

Université de Montréal

**L'étude d'un anticoagulant oral (le rivaroxaban) sur les paramètres
hémostatiques de chiens en santé**

Par Bérénice Conversy

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Avril 2014

© Bérénice Conversy, 2014

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé
Etude d'un anticoagulant oral (le rivaroxaban)
sur les paramètres hémostatiques
de chiens en santé

Présenté par
Bérénice Conversy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Carolyn Grimes, présidente-rapporteuse
Marie-Claude Blais, directrice de recherche
Marilyn Dunn, co-directrice de recherche
Mathilde Leclère, membre du jury

Résumé

Chez le chien, les thromboses représentent une complication majeure de nombreuses conditions qui sont revues dans ce manuscrit. L'arsenal thérapeutique actuel présente certaines limites: des effets anticoagulants variables d'un patient à l'autre, des hémorragies et une administration par voie sous-cutanée pour l'héparine. Le rivaroxaban est un nouvel anticoagulant oral approuvé pour la prévention et le traitement des thromboses chez l'humain. C'est un inhibiteur direct du facteur Xa.

La présente étude a pour objectif d'évaluer les effets hémostatiques du rivaroxaban chez des chiens en santé, en utilisant les tests de coagulation suivants: temps de prothrombine (PT), temps partiel de thromboplastine (aPTT), activité anti-facteur X, génération de thrombine (GT) et thromboélastographie (TEG®).

Tout d'abord, l'effet anticoagulant du rivaroxaban a été évalué *in vitro* : le plasma citraté pauvre en plaquettes provenant de 20 Beagle en santé a été aliquoté et enrichi avec des solutions de rivaroxaban à des concentrations de 0 à 1000 mg/L d'anticoagulant. Une prolongation concentration-dépendante de tous les tests de coagulation a été notée. Les concentrations de 0.024 et 0.053 mg/L diminuent respectivement de 50% la vitesse de propagation de la GT et la densité optique de l'activité anti-facteur X. Ces derniers tests sont les plus sensibles et précis pour détecter l'effet anticoagulant du rivaroxaban.

Ensuite, 24 Beagle en santé ont été répartis aléatoirement en 3 groupes (n=8). Chaque groupe a reçu par voie orale un placebo, ou 20 mg de rivaroxaban une ou deux fois à 8h d'intervalle. Quinze échantillons sanguins ont été prélevés pour chaque chien sur 30 heures. Pour tous les tests de coagulation excepté la TEG®, une différence significative a été notée dans les résultats entre les groupes traités et le groupe placebo ($p < 0.0001$). La durée de l'effet anticoagulant du rivaroxaban était de 7.9-18.7h dans le groupe traité une fois; et de 17.5-26.8h dans le groupe traité deux fois. Le pic d'action de l'effet anticoagulant était d'environ 2h. Seul le paramètre R de la TEG® était significativement affecté dans les groupes traités.

En conclusion, le rivaroxaban exerce un effet anticoagulant chez le chien à la dose de 2 mg/kg. Une administration biquotidienne semble appropriée pour un effet de 24h.

Mots-clés : coagulation, rivaroxaban, chien, thrombose, pharmacodynamie

Abstract

In dogs, thrombosis is a major complication detected in many conditions. The limits of the current available anticoagulants in veterinary medicine are their variable effects from one patient to another, bleeding complications and subcutaneous injections for heparin administration. Rivaroxaban is a novel oral anticoagulant approved for the prevention and treatment of thrombosis in humans. It is a direct factor Xa inhibitor.

The objectives of the study were to determine the haemostatic effects of rivaroxaban in healthy dogs by evaluating the following coagulation assays: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), anti-factor X activity, thrombin generation (TG) and thromboelastography (TEG®).

An *in vitro* study was conducted: citrated platelet poor plasma from 20 healthy Beagles was aliquoted and mixed with rivaroxaban to obtain solutions ranging from 0 to 1000 mg/L of the anticoagulant. Rivaroxaban exerted a concentration-dependent anticoagulant effect. Rivaroxaban solutions at 0.024 and 0.053 mg/L cause 50% inhibition of the propagation of TG and of the optical density of anti-factor X activity respectively. These assays were the most sensitive to detect the anticoagulant effect of rivaroxaban.

Secondly, 24 healthy Beagles were randomly divided in 3 groups (n=8) and received one placebo pill orally, or 20 mg rivaroxaban once or twice at 8h interval. Fifteen citrated blood samples were collected from each dog over 30h. For each coagulation assay except for TEG®, there was a significant difference in assay results between placebo and rivaroxaban groups ($p < 0.0001$). The duration of the rivaroxaban anticoagulant effect was 7.9-18.7h in the group receiving rivaroxaban once, and 17.5-26.8h in the group receiving rivaroxaban twice. The peak of action of rivaroxaban appeared 2h after the dose. Only R parameter of TEG® was significantly affected by rivaroxaban administration.

To conclude, rivaroxaban is an efficient anticoagulant in healthy dogs at 2 mg/kg. A twice daily administration seems appropriate to exert a 24h anticoagulation.

Key-words: coagulation, rivaroxaban, dog, thrombosis, pharmacodynamics

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des abréviations.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Remerciements.....	xii
INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : Synthèse des connaissances bibliographiques actuelles.....	4
I- L'équilibre de la coagulation.....	5
1- Les phases de la coagulation.....	5
a. Hémostase primaire.....	5
b. Hémostase secondaire : cascade de la coagulation.....	7
c. Hémostase secondaire : vision moderne de la coagulation.....	8
1. Initiation.....	8
2. Amplification.....	9
3. Propagation.....	9
4. Les microparticules.....	10
d. Fibrinolyse.....	11
2- Définition d'un état hypercoagulable.....	12
3- Tests de laboratoire d'évaluation de l'hémostase.....	15
a. Les temps de coagulation : le temps de prothrombine (PT) et le temps partiel de thromboplastine (aPTT).....	16
1. Principes.....	16
2. Intérêts et limites.....	17
b. La thromboélastographie.....	17
1. Principe.....	17
2. Intérêt et limites.....	19
c. Le temps de génération de thrombine.....	20
1. Principe.....	20
2. Les paramètres du test.....	22
3. Intérêt et limites.....	23

