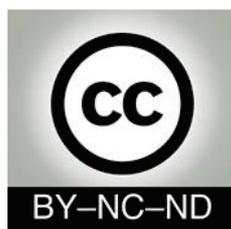




<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n°38

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 10 Mars 2022 par

Mme FUENZALIDA VASQUEZ Valentina

Né le 19 Juillet 1993

A Talagante (Chili)

INTERACTIONS TOXICOLOGIQUES ENTRE LES PLANTES ET LES ANTICOAGULANTS ANTIVITAMINES K.

JURY

Présidente du jury et tutrice pédagogique : Mme VINCIGUERRA Christine,
Professeur, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Directeur de thèse : M. BENOIT Etienne, Professeur, Directeur du
laboratoire de Recherche unité USC1233 – VetAgro Sup, Ecole vétérinaire
de Lyon

Membre du jury : M. FOUILLET Bruno, Pharmacien PhD, Maitre de
conférences de l'Université Claude Bernard Lyon 1

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université
- Présidence du Conseil Académique
- Vice-Président du Conseil d'Administration
- Vice-Président de la Commission Recherche
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire

Frédéric FLEURY
Hamda BEN HADID
Didier REVEL
Jean François MORNEX
Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Claude DUSSART
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

UFR Fédération Sciences (Chimie, Mathématique, Physique)	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département composante informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département composante Génie Électrique et des procédés (GEP)	Directeur : Mme Rosaria FERRIGNO
Département composante mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOUILLE
Polytech Lyon	Directrice : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE

ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon
LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU - HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU - PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Xavier ARMOIRY (PU – PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU - enseignant contractuel temps partiel)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU - PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU - enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU – PH - HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**
Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)
Madame Delphine HOEGY (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
Madame Nadia WALCHSHOFER (PR)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU - HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
Monsieur François HALLE (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU-PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Madame Camille LEONCE (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU - PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (PR)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU - PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU - HDR)
- **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
Madame Anne INIGO PILLET (MCU - enseignant contractuel temps partiel)
Madame Pauline LOUBERT (MCU – enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Guillaume MONNERET (PU - PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU - PH)
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Sarah HUET (MCU-PH)
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU - PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)
Madame Amy DERICQUEBOURG (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (PR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)
Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur David GONCALVES (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU - enseignant contractuel temps partiel)
Madame Valérie VOIRON (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,



En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.*
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date :

Signatures de l'étudiant et du Président du jury

REMERCIEMENTS

Monsieur **Etienne Benoit**, je vous remercie pour l'accompagnement tout au long de cette thèse, dans la joie et la bonne humeur, ainsi que pour votre disponibilité et votre bienveillance. Vous m'avez permis de découvrir le milieu de la recherche, notamment dans la toxicologie, et ça en compagnie des meilleurs chercheurs lyonnais.

Madame **Christine Vinciguerra**, merci d'avoir accepté de présider mon jury et de m'encadrer en tant que tutrice pédagogique. Au-delà d'être une grande experte dans le domaine de l'hématologie, et je pense que tous les étudiants ne peuvent être que d'accord avec mes propos, vous avez su nous donner le goût dans cette matière, vous avez su nous soutenir lors des conseils d'administration en tant que doyenne et pour cela, nous sommes tous très reconnaissants.

Monsieur **Bruno Fouillet**, je vous remercie pour votre accompagnement depuis toutes ces années. Depuis que j'ai choisi de me spécialiser dans l'évaluation pré-clinique et clinique du médicament, vous m'avez soutenu, aidé à trouver mes différents stages, simplement répondu à mes questions concernant le métier. Je vous remercie aujourd'hui pour votre implication auprès des étudiants.

Je tiens à remercier Monsieur **Jérôme Guitton**, qui n'a pas pu être présent aujourd'hui mais qui faisait partie intégrante de mon jury.

Voy a empezar estos agradecimientos con mis papas, que me han dado todo en esta vida. Sin duda alguna, no estaria donde estoy hoy sin su apoyo incondicional, su amor y todos los sacrificios que hicieron para darme un buen futuro. **Papi** muchas gracias por todos los consejos sabios que me has dado desde pequena, el gusto por la aventura y los cambios en esta vida, todo el amor entregado y sobre todo por todas las reparaciones hechas en mis autos jaja no, es broma, gracias por siempre estar ahí por mí. **Mami** te quiero agradecer porque eres un modelo de mujer y de mamá para mí, eres la persona más altruista que conozco. Gracias por darme siempre lo mejor de ti, por enseñarme que en esta vida el esfuerzo sí paga y con un poquito de amor, todo es mejor.

A ustedes, mis padres adorados, les dedico esta tesis.

Quiero agradecer igualmente a mi hermano, **Ricardo**, porque finalmente es gracias a ti que me aprendí las tablas de multiplicaciones y que la escuela y los estudios me empezaron a gustar. Te quiero desear lo mejor en esta etapa de tu vida, me alegra mucho ser parte de ella. Je souhaiterais également te souhaiter la bienvenue dans la famille Fuenzalida, **Donia**, je n'aurais pas pu rêver mieux comme épouse pour mon frère.

Si je suis également aujourd'hui parmi vous en train de fêter la fin de mes études c'est aussi grâce à mes parents de cœur, **Carmen** et **Yannick**. Merci de m'avoir accueilli comme votre fille, vous m'avez ouvert les portes de votre monde, m'offrant ainsi une deuxième famille, ce qui est inestimable à mes yeux. Merci pour tout ce que vous avez fait et continuer de faire pour moi, toujours avec autant d'amour et tendresse.

Ma personne, **Ella**, merci merci merci d'être toujours là. Nous avons commencé notre histoire au lycée et regarde où nous sommes arrivés, qui aurait cru, que les deux lampadaires seraient devenus aujourd'hui chirurgien et pharmacien, en tout cas, pas notre prof de philo. Merci d'être devenu ma sœur, de me remonter les bretelles quand il faut mais surtout de ton amitié inconditionnelle, de ta folie quotidienne et tout ton amour. S'il y a quelque chose que je sais avec certitude, c'est que notre histoire est sans fin ma biche, hey oui, il va falloir me supporter jusqu'à la fin des temps.

A mes amis pharmaciens, merci pour votre compagnie durant ce court et en même temps long parcours que sont les études de pharmacie, vous avez tous mis à un moment donné, un grain de folie à ma vie étudiante.

Merci **Clara**, **Elo** et **Léa** pour votre amitié inconditionnelle. **Elo**, je te remercie pour ton côté coupé/décalé (t'es ser ?) que j'adore par-dessus tout (en passant par les baskets bleues puis les mules et ça jusqu'aux bobs moumoutes), pour tous nos fous rires de joies et de détresse (parfois) et pour ton unicité. **Clara**, sans toi je crois que je serai encore sur les bancs de la fac, merci pour tes précieux conseils, ton envie de me voir réussir, ton énergie qui te permet de te surpasser tous les jours un peu plus, ton élégance éternelle et à toutes tes recettes « à tomber par terre » comme tu dirais. **Léa**, un grand merci à toi pour ton sens aigu du détail, pour ta franchise plus que bienveillante, ton admirable légèreté et ta funAttitude immanquable à chaque fois que l'on se retrouve.

Merci **Laura** pour ta douceur, ton humanisme et ta positivité. Merci **Hortense** pour toutes ces longues années passées avec toi, tu es la plus rigolote des pharmaciennes, en espérant que l'on puisse vivre milles et une autres aventures.

Merci **Marion**, à nos multiples sorties étudiantes, pas toujours très pédagogiques mais toujours aussi sympa ! Je crois que c'est bien à cause de toi que j'ai fait pas mal de TP soit en gueule de bois sans avec une petite heure de sommeil derrière moi mais avec des souvenirs plein la tête (et sûrement de la fumée plein les poumons haha mais c'est toi également qui m'a fait arrêter donc les comptes sont bons).

Merci **Marina**, je pense que tous les paramètres de cet équation appelée amitié ne cessent de se multiplier afin de donner un beau résultat bien précis et concis. Je te remercie pour toutes tes attentions, pour ton rire sans fin, pour toutes les aventures vécues et toutes celles qui restent à vivre et surtout merci d'avoir été cupidon pour moi.

Merci **Wassim** et **Djawed**, le binôme de shock, les rois de Salou beach, huele rico la sardina, les fada de la sauce andalouse, les as de la pétanque (ah non il faut quand même pas exagérer)! Je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble, pourvus qu'ils soient encore bien nombreux. Une chose est sûre, c'est qu'à vos côtés, ces moments sont toujours magiques.

Merci à mes chères médecins et chirurgiens.

Amélie, **Axelle**, **Fanny** et **Delphine**, je vous remercie à vous toutes pour votre grain de folie permanent. Je ne sais pas comment vous faites mais dans n'importe quel endroit où vous passez, vous éparpillez votre bonne humeur, votre joie de vivre et votre énergie débordante. Ne perdez jamais cette âme d'enfant que vous reflétez si bien sur les gens qui vous entourent.

Merci ma **Capucine**, je te remercie pour ton franc parler et pour tout ton être assez paradoxal je dirai mais c'est aussi ça qui te rend si unique et précieuse, pour toutes tes convictions plus que bienveillantes mais par-dessus de tout, merci d'être différente.

Merci ma beauté sans tête, **Solène**, toi qui es bien capable de comprendre le début de cette phrase sans te vexer mais plutôt en rigolant, je te remercie pour tes histoires farfelues, pas très synthétiques, mais toujours aussi marrantes les unes que les autres mais surtout, merci pour ton amitié infinie.

Merci **Cécile**, je te remercie pour tous les excellents moments passés ensemble, pour ton esprit toujours assez cocasse, pour ta patience (heyhey) parfois limitée lors de nos milles et unes soirées arrosées et surtout merci pour ton amitié dévouée envers les gens qui te sont chers.

Merci à mes premières collègues de boulot. **Léa**, **Ines**, **Audrey**, **Rachel**, **Marie** et **Ludivine**, vous avez embelli ma première expérience professionnelle, la rendant unique et inoubliable. Merci à tous nos fous rires pendant nos pauses et sorties en dehors de l'hôpital. A nos voyages quotidiens assez philosophiques, aux bons plans révélés, aux meilleures recettes de pâtisserie, à nos goûts différents en termes de genre masculin, aux histoires mord moi le nœud et aux nombreuses sottises dites et à celles qui viendront. Merci au **SHUPT** de m'avoir vu grandir en tant que professionnel de santé.

Merci également au **laboratoire de recherche USC1233** m'ayant permis de réaliser cette thèse ainsi que toutes les personnes qui y travaillent.

Et pour finir, je souhaiterais remercier mon grand amour. Merci **Victor** pour le soutien inconditionnel apporté tous les jours, pour me porter vers le haut dès que l'occasion se présente, pour être mon meilleur ami, pour m'avoir montré que l'on peut voir la vie autrement et surtout pour me permettre d'être la meilleure version de moi-même.

« Si la peur frappe à ta porte et que tu as le courage de l'ouvrir, tu t'apercevras que derrière, il n'y a personne »

M. Ankaoua, Kilomètre zéro

Tables de matières

REMERCIEMENTS	9
LISTE DES ABREVIATIONS	15
LISTE DES GRAPHIQUES	16
LISTE DES TABLEAUX	16
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES ANNEXES	17
INTRODUCTION	18
PARTIE 1 : RAPPEL HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. L'hémostase primaire.....	22
1.1 Composants de la paroi vasculaire.....	22
1.2 Plaquettes sanguines.....	24
1.3 Facteur de Willebrand	25
1.4 Fibrinogène	26
1.5 Les différentes étapes de l'hémostase primaire.....	26
2. La coagulation.....	28
2.1 Phase d'initiation.....	30
2.2 Phase d'amplification.....	31
2.3 Formation du caillot de fibrine.....	31
3. Fibrinolyse.....	33
4. Cycle de la vitamine K et la coagulation.....	34
5. Propriétés anticoagulantes des plantes	37
5.1 Lapachol.....	38
5.2 Curcumine	40
6. Exploration de la coagulation.....	45
6.1 Tests d'exploration de la coagulation.....	45
6.2 Médicaments antivitamine K	47
6.3 Médicaments anticoagulants oraux directs.....	50
6.4 Rodenticides.....	52
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES	55
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	61
1. Le lapachol.....	61
2. La curcumine.....	67
CONCLUSION GENERALES	75
Bibliographie	76
Annexes	80

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations	Définition
ADP	Adénosine diphosphate
AOD	Anticoagulants oraux directs
AUC	Aire sous la courbe
AVK	Antivitamine K
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
FSF	Facteur de stabilisation de la fibrine
FT	Facteur tissulaire
GGCX	Gamma-glutamyl carboxylase
HPM	Haut poids moléculaire
INR	Ratio normalisé international
KH2	Vitamine K hydroquinone
KO	Vitamine K 2,3-époxyde
LC/MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MGP	Matrice carboxylée protéine gamma glutamique
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PTA	Plasma thromboplastin antecedent
TAFI	Inhibiteur de fibrinolyse activé par la thrombine
TCA	Temps de céphaline avec activateur
TFPI	Inhibiteur du facteur tissulaire
VKOR	Vitamine K époxyde réductase
VKR	Vitamine K quinone réductase
UMA	Unité de masse atomique

LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 1	Validation de la méthode par gamme d'étalonnage du lapachol
Graphique 2	Pharmacocinétique plasmatique du lapachol
Graphique 3	Pharmacocinétique hépatique du lapachol
Graphique 4	Métabolites issus du dosage du lapachol plasmatique
Graphique 5	Temps de Quick avec dabigatran
Graphique 6	Temps de coagulation d'écarine avec le dabigatran
Graphique 7	Test chromogénique à base d'écarine avec le dabigatran
Graphique 8	Concentration plasmatique du dabigatran en fonction de la densité optique finale
Graphique 9	Temps de Quick avec curcumine
Graphique 10	Temps de coagulation d'écarine avec la curcumine
Graphique 11	Test chromogénique à base d'écarine avec la curcumine
Graphique 12	Concentration plasmatique de la curcumine en fonction de la densité optique finale

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Facteurs et protéines de la coagulation
Tableau 2	Pharmacocinétique des antivitamine K de première génération
Tableau 3	Pharmacocinétique du dabigatran, inhibiteur direct de la thrombine
Tableau 4	Pharmacocinétique de la bromadiolone et le brodifacoum
Tableau 5	Concentrations inhibitrices initiales et finales du lapachol

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Cellules endothéliales et cellules musculaires lisses d'une artère (gauche) et d'une veine (droite)
- Figure 2** Représentation schématique d'une plaquette
- Figure 3** Hémostase primaire : interactions entre les différents acteurs de la formation du thrombus blanc
- Figure 4** Cascade de coagulation présentant les voies extrinsèques, intrinsèques et communes
- Figure 5** Structures chimiques des différentes formes de la vitamine K
- Figure 6** Cycle de la vitamine K
- Figure 7** Structure de VKOR
- Figure 8** Structure chimique du lapachol
- Figure 9** Arbre appelé « lapacho »
- Figure 10** Structures chimiques des différents composés du curcuma
- Figure 11** La curcumine comme un potentiel antithrombotique lors d'anomalies de l'hémostase induites par le SARS-CoV-2
- Figure 12** Formule et évaluation de l'INR dans le cadre d'un patient sous AVK
- Figure 13** Structure chimique des antivitamine K oraux thérapeutiques en médecine humaine
- Figure 14** Structures chimiques du dabigatran etexilate (prodrogue) et dabigatran
- Figure 15** Structures chimiques des AVK de première génération, utilisés dans la gestion des rongeurs
- Figure 16** Structures chimiques des AVK de deuxième génération, utilisés dans la gestion des rongeurs
- Figure 17** Dosage du lapachol en mode négatif APCI, à 241.1 uma
- Figure 18** Spectre du pic à un temps de rétention de 2.43 minutes
- Figure 19** Spectre du pic à un temps de rétention de 6.5 minutes
- Figure 20** Oxydation NADPH dépendante du lapachol

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1** Revue éthique d'un projet d'utilisation animale à des fins scientifiques. Comité d'éthique de VetAgroSup n° 18.

INTRODUCTION

La gestion de population de rongeurs est un enjeu majeur de santé publique. En effet, les rongeurs sont à l'origine de pertes de récoltes céréalières mondiales importantes posant un problème pour la sécurité du marché agroalimentaire et à la sécurité du métier d'agriculteur. A l'échelle mondiale, on estime à 77 millions de tonnes de nourriture perdues chaque année à cause des rongeurs nuisibles. Par exemple, en Asie, la consommation annuelle de cultures vivrières par les rongeurs pourrait nourrir 200 millions de personnes. Les dommages causés par les rongeurs avant et après récolte affectent environ 280 millions de personnes sous alimentées dans le monde. Les rongeurs consomment et détruisent chaque année des millions de tonnes de cultures et des céréales stockées dans le monde via leur urine, leurs parasites, leurs excréments, leurs poils et leurs sécrétions (1).

De plus, les rongeurs sont donc des vecteurs de maladies infectieuses pour l'Homme telles que la leptospirose (2) ou la salmonellose (3) ainsi que pour les animaux telles que la cryptosporidiose ou la campylobactériose entre autres (3). Un certain nombre de maladies et de parasites se transmettent par l'urine, la salive et les excréments des rongeurs. Ces maladies sont généralement transmises aux humains via l'urine et les excréments ou via des hôtes lorsqu'elles interagissent avec les plantes cultivées et les humains (1). Ils dégradent également les biens et les installations abimant les câbles électriques et pouvant causer des coupures d'électricité et des incendies sans parler de l'impact négatif sur la faune, perturbant des écosystèmes fragiles (3).

Dans le but de gérer cette problématique, 2 types de réglementation concernant les rodenticides ont été créées : des produits phytopharmaceutiques à destinée des protections des cultures agricoles et des biocides à destinée des milieux bâtis (3). Ces substances actives, autrefois à base de trioxyde d'arsenic ou de thallium, sont aujourd'hui le plus souvent des anticoagulants antivitaminique K, provoquant ainsi la mort de l'animal par blocage de la coagulation.

Ces anticoagulants présentent l'avantage de ne pas créer une aversion alimentaire, phénomène récurrent chez le rongeur consistant à éviter un aliment que l'animal associe à un trouble interne, par un mécanisme d'apprentissage (4).

Les différentes générations de rodenticides ont un mécanisme d'action impliquant la cascade de la coagulation et le cycle de la vitamine K. En effet, la consolidation du thrombus plaquettaire nécessite une cascade de réactions impliquant les voies extrinsèques, intrinsèques et communes pour ainsi activer les facteurs de coagulation et former un réseau de fibrine. La dihydrovitamine K (KH₂) intervient comme cofacteur d'une carboxylase qui transforme des

molécules d'acide glutamique en acide gammacarboxyglutamiques, permettant de fixer le calcium. Au cours de cette réaction, la KH₂ est oxydée en vitamine K époxyde (KO). Cette réaction permet la maturation de certains facteurs pro coagulants en se fixant sur les phospholipides de la membrane. Ultérieurement, il est nécessaire de réduire la KO en sa forme réduite par l'intermédiaire d'une enzyme appelée vitamine K époxyde réductase ou VKOR, cible de nombreux anticoagulants (5).

Il existe 2 générations d'anticoagulants utilisés comme rodenticides : la première génération d'anticoagulants avec le coumaphène et les indane-1,3-dione où les premiers signes de résistance chez les rongeurs ont vu le jour en 1960 et la seconde génération d'anticoagulants comportant des molécules avec un effet très rémanent persistant plusieurs mois, même après une seule prise, ce qui provoque un problème d'écotoxicité des prédateurs des rongeurs et des animaux non prédateurs qui mangeraient ces appâts (6). Cette deuxième classe est apparue afin de pallier les problématiques de résistance créée par la première génération d'anticoagulants rodenticides.

D'après la littérature scientifique, il existerait également des molécules naturelles ayant des propriétés anticoagulantes inhibant l'enzyme VKOR, comme le lapachol ou le férulenol ou bien inhibant les facteurs de coagulation comme les molécules trouvées dans le curcuma ou l'ail (7) (8).

Le lapachol est un composé naphthoquinone naturel obtenu de plusieurs espèces végétales, principalement des bignoniacées et est un inhibiteur naturel de la VKOR, comme la warfarine (7).

D'autres extraits de plantes possèdent des propriétés jouant sur les facteurs de coagulation comme le curcuma qui présente un grand nombre d'effets positifs sur l'agrégation plaquettaire et la fibrinolyse grâce à son curcuminoïde de type poly phénolique, la curcumine. Il provient de l'Inde et de l'Asie de l'Est et est notamment utilisé à des fins culinaires et de médecine traditionnelle. La curcumine possède énormément de propriétés telles que des propriétés anti oxydantes, anti-inflammatoire, immunomodulatrice, anti-arthrite, antidépressives, régulation des lipides, entres autres. Des nombreuses études montrent l'intervention de la curcumine au niveau de la cascade de la coagulation, bloquant le facteur Xa et IIa conduisant à l'inhibition de la transformation du fibrinogène à la fibrine au niveau de la voie commune de la coagulation (8).

Ce travail de thèse d'exercice de pharmacie porte donc sur la recherche d'une potentielle synergie entre le lapachol, inhibiteur du cycle de la vitamine K, et la curcumine, inhibiteur direct de la thrombine, dans le but de développer un nouveau rodenticide anticoagulant naturel à base des plantes qui pallierait les limites des générations précédentes de rodenticides.

Ainsi, de nombreuses expérimentations *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* seront réalisées afin de répondre à cette problématique.

PARTIE 1 : RAPPEL HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE

L'hémostase est le processus physiologique permettant l'arrêt du saignement. Elle est composée d'une suite d'événements physiologiques et biochimiques, finissant par la formation d'un thrombus stable qui scelle le vaisseau sanguin (9).

Elle se décompose en 3 étapes (10) :

- **L'hémostase primaire** : première étape d'urgence du contrôle hémorragique, conduisant au thrombus plaquettaire en une durée de 3 à 5 minutes.
- **L'hémostase secondaire ou coagulation plasmatique** : consolidation d'un réseau protéique de fibrine qui forme un thrombus plaquettaire emprisonnant des globules rouges ; en une durée de 5 à 10 minutes.
- **La fibrinolyse** : étape assurant secondairement la dégradation enzymatique de la masse fibrinoplaquettaire à l'issue de la réparation vasculaire en une durée de 48 à 72 heures.

L'hémostase primaire et la coagulation commencent de façon simultanée, afin d'empêcher qu'une grande quantité de sang quitte l'organisme par la brèche vasculaire, et ainsi conserver l'oxygénation des organes. L'hémostase prévient donc la formation d'hémorragies spontanées. Cependant, une hémostase trop efficace pourrait causer des thromboses, bouchant ainsi les vaisseaux. Une régulation de ce processus physiologique est donc nécessaire (10).

