR until the fifth day of anticoagulant treatment.
10. The time necessary to reach a therapeutic INR is prolonged in patients who had suprathreshold values of the INR in the period before reaching the therapeutic INR, compared to those not having had high values of INR.
11. The frequency of the hemorrhages was 4.9%, all the recorded hemorrhages being classified as minor.
12. Hemorrhagic risk in patients treated by Acenocumarol is not increased by old age or by concomitant treatment by Spironolactone or statins.
13. The presence of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1*2 polymorphisms was not associated with an increase of the risk of hemorrhages.

19. The presence of supratherapeutic INR was significantly correlated with the occurrence of hemorrhages.

20. No statistically significant relation was found between the concomitant treatment by statins, PPI or Spionolactone and the values of INR3 or INRDIF in patients treated by Acenocumarol.

21. CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms had no impact on INR values determined 3 days after the initiation of the treatment by Acenocumarol.

22. The polymorphism AA of VKORC1 influenced INR3 and INRDIF values, increasing the risk that the patients have a supratherapeutic INR.

Originality and innovative contributions of the thesis

The PhD thesis is original due to the following accomplishments:

1. The relation between the polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes and the dose of anticoagulant necessary to obtain a therapeutic INR was investigated, this study never being realized before in our country.

2. The results that were obtained create a basis to optimize the individual therapeutic plan, according to the genetic thesaurus of the patient in order to minimize the adverse effects associated with Acenocumarol therapy.

3. It proves the opportunity of the screening for CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms before the initiation of Acenocumarol treatment.

4. It showed the effect of the presence of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 polymorphisms on the time to reach the therapeutic INR.

5. It defined a new parameter – the difference between the INR value in the third day of treatment and the initial INR (INRDIF) – as an expression of the genotype-phenotype correlation.

6. It displayed the effect of the presence of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms on INR3 and INRDIF values.

7. The relation between the presence of the VKORC1 polymorphism and the values of INR3 and INRDIF was studied.

THÈSE DE DOCTORAT

Les particularités pharmacogénétiques du traitement anticoagulant oral

Directeur des études doctorales

Prof. Dr. Anca Dana Buzoianu

Étudiante au doctorat

Florentina Claudia Militaru



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE DE MATIÈRES

INTRODUCTION	13
L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	
1. La pharmacogénétique et son influence sur le métabolisme des médicaments	17
2. Les anticoagulants oraux	25
3. L'influence des polymorphismes CYP2C9 et VKORC1 sur l'efficacité et sécurité du traitement anticoagulant oral	29
CONTRIBUTION PERSONELLE	
1. L'hypothèse de travail/objectifs	37
2. Méthodologie générale	39
3. L'étude 1- L'impact des polymorphismes CYP2C9 et VKORC1 sur la dose d'anticoagulant oral	45
3.1. Introduction	45
3.2. Hypothèse de travail	46
3.3. Matériel et méthode	46
3.4. Résultats	48
3.5. Discussions	55
3.6. Conclusions	59
4. L'étude 2- L'impact des polymorphismes CYP2C9 et VKORC1 sur le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique chez les patients traités par acénocoumarol	61
4.1. Introduction	61
4.2. Hypothèse de travail	62
4.3. Matériel et méthode	62
4.4. Résultats	64
4.5. Discussion	69
4.6. Conclusions	72
5. L'étude 3 – Les déterminants du risque hémorragique lors du traitement par acénocoumarol	73
5.1. Introduction	73
5.2. Hypothèse de travail	74
5.3. Matériel et méthode	74
5.4. Résultats	77
5.5. Discussion	80
5.6. Conclusions	82
6. L'étude 4 - Corrélations génotype-phénotype chez les patients traités par acénocoumarol	83
6.1. Introduction	83
6.2. Hypothèse de travail	84
6.3. Matériel et méthode	85
6.4. Résultats	86
6.5. Discussion	93
6.6. Conclusions	95
7. Conclusions générales	97
8. L'originalité et les contributions innovatrices de la thèse	99
RÉFÉRENCES	101

Mots clés: pharmacogénétique, acénocoumarol, variabilité de la réponse au traitement, polymorphismes CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, INR.

L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

La diversité génétique a une contribution importante en termes de sensibilité pour l'apparition d'une maladie et en ce qui concerne la réponse au traitement.