d.	Activité anti-facteur X.....	23
1.	Principe	23
2.	Intérêt et limites.....	24
4-	Influence de l'hémolyse, l'ictère et la lipémie sur les tests de coagulation.....	25
II-	Les thromboses chez le chien.....	27
1-	Les thromboses veineuses <i>versus</i> artérielles.....	27
2-	Les conditions associées aux thromboses.....	27
a.	Entéropathie avec perte de protéines.....	27
b.	Néphropathie avec perte de protéines.....	28
c.	Les états inflammatoires.....	29
d.	Les maladies à médiation immunitaire.....	31
1.	Anémie hémolytique à médiation immunitaire (AHMI).....	31
2.	Thrombocytopénie à médiation immunitaire	32
3.	Autres.....	32
e.	Les affections hépatobiliaires et pancréatiques.....	32
f.	La septicémie.....	33
g.	Les néoplasmes.....	33
h.	L'hyperadrénocorticisme.....	34
i.	Le diabète mellitus.....	36
j.	L'administration de corticostéroïdes.....	36
k.	L'insuffisance cardiaque congestive.....	37
l.	L'obésité.....	37
m.	Causes iatrogéniques.....	38
III-	Les anticoagulants communément utilisés en médecine vétérinaire.....	39
1-	Les anti-vitamines K.....	39
a.	Mécanisme d'action.....	39
b.	Suivi.....	39
c.	Usage et imites.....	40
2-	L'héparine.....	41
a.	Mécanisme d'action.....	41
b.	Suivi.....	41

c.	Usage et limites.....	42
3-	Les héparines de faible poids moléculaire (HBPM).....	43
a.	Mécanisme d'action.....	43
b.	Suivi.....	43
c.	Usage et limites.....	44
4-	Les anti-agrégants plaquettaires.....	44
a.	Aspirine.....	45
1.	Mécanisme d'action.....	45
2.	Usage et limites.....	45
b.	Clopidogrel.....	46
1.	Mécanisme d'action.....	46
2.	Usage et limites.....	47
c.	Inhibiteurs du récepteur plaquettaire IIb/IIIa.....	47
1.	Mécanisme d'action.....	47
2.	Usage et limites.....	47
IV-	Le rivaroxaban.....	49
1-	Caractéristiques du produit.....	49
a.	Description.....	49
b.	Métabolisme.....	50
2-	Usage en médecine humaine.....	51
a.	Pharmacocinétique.....	51
b.	Pharmacodynamique : effets sur les tests de la coagulation.....	52
c.	Précautions d'emploi.....	53
d.	Prise en charge des saignements.....	54
e.	Indications.....	56
3-	Données en médecine vétérinaire	56
a.	Avantage d'une administration orale : observance et injections.....	56
b.	Données disponibles dans l'espèce canine.....	56
4-	Etude du rivaroxaban chez le chien.....	57
a.	Notions de pharmacologie.....	58
b.	Pharmaco-modélisation de l'évaluation du rivaroxaban chez le chien.....	59

PARTIE 2 : Rivaroxaban demonstrates <i>in vitro</i> anticoagulant effects in canine plasma	64
I- Abstract.....	66
II- Introduction.....	66
III- Materials and methods.....	68
IV- Results.....	71
V- Discussion.....	72
VI- Conclusion.....	75
VII- References.....	76
VIII- Tables and figures to accompany the article.....	80
PARTIE 3 : <i>In vivo</i> evaluation of the effects of rivaroxaban on coagulation parameters in healthy dogs..	85
I- Abstract.....	87
II- Introduction.....	88
III- Materials and methods.....	89
IV- Results.....	94
V- Discussion.....	96
VI- Conclusion.....	99
VII- Footnotes.....	100
VIII- References.....	101
IX- Tables an figures to accompany the article.....	104
DISCUSSION.....	111
CONCLUSION.....	117
BIBLIOGRAPHIE.....	119

Liste des abréviations

ADP : adénosine di-phosphate

AHMI : anémie hémolytique à médiation immunitaire

APC : activated protein C; protéine C activée

aPTT: temps partiel de thromboplastine

AT : anti-thrombine

ATP : adénosine tri-phosphate

CAT : thrombinogramme automatisé calibré

CIVD : coagulation intra-vasculaire disséminée

CRP: C reactive protein; protéine C réactive

CYP : cytochrome P

ETP : endogenous thrombin potential ; potential de thrombine endogène

FFP : freeze frozen plasma ; plasma frais congelé

FV : facteur V

FVII : facteur VII

FX : facteur X

FXII : facteur XII

FT : facteur tissulaire, thromboplastine

GP : glycoprotéine

GT : génération de thrombine

HBPM : héparine de bas poids moléculaire

IL : interleukine

INR : international normalized ratio ; ratio normalisé international

ISI : index de sensibilité international

MP : microparticule

PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène-I

PCC : prothrombin complex concentrate ; concentré de complexe prothrombine-facteur IV

PD : pharmacodynamie

PK : pharmacocinétique

PK/PD : pharmacocinétique-pharmacodynamique

PLE : protein-loss enteropathy ; entéropathie avec perte de protéines

PLN : protein-loss nephropathy ; néphropathie avec perte de protéines

PS : phosphatidylsérine

PT : temps de prothrombine

RBC : red blood cells ; concentré de globules rouges

RPCU : ratio protéines sur créatinine urinaire

SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique

TAFI : inhibiteur de fibrinolyse activé par la thrombine

TAT : complexe thrombine-antithrombine

TEG® : thromboélastographie®

TFPI : facteur tissulaire inhibiteur

TNF : facteur de nécrose tissulaire

t-PA : activateur tissulaire du plasminogène

TMI : thrombocytopenie à médiation immunitaire

VASP : phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs

vWF : facteur de von Willebrand

Liste des tableaux

Tableau I : Description fonctionnelle des anticoagulants naturels.....	13
Tableau II: Implication des différentes cytokines inflammatoires dans l'activation de la coagulation. ...	29
Tableau III : Pathogénèse des complications thrombotiques chez les patients humains atteints d'hyperadrénocorticisme.....	35
Tableau IV : Comparaison des données pharmacocinétiques et métaboliques du rivaroxaban chez l'humain et le chien.....	57

Article 1

Table I : Non linear models and formulas for calculating platelet poor plasma (PPP) drug concentration needed to double or to halve baseline value of coagulation parameters.....	80
Table II: Comparison of required rivaroxaban concentrations to double or inhibit 50% baseline of thrombin generation parameters between normal canine plasma and human data.....	81

Article 2

Table I : Determination of rivaroxaban input and output half lives, and its anticoagulant potency at steady-state (EDK_{50}) with different coagulation assays in healthy dogs after an oral dose.....	104
---	-----