1. L'hémostase primaire

L'hémostase primaire correspond à l'ensemble des mécanismes physiologiques permettant l'obturation initiale de la brèche vasculaire et initiant le début de sa réparation. Le thrombus blanc est le produit final de l'hémostase primaire, quatre acteurs principaux dominent cette phase (10) :

- Les composants de la paroi vasculaire
- Les plaquettes sanguines
- Le facteur de Willebrand
- Le fibrinogène

1.1 Composants de la paroi vasculaire

La composition anatomique des vaisseaux repose sur un assemblage de plusieurs couches cellulaires et non cellulaires variant selon la nature et le calibre vasculaire. De l'intérieur vers l'extérieur, nous retrouvons la monocouche de cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et la couche externe de tissu conjonctif ou adventice (10).

L'hémocompatibilité des cellules endothéliales au repos est la propriété fondamentale de la paroi vasculaire qui permet l'équilibre physiologique des mécanismes d'hémostase. Celle-ci permet donc de prévenir l'activation du système de la coagulation en étant thromborésistante. En revanche, lorsque les cellules endothéliales sont activées, notamment les structures sous endothéliales, elles deviennent hautement thrombogènes. Toute rupture de l'intégrité de la couche endothéliale met à nu les structures sous endothéliales qui, en contact direct avec le sang circulant, déclenchent les phénomènes de l'hémostase primaire et secondaire à l'origine d'un thrombus (10). La figure 1 montre une représentation schématique des cellules endothéliales et musculaires lisses au sein des artères et veines.

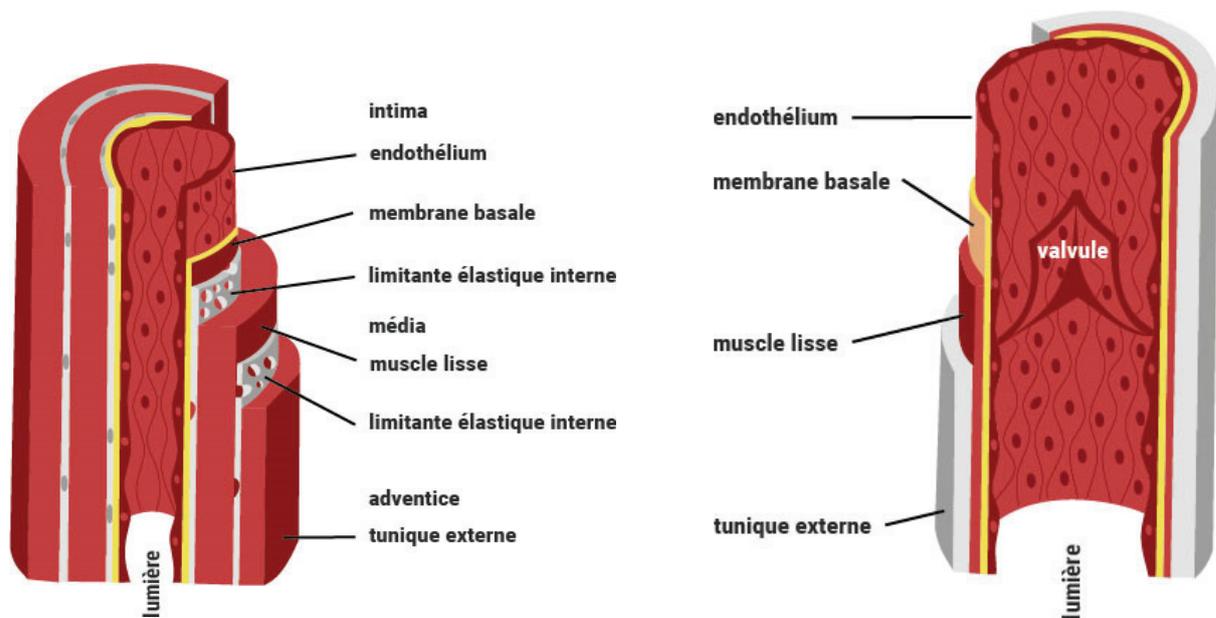


Figure 1 : Cellules endothéliales et cellules musculaires lisses d'une artère (gauche) et d'une veine (droite).
Fédération française de cardiologie 2021.

Les cellules endothéliales tapissent la surface interne de la lumière vasculaire et forment une monocouche de cellules cohésives dont les propriétés varient en fonction de leur état d'activation : thrombomodulation, production protéique, perméabilité sélective assurant les échanges entre le sang et le milieu intérieur. Elles sont arrimées sur une couche de macromolécules qu'elles synthétisent elles-mêmes et qui sont très thrombogènes : collagène, fibronectine, laminine, facteur de Willebrand, glycosaminoglycanes (10).

La thromborésistance de la cellule endothéliale est assurée par des propriétés telles que la charge ionique négative de la membrane, l'agencement antiadhésif des protéines de surface, la production locale de médiateurs antiagrégants plaquettaires, d'inhibiteurs de la coagulation ou encore d'activateurs de la fibrinolyse (10).

La thrombogénicité de la cellule endothéliale s'exprime à travers la modulation de ces propriétés induite par divers médiateurs activateurs comme les endotoxines bactériennes, les cytokines pro-inflammatoires ou encore la thrombine. La cellule endothéliale activée exprime des protéines prothrombotiques à sa surface membrane déclenchant les phénomènes d'adhésion, agrégation plaquettaire ou la coagulation (10).

La cellule endothéliale est le siège de la production de nombreuses molécules impliquées dans l'hémostase (10) :

- Le collagène, une des principales protéines prothrombogène

- Le facteur tissulaire, récepteur du facteur VII
- La thrombomoduline, permettant l'activation de la protéine C
- Les protéines vasoactives (monoxyde d'azote vasodilatateur ou endothéline vasoconstrictrice)
- Les protéines modulant à la fois l'activité plaquettaire et la vasomotricité telles la prostacycline (antiagregante et vasodilatatrice) ou la thromboxane (proagregante et vasoconstrictrice)

Les cellules musculaires lisses assurent le tonus vasomoteur, à travers du système nerveux autonome et de médiateurs chimiques vasoactifs comme le monoxyde d'azote et l'endothéline, produits par la cellule endothéliale (10).

1.2 Plaquettes sanguines

Les plaquettes sont des cellules anucléées produites après la fragmentation cytoplasmique de leurs précurseurs mégacaryocytaires dans la moelle osseuse. Leurs structures est en accord avec leurs fonctions d'adhésion à l'endothélium et d'autoagrégation :

- Membrane cytoplasmique : est constituée d'une double couche lipidique où des glycoprotéines hydrophobes riches en acide sialique s'arriment, ce qui permet de déterminer la charge négative de cette membrane. Les phospholipides constituent 80% des lipides situés dans la membrane cytoplasmique. A l'état de repos plaquettaire, ils sont polarisés au niveau du feuillet interne. A l'état d'activation plaquettaire, ils sont exposés vers le feuillet externe de la membrane, étant ainsi au contact des composants plasmatiques et assurant donc leur fonction procoagulante. Concernant les glycoprotéines, elles jouent un rôle de récepteur qui permet de transmettre un signal vers les structures cytoplasmiques. Les 2 types de glycoprotéines dont les fonctions sont les plus connues, sont le complexe gpIb/IX, récepteur du facteur de Willebrand jouant un rôle dans l'adhésion plaquettaire à l'endothélium, et le complexe gpIIb/IIIa, récepteur du fibrinogène jouant un rôle dans l'agrégation plaquettaire (10).
- Système membranaire complexe intracytoplasmique : définit la cellule plaquettaire ainsi que ses fonctions sécrétrices. Le système canaliculaire ouvert correspond à un réseau membranaire constitué d'invaginations de la membrane plasmique et son rôle est de permettre l'écoulement et le stockage des substances des granulations plaquettaires. En revanche, le système tubulaire dense n'est pas ouvert sur l'extérieur et correspond à un lieu de stockage du calcium utilisé par les structures contractiles (5).
- Système microtubulaire et microfibrillaire : représente l'appareil contractile de la cellule plaquettaire. Au repos, il permet le maintien de sa forme discoïde ; pendant son état

d'activation, il est caractérisé par ses mouvements et changements de forme, via deux principales protéines contractiles : l'actine et la myosine (10).

- Système de granulations intracytoplasmiques : il existe 3 types de granules intracytoplasmiques, chaque type de granule est individualisable et présente un rôle de stockage. Les granules alpha sont les plus nombreux et contiennent des facteurs de la coagulation et des cytokines. Les granules denses sont les moins nombreux et contiennent des substances proagrégantes et vasoactives. Les lysosomes sont le lieu de stockage de diverses enzymes à activité antibactérienne ou protéolytique (10).

La figure 2 montre la représentation schématique d'une plaquette avec ses différents composants.

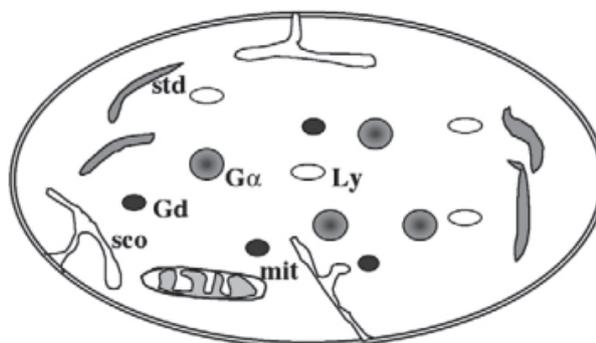


Figure 2 : Représentation schématique d'une plaquette. Gα : granules α ; Gd : granules denses ; Ly : lysosomes ; sco : système canaliculaire ouvert ; mit : mitochondrie ; std : système tubulaire dense. de Revel T. Physiologie de l'hémostase The Normal Haemostatic Process.

1.3 Facteur de Willebrand

Il s'agit d'une protéine produite par les cellules endothéliales ainsi que par les mégacaryocytes. Son précurseur correspond à un monomère composé de 2050 acides aminés et avec un poids moléculaire de 270kDA qui se polymérise secondairement en facteur de Willebrand de haut poids moléculaire pour être stocké par la cellule endothéliale, avant d'être libéré dans la circulation (10).

Le facteur de Willebrand assure l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales déjà activées, ou au sous-endothélium, par le biais de son récepteur plaquettaire gpIb/IX. Il représente donc la protéine qui transporte le facteur VIII ou facteur antihémophilique A (10).

1.4 Fibrinogène

Protéine soluble synthétisée par le foie, substrat final de la coagulation qui est transformé en fibrine insoluble par la thrombine. Le fibrinogène exerce un rôle important au niveau de l'hémostase primaire en assurant les ponts moléculaires interplaquettaires à l'origine des agrégats plaquettaires (10).

1.5 Les différentes étapes de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire est caractérisée par la rapidité de sa génération mais aussi par sa fragilité, nécessitant une consolidation secondaire par un réseau de fibrine, produit final des processus enzymatiques de la coagulation plasmatique. Plusieurs étapes permettent la formation du clou plaquettaire : la *vasoconstriction*, l'*adhésion des plaquettes* au sous-endothélium, l'*activation* et la *sécrétion plaquettaire* et l'*agrégation des plaquettes* entre elles aboutissant au clou plaquettaire (10).

Secondairement à la constitution de la brèche vasculaire, la première étape correspond au temps vasculaire : il s'agit d'une *vasoconstriction* provoquant une diminution du calibre vasculaire, ralentissant donc le débit sanguin. Il permet une diminution des pertes et une stase circulatoire qui favorise la mise en place des différentes étapes de l'hémostase. Cette vasoconstriction est induite par l'élasticité de la tunique sous-endothéliale des cellules musculaires lisses mais également par le système nerveux neurovégétatif innervant les structures vasculaires (10).

L'*adhésion plaquettaire* est un phénomène passif induit par la rencontre des plaquettes circulantes avec les structures sous-endothéliales hautement thrombogènes mises à nu par la rupture de la couche endothéliale. La fixation du facteur de Willebrand au collagène qui s'arrime à la membrane plaquettaire par son récepteur, la gpIb, permet l'adhésion plaquettaire. D'autres glycoprotéines participent à cette adhésion, étape indispensable à leur activation (10).

L'*activation plaquettaire* est caractérisée par deux phénomènes principaux, leur changement de forme et leur activation métabolique. Ces deux phénomènes nécessitent de l'énergie ainsi que des ions calcium intracytoplasmiques disponibles afin d'activer le système contractile actine-myosine. Lorsque les plaquettes sont activées, leur forme devient sphérique émettent des pseudopodes et s'éparpillant sur la surface d'adhésion. Les granules intracytoplasmiques fusionnent avec le système canaliculaire ouvert, libérant leur contenu qui se dispersera ainsi dans le plasma environnant. Cette libération de substances proagrégantes, procoagulantes et/ou

vasomotrices contribue à l'amplification de l'hémostase primaire et permet un environnement favorable à la coagulation plasmatique (10).

La plaquette activée génère également de nombreuses substances pharmacologiquement actives notamment l'acide arachidonique. Une fois métabolisé par la phospholipase A2, il devient TXA1, puissant vasoconstricteur modulant les activités plaquettaire et vasculaire. Il existe aussi un autre phénomène présent lors de la phase d'activation plaquettaire : le flip-flop membranaire. Il s'agit d'un repositionnement des structures internes vers l'extérieur de la membrane permettant ainsi d'être en contact avec le plasma. Ce flip-flop permet aux phospholipides chargés négativement, positionnés désormais à l'extérieur de la membrane, d'être disponibles pour la fixation des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants, amplifiant ainsi les processus enzymatiques de la cascade de la coagulation (10).

Les principaux agonistes de *l'agrégation plaquettaire* sont l'ADP et les traces de thrombine produites par les premières étapes de la coagulation. Elle sera également amplifiée par d'autres substances telles que la TXA2, l'adrénaline ou la sérotonine. L'agrégation plaquettaire est possible grâce aux pontages adhésifs interplaquettaires causés par le fibrinogène par le biais de sa fixation à son récepteur, la gpIIb/IIIa. Ce phénomène actif requiert également de l'énergie et disponibilité de calcium (10). La figure 3 montre les différentes étapes de l'hémostase primaire.

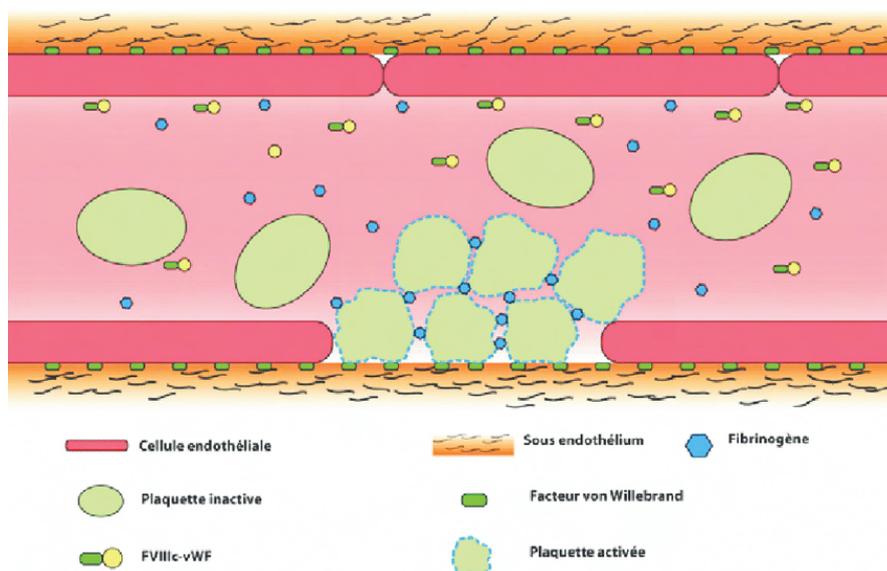


Figure 3 : Hémostase primaire : interactions entre les différents acteurs de la formation du thrombus blanc. Hafian, Hilal & Furon, Vincent & Mauprivez, Cedric. (2010). Orientation diagnostique devant les anomalies du temps de saignement, du temps de céphaline activé, du temps de Quick et de l'international normalized ratio.

2. La coagulation

La coagulation est le processus de consolidation du clou plaquettaire par un réseau protéique de fibrine permettant de réaliser une hémostase permanente. Le processus central de la coagulation est la génération de la thrombine, enzyme clé permettant la transformation du fibrinogène en fibrine et assurant la retroactivation et l'amplification de la coagulation et de l'hémostase primaire (10).

Les facteurs de la coagulation sont des protéines plasmatiques participant au processus de la coagulation et dont on distingue trois groupes différents : les protéines à activité enzymatique, les protéines dénuées d'activité enzymatique mais servant de cofacteurs et les protéines jouant un rôle de substrat (10). Le tableau 1 représente les facteurs et les protéines de la coagulation.

Tableau 1 : Facteurs et protéines de la coagulation

Numérotation	Nom du précurseur	Fonction	Vitamine K dépendance
I	Fibrinogène	Substrat	
II	Prothrombine	Zymogène	+
III	Phospholipides		
IV	Calcium		
V	Proaccélerine	Cofacteur	
VII	Proconvertine	Zymogène	+
VIII	Facteur anti hémophilique A	Cofacteur	
IX	Facteur anti hémophilique B	Zymogène	+
X	Facteur de Stuart	Zymogène	+
XI	Facteur Rosenthal	Zymogène	
XII	Facteur Hageman	Zymogène	
XIII	Facteur stabilisant la fibrine	Zymogène	
	Facteur de Fletcher	Zymogène	
	Facteur Fitzgerald	Zymogène	
	Facteur tissulaire	Récepteur VIIa	
	Facteur inhibiteurs		
	Antithrombine	Inhibiteur	
	Protéine C	Zymogène	+
	Protéine S	Cofacteur	+
	Thrombomoduline	Récepteur IIa	

Tous les facteurs sont synthétisés au niveau hépatique par les hépatocytes et sont des précurseurs d'enzymes, à l'exception des Facteurs V et VIII qui sont plutôt des cofacteurs favorisant l'activité enzymatique d'un des autres facteurs activés (10).

Chaque facteur de la coagulation est défini par son activité coagulante, et par son activité antigénique évaluée par le dosage de la protéine. Un défaut fonctionnel se traduit ainsi par une diminution de l'activité coagulante avec conservation de l'activité antigénique (10).

Les facteurs vitamine K dépendant et les facteurs contacts étant zymogènes, circulent dans le plasma sous forme d'un précurseur enzymatique inactif ou proenzyme. Ils possèdent un site actif protéolytique au niveau de la région C terminale, qui est masqué lorsque la molécule n'est pas activée. Ce domaine catalytique se caractérise par une séquence précise d'acides aminés comportant un résidu sérine ; une hydrolyse partielle de la molécule démasquant le site sérine protéase permettrait l'activation d'un facteur. Le facteur activé pourrait à son tour activer également un autre facteur par hydrolyse, provoquant ainsi une véritable cascade enzymatique (11).

En ce qui concerne la vitamine K, elle est nécessaire à l'acquisition des propriétés fonctionnelles des facteurs vitamine K-dépendants. Son rôle consistant en une carboxylation des résidus d'acide glutamique de la partie N terminale de la chaîne polypeptidique. La carboxylation permet la fixation du calcium, véritable pont entre la chaîne polypeptidique et la surface phospholipidique plaquettaire ou tissulaire. En l'absence de vitamine K, le foie libère des facteurs décarboxylés très faiblement actifs (9).

La fixation des sérines protéases procoagulantes à la surface des phospholipides confère trois types d'avantages au processus de coagulation : un accroissement de la concentration accélérant les interactions entre les différents facteurs, une restriction locale de l'activation de la coagulation, une protection des enzymes procoagulantes vis-à-vis des inhibiteurs circulants de la coagulation (10).

Les facteurs contacts sont essentiellement définis par leur rôle dans le développement de la coagulation du plasma in vitro. Leur activation est déclenchée par le contact avec une surface non mouillable ou chargée négativement tel le sous-endothélium. Ils participent également à la fibrinolyse et au processus d'inflammation, tous deux étroitement reliés au système de la coagulation (10).

Concernant les cofacteurs, ils sont dépourvus d'activité enzymatique mais accélèrent les réactions entre une enzyme et son substrat, jouant donc un rôle de potentialisateur des interactions enzymatiques (10).

Le troisième type de facteur de coagulation qui joue un rôle de substrat sans activité enzymatique ou catalytique propre, est le fibrinogène. Ce dernier est le substrat final de la coagulation, hydrolysé par la thrombine qui le transforme en chaînes insolubles de fibrine. Il s'agit d'un polypeptide formé de six chaînes identiques deux à deux, reliées par des ponts disulfures. L'effet hydrolytique de la thrombine permet la polymérisation des chaînes de fibrinogène en gel de fibrine. Il intervient également pendant l'hémostase primaire permettant l'agrégation des plaquettes entre elles (10).

Les phospholipides sont constitués d'une surface moléculaire catalytique permettant le déclenchement de la coagulation par l'activation des facteurs procoagulants. Les phospholipides impliqués dans le déclenchement et le déroulement de la coagulation comprennent la phosphatidylsérine plaquettaire ou facteur 3 plaquettaire (F3P) et le facteur tissulaire ou thromboplastine tissulaire. La phosphatidylsérine plaquettaire s'exprime à la surface de la membrane plaquettaire lors de son activation. Le facteur tissulaire, quant à lui, s'exprime de façon inductible par la cellule endothéliale activée et de façon constitutive par les cellules sous-endothéliales, fibroblastes et cellules musculaire lisses. Lors de la brèche vasculaire, il est exposé aux protéines procoagulantes exposant les structures sous-endothéliales (10).

Le déroulement de la cascade enzymatique de la coagulation se compose de 3 étapes :

- Phase d'initiation
- Phase d'amplification
- Formation du caillot de fibrine

2.1 Phase d'initiation

Lors d'une lésion vasculaire, une libération massive de facteur tissulaire (FT) va permettre le démarrage de la coagulation. En présence de calcium, le FT forme un complexe avec le FVII, aboutissant en l'activation du FVII (FVIIa) puis en la formation d'un complexe FT-FVIIa. Ce complexe va ainsi pouvoir rapidement activer le FX par protéolyse. Cette première cascade de coagulation, connue sous le nom de « voie du facteur tissulaire » se met en place en premier (10).

Cependant, le FXa peut également provenir de la voie intrinsèque déclenchée dans un second temps par certaines structures chargées négativement du sous endothélium vasculaire. Après la liaison de la prekallikréine et du KHPM sur ce sous endothélium, une cascade de coagulation va avoir lieu, par activations successives des facteurs FXII, FXI, FIX puis FIXa. Le FIXa formé pourra ainsi former un complexe avec son cofacteur FVIIIa, appelée complexe tenase, ce qui aboutira à l'activation du FX en FXa, amplifiant considérablement le rendement de la production de prothrombinase (10).

A partir de la formation de FXa, résultat des deux voies précédentes, la voie commune de la coagulation va débiter par la formation du complexe prothrombinase entre FXa et son cofacteur FVa ainsi que les phospholipides tissulaires et le calcium, entraînant finalement l'activation de la prothrombine en thrombine (10).

2.2 Phase d'amplification

Le complexe prothrombinase assure la protéolyse de la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa), protéine clé de la coagulation responsable de la génération du caillot de fibrine. En outre, la thrombine assure une amplification du rendement de la cascade enzymatique en activant les cofacteurs V et VIII qui accélèrent considérablement l'activité des complexes de la prothrombinase (Va) et de la tenase (VIIIa), conduisant à un accroissement explosif de la production de la thrombine. Ce phénomène est nommé double boucle de retroactivation de la génération de thrombine sur laquelle repose toute l'efficacité et la puissance du système (10).