La pharmacogénétique et pharmacogénomique tentent d'établir l'influence des facteurs génétiques sur l'efficacité et la fréquence des réactions indésirables aux médicaments. On s'attend à ce que le traitement personnalisé, selon le profil génétique de chaque patient soit bientôt présent dans la pratique clinique.

La grande variabilité interindividuelle et interethnique en ce qui concerne la réponse thérapeutique peut être attribuée, au moins en partie, aux polymorphismes génétiques. Le plus souvent, ces polymorphismes sont des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) - altérations minimes de l'information génétique, présentes à plus de 1 % de la population. Ces variations sont considérées comme normales, mais, dans certaines circonstances peuvent s'exprimer dans le plan phénotypique.

Les anticoagulants oraux (les antivitamines K – AVK) - warfarine et acénocoumarol - sont des médicaments couramment utilisés pour la prévention et le traitement des maladies thromboemboliques et appartiennent à la catégorie des médicaments plus prescrits. Ils sont caractérisés par un index thérapeutique bas et une variabilité interindividuelle de la réponse au traitement. Les complications possibles du traitement par AVK comprennent l'hémorragie grave ou une manque d'efficacité, découlant d'une anticoagulation excessive ou insuffisante.

Les facteurs environnementaux ont été considérés depuis beaucoup de temps comme les principales responsables de la variabilité interindividuelle au traitement anticoagulant oral. Parmi ces facteurs sont comptés : les caractéristiques des patients (âge, sexe, index de masse corporelle), l'apport alimentaire en vitamine K, les comorbidités (insuffisance hépatique, insuffisance rénale grave, insuffisance cardiaque, maladies de la thyroïde, etc.), les pathologies intercurrentes aiguës (fièvre, infection, insuffisance cardiaque, diarrhée etc.) et les médicaments co-prescrits.

À côté de facteurs démographiques ou environnementaux recensés, des polymorphismes génétiques ont été identifiés, expliquant une partie importante de la variabilité interindividuelle de la réponse au traitement anticoagulant oral.

En février 2004, deux équipes ont publié dans le même numéro de *Nature* l'identification du gène codant pour la sous-unité C1 de la vitamine K époxyde-réductase (VKORC1). Le gène de VKORC1 est situé sur le chromosome 16 et code pour une réductase di-thiol-dépendante transformant la vitamine K époxyde en vitamine K quinone. Cette enzyme semble être l'une des enzymes-cible des anticoagulants oraux. L'inhibition irréversible de l'enzyme VKORC1 par les AVK bloque la régénération de la vitamine K, résultant ainsi en la synthèse de facteurs procoagulants non fonctionnels.

Les polymorphismes génétiques *VKORC1* sont regroupés en 4 haplotypes majeurs. L'haplotype *VKORC1**2 est le plus important en ce qui concerne la variabilité de la réponse aux AVK et le risque de surdosage. La marque d'haplotype *VKORC1* * 2 est représenté par le polymorphisme c. G-1639A, situé au niveau du promoteur du gène *VKORC1*; sa présence indique une faible quantité de vitamine K.

L'acénocoumarol est inactivée par le CYP2C9. Les sujets porteurs d'au moins une allèle muté - CYP2C9 * 2, mais en particulier CYP2C9 * 3 (allèle avec une activité de seulement 5%) – ont une sensibilité accrue à une dose moyenne d'acénocoumarol. Il semble que jusqu'à 14 % de la variabilité de la réponse et le dosage optimal d'acénocoumarol peut être expliquée par les polymorphismes génétiques CYP2C9 * 2 et surtout CYP2C9 * 3.

CONTRIBUTION PERSONELLE

Compte tenu de la difficulté de l'utilisation des AVK, et par conséquent, le risque d'hémorragie ou inefficacité le traitement, nous avons considéré utile l'étude des aspects pharmacogénétiques de la variabilité de la réponse au traitement anticoagulant oral.

Méthodologie générale: 301 patients (146 M, 155 F) traités par acénocoumarol, suivis dans la Clinique Médicale 5 et l'Institut du Coeur de Cluj-Napoca dans la période 2009-2011, ont été inclus dans l'étude.