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de l'hémostase primaire.....	6
Figure 2 : Les différents facteurs impliqués dans les voies intrinsèque, extrinsèque et commune de la cascade de la coagulation.....	7
Figure 3 : Schématisation des 3 phases de la coagulation selon le modèle cellulaire.....	10
Figure 4 : Représentation schématique du rôle des microparticules dans le développement d'un thrombus.....	11
Figure 5 : Schéma résumant la formation des produits de dégradation du fibrinogène et des D-dimères..	12
Figure 6 : Représentation schématique de la triade de Virchow.....	15
Figure 7 : Schématisation du fonctionnement de la thromboélastographie.....	18
Figure 8 : Thromboélastogramme et ses paramètres.....	19
Figure 9 : Les différentes étapes de la réalisation du test de génération de thrombine.....	21
Figure 10 : Les différents paramètres du thromboélastogramme.....	22
Figure 11 : Principe du test d'activité anti-facteur Xa.....	24
Figure 12 : Activation et fonctions de la protéine C.....	30
Figure 13 : Lien entre l'obésité et le développement d'un état hypercoagulable.....	37
Figure 14 : Mécanisme d'action des anti-vitamines K. Exemple du warfarin.....	39
Figure 15 : Mécanisme d'action de l'héparine non fractionnée.....	41
Figure 16 : Mécanisme d'action d'une héparine de bas poids moléculaire.....	43
Figure 17 : Mécanisme d'action du clopidogrel.....	46
Figure 18 : Synthèse des mécanismes d'action des différents anti agrégants plaquettaires.....	48
Figure 19 : Interaction moléculaire entre le rivaroxaban (en rouge) et le facteur Xa (en vert, séquence d'acides aminés identiques chez l'Homme et le chien).....	50
Figure 20 : Voie métabolique oxydative hépatique du rivaroxaban.....	50
Figure 21 : Voie métabolique d'hydrolyse hépatique du rivaroxaban.....	51
Figure 22 : .Guide pour la prise en charge des saignements chez un patient traité avec du rivaroxaban...	55
Figure 23 : Modèle pharmacologique détaillant les paramètres phramacocinétiques et pharamcodynamiques utilisé dans l'étude du rivaroxaban oral chez des chiens en santé.....	61

Article 1

Figure 1 : Examples of <i>in vitro</i> rivaroxaban concentrations determination that doubled or inhibited 50% baseline assay value on canine PPP.....	82
Figure 2: Assay sensitivity of each test to detect anticoagulant effect of rivaroxaban in canine PPP.....	83
Figure 3: thrombin generation versus time for different <i>in vitro</i> rivaroxaban concentrations in canine PPP.....	84

Article 2

Figure 1 : Schematic representation of the K-PD model used to evaluate the anticoagulant effect in healthy dogs after oral rivaroxaban administration.....	105
Figure 2 : Comparison of coagulation assay results of each dog from groups 1 and 2 with model-predicted data after oral rivaroxaban evaluation in healthy dogs.....	106
Figure 3 : Model-predicted coagulation assay values over time for dogs in group 1 (n=8).....	107
Figure 4 : Rivaroxaban anticoagulant effect duration determination by evaluating time to return to baseline in groups 1 (n=8) and 2 (n=8).....	108
Figure 5 : Rivaroxaban duration of action determination by evaluating time to return to baseline of coagulation assay values in groups 1 and 2.....	109
Figure 6 : Oral rivaroxaban effects on TEG parameters in healthy dogs.....	110

Remerciements

A ma directrice Marie-Claude et ma co-directrice Marilyn, toujours disponibles pour m'aider en personne ou par l'intermédiaire des i-phones ☺ Je me souviens encore lorsque nous prélevions le sang des Beagles sous une chaleur étouffante, quelle aventure et que de fous rires ! Merci pour la proposition de ce projet de recherche si fascinant et aux résultats prometteurs qui nous ont permis d'ouvrir plusieurs discussions dans les congrès de l'ACVIM. Votre esprit scientifique et analytique m'épatent toujours, et ce fut un honneur de vous avoir à mes côtés ! J'espère que l'on pourra un jour retravailler ensemble....

Merci à Carolyn pour tes précieux conseils, ton aide dans les manipulations et ta disponibilité. Tu trouvais toujours les mots pour me rassurer (surtout en anglais !) et j'ai vraiment été contente de te rencontrer et de travailler avec toi.

Merci à Jérôme del Castillo, pour votre soutien, votre aide et votre disponibilité pour les nombreuses heures d'analyses statistiques et les multiples explications de PKPD.... ce fut tout un défi pour moi !

A Lisa, merci pour ton soutien, ta gentillesse et ta disponibilité. Tu trouves toujours les mots justes et la solution aux diverses situations !

Merci à Sandrine Cros, Anik Cormier et Annie Fontaine pour la réalisation des analyses de laboratoire. Merci pour votre patience lors de mon invasion dans vos laboratoires !

Merci à ma famille et à mon conjoint, Guy, pour votre soutien inconditionnel dans mes choix professionnels et personnels, vos encouragements et votre amour.

Merci à mes co-résidents, pour votre soutien et les fou-rires passés ensemble ! J'espère vous revoir très bientôt et je vous souhaite bonne chance dans vos projets.

Merci à toute l'équipe dynamique et joyeuse de médecine interne, l'entre-aide est une de nos forces ! Une dédicace particulière à 'Mélichat' pour ses cupcakes qui illuminent nos journées !

INTRODUCTION

Chez le chien, les thromboses représentent une complication majeure de nombreuses conditions systémiques, parmi lesquelles on rencontre les néoplasmes, les entéropathies / néphropathies avec perte de protéines (PLE, PLN), l'anémie hémolytique à médiation immunitaire (AHMI), l'hyperadrénocorticisme, l'administration de corticoïdes, les pancréatites, les coagulations intra-vasculaires disséminées (CIVD) (Kittrell & Berkwitt, 2012a). Une altération de l'équilibre entre les éléments pro-coagulants et anticoagulants endogènes mènent à la formation de thromboses (Alcott, Wong, Brockus, & Sponseller, 2009). Parmi les anticoagulants au sens large (i.e. les anticoagulants et les anti-agrégants plaquettaires) utilisés de routine en médecine canine, seuls les anti-vitamines K sont administrés par voie orale, mais leurs effets sont variables d'un patient à l'autre et des saignements peuvent être observés (Dunn & Brooks, 2009). La daltéparine (héparine de bas poids moléculaire (HBPM)) représente le traitement anticoagulant actuel de choix en raison de sa durée d'action supérieure à l'héparine et sa sécurité d'emploi comparativement aux anti-vitamines K (Kittrell & Berkwitt, 2012b; Wong, Brockus, Alcott, & Sponseller, 2009). Toutefois, son mode d'administration par voie sous-cutanée peut limiter son utilisation et l'observance des propriétaires (Eymin & Jaffer, 2012).

Le rivaroxaban est un anticoagulant oral récemment approuvé en médecine humaine pour la prévention et le traitement des thromboses (Perzborn et al., 2010). Ce mode d'administration rend le rivaroxaban particulièrement attirant pour un usage en médecine canine. Mais aucune étude évaluant l'efficacité et l'activité de ce médicament chez le chien n'a été réalisée; seules la pharmacocinétique et l'innocuité ont été évaluées chez l'espèce canine en vue de la commercialisation du médicament chez l'humain (Weinz et al., 2005).