2.3 Formation du caillot de fibrine

La transformation du fibrinogène en fibrine se fait grâce à la thrombine. Dans un premier temps, la thrombine hydrolyse partiellement le fibrinogène pour former des monomères de fibrine soluble. Ces derniers étant instable, c'est le FXIIIa qui les stabilisera en pontant les monomères via des liaisons covalentes, pour former la fibrine. Pour empêcher la fibrinolyse, la thrombine active également le facteur TAFI (inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine). La fibrine va pouvoir stabiliser l'agrégat plaquettaire, qui se rétractera en augmentant sa solidité (10).

Il existe une régulation de la coagulation, effectuée par 3 éléments, qui inactiveront les facteurs de coagulation activés au niveau de la circulation et de la paroi des cellules endothéliales saines (10) :

- L'antithrombine : glycoprotéine inhibitrice des sérines protéases. Elle est produite par les hépatocytes et les cellules endothéliales, et circule dans le sang. Elle inhibe la thrombine, le FXa, le FIXa et le FXIa en se complexant avec eux. Cette glycoprotéine n'est pas active à la surface plaquettaire où le caillot se forme, mais neutralise les facteurs enzymatiques dès qu'ils diffusent à distance.
- Le système plasmatique de la protéine C : Dans ce système, la thrombomoduline, à la surface des cellules endothéliales saines, va former un complexe avec la thrombine lorsque cette dernière sera à proximité. Ce complexe va ainsi permettre l'activation de la protéine C, qui formera un complexe avec la protéine S, résultant en l'inactivation des cofacteurs de coagulations FV et FVIII. La protéine C est vitamine K dépendante et circulante dans le sang. La protéine S est aussi vitamine K dépendante et elle potentialise l'action de la protéine C.
- L'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI) va inactiver le complexe FT-FVIIa lors de la production du FXa.

La figure 4 représente la cascade de coagulation avec les différentes voies : extrinsèque, intrinsèque et commune.

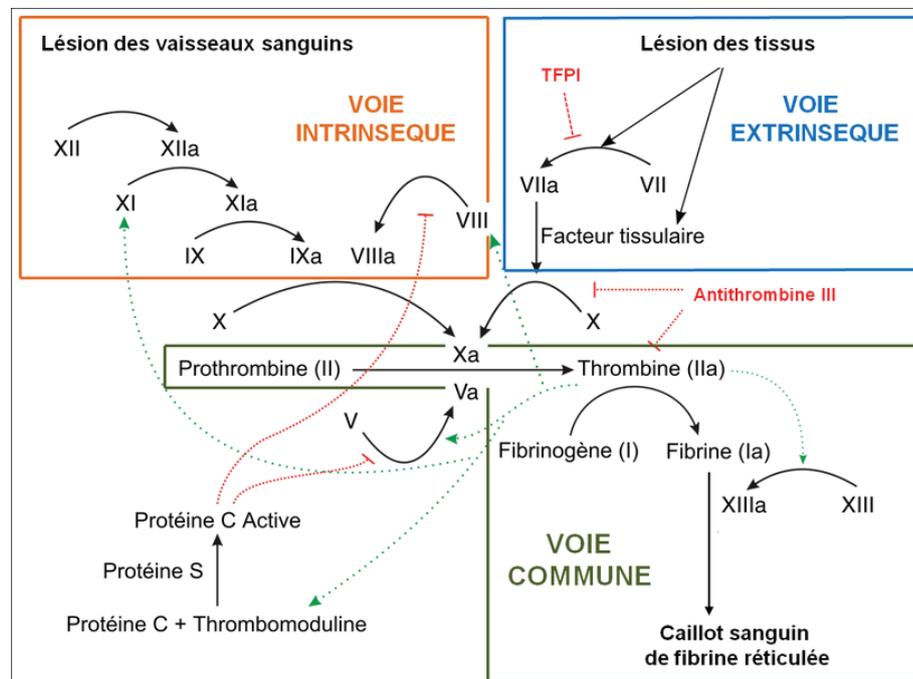


Figure 4 : Cascade de coagulation présentant les voies extrinsèques, intrinsèques et communes. Poupard N. Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparine pour le traitement de l'angiogenèse tumorale.

3. Fibrinolyse

La fibrinolyse est le processus physiologique provoquant la dissolution du caillot de fibrine. La plasmine est l'enzyme clé de la fibrinolyse, elle dérive d'un précurseur plasmatique inactif appelé plasminogène, glycoprotéine d'origine hépatique. Ce précurseur possède une affinité importante pour la fibrine et s'y fixe permettant ainsi la génération locale de plasmine via le démasquage des sites protéolytiques (10).

La plasmine détruit le fibrinogène et la fibrine en divers fragments appelés produits de dégradation de la fibrine ou PDF. Ils peuvent être quantifiés dans le plasma et cette quantification est le reflet de l'activité de la plasmine et donc de la coagulation (10).

La fibrinolyse est contrôlée par 2 systèmes équilibrés d'activation et inhibition de l'activité de la plasmine.

Il existe principalement 2 activateurs : le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) et la pro-urokinase ou u-PA (activateur urinaire du plasminogène). Le t-PA est une sérine protéase ayant une activité protéolytique sur le plasminogène déclenchée lors de son adsorption sur la fibrine. L'u-PA, quant à elle, est présente dans nombreux tissus mais son rôle physiologique reste moins connu (10).

Concernant les inhibiteurs, la principale protéine inhibitrice de plasmine est la α 2-antiplasmine. Il s'agit d'une glycoprotéine qui neutralise la plasmine plasmatique circulante non liée à la fibrine. Le principal inhibiteur des activateurs du plasminogène, appelé PAI. Le PAI de type 1 est une glycoprotéine qui inhibe le t-PA et u-PA par formation d'un complexe covalent, il est majoritairement localisé dans les granules α des plaquettes et est libéré lors de l'activation plaquettaire qui initie l'hémostase. En ce qui concerne, le PAI de type 2, un autre inhibiteur synthétisé par le placenta au cours de la grossesse (10).

Le rôle de la fibrinolyse est donc de lyser progressivement le caillot après la cicatrisation de la brèche vasculaire, mais aussi dans la prévention de son extension évitant l'occlusion de la lumière vasculaire (10).

4. Cycle de la vitamine K et la coagulation

La coagulation sanguine nécessite la présence de vitamine K. Cette vitamine, découverte en 1929 par le danois Henrik Carl Dam, existe sous 3 formes (5):

- La vitamine K1, isolée de la luzerne, est connue sous le nom de phylloquinone et est le seul homologue de la vitamine K présent dans les plantes.
- La vitamine K2, isolée de la farine de poisson putréfiée, est connue sous le nom de ménaquinone, principalement d'origine bactérienne.
- La vitamine K3, forme synthétique de la vitamine K, est connue sous le nom de ménadione.

La figure 5 représente les différentes structures chimiques de la vitamine K.

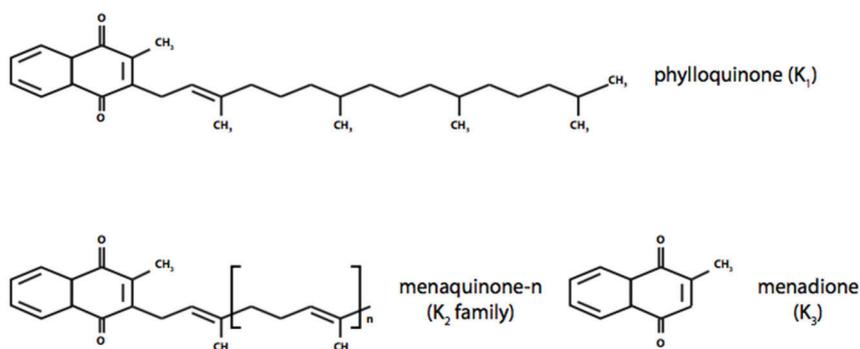


Figure 5 : Structures chimiques des différentes formes de la vitamine K, JP Agarra, Role de la vitamine K2 dans la prévention de l'ostéoporose et des maladies cardiovasculaires, Lettre de l'Institut Européen de Physionutrition et Phytothérapie, 2017.

La vitamine K, sous forme hydroquinone (KH₂), est le cofacteur exclusif de l'enzyme gamma-glutamyl carboxylase (GGCX), responsable de l'activation des facteurs de coagulation II, VII, IX et X par ajout de groupe carboxyle en position gamma. Ces facteurs sont dits vitamine K dépendants. Tous les facteurs de coagulation vitamine K dépendants nécessitent une carboxylation des résidus glutamate 9-13 à l'extrémité N-terminale de la protéine. Ainsi, les défauts de carboxylation provoquent des troubles de la coagulation, connus sous le nom de carence combinée en facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K (12).

Avec la découverte de nouvelles protéines gamma-carboxyglutamique, l'importance de la carboxylation a été étendue au-delà de la coagulation. Par exemple, la matrice carboxylée protéine gamma-carboxyglutamique (MGP ou matrix Gla protein) est un puissant inhibiteur de la calcification vasculaire et de la minéralisation du tissu conjonctif. Si cette matrice n'est

pas carboxylée, elle est impliquée dans les maladies cardiovasculaires et autres syndromes non hémorragiques. L'ostéocalcine, une autre protéine dépendante de la vitamine K, est produite par les ostéoblastes et possède une importance capitale lors de la formation osseuse. Des études récentes suggèrent que l'ostéocalcine fonctionne également comme une hormone affectant le métabolisme du glucose. Les enzymes de la carboxylation sont essentielles pour comprendre la coagulation du sang, mais également pour comprendre d'autres processus physiologiques (12).

Cependant, lors de la réaction entre GGCX et son substrat enzymatique, la vitamine K sous sa forme hydroquinone (donc réduite) est oxydée en vitamine K 2,3-époxyde (KO). Pour retrouver un stock de KH₂ pour réaliser une nouvelle fois la réaction, la vitamine K réduite peut provenir de l'alimentation, ou être recyclé à partir de la KO lors du cycle de la vitamine K. Ce processus est composé d'une double réduction de KO par l'enzyme vitamine K époxyde réductase (VKOR), présente dans la membrane du réticulum endoplasmique. La vitamine K, ayant des caractéristiques hydrophobes, peut ainsi aisément rencontrer l'enzyme (12) (13). La figure 6 montre le cycle de la vitamine K.

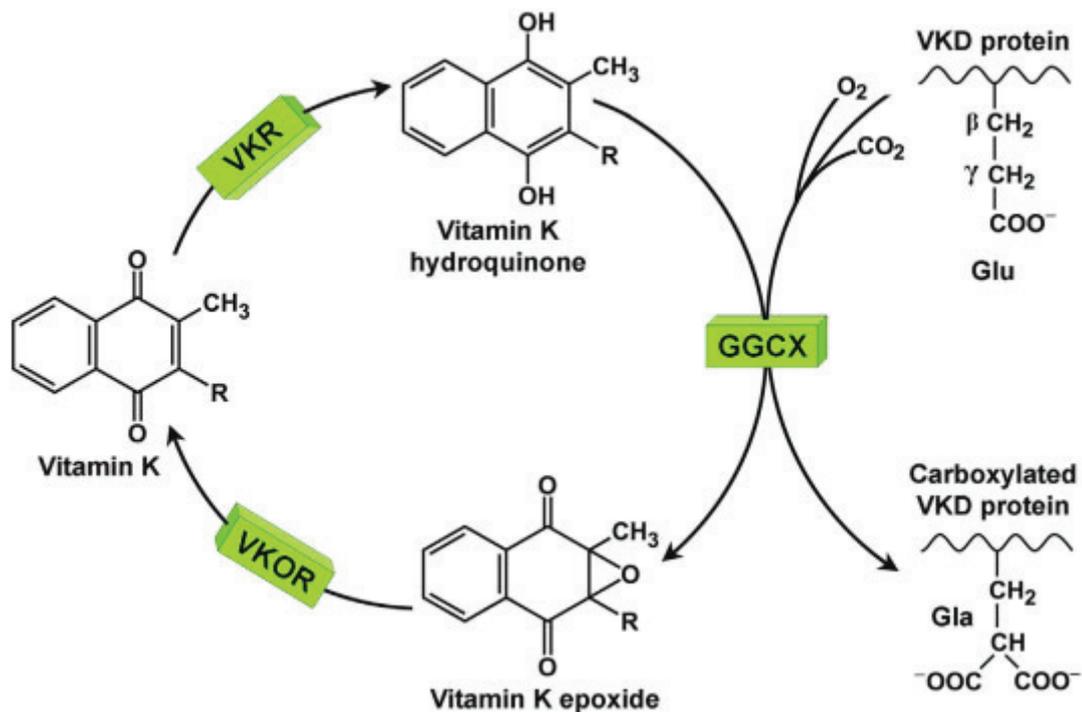


Figure 6 : Cycle de la vitamine K. Tie J-K, Stafford DW. Functional Study of the Vitamin K Cycle Enzymes in Live Cells. Methods Enzymol. 2017;584:349–94.

Le gène de l'enzyme VKOR a été identifié en 2004 (12)(14), grâce à des études menées sur des gènes aux fonctions inconnues au sein d'un locus du chromosome 16. 13 gènes ont été sélectionnés à partir de précédentes études de modélisation, qui avaient prédit une région transmembranaire à VKOR. À la suite de tests utilisant de petites molécules d'ARN interférents (siARN) sur ces 13 gènes, 1 des 13 gènes a entraîné une réduction significative de l'activité VKOR. Le gène putatif VKOR a ensuite été cloné et surexprimé dans des cellules d'insectes, pour confirmer la fonction VKOR (15).

Le gène VKOR couvre 5126 paires de bases sur le chromosome humain 16, contient trois exons et code une protéine de 163 acides aminés avec une masse moléculaire relative calculée d'environ 18 kDa. Ce gène est retrouvé chez les vertébrés, insectes, plantes, protistes, archées et bactéries. Cinq acides aminés sont complètement conservés chez les protéines VKOR de tous ces règnes, dont deux cystéines incluses dans un motif CxxC, essentielles à la fonction redox. De plus, la présence de cette protéine dans des règnes aussi éloignés suggère une apparition précoce de l'activité VKOR dans le développement de la vie eucaryote, probablement avec une autre fonction non directement liée à la gamma-carboxylation des protéines (15).

L'enzyme VKOR possède une structure à 4 hélices transmembranaires, et une hélice extra-membranaire. Les hélices sont reliées par des structures secondaires en boucles. La figure 7 représente la structure de VKOR via la modélisation moléculaire.

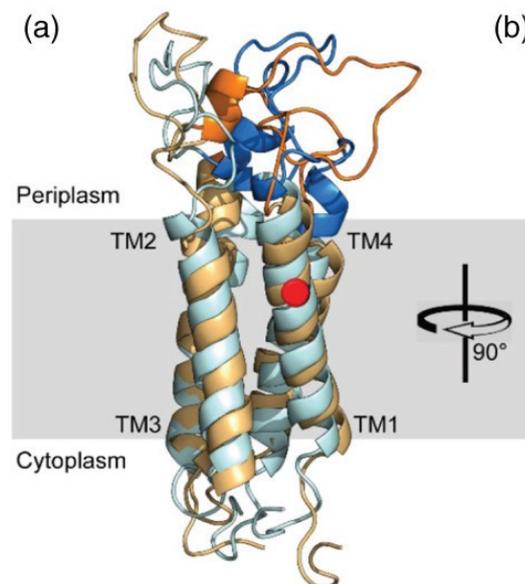


Figure 7 : Structure de VKOR. Joffrey, Goulois & Chapuzet, Audrey & Lambert, Veronique & Chatron, Nolan & Tchertanov, Luba & Legros, Lionel & Benoit, Etienne & Lattard, Virginie. (2015). Evidence of a target resistance to antivitamin K rodenticides in the roof rat *Rattus rattus*: Identification and characterization of a novel Y25F mutation in the *Vkorc1* gene. *Pest management science*. 72. 10.1002/ps.4020.

5. Propriétés anticoagulantes des plantes

La recherche de produits naturels pour le développement de nouveaux principes actifs est essentielle puisqu'il existe une grande diversité de composants chimiques qui peuvent agir comme des médicaments. Dans cette perspective, la biodiversité est extrêmement riche, notamment dans les forêts tropicales, offrant de grandes possibilités pour découvrir de nouveaux potentiels principes actifs.

Par exemple, au-delà de 8 semaines, la famille *Astéracée* du genre *échinacée* peut provoquer une hépatotoxicité et ne doit donc pas être utilisée avec d'autres médicaments hépatotoxiques connus, tels que les stéroïdes anabolisants, l'amiodarone, le méthotrexate et le kétoconazole. La grande camomille, l'ail, le ginkgo, le gingembre et le ginseng peuvent altérer le temps de saignement et ne doivent pas être utilisés en même temps que la warfarine sodique. Le ginseng peut provoquer des maux de tête, des tremblements et des épisodes maniaques chez les patients traités par le sulfate de phénelzine, et ne doit pas non plus être utilisé avec des œstrogènes ou des corticostéroïdes en raison des effets additifs possibles. Le mécanisme d'action du millepertuis étant incertain, l'utilisation concomitante d'inhibiteurs de la monoamine oxydase et d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine est déconseillée. La valériane ne doit pas être utilisée en association avec des barbituriques car une sédation excessive peut survenir. Le kyushin, la réglisse, le plantain, la racine d'uzara, l'aubépine et le ginseng peuvent interférer soit avec la pharmacodynamique de la digoxine, soit avec la surveillance de la digoxine. L'huile d'onagre et la bourrache ne doivent pas être utilisées avec des anticonvulsivants car elles peuvent abaisser le seuil convulsif. Shankapulshpi, une préparation ayurvédique, peut diminuer les niveaux de phénytoïne ainsi que diminuer l'efficacité du médicament. Les acides tanniques présents dans certaines herbes (par exemple, le millepertuis et le chou palmiste nain) peuvent inhiber l'absorption du fer. Le varech en tant que source d'iode peut interférer avec les thérapies de remplacement de la thyroïde. De nombreuses herbes (p. ex., karela et ginseng) peuvent affecter la glycémie et ne doivent pas être utilisées chez les patients atteints de diabète de type II (16).

Une étude récente a démontré que le ferulénol et la ferprénine, contenu dans certaines plantes de la famille *Ferula sp*, sont efficaces pour inhiber l'enzyme VKORC1, empêchant ainsi le recyclage de la vitamine K chez les animaux ayant consommé suffisamment de fêrule. Tous les animaux consommant de la fêrule contenant une de ces molécules en quantité suffisante pourraient donc présenter des troubles de la coagulation. Ces molécules présentant des activités anticoagulantes relativement puissantes seraient, en revanche, peu persistantes (17).

Dans le cadre du travail de cette thèse, nous nous intéresserons principalement aux plantes ayant des propriétés anticoagulantes et, plus particulièrement au lapachol et au curcuma.

5.1 Lapachol

Le lapachol (2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butényl)-1,4-naphtoquinone) est un pigment trouvé dans les graines et le bois de cœur de certaines plantes tropicales, principalement des bignoniacées (*Tabebuia* sp.)(18), et possède un poids moléculaire de 242,27 g/mol (7). La principale source du lapachol est un arbre, appelé lapacho, arbre sacré des incas, ou encore pau d'arco (19). La figure 8 représente la structure chimique du lapachol.

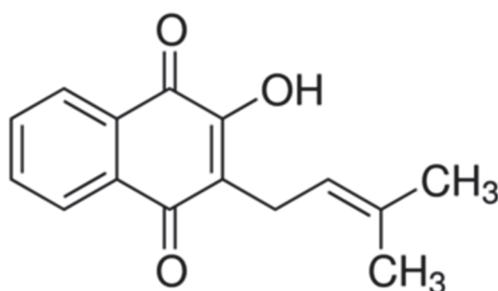


Figure 8 : Structure chimique du lapachol. Beniddir, Mehdi. (2012). Search for antiplasmodial compounds from the malagasy biodiversity.

Tabebuia impetiginosa est un arbre à feuillage persistant, à fleurs roses, trouvé dans la forêt amazonienne, mais également en Argentine, Bolivie, Brésil, Colombie, Equateur, Guinée française, Paraguay, Pérou, Surinam, Trinité-et-Tobago et Venezuela. Cet arbre a été utilisé, pendant des milliers d'années, dans les préparations contre des maladies comme le cancer, la syphilis, le paludisme, notamment sous forme de « thé » (20). La figure 9 représente l'arbre appelé Lapacho.



Figure 9 : Arbre appelé « Lapacho ». Tea bees trips, lapacho herbal tea .
<https://teabeestrips.wordpress.com/2018/04/11/lapacho-herbal-tea/>

Dans ce cadre, le Dr Theodoro Meyer, professeur de botanique et de géographie végétale à l'Université nationale de Tucuman en Argentine, a documenté les premiers cas cliniques de chimiothérapie anticancéreuse à l'aide d'extraits de divers lapacho en 1966 (20).

Encore aujourd'hui, le pau d'arco est utilisé pour combattre des infections, notamment les gastro-entérites, les infections des voies respiratoires, les infections cutanées, la cystite et la vaginite (7).

Le lapachol a également été répertorié dans les années 1960, lors d'un projet d'identification et d'isolation de composés anticancéreux dans les plantes, organisé par l'Institut national du Cancer des États-Unis. Dans le cadre de ces travaux, le lapachol a été identifié comme une molécule à potentiel avec une concentration plasmatique efficace pour l'activité antitumorale mais ayant des effets indésirables anticoagulants. Pour cette raison, l'essai clinique de phase I a été arrêté. Cette activité anticoagulante résulterait d'une puissante inhibition de la vitamine K époxyde réductase et la vitamine K quinone réductase (21).

Lors d'une étude sur la promotion des métastases menée par *Maeda et al.*, ils ont mis en évidence un antagonisme de la vitamine K par le lapachol, qui serait impliqué dans la promotion des métastases. Dans ce but, ils ont examiné l'effet de la warfarine, l'antagoniste de la vitamine K le plus couramment administré, sur la métastase expérimentale des cellules de mélanome B16BL6. Une administration unique de warfarine de 0,33 mg/kg, 6 heures avant l'injection des cellules tumorales a considérablement favorisé la métastase des cellules du mélanome B16BL6. L'expérience a été également réalisé avec le lapachol mais à des doses bien supérieures, à 80

mg/kg. Afin de confirmer que la promotion des métastases par le lapachol et la warfarine est médiée par des voies dépendantes de la vitamine K, la vitamine K3 a été administré 3 fois avant l'administration orale de lapachol ou de warfarine, puis les cellules de mélanome B16BL6 ont été injectées par voie intraveineuse à des souris. La vitamine K3 a clairement montré la suppression de la promotion des métastases par le lapachol et la warfarine. Ces résultats indiquent que la promotion des métastases par le lapachol et la warfarine proviennent de l'antagonisme de voies dépendantes de la vitamine K (21).

L'action anticoagulante du lapachol utiliserait le même mécanisme d'action que la warfarine, au vu de la ressemblance des structures chimiques entre ces deux molécules. Ce mécanisme d'action a été vérifié par Preusch et Suttie, apportant la preuve de l'inhibition *in vitro* de VKOR par le lapachol (7).