Les critères d'inclusion: Nous avons inclus dans cette étude des patients âgés de plus de 18 ans qui ont signé le formulaire de consentement éclairé et qui ont été traités par acénocoumarol pour une ou plusieurs des situations cliniques suivantes: 1. Thrombose veineuse profonde des membres inférieures (TVP) ± embolie pulmonaire (EP); 2. Fibrillation atriale permanente (FIA); 3. Prothèse valvulaire

Les critères d'exclusion: patients de moins de 18 ans ; patients ayant une espérance de vie de moins d'un an en raison de comorbidités ; les patients qui n'ont pas signé le consentement informé ; la présence de contre-indications de la thérapie anticoagulante ; la grossesse.

Les variables quantifiées:

1. Données générales: âge, sexe, origine du patient : urbain ou rural

2. Données cliniques:

- *le diagnostique:* TVP, EP, FIA, Prothèse valvulaire

- *médicaments co-prescrits*

- *dose d'acénocoumarol/semaine (mg)*

- *les valeurs INR;* INR thérapeutique = entre 2 et 3, INR supratherapeutique: > 3; INR subtherapeutique: <2. Chez les patients avec prothèses valvulaires l'INR-ut thérapeutique a été considéré entre 3,5 et 4,5.

3. Données génétiques: polymorphismes CYP2C9*2 și CYP2C9*3 (hétérozygotes ou homozygotes); génotype VKORC1

Détermination du génotype. Le génotypage pour les allèles CYP2C9*2, CYP2C9*3 et VKORC1*2 a été faite par la méthode PCR-RFLP (Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism).

Analyse statistique. L'enregistrement des données a été fait à l'aide du logiciel Microsoft Excel XP. L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 17.

L'étude 1. L'impact des polymorphismes CYP2C9 et VKORC1 sur la dose d'anticoagulant oral

Hypothèse de travail: certains polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme et le mécanisme d'action des AVK influencent la réponse thérapeutique, en ce qui concerne leur efficacité et toxicité. Nous avons étudié l'influence des polymorphismes des gènes CYP2C9 et VKORC1 sur la dose nécessaire pour obtenir l'efficacité thérapeutique, en minimisant le risque d'hémorragies.

Matériel et méthode: 301 patients (146 H, 155 F) traités par acénocoumarol ont été inclus. Les patients ont été divisés en trois groupes : patients qui ont reçu une dose d'acénocoumarol **faible** (≤ 7 mg/semaine), **moyenne** (>7 mg et ≤ 28 mg/semaine) ou **haute** (>28 mg/semaine).

Analyse statistique: La régression logistique multinomiale a été utilisée pour étudier l'influence de certains facteurs (âge, sexe, médicaments co-prescrits, génotype CYP2C9, polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1) sur la probabilité qu'un patient reçoive une dose faible, moyenne ou haute d'acénocoumarol.

Résultats: La dose hebdomadaire minimale d'acénocoumarol a été de 2 mg et celle maximale de 49 mg. La dose moyenne d'acénocoumarol a été de 17.3 mg/semaine, la médiane de 16 mg/semaine. Les valeurs de la dose hebdomadaire d'acénocoumarol ont été distribuées d'une façon non-normale, ce qui a déterminé l'emploi des tests non-paramétriques pour l'analyse statistique (test de Kolmogorov-Smirnov; $p < 0.05$).

La dose d'acénocoumarol n'a pas différencié entre les hommes et les femmes (test de Mann-Whitney; $p = 0.06$).

Nous avons constaté une corrélation négative, fortement significative statistiquement, entre l'âge et la dose hebdomadaire d'acénocoumarol (corrélation Spearman; $r = -0.339$; $p < 0.001$). Cette corrélation a gardé sa signification statistique quand nous avons pris en compte les variables suivantes : *sexe* (corrélation partielle; $r = -0.342$; $p < 0.001$); *traitement par IPP* (corrélation partielle; $r = -0.349$; $p < 0.001$), *spironolactone* (corrélation partielle; $r = -0.342$; $p < 0.001$), *statines* (corrélation partielle; $r = -0.361$; $p < 0.001$), *présence de l'allèle CYP2C9*2* (corrélation partielle; $r = -0.353$; $p < 0.001$), *l'allèle CYP2C9*3* (corrélation partielle; $r = -0.344$; $p < 0.001$), *le polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2* (corrélation partielle; $r = -0.370$; $p < 0.001$).

