

## CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE LA VITAMINE K1 ET DE L'ACENOCOUMAROL EN FONCTION DU TEMPS DE QUICK (I.N.R.)

### PLASMATIC CONCENTRATIONS OF VITAMIN K1 AND ACENOCOUMAROL RELATED TO THE I.N.R. VALUES

Th. Gougnard\*, C. Charlier\*, J.-L. David\*\*, G. Plomteux\*

**Mots-clefs:** Vitamine K, Anticoagulants coumariniques, Surveillance thérapeutique

#### INTRODUCTION

Les facteurs procoagulants II, VII, IX et X sont synthétisés par le foie. Leur activité nécessite la carboxylation de 9 à 10 résidus glutamiques (Glu) situés au niveau de la portion aminoterminal de ces protéines. Cette réaction est catalysée par une carboxylase dont le cofacteur est la vitamine K sous forme réduite (KH<sub>2</sub>), en présence d'oxygène moléculaire et de dioxyde de carbone. Les résidus  $\gamma$ -carboxyglutamiques (Gla) fixent les ions calciques et subissent une translation permettant la liaison à leur co-facteur au niveau de la surface phospholipidique de la membrane plaquettaire et des cellules endothéliales lésées. Ces surfaces constituent le site catalytique de la thrombino-formation.

Les antivitamines K inhibent la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone, ainsi que la réduction ultérieure de cette forme inactive en hydroxyquinone active. La diminution consécutive du nombre de résidus Gla en-dessous de 10 à 13 s'accompagne d'une diminution du potentiel procoagulant (environ 2% pour 6 résidus Gla). En l'absence de vitamine K réduite, les précurseurs synthétisés sont inactifs (PIVKA – Protein Induced by Vitamin K Antagonist or Absence)(1,2,3).

La réponse aux antivitamines K est individuelle et varie aussi au cours du traitement du même patient, nécessitant des contrôles répétés du temps de Quick.

Cette variabilité dépend de l'apport en vitamine K à partir des aliments et de la flore bactérienne intestinale, de la pharmacocinétique des antivitamines K, dont les étapes successives peuvent être influencées par de nombreux médicaments, et du métabolisme des facteurs de coagulation.

Les cas de résistance plus ou moins transitoire aux antivitamines K ne sont pas exceptionnels; ils sont le plus souvent dus à un apport excessif en vitamine K alimentaire ou à l'induction médicamenteuse d'enzymes hépatiques augmentant le catabolisme de l'antivitamine K administré. Par contre, les cas de résistance constitutionnelle sont très rares (4,5).

Les dosages de la vitamine K plasmatique et de l'acénocoumarol peuvent contribuer à en préciser l'origine lorsque le contexte alimentaire ou médicamenteux n'est pas suffisamment explicatif.

Le présent travail vise à déterminer les relations entre, d'une part, les concentrations plasmatiques d'acénocoumarol (Sintrom®) ainsi que celles de vitamine K1, et, d'autre part, les valeurs INR du temps de Quick.

#### MATERIEL ET METHODES

Le travail a porté sur l'examen de 21 prélèvements effectués chez des sujets (15 hommes et 6 femmes) âgés de 29 à 77 ans et traités par l'acénocoumarol (Sintrom®) depuis au moins 2 semaines. Les posologies, très variables, oscillent entre 4 et 42 mg par semaine.

Un prélèvement de 5 ml de sang hépariné a été réalisé chez chaque patient juste avant la prise du médicament. Après centrifugation (2000 g, 5 minutes), les plasmas sont congelés à - 80°C jusqu'à l'analyse (maximum 60 jours).

\* Service de Toxicologie Clinique

\*\* Unité Thrombose – Hémostase, Centre Hospitalier Universitaire de Liège (B35) B-4000 Liège

Reprints: Thierry Gougnard, Service de Toxicologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Liège (B35) B-4000 Liège. Tél.: 04/3667679

Les dosages plasmatiques de vitamine K1 sont réalisés à l'aide de la trousse commerciale « Vitamin K1 » (Ref. KC2400, ImmunDiagnostik, Bensheim, Allemagne). Après purification de 1 ml de plasma sur phase solide C18 et réextraction liquide-liquide à pH acide par un solvant organique, l'extrait est évaporé et repris par 150 µl de phase mobile. On injecte 100 µl sur une colonne en phase inverse (Lichrocart Superspher RP18, 125 x 2 mm, 4 µm, Merck, Darmstadt, Allemagne) d'une chaîne HPLC (Varian, Walnut Creek, Etats-Unis).