Au cours de leur étude, des rats sensibles et résistants à la warfarine ont reçu des administrations de lapachol. Le foie des animaux après administration était centrifugé, afin d'obtenir des microsomes de foie (comprenant notamment des vésicules provenant du réticulum endoplasmique). L'inhibition de la vitamine K quinone réductase (VKR) et de VKOR était plus importante dans des microsomes de foie de rats sensibles à la warfarine que dans ceux résistants à la warfarine. La constante d'inhibition montrait une meilleure affinité chez le rat sensible (K_i : $2\mu\text{M}$) que chez le rat résistant (K_i : $85\mu\text{M}$). Preusch et Suttie ont également prouvé une réversibilité de l'inhibition causée par le lapachol (7)(22).

Malgré les diverses activités thérapeutiques du lapachol, certains effets toxicologiques ont également été signalés. Une étude a montré une forte mortalité chez le fœtus de rats Wistar après une administration de 10 mg/kg par gavage oral du 8^{ème} au 12^{ème} jour de gestation (19). De plus, une étude menée par Felicio *et al* (23), a montré une foetotoxicité après une administration de 100 mg/kg de lapachol du 17^{ème} au 20^{ème} jour de gestation. En revanche, une analyse de mutagénicité *in vitro* du lapachol a montré des résultats négatifs avec le test d'Ames (24).

5.2 Curcumine

Le curcuma, de son nom latin *Curcuma longa*, est une épice indienne populaire utilisée depuis des siècles pour ses propriétés médicinales, dans des maladies telles que les rhumatismes, les ulcères diabétiques, l'anorexie, la toux et la sinusite (25). Le rhizome du curcuma a également été utilisé chez les indigènes comme un médicament pour le traitement des troubles

inflammatoires. Le safran des Indes, dérivé du rhizome, a été largement utilisé par les peuples du Moyen-Orient pendant des siècles en tant que composante alimentaire (26).

L'action du curcuma provient de ses composés polyphénoliques, les polyphénols étant fréquents dans le régime alimentaire et ont montré un large éventail d'effets bénéfiques sur la santé (27). Le curcuma contient trois principaux analogues polyphénoliques : la curcumine (principal curcuminoïde), la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine (présente en plus faibles quantités) (28). La figure 10 représente les différentes structures chimiques de ces composés retrouvés dans le curcuma.

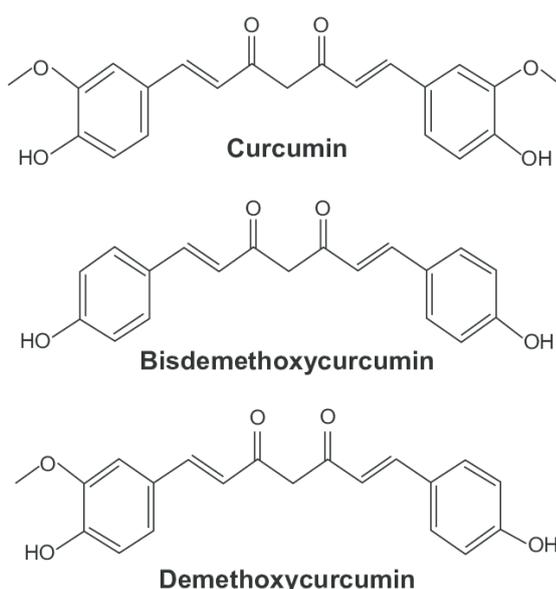


Figure 10 : Structures chimiques des différents composés du curcuma. Park W, Amin ARM, Chen ZG, Shin DM. New perspectives of curcumin in cancer prevention. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2013 May;6(5):387–400.

La curcumine (diferuloylméthane) est le principal curcuminoïde présent dans le curcuma, et est responsable de sa couleur jaune. Cette molécule a été isolée pour la première fois en 1815. Elle a un point de fusion de 176-177°C et est soluble dans l'éthanol, l'acétone, l'acide acétique et le chloroforme (29). Elle a été largement utilisée en complément alimentaire ou en médecine alternative, pour ses diverses propriétés thérapeutiques supposées et sa faible toxicité (8). En effet, cette molécule posséderait des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-cancérogènes, anti-mutagènes et anti-infectieux. De plus, *Bhide et al.* ont montré la sécurité et la tolérance du curcuma chez l'homme lors d'essais cliniques (30).

Il a également été proposé que la curcumine posséderait une action anticoagulante (25). Une étude a montré une modification des temps de thrombine, des taux de prothrombine et des temps

de céphaline activée basés sur le plasma, en lien avec une activité anticoagulante de la curcumine. Le temps de coagulation serait probablement prolongé grâce à l'inhibition de la thrombine ou du FXa provoquée par la curcumine, agissant comme un inhibiteur direct de la thrombine (31).

Récemment, *Rattis et al.*, ont publié une étude concernant la curcumine comme une cible prometteuse dans le traitement adjuvant du COVID-19. Dans le cadre de cette étude, une évaluation de la curcumine dans les anomalies de l'hémostase causées par la COVID-19 a été réalisée (32).

Les cytokines pro-inflammatoires et les niveaux élevés d'angiotensine II induisent la production de facteur tissulaire par les cellules endothéliales, initiant la cascade de la coagulation. La curcumine diminue les cytokines pro-inflammatoires et inhibe donc l'expression du facteur tissulaire dans l'endothélium vasculaire, évitant ainsi la cascade de la coagulation (32).

L'affinité de la curcumine via la liaison de la protéine S du SARS-CoV-2 et l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 peut empêcher l'infection et l'activation des cellules endothéliales (32).

Lors de l'activation de la cascade de coagulation, une fibrinolyse peut se produire, générant des D-dimères. Le traitement via la curcumine diminue le dépôt de fibrine et le niveau de formation des D-dimères (32).

Les lésions des cellules endothéliales peuvent exposer le collagène sous endothélial, qui peut être reconnu par le récepteur plaquettaire Gp-VI, conduisant ainsi à l'activation plaquettaire. La curcumine peut inhiber le récepteur Gp-VI en se liant au collagène, réduisant et ou abolissant ainsi l'activation plaquettaire (32).

L'interaction des plaquettes avec les monocytes via le récepteur P-sélectine-PSGL-1 favorise l'activation des monocytes, provoquant une augmentation de l'expression du facteur tissulaire. La curcumine inhibe cette interaction en inhibant la P-sélectine dans les plaquettes (32).

La mobilisation du calcium intracellulaire médie l'agrégation plaquettaire. La curcumine empêche l'agrégation plaquettaire médiée par le calcium. De plus, la curcumine inhibe la génération de thromboxane A₂ (TXA₂) libérée par les plaquettes activées pour stimuler d'autres activations plaquettaires. Ainsi, la curcumine inhibe l'agrégation plaquettaire (32). La figure 11 représente la curcumine comme un potentiel antithrombotique lors d'anomalies de l'hémostase induites par le SARS-CoV-2.

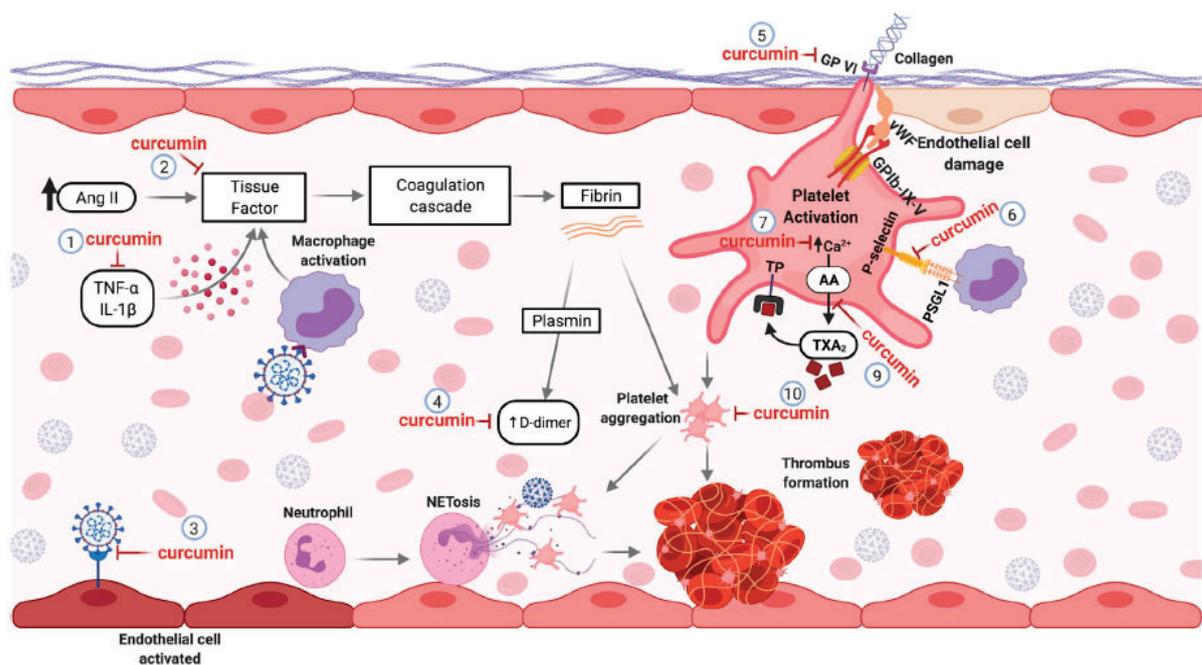


Figure 11 : La curcumine comme un potentiel antithrombotique lors d'anomalies de l'hémostase induites par le SARS-CoV-2. Rattis BAC, Ramos SG, Celes MRN. Curcumin as a Potential Treatment for COVID-19. Front Pharmacol. 2021;12:1068.

De plus, une autre étude menée par *Kim et al.* a également étudié l'impact de la curcumine et de la bisdéméthoxycurcumine lors de la coagulation, par des tests *in vitro* sur du plasma humain. Bien que les activités anticoagulantes de la curcumine et de la bisdéméthoxycurcumine étaient plus faibles que celles de l'héparine, le temps de céphaline activée et le temps de Quick ont été significativement prolongés par la curcumine ou la bisdéméthoxycurcumine à des concentrations égales ou supérieures à 5µM. La prolongation du temps de céphaline activée suggère une inhibition de la voie commune alors qu'une prolongation du temps de Quick indique une inhibition de la voie extrinsèque de coagulation. Pour confirmer ces résultats *in vitro*, des temps de saignement *in vivo* ont été déterminés et ont montrés une prolongation significative du temps de saignement par rapport au contrôle. Étonnamment, les effets de la curcumine sur le temps de coagulation étaient meilleurs que ceux de BDMC suggérant que le groupe méthoxy dans la curcumine régule positivement la fonction anticoagulante de la curcumine et que le mécanisme antithrombotique de la curcumine et du bisdéméthoxycurcumine semble être dû à l'inhibition de la polymérisation de la fibrine et/ou la voie intrinsèque et/extrinsèque sans potentialisation par le substrat chromogène utilisé, en présence ou absence de l'antithrombine III (26).

Selon *Liu et al.*, la pré-administration de 100 mg/kg de curcumine lors de la prise concomitante avec la warfarine ou le clopidogrel, affecte la pharmacocinétique (AUC et C_{max}) de ces médicaments mais n'a aucun impact sur les paramètres de pharmacodynamie tels que l'agrégation plaquettaire ou le taux d'anticoagulation (33).

6. Exploration de la coagulation

L'enzyme VKOR représente la principale cible des molécules AVK utilisées depuis de nombreuses années en gestion de population de rongeurs ainsi qu'en thérapie humaine. Elles forment ainsi l'une des 4 classes d'antithrombotiques thérapeutiques, avec les héparines, les inhibiteurs du fonctionnement plaquettaire et les anticoagulants oraux directs ou AOD. Dans le but de mesurer les dysfonctionnements de la coagulation sanguine, une batterie des tests explorant l'hémostase secondaire existent actuellement.

Dans cette partie, nous allons discuter initialement sur les différents tests d'exploration de la coagulation que nous avons utilisé pour ce travail, puis nous allons présenter brièvement les différentes thérapies humaines dans le cadre des dysfonctionnements de la coagulation afin de finir par une présentation des différents rodenticides présents dans le marché actuel.

6.1 Tests d'exploration de la coagulation

La coagulation sanguine peut présenter des dysfonctionnements, nécessitant une exploration du plasma sanguin. Pour cela, un prélèvement de sang total dans un tube contenant du citrate de sodium doit être réalisé, le citrate de sodium étant un chélateur du calcium empêchant la coagulation. Les FV et FVIII étant très thermolabiles, le prélèvement doit être rapidement centrifugé pour une étude optimale des facteurs de coagulation. À la suite de la centrifugation, le plasma déplaqueté permettra l'exploration de la coagulation.

A partir de ce prélèvement, la coagulation *in vivo* sera simulée lors de tests globaux où la vitesse de formation d'un caillot sera mesurée par méthode optique à l'aide d'un spectrophotomètre, ou par technique mécanique avec une bobine électromagnétique faisant osciller une bille jusqu'à la coagulation du plasma.

Ces tests sont nombreux, mais dans le cadre de cette étude, nous nous intéresseront particulièrement à :

- **Temps de Quick** : explorant la voie extrinsèque et la voie commune. C'est le temps de coagulation d'un plasma citraté, déplaqueté et recalcifié en présence de thromboplastine (déclencheur de la voie extrinsèque) et de phospholipides. En association avec le temps de céphaline avec activateur, il permet l'exploration de l'ensemble des facteurs de coagulation à l'exception du facteur XIII. Il est exprimé en secondes (VN : 12 à 15 secondes) ou en pourcentage (VN : 70-100% chez l'adulte et 40% chez le nouveau-né) ; ce dernier est également

appelé taux de prothrombine. Afin de réduire la variabilité inter laboratoire pour les patients sous AVK, l'*international normalized ratio* ou INR standardisé a été établi. Ce dernier correspond au rapport du temps de Quick du malade à celui du témoin, corrigé en fonction de l'indice de sensibilité ou ISI propre au réactif et à l'appareillage. Les valeurs normales pour l'INR sont comprises entre 1-2 chez les patients non traités par AVK ; chez les patients traités par AVK, l'INR est compris entre 2-3. Un INR < 2 indiquant une dose insuffisante chez un patient sous AVK et un INR > 3 indiquant une dose trop forte avec un risque potentiel d'hémorragie (34). La figure 12 représente la formule de l'INR et son échelle d'évaluation chez un patient sous AVK.

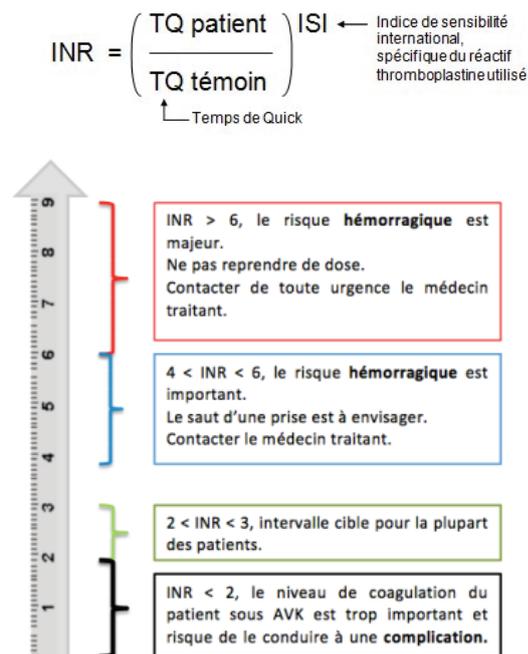


Figure 12 : Formule et évaluation de l'INR dans le cadre d'un patient sous AVK. UNSPG, mon traitement par AVK au quotidien.

- Temps de céphaline avec activateur (TCA) : explorant la voie intrinsèque et la voie commune. C'est le temps de coagulation d'un plasma citraté, déplaquetté et recalcifié en présence de phospholipides et d'un activateur de la voie intrinsèque. VN : 30-40 secondes. (10)
- Dosage du fibrinogène : explorant la voie commune. C'est la mesure du temps de coagulation d'un plasma citraté, déplaquetté et recalcifié en présence de faible quantité de thrombine. VN : 2-4 g/l. (10)

Il existe également des tests plus spécifiques. C'est le cas du test chromogénique consistant à observer la présence d'un des facteurs de coagulations. Lors de ce test, un peptide synthétique

sera clivé spécifiquement par un des facteurs de coagulations, entraînant l'apparition d'une coloration. Par exemple, le test chromogénique à base d'écarine mesure spécifiquement l'effet anticoagulant des inhibiteurs directs de la thrombine tel le dabigatran (35).

Un autre test spécifique utilisé est le temps de coagulation par l'écarine. L'écarine est une enzyme provenant du venin de serpent, *Echis carinatus*, qui permet la transformation de la prothrombine en meizothrombine. La meizothrombine est l'intermédiaire de la transformation du fibrinogène en fibrine. Si l'on utilise ce test en présence d'un inhibiteur direct de la thrombine, la meizothrombine serait inhibée empêchant donc le passage du fibrinogène en fibrine et allongeant ainsi le temps de coagulation par l'écarine (36).

6.2 Médicaments antivitamine K

Les médicaments AVK ont été introduits au début des années 1940, indiqués dans la prévention des maladies thrombo-emboliques. On distingue deux classes d'AVK thérapeutiques (37) :

- Les dérivés coumariniques (acénocoumarol et warfarine)
- Les dérivés de l'indane-dione (fluindione)

En France, la prescription de la fluindione est très majoritaire (près de 70% des patients sous AVK) et la warfarine est globalement l'AVK le plus prescrit dans le reste du monde (37).

La warfarine est également nommée coumaphène. La warfarine et l'acénocoumarol possède 1 carbone asymétrique (présence de 2 énantiomères), et sont vendus sous forme de mélange racémique R/S (38). La figure 13 montre les structures chimiques des AVK utilisés en médecine humaine.

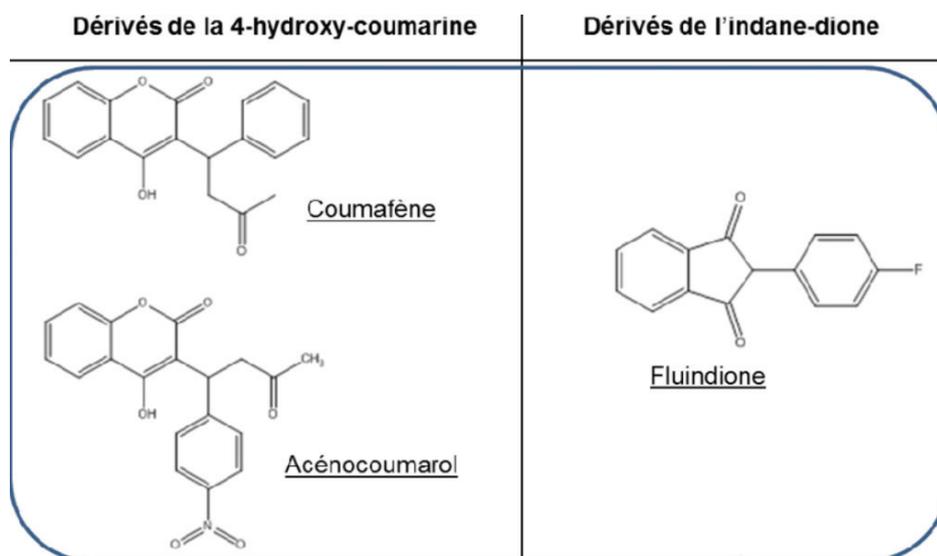


Figure 13 : Structure chimique des antivitamine K oraux thérapeutiques en médecine humaine. A. Hammed, Résistance de cible aux antivitamine K, Analyse des conséquences catalytiques de différentes mutations de VKORC1 et, étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1.

Les AVK interviennent dans le mécanisme de réduction de la vitamine K, en agissant sur VKOR. Ainsi, la vitamine K époxyde (KO) ne peut pas redevenir sous forme hydroquinone (KH₂), bloquant l'action de l'enzyme GGCX privée de cofacteur. Cette inhibition va donc empêcher l'activation des 4 facteurs de la coagulation vitamine-K dépendants, bloqués en forme glutamique, qu'on nomme alors « protéines induites par les antagonistes de la vitamine K » ou PIVKA (15). Les AVKs agissent au niveau des hépatocytes (39).

Le tableau 2 représente la pharmacocinétique des AVK de première génération (40) (41) (42) :

Tableau 2 : Pharmacocinétique des antivitamine K de première génération

Molécule	Warfarine	Acénocoumarol	Fluindione
Absorption	Rapide	Absorption rapide	Rapide
Distribution	<p>Fortement liée à l'albumine.</p> <p>Seule la fraction libre est active et métabolisée.</p> <p>Passage dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire</p>	<p>Fortement liée à l'albumine.</p> <p>Volume apparent :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,16-0,18 L/kg pour l'énantiomère R - 0,22-0,34 L/kg pour l'énantiomère S. <p>Passage dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire</p>	<p>Fortement liée à l'albumine.</p> <p>Seule la fraction libre est active et métabolisée.</p> <p>Passage dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire</p>
Métabolisme	<p>Cytochromes P450 (incluant CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8, CYP2C18, CYP1A2 et CYP3A4).</p>	<p>Cytochrome 2C9 : hydroxylation en 6- et 7- des 2 énantiomères, formant 4 métabolites. La variabilité génétique liée au CYP2C9 participe à 14 % de la variabilité interindividuelle.</p> <p>Implication des cytochromes CYP1A2 et CYP2C19.</p>	
Elimination	<p>Demi-vie : 35-40 heures.</p> <p>Elimination urinaire sous forme de produit pur ou de métabolite dégradé.</p>	<p>Demi-vie : 8-11 heures.</p> <p>Clairance plasmatique : 3,65L/h.</p> <p>Elimination des métabolites : 60 % dans l'urine et 29 % dans les fèces.</p> <p>Elimination sous forme inchangée (0,2 % de la dose) : urine.</p>	<p>Demi-vie : 31 heures.</p> <p>Elimination urinaire sous forme de produit pur ou de métabolite dégradé.</p>

Le tableau 3 représente la pharmacocinétique du dabigatran (43) :

Tableau 3 : Pharmacocinétique du dabigatran, inhibiteur direct de la thrombine

Molécule	Dabigatran
Absorption	<p>Biodisponibilité absolue du dabigatran par voie orale : 6,5 %. Après administration orale chez des volontaires sains, une augmentation rapide de la concentration plasmatique est observée avec une Cmax atteinte 0,5 à 2 heures après la prise.</p> <p>L'absorption est retardée lors d'une intervention chirurgicale. Les jours suivants, l'absorption du dabigatran est rapide avec un pic de concentration plasmatique 2 heures après la prise.</p> <p>La biodisponibilité n'est pas affectée par la présence d'aliments, la concentration plasmatique de pic est cependant atteinte avec 2 heures de retard.</p>
Distribution	<p>Faible liaison du dabigatran aux protéines plasmatiques (34-35 %). Liaison indépendante de la concentration.</p> <p>Volume de distribution : 60 à 70 litres. Le volume de distribution du dabigatran excède le volume total de l'eau corporelle humain, indiquant une distribution tissulaire modérée.</p>
Métabolisme	<p>Conjugaison possible, formant des acylglucuronides pharmacologiquement actifs. Il existe quatre isomères de position (1-O, 2-O, 3-O, 4-O-acylglucuronide), chacun représentant moins de 10 % de la quantité totale de dabigatran dans le plasma.</p> <p>Traces d'autres métabolites détectés par méthodes analytiques hautement sensibles.</p>
Elimination	<p>Elimination principalement par voie urinaire sous forme inchangée.</p> <p>Débit de filtration glomérulaire : 100 mL/min.</p> <p>Les concentrations plasmatiques diminuent de façon bi exponentielle, avec une demi-vie terminale moyenne de 11 heures chez des sujets âgés sains. La demi-vie est indépendante de la dose.</p>

6.4 Rodenticides

La gestion de population de rongeurs est un enjeu majeur de société. En effet, les rongeurs causent des problèmes agricoles par la destruction de récoltes (estimées à 40 millions de tonnes de céréales par an), dégradation des fils électriques, isolants thermiques et sont responsables de la propagation de pathogènes pouvant causer des maladies humaines (45). Les AVK utilisés en tant que rodenticides vont ainsi causer la mort de l'animal nuisible par hémorragie, en bloquant sa coagulation.