Le rivaroxaban est un inhibiteur direct du facteur Xa de la coagulation. Le facteur Xa joue un rôle clé dans les étapes d'initiation et de propagation de la coagulation : il permet la conversion de milliers de molécules de prothrombine en thrombine à la surface des plaquettes grâce à la formation des complexes tenase et pro-thrombinase (Smith, 2009). Le rivaroxaban se lie directement au site catalytique du facteur Xa. Il inhibe aussi bien le facteur Xa libre que le facteur Xa inclus dans le complexe pro-thrombinase ou lié au caillot sanguin (Perzborn et al., 2005). Etant donné que la séquence d'acides-aminés du facteur Xa interagissant avec le rivaroxaban est identique chez le chien et l'humain (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_534191.1), nous pouvons formuler l'hypothèse que le rivaroxaban pourrait être un ligand approprié pour le facteur Xa canin. En d'autres termes, nous supposons que le rivaroxaban pourrait constituer un anticoagulant efficace chez le chien.

En médecine humaine, le rivaroxaban est administré à une dose fixe (bien que variable selon la condition), et aucun suivi de coagulation n'est nécessaire à moins d'une suspicion d'effet excessif (Palareti et al., 2013).

Les méthodes employées pour l'évaluation de l'hémostase sont nombreuses et variées. Les temps de coagulation, soient le temps de prothrombine (PT) et temps partiel de thromboplastine (aPTT), sont utiles dans l'évaluation d'états hypo-coagulables, bien que leur sensibilité soit faible: la prolongation des temps nécessite une diminution $\geq 70\%$ de l'activité d'un facteur de la coagulation (Cheng, Mathews, Abrams-Ogg, & Wood, 2011). Toutefois, il est décrit que le PT reflète bien l'effet du rivaroxaban et son usage est recommandé en situations d'urgence chez les patients humains traités avec du rivaroxaban (Molenaar, Dinkelaar, & Leyte, 2012). L'activité anti-facteur Xa évalue directement l'activité propre du rivaroxaban et ce test est recommandé en médecine humaine dans le cadre du suivi de la médication dans certaines circonstances (Palareti et al., 2013; Samama et al., 2012). D'autres tests dynamiques impliquant les composants cellulaires et plasmatiques de la coagulation ont été développés : la thromboélastographie et le test de génération de thrombine (GT). Ils évaluent la coagulation dans sa globalité. Ces tests ne sont par contre pas disponibles dans tous les laboratoires. De plus, la thromboélastographie (TEG®) nécessite une analyse immédiate suite au prélèvement (ou dans les 30 minutes), ce qui complique son utilisation en pratique (Cheng et al., 2011). Dans l'organisme, l'équilibre entre la production et la dégradation de la thrombine détermine si un patient est hypo- ou hyper-coagulable : le test de génération de thrombine met en évidence l'importance de la thrombine dans la coagulation. L'effet anticoagulant du rivaroxaban a été documenté par la modification des paramètres de GT (Gerotziafas, Elalamy, Depasse, Perzborn, & Samama, 2007; Molenaar et al., 2012).

La présente recherche a deux principaux objectifs :

- tout d'abord documenter l'effet du rivaroxaban *in vitro* sur du plasma de chiens en santé. Différentes concentrations de rivaroxaban ont été évalués à l'aide des tests de coagulation suivants : PT, PTT, activité anti-facteur X, et le test de GT ;
- ensuite évaluer la pharmacodynamie du rivaroxaban chez des chiens en santé, à l'aide des tests de coagulation suivants : PT, PTT, activité anti-facteur Xa, TEG®, et le test de GT. La posologie du rivaroxaban a été déterminée à partir de la phase *in vitro* et des données disponibles en médecines humaine et canine (étude de pharmacocinétique).

Deux hypothèses ont été formulées pour cette étude :

- le rivaroxaban exerce *in vitro* un effet anticoagulant sur le plasma canin, et ce, de façon concentration-dépendante.
- le rivaroxaban exerce un effet anticoagulant chez des chiens en santé avec des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique prévisibles.

PARTIE 1 : Synthèse des connaissances bibliographiques actuelles

I- L'équilibre de la coagulation

L'hémostase correspond à un système hautement conservé qui permet le maintien de l'intégrité vasculaire, la conservation de la fluidité sanguine et la dégradation des caillots sanguins après leur formation. La coagulation a suscité (et suscite encore) l'intérêt de nombreux chercheurs en médecine humaine comme en médecine vétérinaire (Versteeg, Heemskerk, Levi, & Reitsma, 2013). Bien qu'il existe des simultanités, elle se décrit communément en 3 phases : l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et la fibrinolyse (Alcott et al., 2009).

1- Les phases de la coagulation

a. Hémostase primaire

Les plaquettes assurent l'hémostase primaire. Ce sont des cellules anucléées issues de fragments cytoplasmiques des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elles sont composées de 3 parties : la zone périphérique responsable de leur adhésion et leur agrégation, la zone sol-gel responsable de la contraction et du support des microtubules, et la zone des organelles comprenant les granules (Cimmino & Golino, 2013).

Suite à une brèche de l'endothélium vasculaire, les cellules musculaires lisses du vaisseau vont immédiatement se contracter, permettant ainsi un ralentissement du passage des plaquettes et leur adhésion à l'endothélium pour former un bouchon appelé « clou plaquettaire ». La formation de ce clou se fait en 4 étapes (Alcott et al., 2009; Boudreaux, 2010; Boudreaux & Catalfamo, 2010; Cimmino & Golino, 2013; de Groot, Urbanus, & Roest, 2012).

Brièvement, l'**adhésion** des plaquettes au sous-endothélium vasculaire se fait soit directement avec le collagène exposé (récepteurs plaquettaire GPVI et $\alpha 2\beta 1$), ou par l'intermédiaire du facteur von Willebrand (vWF) avec le récepteur plaquettaire GPIb-V-IX. Ces interactions permettent l'**activation** des plaquettes qui vont alors modifier leur configuration membranaire et changer leur forme. Les phosphatidylsérines (PS), chargées négativement et situées normalement sur la face interne de la bicouche lipidique membranaire, se retrouvent exposées à la surface externe sous l'action d'une enzyme : la scramblase (Nomura, Ozaki, & Ikeda, 2008). Ce changement participe à coagulation grâce à la liaison entre les PS anioniques et les protéines de la coagulation (Martinez, Tual-Chalot, Leonetti, & Andriantsitohaina, 2011). Les plaquettes vont également présenter des pseudopodes membranaires qui augmentent la surface de contact entre elles et les cellules endothéliales. Les plaquettes vont libérer le contenu de leurs granules alpha (renfermant le FV, le vWF, le fibrinogène, la thrombospondine et la

fibronectine) et de leurs granules denses (renfermant l'ATP, l'ADP, la sérotonine, le calcium et les phosphates inorganiques), ce qui va permettre le **recrutement** d'autres plaquettes. L'ADP libérée va agir sur les récepteurs plaquettaire aux alentours et accroître leur activation en augmentant la concentration intracellulaire en calcium directement (via le récepteur plaquettaire P2Y1) et indirectement (via le récepteur plaquettaire P2Y12) en inhibant l'adénylyl cyclase, ce qui diminue la concentration d'AMPc et augmente la concentration en calcium. Enfin, l'**agrégation** plaquettaire est permise par le récepteur GP α 2 β 3 qui lie le fibrinogène entre les plaquettes et stabilise le clou.