Le traitement concomitant par IPP, spironolactone ou statines n'a pas influencé l'appartenance des patients à un des trois groupes.

L'allèle CYP2C9*2 a été présente chez 63 patients (20.2%) et CYP2C9*3 a été trouvée chez 51 cas (16,9%). Il n'y a pas eu de différences significatives statistiques entre les groupes de patients concernant la fréquence de l'allèle CYP2C9*2 (test de χ^2 ; $p = 0.36$).

Le pourcentage de l'allèle CYP2C9*3 a différencié significativement entre les groupes (test de χ^2 ; $p = 0.03$).

Quand la présence de toutes allèles de CYP2C9 a été prise en compte, nous avons déterminé une association entre celles-ci et les doses thérapeutiques faibles d'acénocoumarol (teste χ^2 ; $p=0.03$).

La fréquence des génotypes du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1 a été : GG – 32.5%, GA – 50.7%, AA – 16.5%. La présence d'un allèle A a augmenté la probabilité qu'un patient reçoive une faible dose d'acénocoumarol.

Les résultats de la régression logistique multinomiale (catégorie de référence – dose moyenne d'acénocoumarol) démontre que l'allèle CYP2C9*3 augmente la chance qu'un patient reçoive une faible dose d'acénocoumarol (OR 3.4; $p=0.006$; 95% CI: 1.41-8.34).

La présence du génotype GA du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1 a augmenté 6.5 fois la chance de recevoir une faible dose d'acénocoumarol (OR 6.5; $p=0.01$; 95% CI: 1.38-30.5).

La présence du génotype AA du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1 a monté encore plus la probabilité qu'un patient reçoive une faible dose d'acénocoumarol (OR 11.6; $p=0.003$; 95% CI: 2,26-59.58).

Les patients ayant un âge au-delà de 65 ans ont eu une probabilité accrue de 3.2 fois (OR) de recevoir une faible dose d'acénocoumarol ($p=0.01$; 95 CI 1.24-8.25) et un risque moindre de 76% pour un traitement par acénocoumarol à haute dose ($p=0.001$; 95% CI 0.1-0.56).

Les patients ayant le génotype GA ou AA ont eu des chances moindres d'être traités par une haute dose d'acénocoumarol (OR, 0.2; $p<0.001$; 95CI%: 0.09-0.45; respectivement OR, 0.05; $p=0.006$; 95%CI: 0.007-0.43).

L'étude 2. L'impact des polymorphismes CYP2C9 et VKORC1 sur le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique chez les patients traités par acénocoumarol

Hypothèse de travail: en connaissant les déterminants de la réponse individuelle au traitement par acénocoumarol il est possible d'anticiper l'effet de l'anticoagulant sur le patient, regardé comme entité distincte.

Matériel et méthode: nous avons inclus dans l'étude 105 patients, dont 51 femmes (48.6%) et 54 hommes (51.4%), traités par acénocoumarol. Hormis les variables quantifiées décrites dans le chapitre de méthodologie générale, nous avons noté également *le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique*, exprimé en jours, prenant en compte le nombre des jours nécessaires pour obtenir une valeur constante de l'INR aux trois déterminations successives, en gardant la même dose d'acénocoumarol. L'INR-cible a été situé entre 2 et 3 (pour les patients ayant une TVP, EP ou FA), respectivement entre 3.5 et 4.5 (patients aux prothèses valvulaires).

Analyse statistique: nous avons réalisé une analyse multivariée, en concevant plusieurs modèles prédictifs utilisant la régression de Cox. La variable temps-dépendante a été le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique et l'atteinte de l'INR thérapeutique jusqu'au 5^{ème} jour de traitement anticoagulant a été définie comme événement dépendant.

Résultats: Le temps moyen nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique a été de 5 jours, le temps minime d'un jour et le maximum de 15 jours. L'analyse statistique du temps a montré une distribution non-normale (teste Kolmogorov-Smirnov).