Il existe 2 générations d'anticoagulants utilisés actuellement comme rodenticides :

- 1) Première génération d'anticoagulants : comprenant des dérivés coumariniques (coumaphène) et les dérivés de l'indane-1,3-dione (chlorophacinone, diphacinone ...)(46). Ces molécules nécessitent une administration répétée pour tuer l'animal et sont très peu rémanentes. Cependant, la résistance de certains rongeurs vis-à-vis de cette génération d'anticoagulants a remis en question l'efficacité de ces molécules. Ces résistances combinent des aspects génétiques (liés à une pression de sélection face à un usage trop général de rodenticides) et des aspects comportementaux des animaux induisant une résistance acquise (les rongeurs évitent les appâts) (47). La figure 15 représente les différentes structures chimiques des AVK de première génération utilisés dans la gestion des rongeurs.

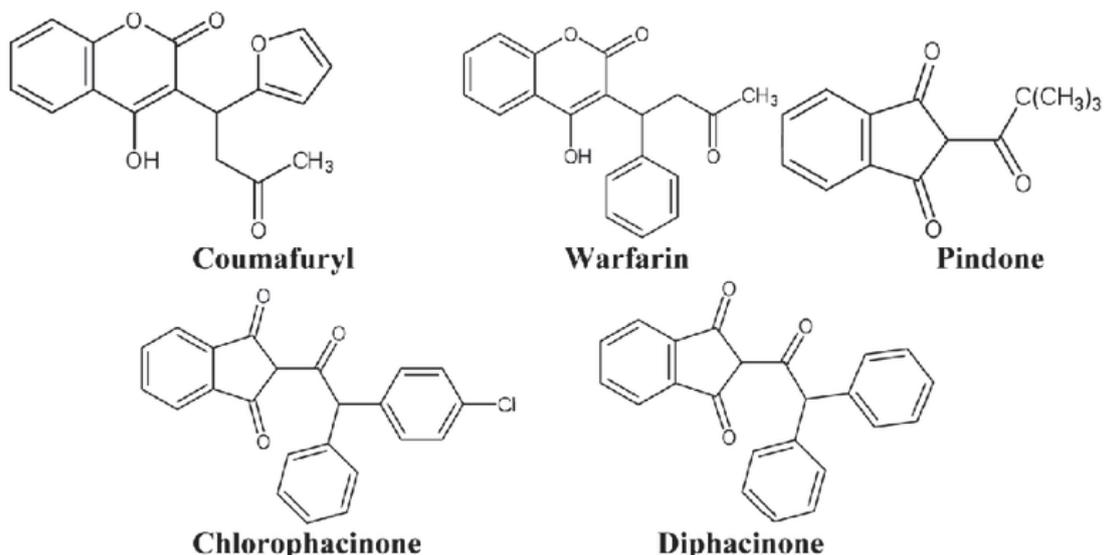


Figure 15 : Structures chimiques des AVK de première génération, utilisés dans la gestion des rongeurs.

Vudathala, Daljit & Cummings, Margaret & Murphy, Lisa. (2010). Analysis of Multiple Anticoagulant Rodenticides in Animal Blood and Liver Tissue Using Principles of QuEChERS Method. Journal of analytical toxicology. 34. 273-9. 10.1093/jat/34.5.273.

2) Pour pallier ce phénomène, une seconde génération d'AVK est apparue. Cette nouvelle génération comprend des dérivés coumariniques (bromadiolone, brodifacoum, difénacoum, diféthialone, flocoumafén ...). Ces molécules sont plus efficaces que les molécules de première génération, mais possèdent une rémanence pouvant aller jusqu'à plusieurs mois, ce qui provoque un problème d'écotoxicité (6). Différentes espèces non-cibles sont touchées par cette exposition accidentelle, comme des prédateurs des rongeurs ou des animaux sauvages consommant accidentellement les appâts. C'est le cas des hermines, des belettes, des renards roux, des visons européens, des lynx roux ou de divers rapaces (milan royal, buses, crécerelles, faucons pèlerins et aigle) (46) (47). La figure 16 représente les différentes structures chimiques des AVK de deuxième génération utilisés dans la gestion des rongeurs.

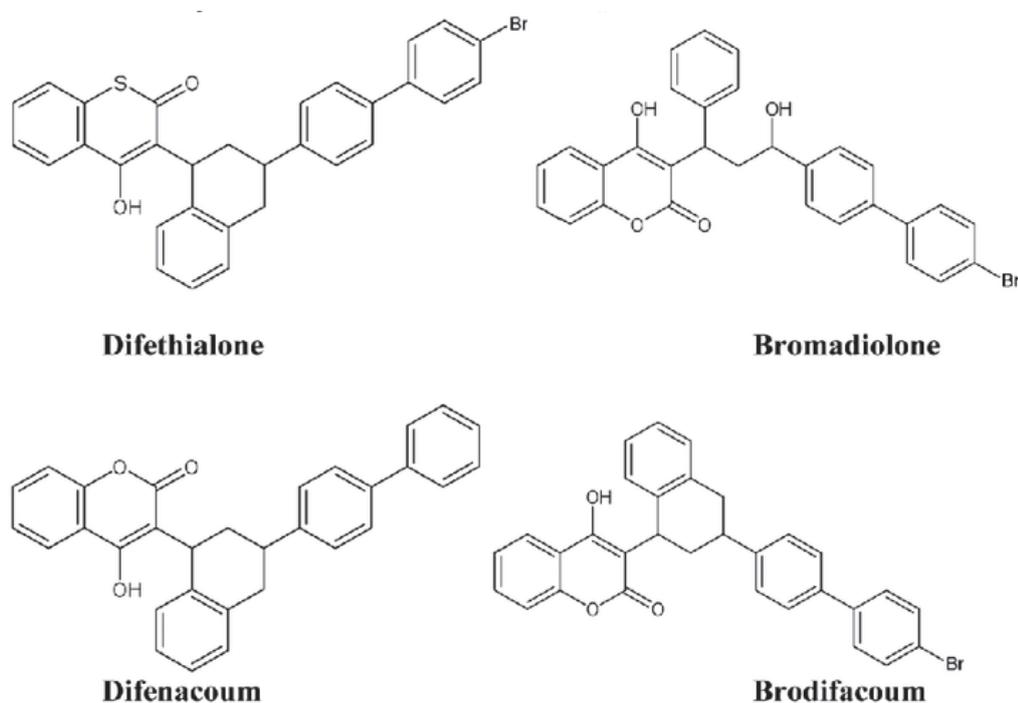


Figure 16 : Structures chimiques des AVK de deuxième génération, utilisés dans la gestion des rongeurs.

Vudathala, Daljit & Cummings, Margaret & Murphy, Lisa. (2010). Analysis of Multiple Anticoagulant Rodenticides in Animal Blood and Liver Tissue Using Principles of QuEChERS Method. *Journal of analytical toxicology*. 34. 273-9. 10.1093/jat/34.5.273.

Le mécanisme d'action est similaire aux AVK utilisés en thérapeutique humaine. En revanche, la pharmacocinétique des rodenticides de deuxième génération reste très différente. Dans le but d'observer la diversité au sein de cette même classe, nous allons prendre en exemple la

bromadiolone, AVK rapidement éliminé dans l'organisme, et le brodifacoum, AVK ayant une élimination beaucoup plus tardive.

Le tableau 4 représente la pharmacocinétique de la bromadiolone et le brodifacoum, AVK de deuxième génération.

Tableau 4 : Pharmacocinétique de la bromadiolone et le brodifacoum (47)

Molécule	Bromadiolone	Brodifacoum
Absorption	Rapide	Rapide
Distribution	Organe de stockage : foie	Organe de stockage : foie
Métabolisme		
Elimination	Voie d'excrétion majoritaire : fécale Demi-vie plasma : 20 jours Demi-vie foie : 150-200 jours	Voies d'excrétion : urinaire et fécale Demi-vie plasma : 91 jours Demi-vie foie : 170-318 jours

Ils sont principalement excrétés sous la forme de la molécule initiale à l'exception de la chlorophacinone, le coumafène et le coumatétralyl où la métabolisation serait importante (47).

Comme nous pouvons constater, le brodifacoum apparait comme la molécule la plus persistante dans le foie, les concentrations hépatiques de brodifacoum étant toujours plus élevées que celles de bromadiolone à dose égale et après 200 jours (48).

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

Expérimentation animale

Au cours de notre étude, l'expérimentation animale a été nécessaire. En effet, l'utilisation d'animaux a permis d'identifier la biodisponibilité des substances naturelles, de confirmer les résultats obtenus *in vitro*, et de répondre aux critères d'efficacité imposés par la législation des biocides (90% de mortalité), les tests *in vitro* ne permettant pas de répondre à ces critères.

Le rat étant l'espèce cible de nos molécules, les tests ont été réalisés uniquement sur cette espèce. Les animaux utilisés pendant les procédures expérimentales provenaient de fournisseurs agréés : les rats OFA Sprague Dawley (lignée sensible aux anticoagulants antivitaminique K) provenaient de *Charles River* (L'arbresles, France).

Nous avons également utilisé des animaux résistants porteurs d'une mutation du gène VKORC1 L120Q qui induit une forte résistance aux AVK. La mutation a été introgressée dans une lignée de rats Sprague Dawley sur plus de 10 générations. La lignée obtenue, qui est maintenue au laboratoire, que nous appelons Hampshire possède donc pour plus de 99,9% un fond génétique de Sprague Dawley et une zone de moins de 2 megabases autour du gène VKORC1 L120Q issue de rats sauvages résistants (chromosome 1 vers 187 megabases).

Le processus de coagulation étant indépendant de l'âge, des rats adultes seront utilisés. Le processus de coagulation étant indépendant du sexe, des rats femelles et mâles seront utilisés.

Lors des tests, les animaux sont hébergés dans des conditions conformes à leur bien-être, et bénéficient d'un enrichissement suffisant (abri et feuille d'essuie-main pour leur permettre de nicher). Les animaux sont laissés en groupe afin de respecter le caractère sociable des animaux.

Revue éthique d'un projet d'utilisation d'animaux à des fins scientifiques

Le comité d'éthique de VetAgro Sup n°18 a mis un avis favorable au projet « évaluation de la capacité de substances naturelles d'origine végétales à potentialiser l'activité de rodenticides anticoagulants antivitaminique K naturels ou synthétiques » rédigé lors de mon stage de Master 2 « Toxicologie humaine, évaluation des risques et vigilances » (Paris Saclay) (Annexe).

Protocole du traitement au lapachol chez le rat sensible

La poudre de lapachol est dissoute dans l'huile pour permettre le gavage des animaux. Un volume de 30mg de lapachol dans 1 ml d'huile de maïs contenant 10% de DMSO.

L'exploration de la coagulation se fera 3h, 6h, 9h, 12h, 24h et 48h après l'administration de l'anticoagulant antivitamine K naturel. Une observation à 48h permettra d'éviter toute souffrance animale. Au-delà de 3 jours, la réponse est essentiellement conditionnée par la persistance de l'anticoagulant antivitamine K, et pourrait s'accompagner de l'apparition de signes cliniques.

Chaque dose sera donnée à 3 rats par groupe, afin d'assurer une puissance statistique suffisante. À la suite de ces résultats, la synergie entre l'anticoagulant antivitamine K naturel et les substances naturelles sera testée.

Gavage

Administration unique de 300µl de lapachol à raison de 1ml/kg de poids vif.

Mise à mort

Dans un premier temps, les rats seront anesthésiés à l'aide d'un mélange gazeux à base d'isoflurane. Au cours de l'anesthésie, ils seront mis à mort par exsanguination via une ponction intracardiaque, ou via l'utilisation de dioxyde de carbone.

Plasma

Le prélèvement du plasma a été réalisé par ponction intracardiaque du sang chez le rat. Le sang a ensuite été placé dans un tube citraté en agitation permanente. Une centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm a permis de séparer le plasma. Le plasma a été conservé dans un Falcon à température 4-8°C.

Préparation des microsomes à partir de foie de rat

Les microsomes sont des fractions de centrifugation de foie contenant notre protéine d'intérêt (VKORC1), obtenues lors d'une centrifugation microsomiale. Le microsome se compose notamment de vésicules provenant du réticulum endoplasmique, ainsi que d'éléments provenant de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique.

Une première étape de broyage des morceaux de foie assure la libération des différents organites dans le milieu. Ces organites sont séparés à l'aide d'une première centrifugation pendant 10

minutes à 10000G. Les gros organites se retrouvant dans le culot, et les microsomes sont dans le surnageant. Ce surnageant est ensuite recentrifugé à 100000G pendant 1 heure, afin de faire culoter les microsomes. Ces microsomes sont alors re-suspendus dans du tampon de reprise, puis stockés à -80°C avant d'être utilisés.

Tampon de broyage : tampon phosphate 50 mmol/L – pH 7,4

Tampon de reprise : Tampon HEPES-glycérol – HEPES 50mmol/L – glycérol 20% - pH 7,4

Concentration inhibitrice médiane du lapachol sur des microsomes

La gamme de concentrations d'anticoagulants vitamine K naturel est réalisée à partir d'une première solution à 1mM. Pour chaque point de la gamme, du tampon d'incubation est placé dans un tube, puis 0,5 mg de protéines microsomales (obtenus précédemment) sont ajoutés, une solution de vitamine K époxyde (concentration finale dans l'incubation 200µM) est ensuite ajoutée. 10µl de la solution d'AVK est enfin placée dans le tube le tampon.

Tableau 5 : Concentrations inhibitrices initiales et finales du lapachol

Tubes	Concentration initiale en mM	Concentration finale en µM
4-5	0,01	0,16
6-7	0,03	0,31
8-9	0,06	0,625
10-11	0,12	1,25
12-13	0,25	2,5
14-15	0,5	5
16-17	1	10

Le DTT déclenchant la réaction enzymatique, il sera ajouté dans le mélange en dernier. Chaque tube doit alors avoir un volume total de 1 ml. Le mélange complet sera ensuite placé au bain marie pendant 30 minutes. Après ces 30 minutes, l'arrêt de la réaction enzymatique sera réalisé par l'ajout de 2ml d'isopropanol dans chaque tube. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3600 G durant 5 minutes à 4°C.

Une fois la centrifugation terminée, les surnageants de centrifugation sont mélangés à 2mL d'hexane. Un vortexage des tubes permet ensuite de resolubiliser la vitamine K réduite. Les tubes sont ensuite recentrifugés à 3600 G durant 5 minutes à 4°C.

Une fois la seconde centrifugation terminée, la phase supérieure de chaque tube est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur, puis placée à l'évaporateur.

Une fois l'évaporation terminée, la vitamine K (déposée sur la paroi des tubes) est récupérée dans 200µl de méthanol. Afin d'être certain d'avoir récupéré l'intégralité de la vitamine K, un vortexage de 15 secondes ou plus est réalisé sur chaque tube. La solution obtenue est enfin transférée dans des vials, dans l'ordre de concentration croissante en K1 quinone. Les vials sont ensuite conservés à 4-8°C.

Dosage en spectrométrie de masse LC/MS APCI de la vitamine K

La détection MS a été effectuée par un simple quadripôle 6120B d'Agilent Technologies en ionisation positive. Une colonne Poroshell 120 C18, 3.5*50mm a été utilisée avec du méthanol/H2O/Acide formique en 96/4/0,1 comme éluant. Les conditions étaient les suivantes : température du gaz de séchage de 280°C, du vaporisateur 380°C. Le mode SIM à 451,6 uma pour la vitamine K quinone et 467,6 uma pour la vitamine K époxyde et une injection de 2µl. La collecte et le traitement des données ont été effectués avec Masshunter™ Poste de travail d'Agilent Technologies.

Temps de coagulation d'écarine

Le temps de coagulation de l'écarine (ECT) est un test de génération de meizothrombine qui permet une quantification précise des inhibiteurs de la thrombine. L'écarine est mélangée à une solution de chlorure de calcium et de chlorure de sodium (à une concentration de 50mM et 9g/l respectivement), puis mise à chauffer à une température de 37°C dans l'analyseur de coagulation Biomérieux, option 2 plus. Parallèlement, 100µl de plasma citraté et une bille de métal (permettant la rotation dans l'appareil) sont mélangés à 40µl de tampon TRIS et à 5µl d'inhibiteur direct de thrombine, puis mis à chauffer pendant 2 minutes dans l'analyseur de coagulation. Au bout de 2 minutes, la réaction est déclenchée par l'ajout de 10µl du mélange écarine/chlorure de calcium/chlorure de sodium à 37°C, la bille commence alors à tourner dans l'appareil jusqu'à la coagulation. L'analyseur de coagulation donne le temps en secondes.

La quantité précise d'écarine est ajustée de façon à obtenir une coagulation en 50-60 secondes.

Temps de Quick

Le temps de Quick est un examen permettant de mesurer la vitesse de coagulation en explorant la voie extrinsèque. Il est généralement compris 11-14 secondes. Pour évaluer cette vitesse de coagulation, un analyseur de coagulation Biomérieux option 2 plus a été utilisé.

Le réactif utilisé, appelé neoplastine, contient du facteur tissulaire dont le rôle est d'activer la coagulation. Ce réactif est chauffé à 37°C. Parallèlement, 100µl de plasma citraté et une bille de métal sont mélangés à 5µl d'inhibiteur direct de thrombine et mis à chauffer pendant 2 minutes dans l'analyseur de coagulation. Au bout de 2 minutes, la réaction est déclenchée par l'ajout de 200µl de neoplastine à 37°C, la bille commence alors à tourner dans l'appareil jusqu'à la coagulation. L'analyseur de coagulation donne le temps en secondes.

Temps d'écarine chromogénique

Au cours de ce test, 165 µl d'une solution constituée de tampon TrisHCl (à 50mM et pH 8,4), de NaCl (9g/L) et d'Héparine (10000 U/I) est mélangé à 5µl de plasma de rat citraté, à 3 µl de substrat chromogénique de thrombine (25 mg repris dans 5ml d'eau distillée) et à 2µl d'inhibiteur direct de la thrombine. Le mélange est ensuite placé à 37°C. puis l'ajout de 10µl d'écarine à une concentration 1mg/ml. Le mélange final sera analysé par un spectromètre UV, afin de suivre la cinétique de la densité optique à 405 nm.

Extraction du lapachol dans le plasma

Des échantillons de plasma (0,1 µl) ont été enrichis avec 100 µl de méthanol. 400 µl d'acétate d'éthyle ont ensuite été ajoutés, puis le mélange total est vortexé pendant 2 minutes. Après une centrifugation du mélange à 5 000 G pendant 10 min, le surnageant a été transféré dans un tube à essai, puis évaporé à sec par de l'azote gazeux à 37°C. Par la suite, 200 µl de méthanol ont été ajoutés au tube afin de reconstituer le résidu. 2 µl de la solution obtenue ont finalement été injectés dans le système LC-MS pour analyse.

Extraction du lapachol dans le foie – Pharmacocinétique

Un extrait de 1g de foie a été enrichi avec 1ml de méthanol. 8ml d'acétate d'éthyle ont ensuite été ajoutés, avant un vortexage de 2 minutes. Le mélange vortexé subit ensuite une centrifugation à 5000 G pendant 10 minutes, puis le surnageant est transféré dans un tube à essai et évaporé à sec par de l'azote gazeux à 37°C. Une reprise par 4ml d'acétonitrile et 2ml d'hexane a été nécessaire. Après centrifugation de ce second mélange, l'élimination de la phase hexane et l'évaporation de la phase acétonitrile à sec sous un débit d'azote gazeux à 37°C a été réalisée. Le résidu a été reconstitué dans 200 µl de méthanol, puis 2 µl de la solution finale ont été injectés dans le système LC-MS pour analyse.

Oxydation microsomale du lapachol par microsomes hépatiques de foies de rats

Un échantillon de 50µl de microsomes de rats, 190µl d'eau purifiée, 250µl de système régénérant (composé du glucose 6 phosphate, de la glucose 6 phosphate déshydrogénase et du NADP) sont mélangés et l'ajout de 10µl de lapachol active la réaction. Incubation pendant 10 minutes puis arrêt de la réaction avec 1,5ml d'acétonitrile. Une centrifugation à 3000 rpm est nécessaire pendant 10 minutes. L'évaporation de la phase acétonitrile à sec sous un débit d'azote gazeux à 37°C a été réalisée. Le résidu a été reconstitué dans 100 µl de méthanol et 2 µl ont été injectée dans le système LC-MS pour analyse.

Dosage en spectrométrie de masse LC/MS APCI du lapachol

La détection MS a été effectuée par un simple quadripôle 6120B d'Agilent Technologies en ionisation négative. Une colonne Poroshell 120 C18, 3.5*150mm a été utilisée avec du méthanol/H2O/Acide formique en 75/25/0,1 comme éluant. Les conditions étaient les suivantes : température du gaz de séchage de 280°C, du vaporisateur 380°C, le mode SIM à 241,1 uma (lapachol) et 257,1 uma (métabolites hydroxylés) et une injection de 2µl. Des spectres de fragmentation (100 à 600 uma) ont été enregistrés dans la surveillance dynamique des réactions simples (SRM). La collecte et le traitement des données ont été effectués avec Masshunter™ Poste de travail d'Agilent Technologies.