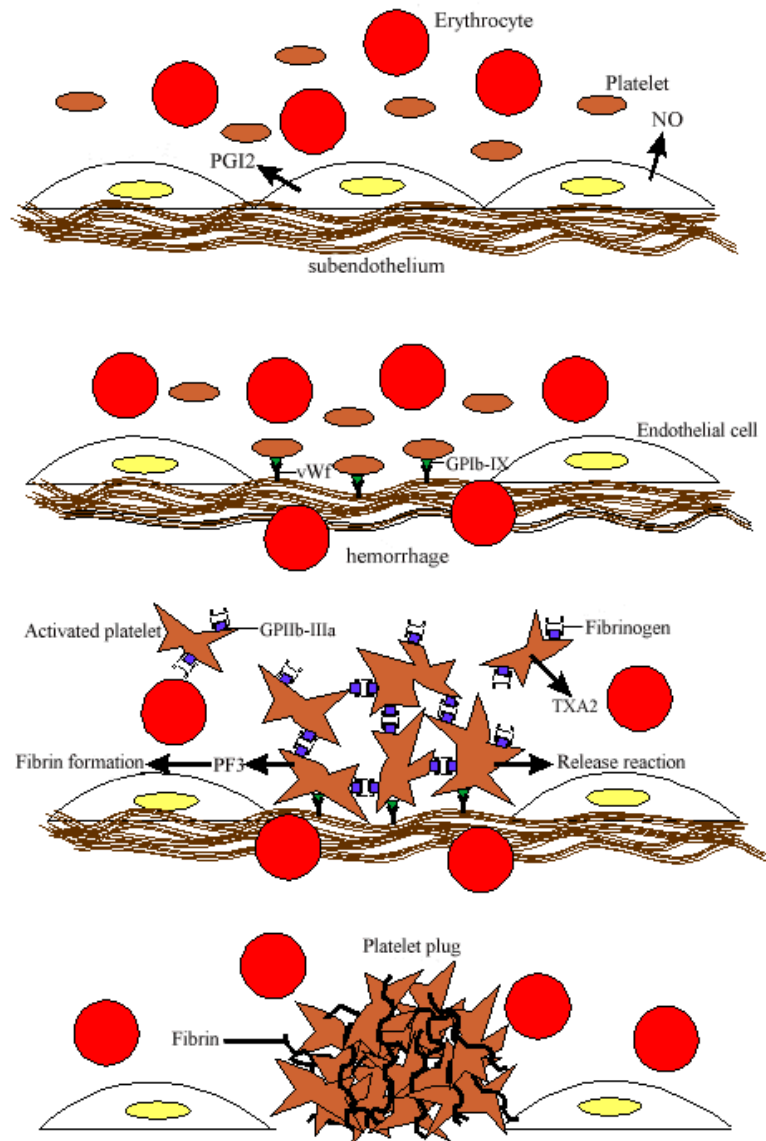


Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de l'hémostase primaire. D'après <http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/coags/primim.htm>.

GPIb-IX : glycoprotéine Ib-IX, GPIIb-IIIa: glycoprotéine Iib-IIIa, NO : oxyde nitrique, PF3 : facteur plaquettaire 3, PGI2 :prostaglandine I2, TXA2 : thromboxane A2, vWf : facteur de von Willebrand

b. Hémostase secondaire : cascade de la coagulation

L'hémostase secondaire permet la formation de fibrine qui vient stabiliser le clou plaquettaire.

A partir des années 1950, il est reconnu que les facteurs de la coagulation se trouvent sous une forme inactive (zymogène) dans le plasma et qu'ils sont convertis en enzymes petit à petit. Ce concept a ensuite été appuyé par des études introduisant la notion de cascade de coagulation. Ce modèle de cascade repose sur une série de réactions au cours desquelles les facteurs inactifs sont convertis en enzymes actives (Figure 2). La plupart de ces réactions se fait sur des surfaces membranaires et nécessite du calcium. La **voie intrinsèque** a été décrite en premier et nommée ainsi, car tous les composés nécessaires à sa réalisation étaient présents dans le sang. Cette voie est initiée par l'activation de contact du FXII sur une surface chargée négativement. La **voie extrinsèque** a ensuite été définie : elle fait intervenir le facteur tissulaire qui ne semblait pas être en contact direct avec le sang chez un patient en santé, et le FVII. La convergence des 2 voies (intrinsèque et extrinsèque) mène à la formation du facteur X qui initie la **voie commune** de la coagulation et aboutit à la formation de thrombine (Alcott et al., 2009; McMichael, 2012; Smith, 2009).

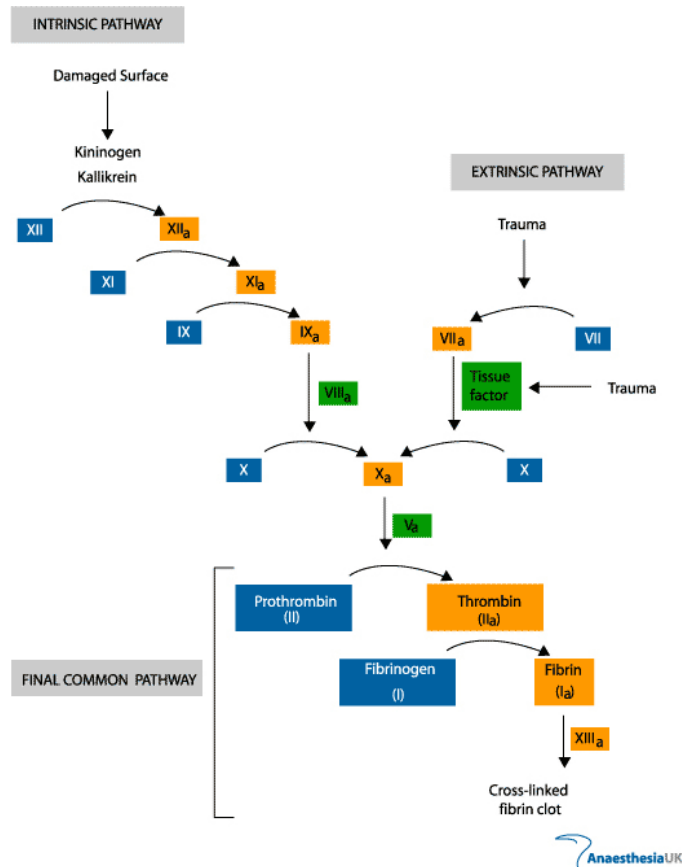


Figure 2 : Les différents facteurs impliqués dans les voies intrinsèque, extrinsèque et commune de la cascade de la coagulation. D'après http://www.frca.co.uk/images/clotting_cascade.gif.