Nous n'avons pas trouvé une corrélation statistiquement significative (corrélation Spearman $r=0.017$; $p=0.86$) entre l'âge des patients et le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique ; la pathologie pour laquelle le patient a reçu le traitement par AVK (TVP, FA, prothèse valvulaire) n'a pas modifié le nombre de jours nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique (teste Mann-Whitney; $p>0.05$); le traitement concomitant par statines, amiodarone, IPP ou spironolactone n'a pas influence le temps nécessaire pour atteindre la cible thérapeutique (teste Mann-Whitney; $p>0.05$). Le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique n'a pas été corrélé avec la dose hebdomadaire d'acénocoumarol nécessaire pour une anticoagulation efficace (correlation Spearman; $p=0.59$). La présence des allèles CYP2C9*2 ou CYP2C9*3 n'a pas influencé le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique (teste Mann-Whitney; $p=0.26$, respectivement $p=0.87$).

Le polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1 a influencé d'une façon significative statistiquement le temps nécessaire pour atteindre l'INR cible (teste Kruskal-Wallis; $p=0.03$). Nous avons également constaté une prolongation du temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique chez les patients ayant eu des valeurs supra-thérapeutiques de l'INR dans la période de titrage de la dose d'anticoagulant (teste Mann-Whitney; $p=0.003$).

Pour examiner l'influence indépendante de chaque paramètre étudié sur la probabilité d'atteindre l'INR thérapeutique en fonction du temps nécessaire pour ceci, nous avons utilisé une régression Cox. Nous avons établi comme événement dépendant le 5^{ème} jour de traitement anticoagulant. La présence du génotype AA du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2 augmente de 1.9 fois (hazard ratio) la probabilité qu'un patient ait un INR thérapeutique jusqu'au 5^{ème} jour de traitement anticoagulant, rapporté à la présence du génotype GG.

L'existence d'un INR supra-thérapeutique lors de la période de début du traitement anticoagulant amène une probabilité moindre de 35% qu'un patient ait un INR thérapeutique au 5^{ème} jour de traitement anticoagulant.

L'étude 3. Les déterminants du risque hémorragique lors du traitement par acénocoumarol

Hypothèse de travail: le risque hémorragique pourrait être déterminé de facteurs d'environnement, ainsi que des facteurs génétiques. Nous avons étudié l'influence de l'âge, sexe, traitement co-prescrit, polymorphismes des gènes CYP2C9 et/ou VKORC1 sur l'apparition des hémorragies chez ces patients.

Matériel et méthode: 223 patients traités par acénocoumarol ont été inclus, dont 110 (49.3%) femmes et 113 (50.7%) hommes. Les complications hémorragiques (majeures, mineures, banales) survenues lors du traitement anticoagulant oral ont été notées.

Résultats: 11 patients (4.9%) ont présenté des complications hémorragiques : dans 4 cas (1.7%) des hémorragies digestives basses ; dans 2 cas (0.8%) des hémoptysies ; dans 2 cas (0.8%) des hématuries ; dans 2 cas des ecchymoses multifocales ; dans 1 cas (0.4%) une hémorragie conjonctivale. Aucune hémorragie n'a pas présenté un danger vital.

Pour examiner l'influence indépendante de chaque paramètre étudié sur le risque d'apparition des complications hémorragiques nous avons conçu un modèle prédictif utilisant la régression logistique multiple. Nous avons obtenu une valeur Nagelkerke R^2 de 0.278 et

une Cox & Snell R^2 de 0.09. Le modèle proposé explique 9% de la probabilité qu'un patient ait des complications hémorragiques. De tous les paramètres de la régression, seulement pour l'INR supra-thérapeutique la signification statistique a été franchie. La présence d'un INR supra-thérapeutique augmente donc le risque d'apparition des complications hémorragiques de 3.1 fois.

L'étude 4. Corrélations génotype-phénotype chez les patients traités par acénocoumarol

Hypothèse de travail: en connaissant les déterminants de la réponse au traitement par acénocoumarol, c'est-à-dire des valeurs de l'INR, on peut appliquer dès le début de la thérapie un traitement personnalisé, adapté au patient. Nous avons visé d'établir une corrélation génotype-phénotype aux patients traités par AVK et nous avons étudié les facteurs génétiques qui pourraient influencer les valeurs de l'INR dans la période d'initiation du traitement par acénocoumarol.

Matériel et méthode: nous avons inclus dans l'étude 131 patients traités par acénocoumarol, dont 70 femmes (53.4%) et 61 hommes (46.6%).