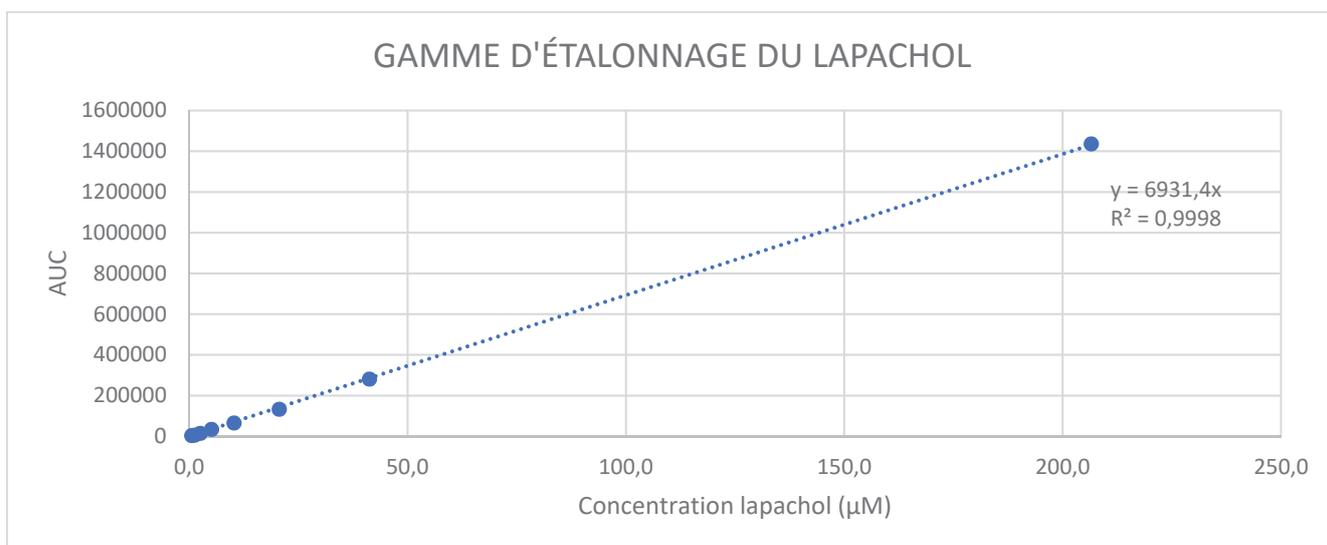
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Le lapachol

Le lapachol est un puissant inhibiteur de l'activité de VKOR chez les microsomes de rats sensibles à la warfarine. Il possède une constante d'inhibition de $3,5\mu\text{M}$ trouvée de manière expérimentale. La concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de l'enzyme VKOR est donc de $3,5\mu\text{M}$ de lapachol (inhibiteur non compétitif). Ce résultat est cohérent à ce que nous trouvons dans la littérature, *Suttie et al* (7), ont montré une constante d'inhibition correspondant à $2\mu\text{M}$ chez les microsomes de rats sensibles à la warfarine.

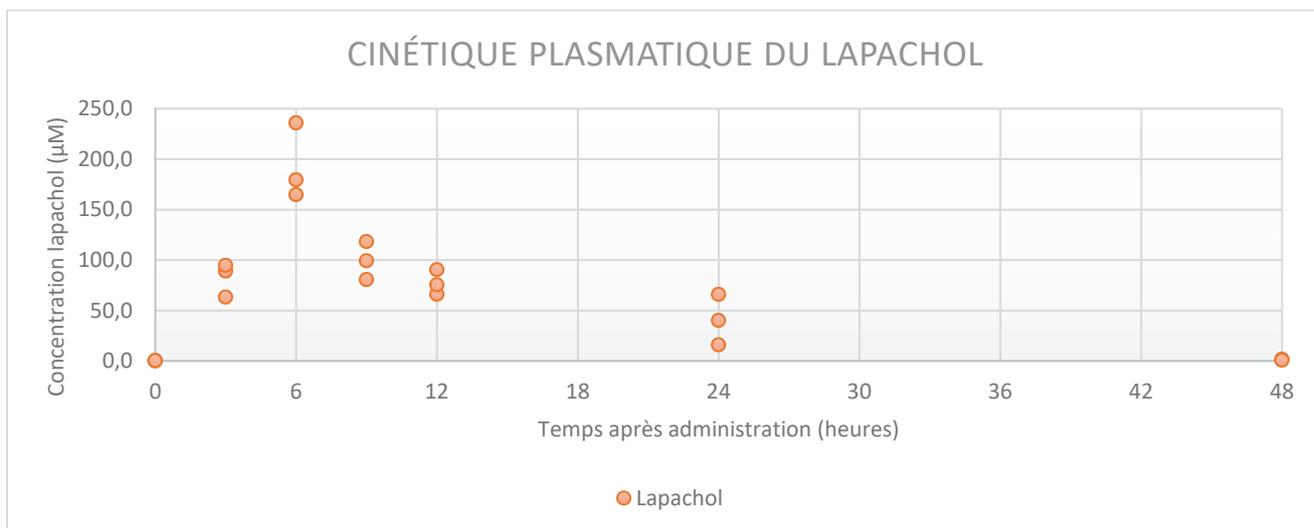
Une mesure du temps de quick du plasma prélevé chez les rats traités au lapachol n'a montré aucune différence par rapport à la mesure de temps de quick normale chez des rats sensibles et non traités.

Pour valider notre méthode de quantification du lapachol dans le plasma, une gamme d'étalonnage a été réalisée avec une supplémentation par le lapachol, représentée dans le graphique 1.



Graphique 1 : Validation de la méthode par gamme d'étalonnage du lapachol

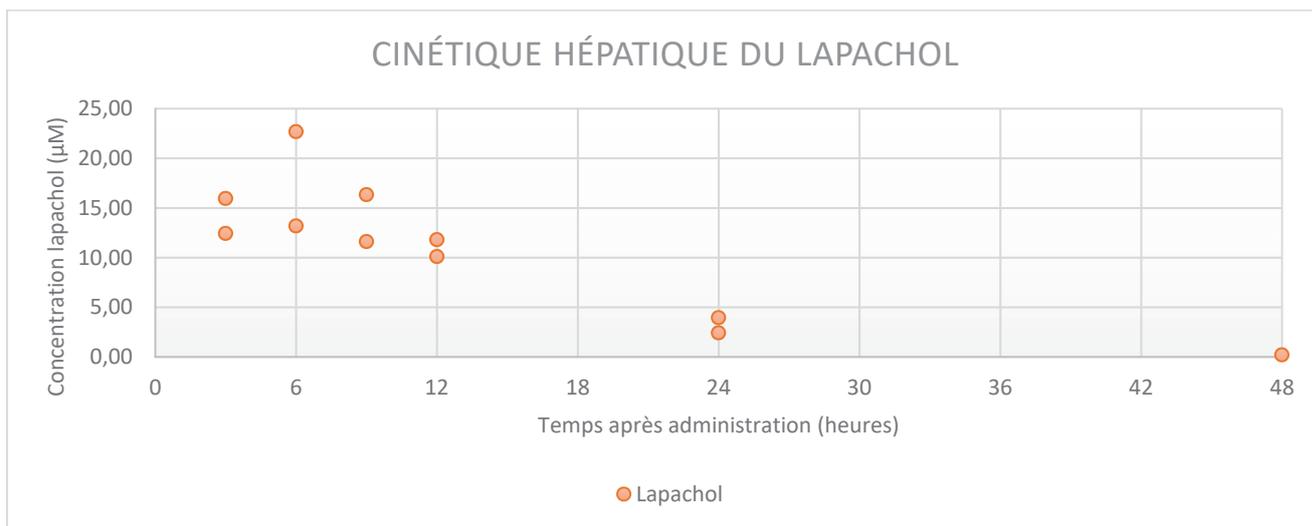
Lorsque le plasma n'est pas supplémenté, nous avons une concentration à $0\mu\text{g/ml}$ de lapachol. Lorsque celui-ci est supplémenté à $130\mu\text{g/ml}$ de lapachol, la concentration observée est de $124\mu\text{g/ml}$, soit un rendement de 94%. La méthode choisie permet donc la détection du lapachol dans le plasma.



Graphique 2 : Pharmacocinétique plasmatique du lapachol

Le graphique 2 représente la cinétique plasmatique du lapachol. Cette cinétique montre une grande concentration plasmatique avec un pic maximum à 6 heures après l'administration du lapachol, une diminution progressive et une disparition du produit vers 48 heures après l'administration.

Les résultats observés concordent avec la description de la pharmacocinétique plasmatique du lapachol de *Bai et al.* (18). En effet, un pic vers 8 heures après l'administration a été observé dans leurs études ainsi qu'un temps de demi-vie d'élimination de 7,62 heures. Ce pic à 6 heures après administration est précoce par rapport au pic obtenu par *Bai et al.* Cette différence pourrait venir de la formule galénique utilisée pour l'administration du lapachol chez le rat. Nous avons utilisé une dilution de lapachol dans une faible quantité de DMSO mélangée à l'huile de maïs alors que *Bai et al.* ont utilisé une dilution à l'eau distillée/chlorure de sodium mélangée avec 1% de polysorbate Tween-80.



Graphique 3 : Pharmacocinétique hépatique du lapachol

Le graphique 3 représente la cinétique hépatique du lapachol. La concentration hépatique du lapachol est nettement inférieure à celle trouvée dans le plasma. Il existe aussi un pic à 6 heures après administration du lapachol avec une diminution progressive jusqu'environ 48 heures après l'administration du lapachol. Le temps de demi-vie d'élimination observé est d'environ 7 heures.

Les résultats de pharmacocinétique hépatique montrent une similitude avec la pharmacocinétique plasmatique mais avec des concentrations nettement inférieures dans le foie. La faible AUC hépatique explique l'effet biologique réduit puisque l'action anticoagulante des antivitamine K s'exerce sur l'inhibition de la VKORC1 et donc sur la gammacarboxylation des facteurs de la coagulation (II, VII, IX et X) produits par le foie.

L'AUC plasmatique est de l'ordre de 10 fois l'AUC hépatique. Cela est probablement dû à un faible effet de premier passage hépatique lié à une forte liaison des protéines plasmatiques. Le coumaphène possède exactement le même type de cinétique contrairement aux anticoagulants rodenticides de 2^{ème} génération, eux-mêmes, possédant une forte concentration hépatique. Le coumaphène, contrairement aux rodenticides de 2^{ème} génération, peut atteindre le fœtus à cause de son importante concentration plasmatique et induire une reprotoxicité provoquant des malformations au niveau nasal chez le rat (49). La similitude des pharmacocinétiques plasmatiques entre le lapachol et le coumaphène, suggère que le lapachol pourrait potentiellement expliquer la reprotoxicité du lapachol chez le rat (23).

Le faible temps de demi-vie d'élimination du lapachol pose un problème par rapport à cette molécule qui pourrait être un nouvel anticoagulant rodenticide. Cette élimination étant courte,

nous n'avons donc pas une concentration adéquate. L'hypothèse d'un fort métabolisme pourrait expliquer ce temps de demi-vie d'élimination court. Au vu de la structure chimique du lapachol, il pourrait subir des hydroxylations, des glucurononconjugaisons directes ou à la suite d'hydroxylations.

Afin d'évaluer le métabolisme du lapachol, un dosage avec LC/MS APCI en mode négatif à 241,1 uma a montré 2 pics avec un temps de rétention de 6,5 minutes correspondant au lapachol standard et un second pic à 2,43 minutes, représenté dans la figure 17.

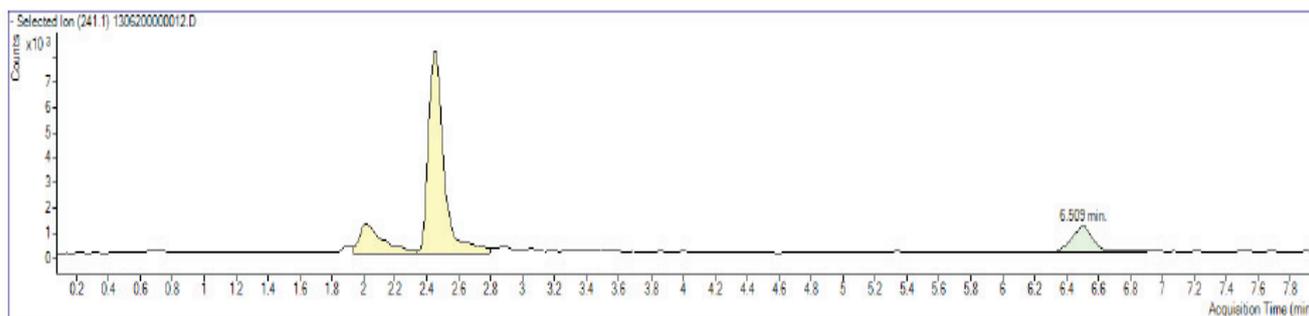


Figure 17 : Dosage du lapachol en mode négatif APCI, à 241,1 uma

L'analyse spectrométrique du standard analytique lapachol nous montre un fragment majoritaire à 241,1 uma, un fragment à 217,9 uma et un fragment à 185,9 uma.

L'analyse spectrométrique du pic avec un temps de rétention de 2,43 minutes nous montre également un fragment majoritaire à 241,1 uma, un fragment à 218,1 uma, un fragment à 186,0 uma. Ces fragments n'apparaissent que pendant la pharmacocinétique du lapachol entre le prélèvement fait 3 heures et 24 heures après le gavage chez le rat et absents avant et 48 heures après l'administration.

Le spectre à 2,43 minutes possède une similitude très importante avec le spectre du lapachol mais ayant un temps de rétention beaucoup plus faible (2,43 minutes) que celui du lapachol (6,5 minutes), le composé correspondant à ce premier pic doit être beaucoup plus hydrophile que le lapachol. Ce pic présente une surface 4 fois supérieure au pic du lapachol.

En outre, le spectre possède un fragment supplémentaire à 451,1 uma, ce qui semblerait indiquer que ce pic soit un métabolite du lapachol.

Une étude supplémentaire en LC/MS/MS permettrait de reconnaître la relation entre 451,1 et 241,1 uma pour ce pic et éventuellement identifier la masse moléculaire du composé parental dont l'ion fils correspondrait au lapachol et donc de proposer une structure de ce possible métabolite.

Les figures 18 et 19 montrent les spectres des pics à 2,43 et 6,5 minutes.

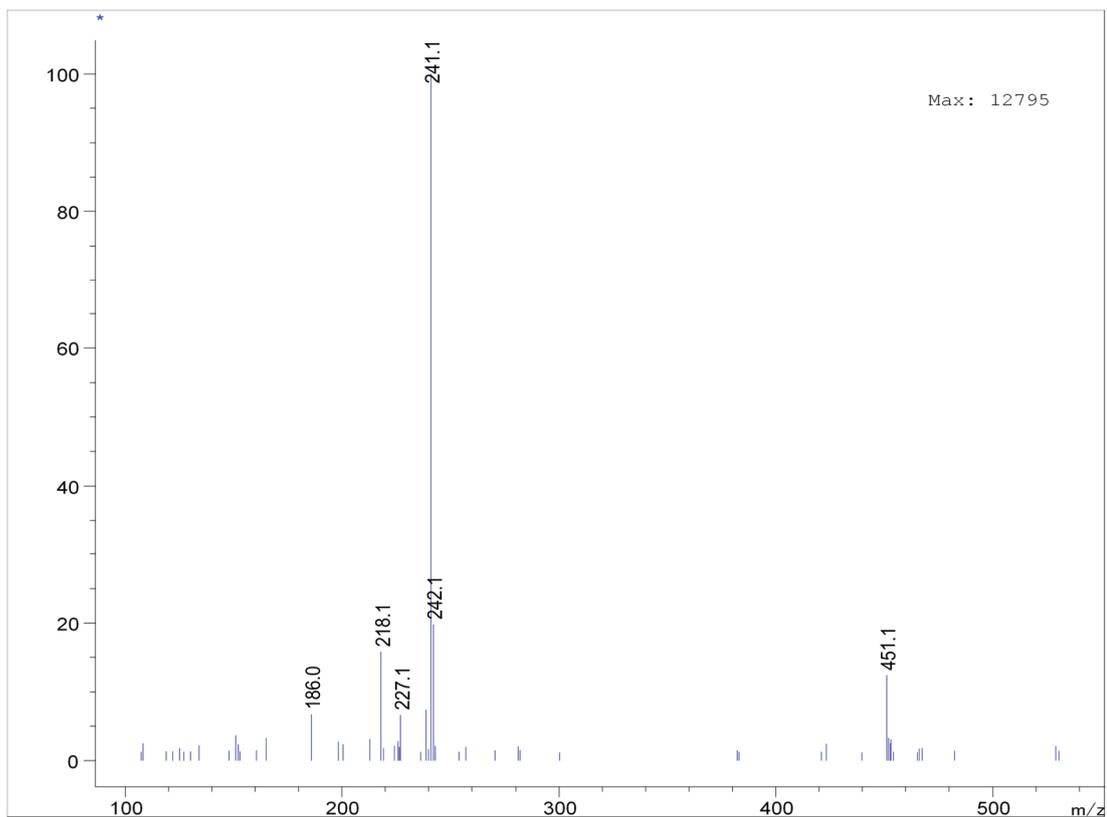


Figure 18 : Spectre du pic à un temps de rétention de 2,43 minutes

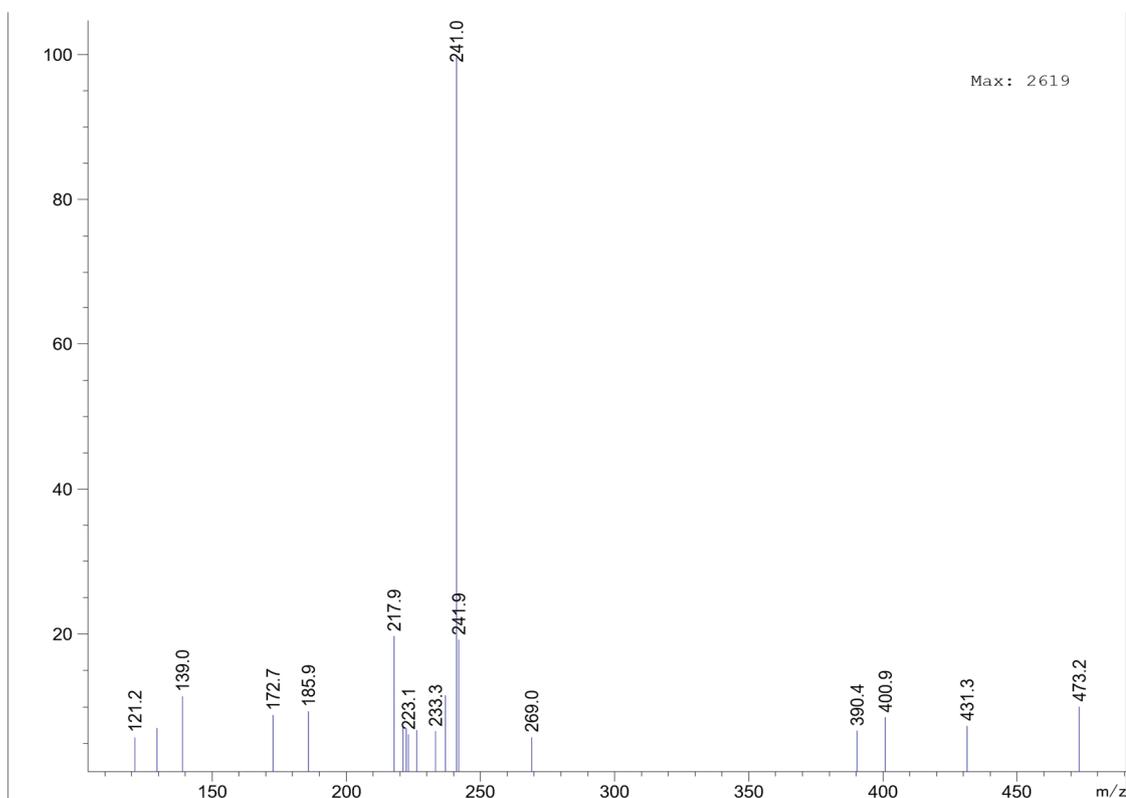
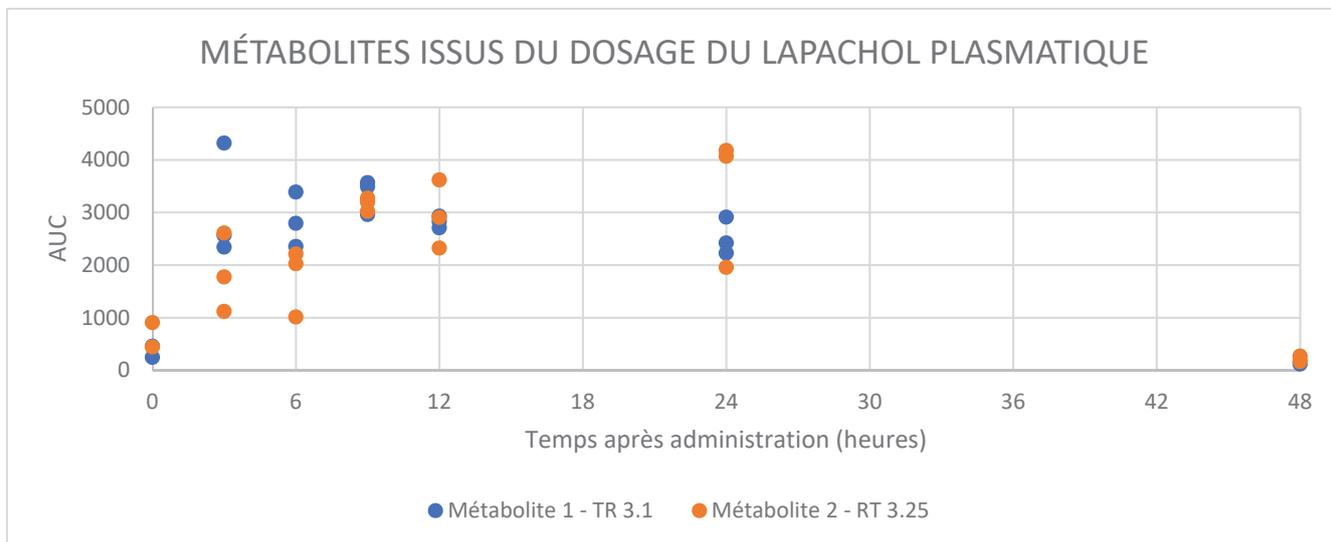


Figure 19 : Spectre du pic à un temps de rétention de 6,5 minutes

De plus, lors du dosage du lapachol plasmatique, il est possible de repérer deux molécules de poids moléculaires de l'ordre de 257 uma, pouvant suggérer une hydroxylation du lapachol, puisque la masse moléculaire de celui-ci en mode négatif est de 241,1 uma et la masse moléculaire d'une hydroxylation est de 16 uma. Ces métabolites sont représentés dans le graphique 4.



Graphique 4 : Métabolites issus du dosage du lapachol plasmatique

Ces mêmes métabolites sont retrouvés dans les extraits hépatiques des animaux traités. Une des hypothèses émises, serait que le fragment à 451,1 uma correspondrait à une glucuroconjugaison du lapachol avec un acide glucuronique de masse moléculaire de 196 uma à la suite de son hydroxylation :

Lapachol à 242,27 uma + Hydroxylation à 16 uma + Acide glucuronique à 194,139 uma = 452,4 uma - 1 uma (APCI négatif) = 451,4 uma ce qui reste très proche du fragment 451,1 uma trouvé.

Etant donné que le métabolisme est souvent cytochrome dépendant, il est nécessaire de réaliser une oxydation NADPH dépendante *in vitro*. On observe deux pics à, respectivement, 5,8 et 6,5 minutes, représentés dans la figure 20.