Après séparation du standard interne, un réacteur post-colonne au zinc permet la réduction des vitamines K en forme hydroquinoniques fluorescentes (excitation à 248 nm, émission à 418 nm) (6).

Les dosages d'acénocoumarol (Sintrom®) s'effectuent après extraction de 1 ml de plasma par du dichlorométhane en milieu acide au moyen d'une technique de chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse « ion-trap » (Esquire-LC, Hewlett-Packard/Bruker Franzen, Bremen, Allemagne)(7,8). Une phase mobile eau/acétonitrile (60/40 volumes) sépare l'acénocoumarol et la warfarine (standard interne) sur une colonne C18 Lichrocart® 125 x 2 mm (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Les temps de prothrombine sont déterminés à l'aide de thromboplastine humaine recombinante (RecombiPlasTin®) sur Electra 1600® (Hemoliance™ - Ortho Diagnostic Systems, Raritan, USA). Leurs résultats sont exprimés en valeurs I.N.R. (International Normalized Ratio).

## RESULTATS

### Validations analytiques

**Vitamine K1:** La détection par fluorescence en permet la détermination de concentrations aussi faibles que 0.10 ng/ml. La méthode est linéaire de 0 à 25 ng/ml et présente une reproductibilité voisine de 5% à 1.7 ng/ml.

**Acénocoumarol:** La méthode permet la quantification de concentrations aussi faibles que 0,3 ng/ml et présente un coefficient de variation inférieur à 10% dans la zone thérapeutique (30-90 ng/ml).

### Plasmas de patients

Les résultats des déterminations du temps de Quick (exprimé en I.N.R.) ainsi que des concentrations plasmatiques d'acénocoumarol et de vitamine K1 des 21 patients sont confrontés aux posologies hebdomadaires de Sintrom® (tableau 1).

Tableau 1 — Résultats des temps de Quick, (I.N.R.), acénocoumarol et vitamine K1 plasmatiques en fonction des posologies utilisées

Patient	Posologie Sintrom mg / semaine	Quick (I.N.R.)	Acénocoumarol (ng/ml)	Vitamine K1 (ng/ml)
1	15	3,88		
2	8	1,67	66,7	0,62
3	19	3,35	28,9	0,3
4	18	2,86	85,6	0,64
5	17	2,88	32,4	2
6	14	2,19	22,5	0,48
7	10	2,63	43	0,5
8	12	1,99	23,9	0,71
9	24	4,07	49,5	0,4
10	12	4,96	72	0,26
11	24	2,87	53,6	0,44
12	6	4,37	79,3	0,61
13	21	2,59	47,3	0,68
14	20	3,53	84,4	0,48
15	19	1,97	98,8	1,02
16	27	1,53	55	0,24
18	42	1,33	105,1	0,55
19	4	4	105,5	0,53
21	14	3,38	69,7	0,58
24	7	1,76	68,5	0,22
25	28	4,95	4,6	0,38
			72,7	0,2
Moyenne	17,2	2,99		
Ecart-type	8,8	1,1	60,4	0,56
			28,2	0,38

## DISCUSSION

Pour des posologies de Sintrom variables selon les sujets (4 à 42 mg par semaine), les valeurs I.N.R. des temps de Quick sont comprises 1,33 et 4,96.

Sur l'ensemble des 21 valeurs plasmatiques d'acénocoumarol, 14 résultats se trouvent dans la marge thérapeutique habituellement acceptée (30-90 ng/ml)(9), 4 sont inférieurs et 3 sont supérieurs.

Toutes les concentrations plasmatiques de vitamine K1 sont comprises dans l'intervalle de référence pour un sujet non traité (0.09 à 2.12 ng/ml) (6); la plupart (19/21) sont inférieures à 0.80 ng/ml. La posologie hebdomadaire d'acénocoumarol et sa concentration plasmatique sont significativement corrélées ( $r^2 = 0.68$ ) (figure 1). Par contre, il n'y a aucune corrélation entre d'une part, la posologie hebdomadaire d'acénocoumarol et sa concentration plasmatique, et, d'autre part, le temps de Quick (I.N.R.) et le taux plasmatique de vitamine K1.