Bien que peu physiologique, la description du modèle de la cascade de coagulation a permis de comprendre les diverses étapes qui se produisent lors de coagulation plasmatique *in vitro*, d'interpréter adéquatement les tests de laboratoire, et de découvrir des inhibiteurs spécifiques de la coagulation (Smith, 2009). Les tests hémostatiques impliquant les voies intrinsèque, extrinsèque et commune sont décrits ci-après.

c. Hémostase secondaire : vision moderne de la coagulation

La cascade de la coagulation décrivant les voies intrinsèque et extrinsèque comme indépendantes présente certaines limites et ne permet pas d'expliquer plusieurs phénomènes biologiques, notamment:

- pourquoi une déficience en FXII, objectivée par une prolongation de la durée de la phase intrinsèque, ne cause pas de saignement, tel qu'observé chez les chats mais aussi chez d'autres espèces (Barr & McMichael, 2012; Brooks, 2010) ;
- pourquoi une déficience en FVIII (hémophilie A) ou FIX (hémophilie B) cause des saignements alors que la voie extrinsèque reste normale ;
- pourquoi une déficience en FVII est associée à des saignements alors que la voie intrinsèque est normale (Smith, 2009).

Les recherches ultérieures ont permis d'établir une **dépendance** entre les voies intrinsèque et extrinsèque, de même qu'un chevauchement entre la formation du clou plaquettaire et la formation du caillot de thrombine. En effet, les plaquettes représentent le support d'assemblage des complexes permettant la génération de thrombine (Furie & Furie, 2007). Cela a mené à redéfinir la théorie de la coagulation. La vision moderne repose donc sur le modèle cellulaire où les complexes de coagulation requièrent des phospholipides membranaires chargés négativement et du calcium (McMichael, 2012). Ce modèle reflète mieux la dynamique physiologique de ce qui se passe *in vivo*. Il comporte trois phases (l'initiation, l'amplification et la propagation) interdépendantes qui se chevauchent (Figure 3).

1. Initiation

L'initiateur de la coagulation est le FT qui est exprimé majoritairement par les cellules situées en dehors des vaisseaux (couche musculaire et adventice de l'endothélium) afin d'éviter la stimulation de la coagulation dans le flot sanguin dans des conditions normales. D'autres cellules (monocytes, cellules tumorales) et les microparticules peuvent exprimer le FT à leur surface dans des conditions normales, mais sous forme inactive (Smith, 2009).

Lors d'un dommage vasculaire, les cellules extravasculaires exprimant le FT sont alors exposées. Le FVIIa, dont 1% circule librement sous forme active dans le sang, se lie alors rapidement au FT. Le

complexe FT-FVIIa active ensuite d'autres FVII et de petites quantités de FIX et FX. Le FXa généré active le FV, puis forme le **complexe prothrombinase** à la surface des cellules exprimant le FT et sur lesquelles le FXa a été généré. Le complexe prothrombinase permet le clivage de la prothrombine et la **formation de petites quantités de thrombine**. Les FXa qui se détachent de la surface membranaire sont inhibés par le facteur tissulaire inhibiteur (TFPI) et l'antithrombine (AT). Par contre, le FIXa n'est pas inactivé par le TFPI et peut diffuser à la surface d'autres cellules, participant ainsi à la phase de propagation (Smith, 2009; Versteeg et al., 2013).

2. Amplification

La petite quantité de thrombine formée active les plaquettes environnantes en se fixant sur leur récepteur PAR (protease activated receptor) (Boudreaux, 2010; Smith, 2009). Les plaquettes changent alors de forme (pseudopodes), « retournent » leur membrane phospholipidique (extériorisation des phosphatidylsérines) et libèrent le contenu de leurs granules denses et alpha.

La thrombine générée active également le FXI et le FV, et clive la liaison entre les vWF et FVIII qui circulent liés afin de libérer le vWF pour l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Enfin, le FVa nouvellement formé amplifie l'activité prothrombinase.

3. Propagation

La propagation a lieu sur des surfaces phospholipidiques pro-coagulantes, telles que les plaquettes activées exposant les PS. Le FXI active le FIX, ce qui permet la formation du complexe tenase (FIXa-FVIIIa) et l'activation du FX qui, via le complexe prothrombinase, produit de **grandes quantités de fibrine** (McMichael, 2012; Smith, 2009; Versteeg et al., 2013).

Ce modèle moderne de la coagulation décrit mieux les processus physiologiques sous-jacents et il incorpore les éléments cellulaires à la coagulation. De nouveaux tests d'exploration globale de l'hémostase ont émergés (thromboélastographie (TEG), génération de thrombine) et tiennent compte de l'intégration des composants cellulaires aux facteurs de coagulation dans l'hémostase.