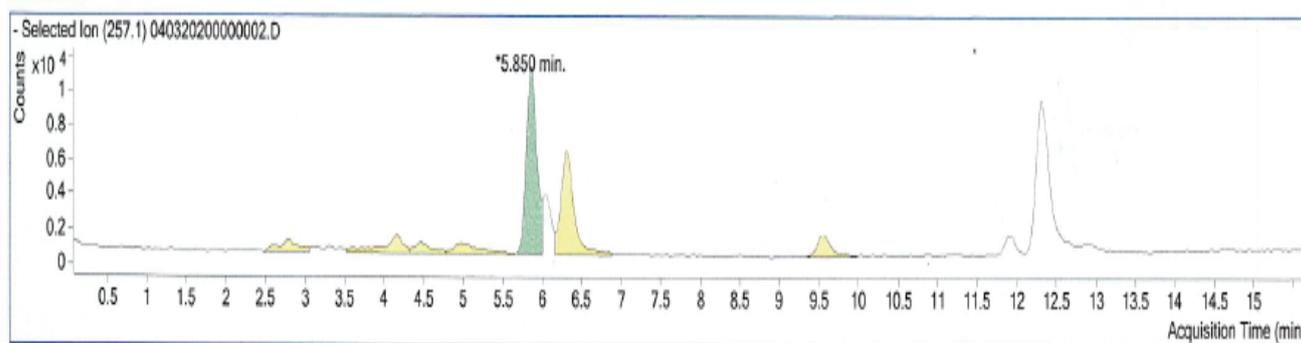


Figure 20 : Oxydation NADPH dépendante du lapachol

La séparation n'a pas été réalisée sur le même système HPLC gradient [(méthanol/acide formique (99,9/0,1 %) vs H₂O/Acide formique (99,9/0,1%)]. Néanmoins, il est très probable que ces métabolites soient les mêmes que ceux observés dans le plasma ceci reste à confirmer.

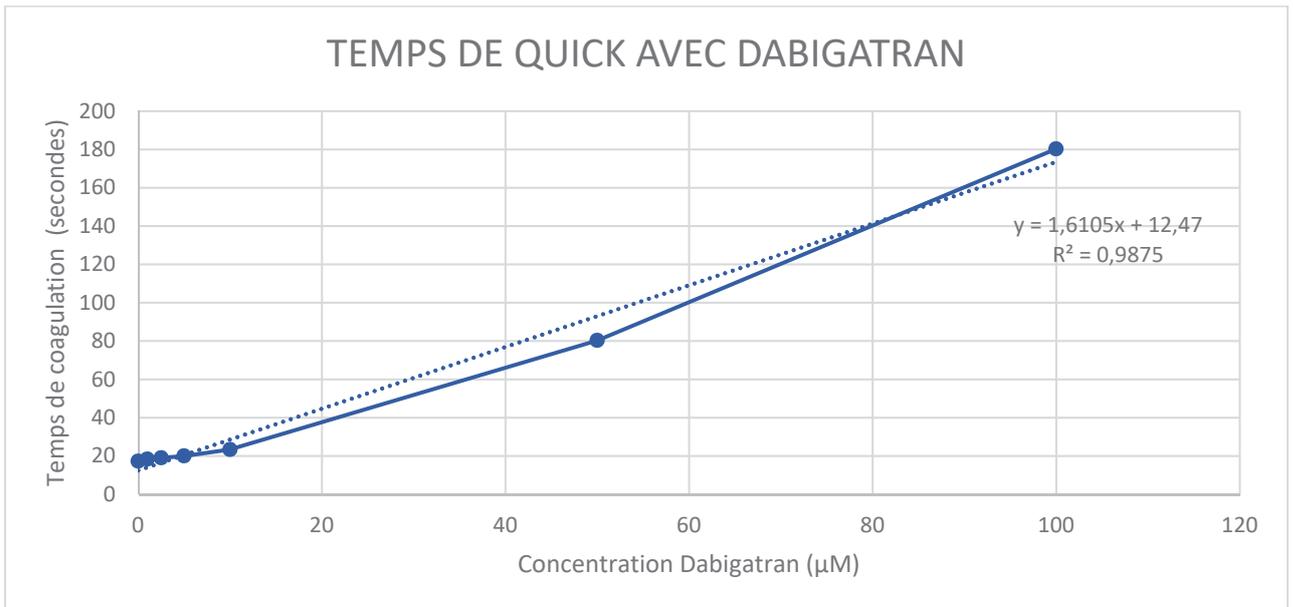
Il semblerait que le lapachol subisse une métabolisation cytochrome dépendante, plus particulièrement, une hydroxylation. Il existe énormément d'inhibiteurs naturels des cytochromes P450 tels que la quercétine issue du ginkgo biloba, l'ail, entres autres, qui pourraient moduler cette inhibition pour permettre d'augmenter le temps de demi-vie d'élimination et donc moduler l'activité anticoagulante du lapachol.

2. La curcumine

Pour mesurer la capacité d'inhibition de la curcumine, probablement inhibiteur direct de la thrombine, 3 tests ont été réalisés : un temps de Quick, un temps de coagulation par l'écarine (50) et un test chromogénique à base d'écarine (36). Afin de valider ces 3 méthodes, un inhibiteur direct de la thrombine, le dabigatran, a été utilisé.

Temps de Quick avec le dabigatran :

Les concentrations de dabigatran allant de 100µM à 1µM (dans le milieu d'incubation) respectivement correspondant à un temps supérieur à 600 secondes jusqu'à 17 secondes, représentées dans le graphique 5.

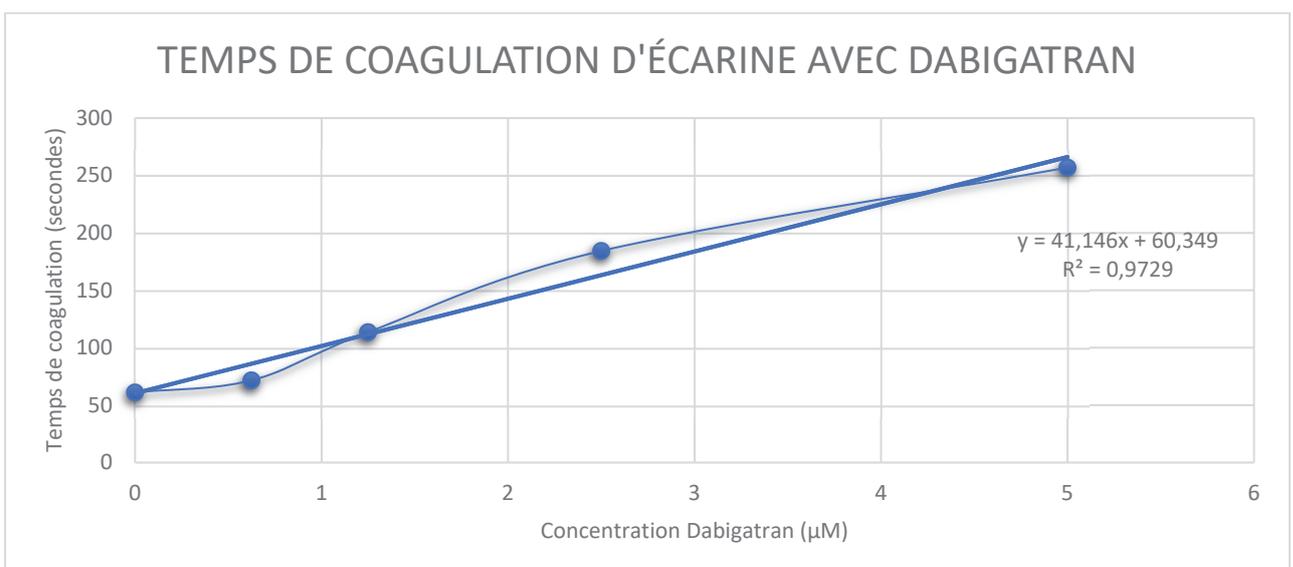


Graphique 5 : Temps de Quick avec le dabigatran

Les concentrations de dabigatran sont corrélées au temps de coagulation du plasma. Plus il y a une augmentation de la concentration, plus le temps de coagulation est long. Il y a donc un allongement modéré du temps de Quick lors de l'utilisation du dabigatran.

Temps de coagulation par l'écarine avec le dabigatran :

Les concentrations de dabigatran allant de 100µM à 0,625µM (dans le milieu d'incubation) respectivement correspondant à un temps supérieur à 600 secondes jusqu'à 60 secondes, représentées dans le graphique 6.



Graphique 6 : Temps de coagulation d'écarine avec le dabigatran

Ce test induit la formation de meizothrombine par l'ajout d'écarine. La meizothrombine est un produit intermédiaire de la formation de thrombine, elle permet donc la transformation du fibrinogène en fibrine (36).

Les concentrations de dabigatran sont corrélées au temps de coagulation du plasma, c'est-à-dire, une augmentation de la concentration de dabigatran conduit à une augmentation du temps de coagulation. L'inhibition de la meizothrombine par le dabigatran empêche la conversion de fibrinogène en fibrine et donc l'allongement du temps de coagulation d'écarine.

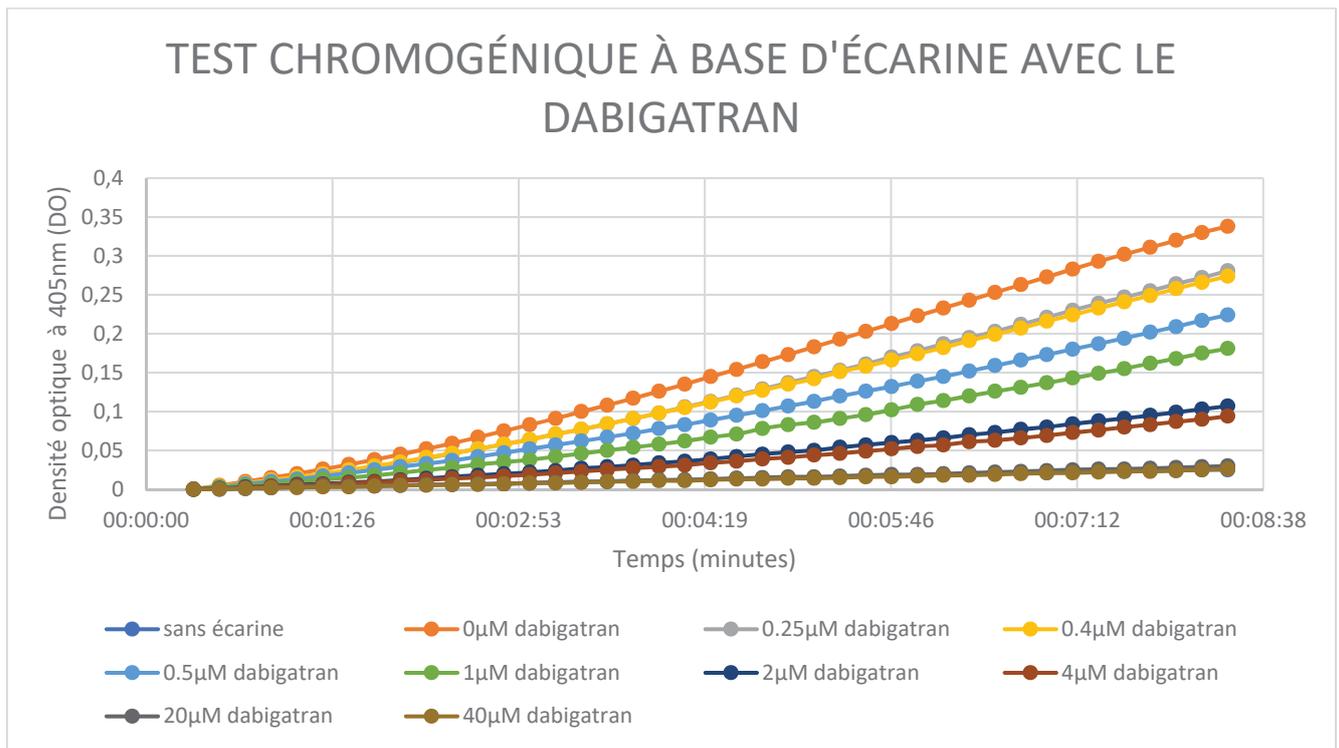
La génération permanente de meizothrombine dépend donc de la présence de prothrombine plasmatique et non de sa concentration.

La quantité d'écarine a été initialement choisie de manière à atteindre un niveau raisonnable temps de coagulation, environ 50-60 secondes.

Ce résultat est cohérent par rapport à ce que l'on trouve dans la littérature, notamment, Samuelson et al. ont confirmé la bonne corrélation et une forte sensibilité du temps de coagulation par l'écarine avec les concentrations plasmatiques de dabigatran (51).

Test chromogénique à base d'écarine avec le dabigatran :

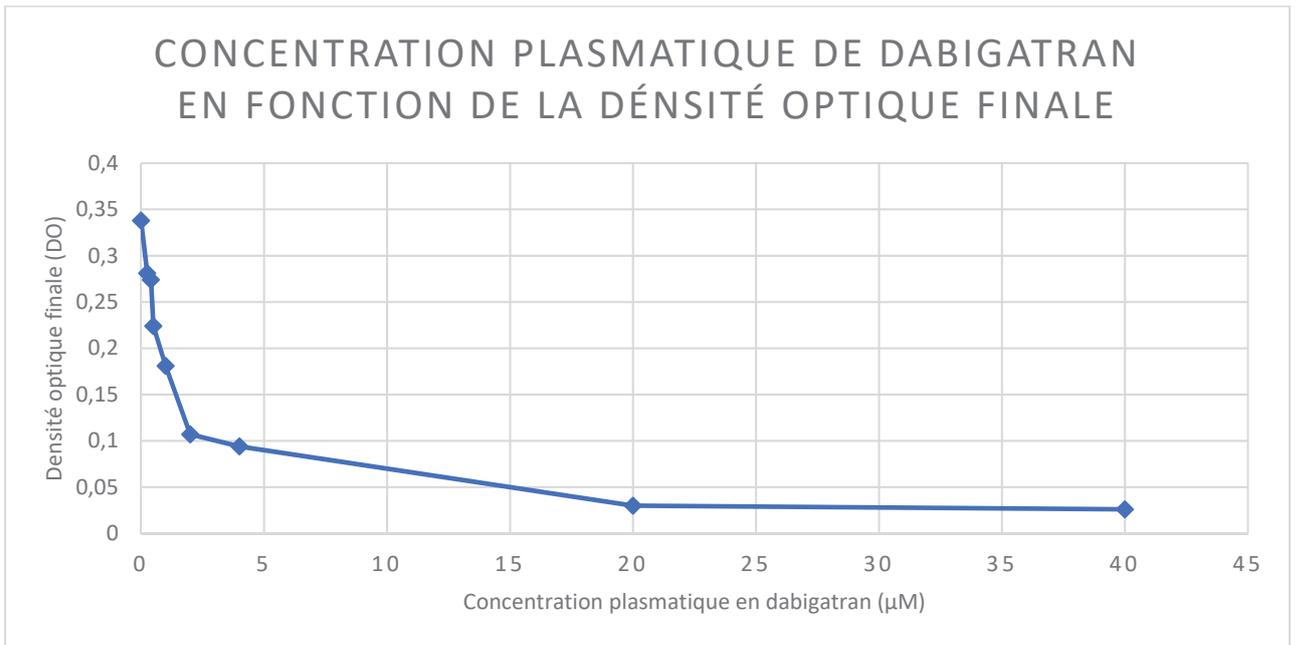
Les résultats du test chromogénique à base d'écarine avec le dabigatran montre une augmentation du temps en fonction de la concentration plasmatique du dabigatran. Cette méthode a été choisie dans le but de montrer qu'une inhibition du facteur IIa ou thrombine allonge le temps de coagulation. Le graphique 7 représente ce test en présence de dabigatran.



Graphique 7 : Test chromogénique à base d'écarine avec le dabigatran

Ce test induit la formation de meizothrombine par l'ajout d'écarine, celle-ci clive le substrat chromogénique thrombinique provoquant une libération massive de p-nitroaniline. C'est la p-nitroaniline qui permet le changement de densité optique et donc l'analyse de l'inhibition de la thrombine (36).

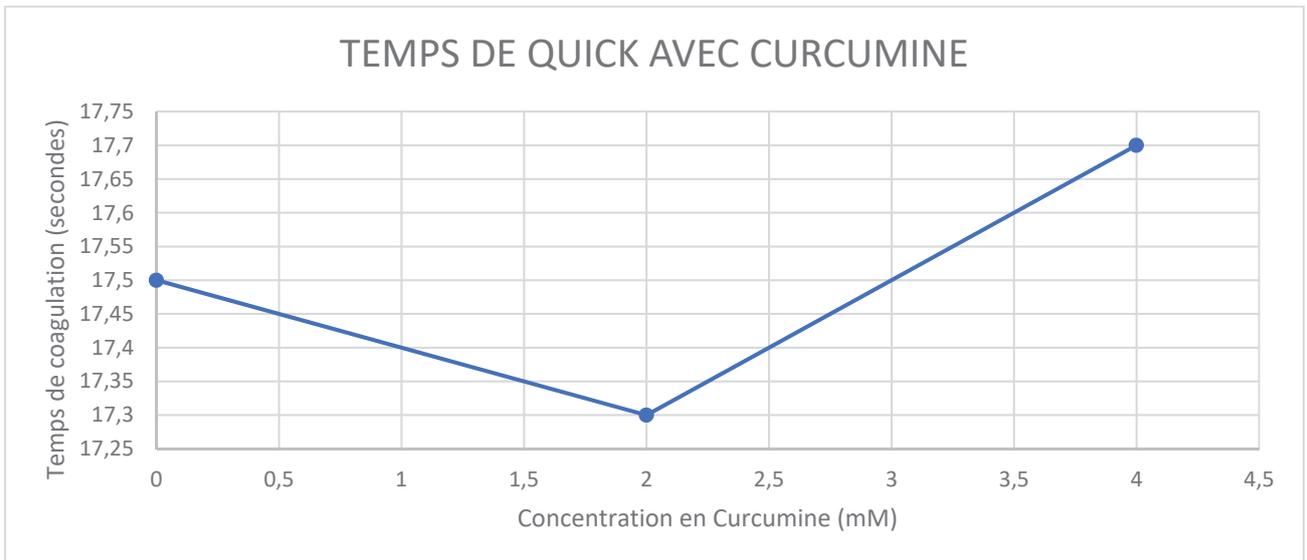
Le graphique 8 représente les résultats montrant un changement de la densité optique au fil du temps selon les différentes concentrations de dabigatran. Lorsque le dabigatran est en faible concentration, la densité optique obtenue est importante. Lorsque le dabigatran est en grande concentration, la densité optique est moins importante. Ce résultat traduit une inhibition de la meizothrombine par le dabigatran en fonction de sa concentration, qui provoque une diminution du clivage du substrat chromogénique thrombinique. Ceci induit une diminution de la libération du p-nitroaniline et donc une diminution de la densité optique.



Graphique 8 : Concentration plasmatique de dabigatran en fonction de la densité optique finale

Cette méthode montre que le dabigatran est bien un inhibiteur direct de la thrombine. Si la curcumine se comporte comme un inhibiteur direct de la thrombine aussi, on devrait obtenir des résultats similaires.

Temps de Quick avec la curcumine :

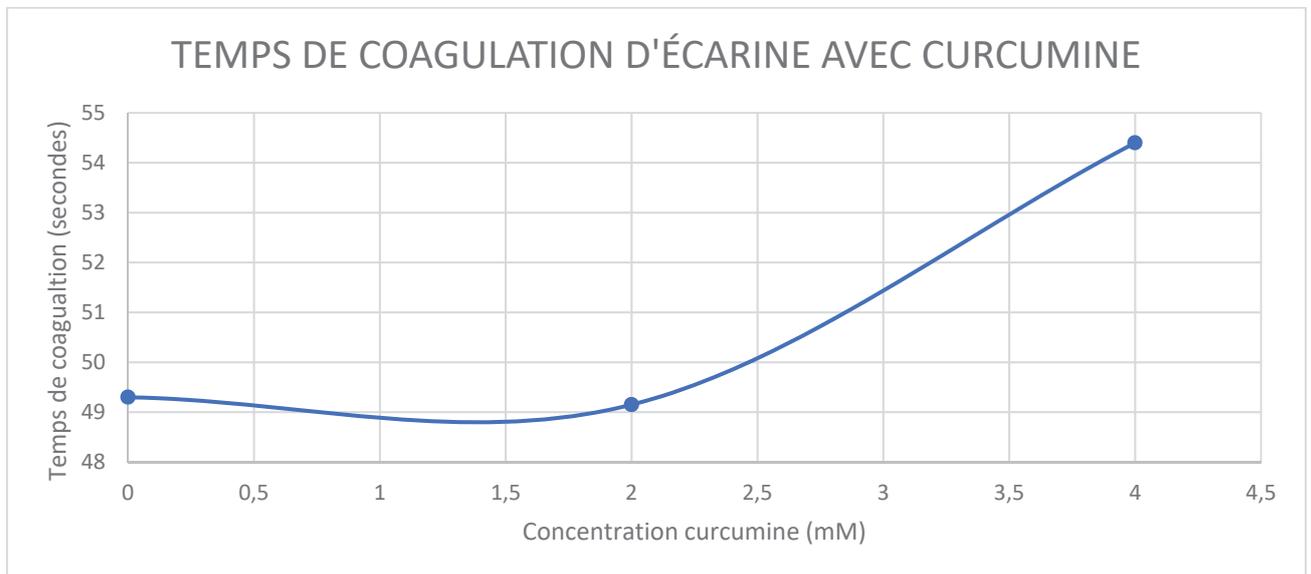


Graphique 9 : Temps de Quick avec la curcumine

Le graphique 9 représente les résultats de temps de Quick en présence de curcumine. Ils ne montrent aucune augmentation du temps de Quick lors de l'utilisation de la curcumine. Les

résultats restent constants et très proche des valeurs que l'on obtient normalement sans un inhibiteur de thrombine.