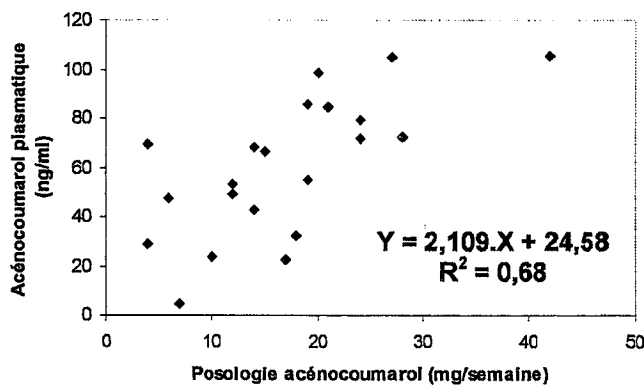


Figure 1: Droite de corrélation entre le taux plasmatique d'acénocoumarol et sa posologie exprimée en mg/semaine.

Les résultats obtenus permettent d'isoler quatre patients. Un patient (patient 18) est résistant au traitement au Sintrom® et présente un I.N.R. de 1,33 malgré une concentration plasmatique élevée d'acénocoumarol. Trois autres patients (patients 12, 19 et 10 dans une moindre mesure) sont particulièrement sensibles au traitement anticoagulant en présentant un I.N.R. supérieur ou égal à 4 avec des posologies faibles de Sintrom® (respectivement 6, 4, 12 mg par semaine).

Ces dosages comparés permettent une approche plus documentée des cas d'hypersensibilité ou de résistance (évaluée en terme d'I.N.R.) à l'acénocoumarol.

## RÉSUMÉ

Les vitamines K, sous forme réduite, agissent comme cofacteurs de la carboxylation des résidus glutamiques des facteurs procoagulants (II, VII, IX et X). La réduction de ces vitamines est inhibée par les anticoagulants oraux.

La réponse aux antivitamines K est individuelle et peut varier au cours du traitement d'un même patient. Les dosages de la vitamine K et de l'acénocoumarol plasmatiques peuvent contribuer à approcher le mécanisme de résistance au traitement anticoagulant.

Les dosages de vitamine K1 sont réalisés après extraction liquide-liquide, par chromatographie liquide avec réduction post-colonne et détection par fluorescence. Les dosages d'acénocoumarol s'effectuent après

extraction liquide-liquide, par chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse (HPLC-ES-MS/MS).

## SUMMARY

Reduced vitamins K are acting as cofactors of glutamic carboxylation of procoagulant factors (II, VII, IX and X). The reduction of these vitamins is inhibited by oral anticoagulants.

The response to antivitamins K is individual and may change during the treatment of a patient. The determinations of plasmatic vitamin K and acenocoumarol may help to explain the mechanism of a resistance to the anticoagulant therapy.

Quantifications of vitamin K1 are realized after liquid-liquid extraction with liquid chromatography and fluorescence detection after post-column reduction. For acenocoumarol, plasma concentration is measured, after liquid-liquid extraction, by liquid chromatography, with ion trap mass spectrometer detector.

## RÉFÉRENCES

1. Hemker HC, Vetkamp JJ, et al. Nature of prothrombin biosynthesis. *Nature* 1963; 200: 589-590.
2. Nelstuen GL, Zytovicz TH, Howard JB. The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 6347-6350.
3. Sadowski JA, Booth SL, Mann KG, Malhotra OP, Bovill EG. Structure and mechanism of activation of vitamin K antagonists. In: Poller L, Hirsh J, eds. Oral anticoagulants. London: Arnold. 1996: 9-29.
4. Keréveur A, Trossaert M, Horellou MH, Conard J, Dupeyron JP, Samama M. Hypersensibilité et résistance aux antivitamines K. *Arch. Mal. Cœur* 1995; 88: 487-495.
5. Sanchez Villegas JM, Piqueras J, Nicolau I, Pico M, Soler JA, Monasterio J. Resistance to antivitamins K. *Sangre* 1992; 37: 297-298.
6. Haroon Y, Bacon DS, Sadowski JA. Liquid-chromatographic determination of vitamin K1 in plasma, with fluorometric detection. *Clin. Chem.* 1986; 32: 1925-1929.
7. Guyon F, Dupeyron JP, Fabiani P. Dosage de l'acénocoumarol (Sintrom) dans le plasma par chromatographie en phase liquide. *Ann. Biol. Clin.* 1985; 43: 743-745.
8. De Vries JX, Kymber KA. Thermospray and particle beam liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of coumarin anticoagulants. *J. Chrom. B.* 1991; 562: 31-38.
9. Uges DRA. Therapeutic and toxic drug concentrations. *TIAFT Bulletin* 1996; 26 supplement.