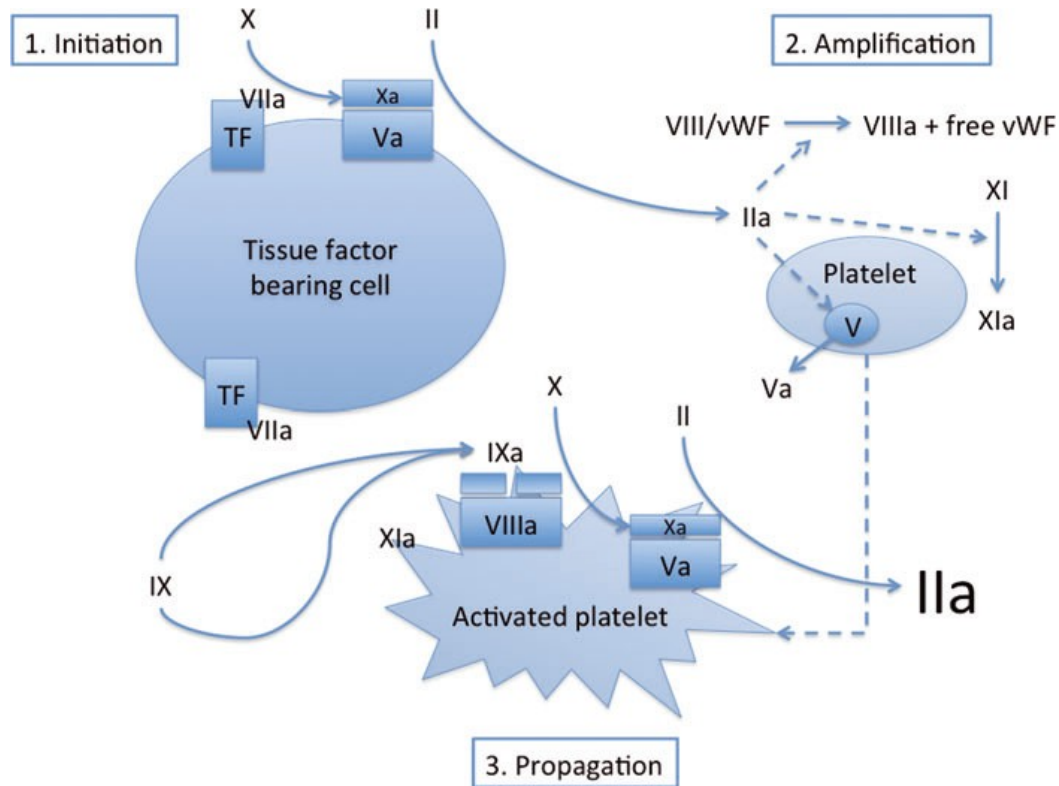


Figure 3 : Schématisation des 3 phases de la coagulation selon le modèle cellulaire (Wiinberg, Jessen, Tarnow, & Kristensen, 2012).

4. Les microparticules

Une étude a montré la possibilité de formation de thrombus chez des souris dépourvues de fibrinogène et/ou de vWF : cela suggère la présence de molécules adhésives participant à la liaison entre les plaquettes et l'endothélium vasculaire (Ni et al., 2000).

Les microparticules correspondent à des vésicules membranaires de 50 à 1000 nm de diamètre prenant origine de diverses cellules (plaquettes, monocytes, cellules tumorales, cellules endothéliales...). Elles sont essentiellement formées lors d'activation cellulaire ou d'apoptose sous l'action de cytokines, de thrombine, de turbulence et d'hypoxie (Nomura et al., 2008). Elles disposent des capacités de médiation de signaux inter-cellulaires et de régulation de l'hémostase (Versteeg et al., 2013). La concentration des microparticules chez les individus en santé est faible. Leur concentration augmente dans plusieurs états pathologiques. La contribution des microparticules à la formation de thrombi repose sur l'expression à leur surface (McMichael, 2012; Smith, 2009):

- de monomères de vWF chez les microparticules dérivées des cellules endothéliales,
- de P-selectine chez les microparticules dérivées des plaquettes,
- de FT chez les microparticules dérivées des monocytes.

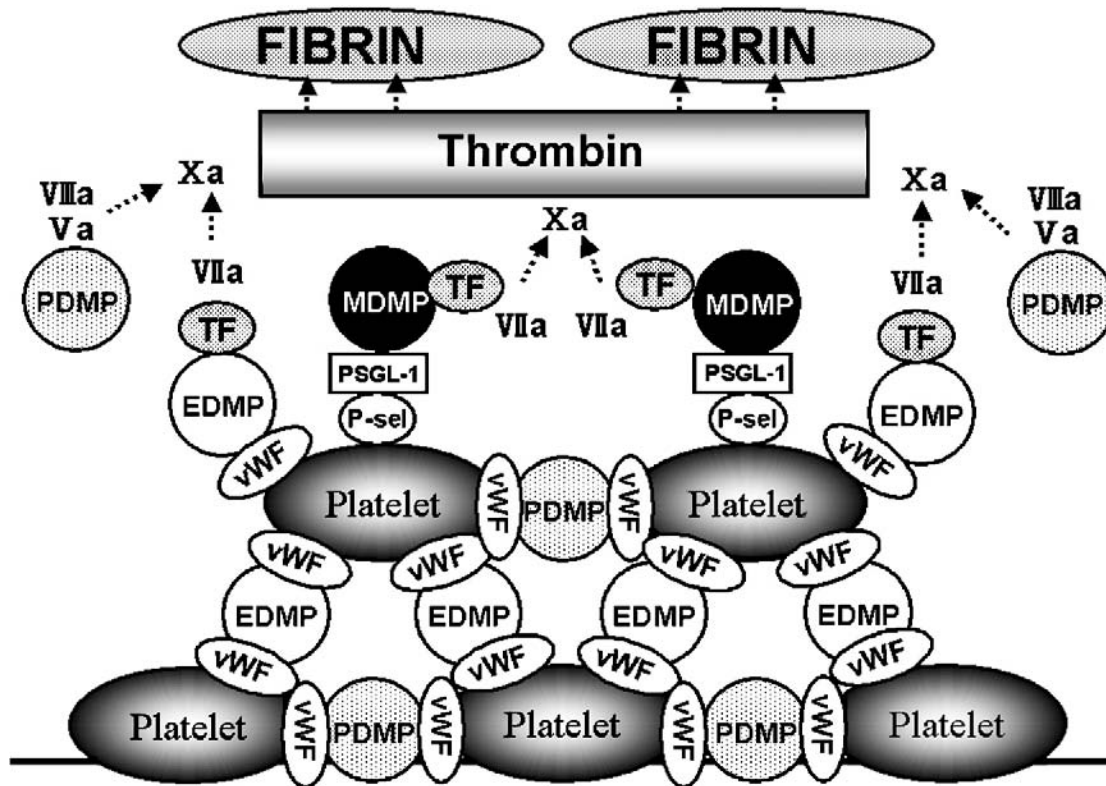


Figure 4: Représentation schématique du rôle des microparticules dans le développement d'un thrombus (Nomura et al., 2008).

EDMP (microparticules dérivées des cellules endothéliales), MDMP (microparticules dérivées des monocytes), PDMP (microparticules dérivées des plaquettes), TF (facteur tissulaire).

b. Fibrinolyse

La fibrinolyse est essentielle à la dissolution du caillot sanguin après sa formation. Le plasminogène, produit par le foie, est converti en plasmine sous l'action du plasminogène activateur synthétisé par les cellules endothéliales. La plasmine dégrade la fibrine polymérisée, ce qui aboutit à la formation de produits de dégradation du fibrinogène et de D-dimères (McMichael, 2012). La présence de D-dimères est indicative de la rupture d'un caillot de fibrine, alors que la présence de produits de dégradation du fibrinogène peut être secondaire à la dégradation du fibrinogène, d'un monomère de fibrine ou d'un caillot de fibrine (Bockenstedt, 2003; McMichael, 2012). D'ailleurs, plusieurs études ont montré une bonne

sensibilité de la concentration des D-dimères pour l'exclusion de la présence de thromboembolisme (Nelson, 2005; Rosser, 2009). L'urokinase, produit par les cellules épithéliales bordant les conduits excréteurs urinaires, est responsable dans une moindre mesure de l'activation de la plasmine, et permet la dissolution des caillots se formant dans ces conduits (Alcott et al., 2009).