Résultats: Les valeurs du premier INR (INR1), enregistré à l'admission, avant le début du traitement anticoagulant, ont été distribuées normalement (teste Kolmogorov-Smirnov; $p > 0.05$). La valeur minimale a été de 0.81, celle maximale de 1.64, la moyenne de 1.13 ± 0.16 et la médiane de 1.12. Les valeurs de l'INR enregistré au 3^{ème} jour de traitement anticoagulant oral (INR3) ont eu une distribution non-normale (teste Kolmogorov-Smirnov; $p < 0.05$). La valeur minimale a été de 0.88, celle maximale de 5.99, la moyenne de 2.2 ± 0.97 et la médiane de 1.91. L'application d'un teste Wilcoxon a montré des différences hautement significatives statistiquement entre les valeurs INR1 et INR3 ($p < 0.001$). Nous avons calculé les différences entre les valeurs INR3 et INR1 (INRDIF) et nous avons obtenu une valeur minimale de 0 ; maximale de 4.49, moyenne de 1.07 et médiane de 0.76.

Pour déterminer une éventuelle influence de l'âge sur l'INR3 nous avons appliqué une corrélation Spearman, concluant à l'absence de celle-ci ($r = 0.027$; $p = 0.75$).

Nous n'avons pas trouvé d'association entre l'INR3 et : sexe des patients (teste Mann-Whitney; $p = 0.56$); traitement concomitant par IPP (teste Mann-Whitney; $p = 0.23$); spironolactone (teste Mann-Whitney; $p = 0.75$); statines (teste Mann-Whitney; $p = 0.47$); présence de l'allèle CYP2C9*2 (teste Mann-Whitney; $p = 0.62$); existence de l'allèle CYP2C9*3 (teste Mann-Whitney; $p = 0.4$). Nous avons démontré l'existence d'une différence significative statistiquement entre les valeurs de l'INR3 chez les patients ayant un génotype AA et ceux ayant un génotype GG du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2 (teste Kruskal- Wallis; $p = 0.01$).

Pour évaluer une potentielle influence de l'âge sur l'INRDIF nous avons appliqué une corrélation Spearman, concluant à l'absence de celle-ci ($r = 0.026$; $p = 0.77$). Nous n'avons pas trouvé d'association entre l'INRDIF et : sexe de patients (teste Mann-Whitney; $p = 0.64$); traitement concomitant par IPP (teste Mann-Whitney; $p = 0.09$), spironolactone (teste Mann-Whitney; $p = 0.36$), statines (teste Mann-Whitney; $p = 0.62$), présence de l'allèle CYP2C9*2 (teste Mann-Whitney; $p = 0.68$), existence de l'allèle CYP2C9*3 (teste Mann-Whitney; $p = 0.69$).

Nous avons prouvé l'existence d'une différence significative statistiquement entre les valeurs de l'INRDIF chez les patients ayant un génotype AA et ceux portant un génotype GA du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2 (teste Kruskal- Wallis; p=0.01).

Pour évaluer l'effet concomitant des paramètres étudiés sur l'INRDIF nous avons appliqué une régression linéaire multiple en utilisant les valeurs de l'INRDIF en tant que variable dépendante. La seule variable qui a influencé indépendamment l'INDIF a été le polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2 (p=0.001).

Dans l'étape suivante nous avons divisé le group en trois catégories en fonction des valeurs de l'INR3 : 39 (29.8%) patients ayant un INR subthérapeutique, 70 (53,4%) avec un INR thérapeutique et 22 (16,8%) patients ayant un INR suprathérapeutique.

L'âge des patients n'a pas été différent dans les trois groups (teste Kruskal- Wallis; p=0.92). Nous n'avons pas constaté des différences significatives entre les groups en ce qui concerne : sexe des patients (teste χ^2 ; p=0.66), traitement concomitant par des IPP (teste χ^2 ; p=0.76), spironolactone (teste χ^2 ; p=0.47), statines (teste χ^2 ; p=0.62), présence de l'allèle CYP2C9*2 (teste χ^2 ; p=0.97), l'allèle CYP2C9*3 (teste χ^2 ; p=0.2).

La proportion des génotypes du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2 a été significativement différente entre les trois sous-groups (teste χ^2 ; p=0.025).

L'analyse de l'influence des paramètres étudiés sur la probabilité qu'un patient ait un INR subthérapeutique, thérapeutique ou suprathérapeutique a été réalisée en utilisant une régression logistique multinomiale. Nous avons utilisé comme variable dépendante de référence le group des patients ayant un INR sous-thérapeutique.