Temps de coagulation par l'écarine avec la curcumine :

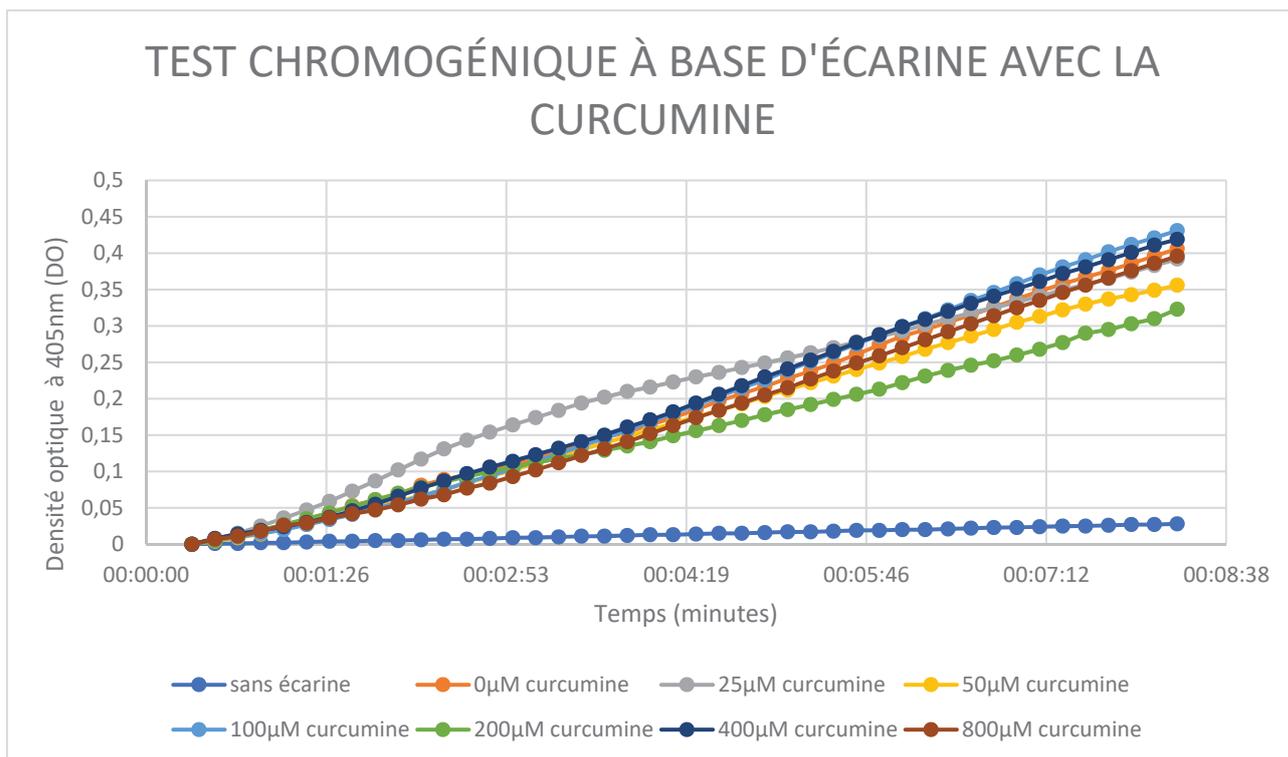


Graphique 10 : Temps de coagulation d'écarine avec curcumine

Le graphique 10 montre le temps de coagulation par l'écarine en présence de curcumine. Les résultats montrent une légère augmentation du temps de coagulation par l'écarine lorsque l'on augmente les concentrations de curcumine. Nous avons une augmentation de 5 secondes alors que pour le dabigatran l'augmentation était de l'ordre de 200 secondes.

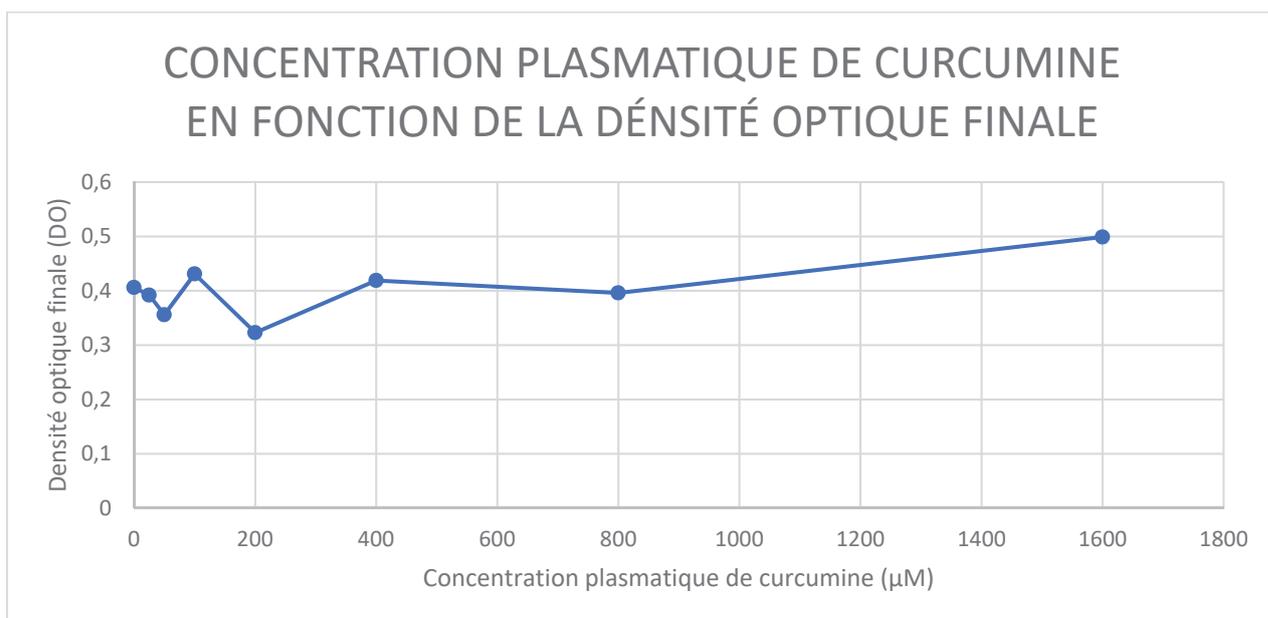
Il est difficile d'augmenter la concentration de curcumine pour explorer l'augmentation du temps de coagulation dans ce test puisque la concentration de 4mM dans le plasma est déjà une grande concentration et la dépasser ne reflèterait pas la réalité.

Test chromogénique à base d'écarine avec la curcumine :



Graphique 11 : Test chromogénique à base d'écarine avec la curcumine

Le graphique 11 représente le test chromogénique à base d'écarine avec la curcumine. Les résultats obtenus ne montrent aucune corrélation entre la concentration en curcumine et l'inhibition de l'activité thrombine.



Graphique 12 : Concentration plasmatique de curcumine en fonction de la densité optique finale

Le graphique 12 représente la concentration plasmatique de curcumine en fonction de la densité optique finale. Aucune corrélation entre la densité optique finale ainsi que la pente de la densité optique en fonction du temps et la concentration en curcumine. Nous n'avons donc pas d'effet sur l'inhibition de la thrombine.

Ces paramètres sont en accord avec l'étude de *Liu et al.* (33), montrant que la curcumine peut avoir des impacts au niveau de la pharmacocinétique, en revanche, aucun changement dans la pharmacodynamie et donc dans l'agrégation plaquettaire ou au niveau de la coagulation.

Malgré le fort potentiel observé dans des nombreux articles dans la littérature scientifique concernant la curcumine, nous avons constaté qu'expérimentalement, les résultats semblent être très différents avec une activité anticoagulante très faible. De ce fait, et en l'absence de l'activité anticoagulante espérée de la curcumine, nous n'avons donc pas réalisé les autres études prévues concernant la potentialisation de l'effet anticoagulant du lapachol via la curcumine.

CONCLUSION GENERALES

THESE SOUTENUE PAR Mme FUENZALIDA VASQUEZ Valentina

Ce travail porte sur l'activité anticoagulante que peuvent posséder les plantes et la manière dont nous pouvons les utiliser afin de remplacer les produits chimiques ou potentialiser ces derniers.

Nous avons donc choisi deux plantes avec un grand potentiel anticoagulant d'après la littérature scientifique. Le lapachol étant un similaire à la warfarine au niveau du mécanisme d'action et la curcumine ayant un potentiel inhibiteur direct au niveau de la thrombine.

Les études pharmacocinétiques plasmatiques et hépatiques du lapachol montrent les propriétés anticoagulantes exercées sur la vitamine K. La concentration plasmatique importante par rapport à la concentration hépatique du lapachol suggère une pharmacocinétique similaire au coumaphène (warfarine), antivitamine K de première génération utilisé depuis de nombreuses années et étant l'AVK le plus prescrit dans le monde en thérapie humaine.

La balance entre les concentrations plasmatiques et les concentrations hépatiques peuvent être à l'origine d'une reprotoxicité du lapachol, ce qui empêcherait l'utilisation chez l'Homme en tant qu'anticoagulant. L'utilisation du lapachol comme un rodenticide est actuellement limitée par son fort métabolisme et donc une faible efficacité. Pour pallier ce manque d'efficacité, une inhibition du métabolisme ainsi qu'une administration de plusieurs doses peuvent être envisagées, ce qui permettrait l'amélioration du lapachol en tant que rodenticide.

Concernant la curcumine, elle n'a pas montré une inhibition de la thrombine dans les tests de coagulation réalisés *in vitro*. Malgré une reproduction exacte de ce qu'il était écrit dans la littérature, nous n'avons pas réussi à obtenir les résultats présentés dans l'article de *Kim et al.* Nous espérons avoir une forte interaction entre un anticoagulant naturel tel le lapachol qui provoquerait une diminution de la prothrombine et de la curcumine que l'on pensait être inhibitrice directe de la thrombine. Au vu des résultats obtenus sur l'effet de la curcumine, nous avons conclu que cette interaction est finalement peu prometteuse.

D'autres pistes peuvent encore être explorées au niveau de l'inhibition de la thrombine. Des extraits des nombreuses plantes comme le ginkgo biloba, l'ail, entres autres, présentent des résultats *in vitro* très encourageants.

Le Président de la thèse,
Nom : C.Vinciguerra

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **14 FEV. 2022**
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Signature :

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeur C. DUSSART

FUENZALIDA VASQUEZ
(CC BY-NC-ND 2.0)

Bibliographie

1. Chemical control of rodents and its impact on rodent infestations during subsequent cropping season [Internet]. [cité 24 nov 2021]. Disponible sur: <http://www.tandfonline.com/doi/epub/10.1080/09670874.2020.1861362?needAccess=true>
2. Desvars-Larrive A, Pascal M, Gasqui P, Cosson J-F, Benoît E, Lattard V, et al. Population genetics, community of parasites, and resistance to rodenticides in an urban brown rat (*Rattus norvegicus*) population. PLoS ONE [Internet]. 8 sept 2017 [cité 4 juin 2020];12(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5590879/>
3. FR_Sustainable-use-of-rodenticides-as-biocide.pdf [Internet]. [cité 25 nov 2021]. Disponible sur: https://hnlkg4f5wdw34kx1a1e9ygem-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2017/01/FR_Sustainable-use-of-rodenticides-as-biocide.pdf
4. Roland S, Rémi G. Odorat et goût: De la neurobiologie des sens chimiques aux applications. Quae; 2013. 575 p.
5. Stafford DW. The vitamin K cycle. J Thromb Haemost. 2005;3(8):1873-8.
6. DeClementi C, Sobczak BR. Common Rodenticide Toxicoses in Small Animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract. mars 2012;42(2):349-60.
7. Preusch PC, Suttie JW. Lapachol inhibition of vitamin K epoxide reductase and vitamin K quinone reductase. Arch Biochem Biophys. nov 1984;234(2):405-12.
8. Keihanian F, Saeidinia A, Bagheri RK, Johnston TP, Sahebkar A. Curcumin, hemostasis, thrombosis, and coagulation. J Cell Physiol. 2018;233(6):4497-511.
9. Dodds WJ. Hemostasis and Coagulation**Supported in part by NIH research grants HL09902 and HL07173 awarded by the National Heart, Lung, and Blood Institute, PHS/DHEW. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals [Internet]. Elsevier; 1980 [cité 6 juin 2020]. p. 671-718. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012396350550022X>
10. de Revel T. Physiologie de l'hémostase The Normal Haemostatic Process. :11.
11. Jobin F. L'hémostase. Presses Université Laval; 1995. 516 p.
12. Tie J-K, Stafford DW. Functional Study of the Vitamin K Cycle Enzymes in Live Cells. In: Methods in Enzymology [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 7 juin 2020]. p. 349-94. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687916303792>
13. Loriot M-A, Beaune P. La vitamine K époxyde réductase: du sang neuf dans les traitements anticoagulants oraux. Rev Médecine Interne. déc 2006;27(12):979-82.
14. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H-J, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature. févr 2004;427(6974):537-41.
15. Garcia AA, Reitsma PH. VKORC1 and the Vitamin K Cycle. In: Vitamins & Hormones [Internet]. Elsevier; 2008 [cité 7 juin 2020]. p. 23-33. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672907000027>
16. Herbal Medicinals: Selected Clinical Considerations Focusing on Known or Potential Drug-Herb Interactions | Complementary and Alternative Medicine | JAMA Internal Medicine | JAMA Network [Internet]. [cité 15 nov 2021]. Disponible sur: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/210330>

17. Gault G, Lefebvre S, Benoit E, Lattard V, Grancher D. Variability of ferulenol and ferprenin concentration in French giant fennel (*Ferula sp.*) leaves. *Toxicol.* 1 juill 2019;165:47-55.
18. Bai L, Han Y, Xu P, Xia B, Zhao Y, Li X, et al. Plasma pharmacokinetics and brain distribution kinetics of lapachol in rats using LC-MS and microdialysis techniques. *RSC Adv.* 2017;7(84):53355-61.
19. Maistro E, Fernandes D, Pereira F, Andrade S. Lapachol Induces Clastogenic Effects in Rats. *Planta Med.* juin 2010;76(09):858-62.
20. Gómez Castellanos JR, Prieto JM, Heinrich M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)—A global ethnopharmacological commodity? *J Ethnopharmacol.* janv 2009;121(1):1-13.
21. Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 juin 2008;229(2):232-8.
22. Gaillard D, Mitjavila S, Derache R. Activite enzymatique, au niveau des microsomes hepatiques du rat, apres administration d'acides phenoliques. *Food Cosmet Toxicol.* juin 1974;12(3):303-11.
23. Felício AC, Chang CV, Brandão MA, Peters VM, Guerra M de O. Fetal growth in rats treated with lapachol. *Contraception.* oct 2002;66(4):289-93.
24. Hakura A, Mochida H, Tsutsui Y, Yamatsu K. Mutagenicity and Cytotoxicity of Naphthoquinones for Ames Salmonella Tester Strains. *Chem Res Toxicol.* juill 1994;7(4):559-67.
25. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* oct 2014;116(1):1-7.
26. Kim D-C, Ku S-K, Bae J-S. Anticoagulant activities of curcumin and its derivative. *BMB Rep.* avr 2012;45(4):221-6.
27. Bachmeier B, Nerlich A, Iancu C, Cilli M, Schleicher E, Vené R, et al. The Chemopreventive Polyphenol Curcumin Prevents Hematogenous Breast Cancer Metastases in Immunodeficient Mice. *Cell Physiol Biochem.* 2007;19(1-4):137-52.
28. Inoue K, Nomura C, Ito S, Nagatsu A, Hino T, Oka H. Purification of Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin by High-Speed Countercurrent Chromatography. *J Agric Food Chem.* 22 oct 2008;56(20):9328-36.
29. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr Sci.* 2004;87(1):10.
30. Joshi J, Ghaisas S, Vaidya A, Vaidya R, Kamat D, Bhagwat A, et al. Early Human Safety Study of Turmeric Oil (*Curcuma longa* Oil) Administered Orally in Healthy Volunteers. 2003;51:6.
31. Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, Manohar BM, Lokanadam B, Puvanakrishnan R. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. *Int J Biochem Cell Biol.* oct 2004;36(10):1967-80.
32. Rattis BAC, Ramos SG, Celes MRN. Curcumin as a Potential Treatment for COVID-19. *Front Pharmacol.* 2021;12:1068.
33. Liu A-C, Zhao L-X, Lou H-X. Curcumin Alters the Pharmacokinetics of Warfarin and Clopidogrel in Wistar Rats but Has No Effect on Anticoagulation or Antiplatelet Aggregation. *Planta Med.* 27 juin 2013;79(11):971-7.

34. dossier_examens_biologie__temps_quick_tq_taux_prothrombine_tp.pdf [Internet]. [cité 20 nov 2021]. Disponible sur: https://www.pharmacie-decaroli.com/sites/pharmacenter.maneki-web.com/files/dossier_examens_biologie__temps_quick_tq_taux_prothrombine_tp.pdf
35. Guéret DP. LES NOUVEAUX ANTICOAGULANTS : LE POINT DE VUE DU BIOLOGISTE. 2013;10.
36. Lange U, Nowak G, Bucha E. Ecarin Chromogenic Assay – A New Method for Quantitative Determination of Direct Thrombin Inhibitors Like Hirudin. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33(4):184-91.
37. Les anticoagulants oraux [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 8 juin 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2851086/fr/les-anticoagulants-oraux
38. Rouleau-Mailloux É. Étude pharmacogénomique de la warfarine et de l'activité physique. :95.
39. Hamed A. Résistance de cible aux antivitamines K : Analyses des conséquences catalytiques de différentes mutations de VKORC1 et étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1. 2013.
40. Résumé des caractéristiques du produit - COUMADINE 5 mg, comprimé sécable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 22 nov 2021]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=63245753&typedoc=R#RcpPropPharmacocinetiques>
41. Résumé des caractéristiques du produit - SINTROM 4 mg, comprimé quadrisécable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 22 nov 2021]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=61510352&typedoc=R>
42. Résumé des caractéristiques du produit - PREVISCAN 20 mg, comprimé quadrisécable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 22 nov 2021]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=68133651&typedoc=R>
43. anx_150193_fr.pdf [Internet]. [cité 22 nov 2021]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210111150193/anx_150193_fr.pdf
44. anx_150930_fr.pdf [Internet]. [cité 22 nov 2021]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2021/20210331150930/anx_150930_fr.pdf
45. Baud F, Garnier R. Toxicologie clinique. 6e éd. Paris: Lavoisier Médecine-sciences; 2017.
46. Damin-Pernik M, Espana B, Lefebvre S, Fourel I, Caruel H, Benoit E, et al. Management of Rodent Populations by Anticoagulant Rodenticides: Toward Third-Generation Anticoagulant Rodenticides. *Drug Metab Dispos*. févr 2017;45(2):160-5.
47. Jacquot M. Usage des rodenticides anticoagulants et conséquences en termes d'exposition et d'impact pour les populations de renard roux. 8 nov 2013 [cité 7 déc 2019]; Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00917412>
48. Jacquot M. Usage des rodenticides anticoagulants et conséquences en termes d'exposition et d'impact pour les populations de renard roux. :209.
49. Chetot T, Taufana S, Benoit E, Lattard V. Vitamin K antagonist rodenticides display different teratogenic activity. *Reprod Toxicol*. avr 2020;93:131-6.

50. Nowak G. The Ecarin Clotting Time, a Universal Method to Quantify Direct Thrombin Inhibitors. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(4):173-83.
51. Samuelson BT, Cuker A, Siegal DM, Crowther M, Garcia DA. Laboratory Assessment of the Anticoagulant Activity of Direct Oral Anticoagulants. *Chest.* janv 2017;151(1):127-38.

Annexes

Revue Ethique d'un Projet d'utilisation d'animaux à des fins scientifiques Comité d'Ethique de VetAgro Sup n°18
Numéro Comité d'Ethique : 2022 Numéro du MENESR :
Titre du Projet : «Evaluation de la capacité de substance naturelles d'origine végétale à potentialiser l'activité de rodenticides anticoagulants antivitamine K naturels ou synthétiques».
Demandeur : Virginie Lattard Responsable de la mise en œuvre en conformité avec l'autorisation : Etablissement Utilisateur : USC1233 – Campus vétérinaire Date de l'avis : 02/04/20
<input checked="" type="checkbox"/> Avis Favorable <input type="checkbox"/> Avis Favorable sous réserve de modification de la version proposée (version 2) <input type="checkbox"/> Avis Favorable sous condition d'apporter des réponses aux questions posées <input type="checkbox"/> Avis Non Favorable en l'état
Commentaires : En complément à cette saisine, les membres du comité d'éthique ont tenu compte des réponses apportées aux questions posées sur : <ul style="list-style-type: none">- les essais en pharmacocinétique qui visent à déterminer l'effet anti-coagulant de rodenticides connus : nous avons bien noté que vous disposez déjà de données pour certaines molécules et certaines souches, mais que vous devez obtenir des résultats avec un plus grand nombre de molécules, avec d'autres lignées de rats- participation d'une stagiaire en master : Cette étudiante ne participera pas aux essais in vivo qui peuvent mener à la mort des animaux. L'avis est globalement favorable pour le projet, considéré comme sévère. Vous êtes invités à communiquer régulièrement l'évaluation de la gravité réelle des procédures réalisées, au comité d'éthique, pour nous aider à un suivi régulier.

Attention : Dès réception de votre dossier en provenance du MESR, il vous sera demandé de faire parvenir au Ministère de la Recherche une version modifiée de votre projet, qui tiendra compte des demandes de modifications qui vous ont été demandées : précisions sur le nombre d'animaux, en particulier.

Gravité : Reclassement Oui Non

Numéro des procédures reclassées :

Sévérité globale du projet :

N° Procédure	Sans réveil	Légère	Modérée	Sévère
1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Le Comité d'éthique demande-t-il une analyse rétrospective à la fin du projet :

Oui Non

Est-il prévu que des animaux soient réutilisés ?

Oui Non

Si oui, le comité d'éthique donne-t-il son accord ?

Oui Non

Date limite de réception des réponses :

Signature du Président : p.o.



Attention : Dès réception de votre dossier en provenance du MESR, il vous sera demandé de faire parvenir au Ministère de la Recherche une version modifiée de votre projet, qui tiendra compte des demandes de modifications qui vous ont été demandées : précisions sur le nombre d'animaux, en particulier.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

FUENZALIDA VASQUEZ Valentina

Interactions toxicologiques entre les plantes et les anticoagulants antivitamine K.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2022, 84p.

ESUME

Les anticoagulants antivitamine K sont utilisées dans la gestion de population de rongeurs depuis de nombreuses années, en empêchant la coagulation des animaux. Ces molécules présentent des limites, comme l'apparition de résistance de certains rongeurs, ou une intoxication secondaire d'espèces non-cibles. Ces enjeux sont essentiels dans le développement de nouveaux rodenticides. Pour répondre à cette problématique, certaines substances naturelles susceptibles d'affecter le processus de coagulation ont été sélectionnées afin d'évaluer leurs capacités à potentialiser l'activité des anticoagulants rodenticides, et ainsi diminuer la dose de ces derniers dans les appâts et contourner les phénomènes de résistance. Les substances naturelles potentiellement anticoagulantes sélectionnées sont le lapachol (substance active du Lapacho) et la curcumine (substance active du curcuma). Des mesures du temps de coagulation ont été réalisées *in vitro* afin d'identifier l'activité coagulante de ces substances naturelles. Des études *in vivo* ont également été réalisées en prélevant du sang intracardiaque de rat sensible, après gavage. Ces études ont permis d'effectuer un bilan d'hémostase et d'étudier la pharmacocinétique des molécules naturelles utilisées, les mécanismes toxicologiques mis en jeu et les éventuels résidus pouvant être responsable de problèmes écotoxicologiques sur des espèces prédatrices de rongeurs.

MOTS CLES

Lapachol
Curcumine
Rodenticide
Anticoagulant

JURY

Mme VINCIGUERRA Christine, Professeur
M. BENOIT Etienne, Professeur
M. FOUILLET Bruno, Pharmacien PhD

DATE DE SOUTENANCE

10 Mars 2022

CONTACT

christine.vinciguerra@univ-lyon1.fr