La présence du génotype AA du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2 a augmenté de 15.7 fois le risque qu'un patient ait un INR suprathérapeutique après 2 jours de traitement par 4 mg d'acénocoumarol.

La présence du génotype GA du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1*2 a augmenté seulement de 4.8 fois le risque qu'un patient ait un INR suprathérapeutique après 2 jours de traitement par 4 mg d'acénocoumarol.

Conclusions générales

1. Les patients porteurs de l'allèle CYP2C9*3 ont nécessité des doses reduites d'acénocoumarol.

2. La présence de l'allèle CYP2C9*2 chez les heterozygotes n'influence pas l'adhésion des patients à l'un des trois groupes de doses (faible, moyenne ou forte).

3. Les patients porteurs du genotype AA du polymorphisme c.-1639G>A de VKORC1 ont nécessité des doses reduites d'acénocoumarol.

4. Les patients âgés de plus de 65 ans ont une probabilité statistiquement significative élevée de recevoir une dose < 7 mg/semaine afin de maintenir un INR thérapeutique.

5. Les médicaments co-prescrits, ni le sexe n'ont pas influencé la dose hebdomadaire d'acénocoumarol.

6. Les déterminants majeurs de la dose d'AVK nécessaire pour maintenir l'INR thérapeutique sont : les polymorphismes VKORC1, CYP2C9 et l'âge.

7. Les facteurs socio-démographiques, les médicaments co-prescrits, la dose d'acénocoumarol - n'ont pas influencé le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique.

8. La présence de l'allèle CYP2C9*2 ou CYP2C9*3 n'a pas influencé le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique.

9. La présence du génotype AA du polymorphisme c.-1639G>A du VKORC1 *2 augmente 1,9 fois la probabilité que le patient présente un INR thérapeutique jusqu'au jour 5 du traitement.

10. Les temps nécessaires pour atteindre l'INR thérapeutique est prolongé chez les patients ayant des valeurs supratherapeutique dans la periode de la titration de la dose d'acénocoumarol.

11. La fréquence des hémorragies était de 4,9 %; toutes les hémorragies étaient mineures.

12. Le risque de saignement chez des patients traités par acenocumarol n'est pas augmenté par l'âge ou par un traitement par statines ou spironolactone.

13. La présence du polymorphisme CYP2C9*2, CYP2C9*3 et VKORC1*2 n'est pas associée avec le risque de saignement.

14. La presence d'INR supratherapeutique est significativement corrélée à l'apparition des saignements.

15. Nous n'avons pas constaté la présence d'un lien statistiquement significatif entre le traitement par les statines, IPP ou spironolactone et les valeurs d'INR3 ou INRDIF chez les patients traités par acénocoumarol.

21. Les polymorphismes CYP2C9*2 et CYP2C9*3 n'ont pas influencé les valeurs INR3.

22. Le polymorphisme AA du VKORC1 a influencé les valeurs INR3 et INRDIF, augmentant le risque d'un INR supratherapeutique.

L'originalité et les contributions innovatrices de la thèse

La thèse est originale par les acquis suivantes:

1. L'étude de la relation entre les polymorphismes du CYP2C9, VKORC1 et la dose d'acénocoumarol nécessaire pour obtenir un INR thérapeutique, étude qui n'a jamais été accompli dans notre pays.

2. Le resultat crée la prémisses pour optimiser le schéma thérapeutique individuelle, selon le patrimoine génétique du patient

3. Fait la preuve de l'opportunité du dépistage des polymorphismes du CYP2C9, VKORC1 avant de commencer les AVK.

4. A montré l'effet de la presence des polymorphismes CYP2C9*2, CYP2C9*3 et VKORC1 sur le temps nécessaire pour atteindre l'INR thérapeutique :

5. La definition d'un nouveau paramètre - INRDIF – la difference entre la valeur d'INR du 3ème jour et la valeur initiale – comme expression de la correlation genotype-phenotype.

6. A montré l'effet de la présence des polymorphismes CYP2C9*2 et CYP2C9*3 sur les valeurs INR3 et INRDIF.

7. A étudié la relation entre la présence du polymorphisme VKORC1 et les valeurs INR3 et INRDIF.