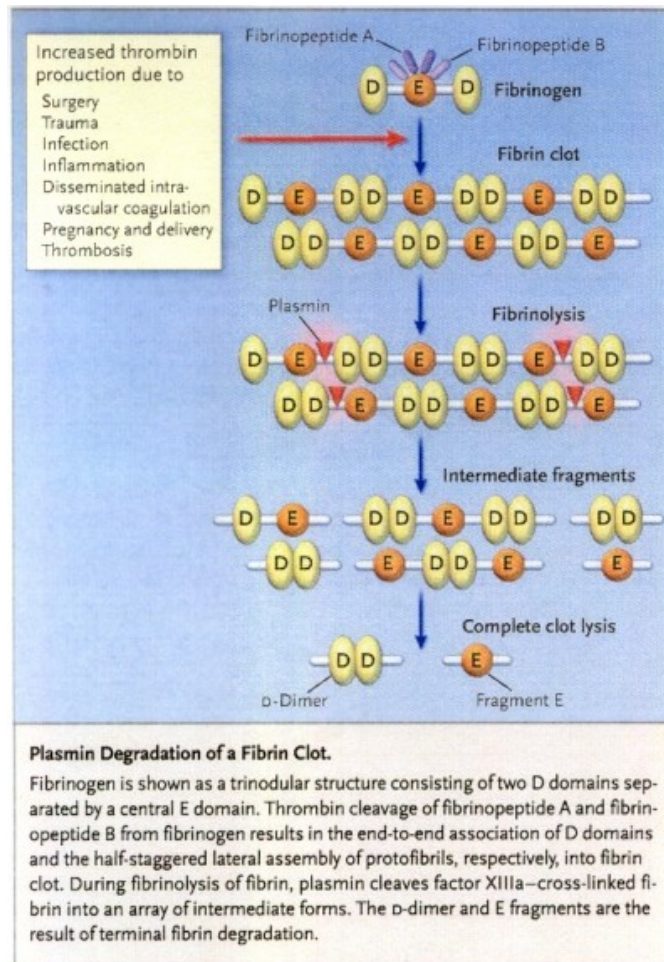


Figure 5 : Schéma résumant la formation des produits de dégradation du fibrinogène et des D-dimères (www.biomerieux-diagnostics.com).

2- Définition d'un état hypercoagulable

Dans des conditions physiologiques normales, les anticoagulants naturels : le TFPI, la protéine C, la protéine S, l'antithrombine et les enzymes de la fibrinolyse, contrôlent étroitement la formation de thrombine et le dépôt de fibrine en permettant leur création seulement lorsque nécessaire (Tableau I).

Voici un bref rappel de l'implication de chacun des anticoagulants naturels (Kubier & O'Brien, 2012) :

Anticoagulant	Rôle	Production	Mécanisme d'action	Implications pathologiques
TFPI	Inhibe : ▪ complexe FT-FVIIa ▪ FXa	▪ Cellules endothéliales (face luminale) ▪ Mégacaryocytes, monocytes, fibroblastes pulmonaires, synoviocytes	▪ Inhibiteur de protéase (agit via les domaines Kunitz) : 1-liaison réversible directe du domaine K2 au FXa 2-liaison irréversible et calcium-dépendante du domaine K2 au complexe FT-FVIIa	▪ Taux élevé lors de cancer (tumeur solide), sepsis, urémie, diabète, hyperlipémie ▪ TFPI recombinant : - Prévient les thromboses et le développement de CIVD chez le lapin - Réduit la mortalité lors de choc septique secondaire à <i>E coli</i> chez le lapin
Protéine C	▪ Pouvoir anticoagulant: - FVa, FVIIIa ▪ Propriétés anti-inflammatoires	▪ Foie ▪ Vitamine-K dépendante ▪ Circule sous forme de zymogène ▪ Conversion en APC par le complexe endothélial thrombine-thrombomoduline	▪ Inactivation des FVa et FVIIIa en présence de calcium, phospholipides et protéine S	▪ Déficience acquise en protéine C lors de maladie hépto-biliaire, sepsis, insuffisance cardiaque congestive, aflatoxicose
Protéine S	▪ Co-facteur de la APC et TFPI	▪ Cellules endothéliales et foie ▪ Stockage dans cellules endothéliales et granules plaquettaires α ▪ Vitamine K dépendante ▪ 2 formes plasmatique: libre (40%) ou complexée (C4b du complément)	▪ Co-facteur de APC (se lie aux phospholipides membranaires par son domaine glargine) - Augmente inactivation FVa et FVIIIa ▪ Co-facteur de TFPI - liaison au domaine K3 du TPFI	▪ Déficience lors de sepsis (diminution de production, consommation, utilisation)
AT	▪ Pouvoir anticoagulant: - FIIa, FIXa, FXa, FXIa ; FVIIa (avec héparines) ▪ Propriétés anti-inflammatoires	▪ Foie ▪ 2 isoformes : - Isoforme α (plasma) - Isoforme β (paroi des vaisseaux sanguins, 5-10% dans le plasma)	▪ Inhibiteur de sérine protéase ▪ Activité de l'AT multipliée par 1000 en présence d'héparines (naturelles ou synthétiques) ▪ Liaison de l'héparine à l'AT sur une séquence pentasaccharidique spécifique	▪ Déficience en AT acquise lors de PLN, PLE, sepsis ▪ taux AT < 60% associé à un risque augmenté de mort lors d'AHMI, pancréatite, hépatopathie, néoplasie chez le chien

Tableau I : Description fonctionnelle des anticoagulants naturels.

La pathophysiologie du développement des thromboembolismes a été conceptualisée par Rudolph Virchow dans les années 1800 et repose sur la triade suivante (Good & Manning, 2003; Kittrell & Berkwitt, 2012a; Lopez & Chen, 2009):

- Un **dommage endothélial** structurel ou fonctionnel. L'endothélium produit des antiagrégants plaquettaires tels que l'oxide nitrique (cause une vasodilatation et inhibe l'activation plaquettaire), les prostacyclines (cause une vasodilatation et inhibe l'activation et l'agrégation plaquettaire) et l'adénosine diphosphatase qui dégrade l'ADP (activateur plaquettaire) en ATP. Il produit également des anticoagulants naturels, tels que la thrombomoduline (permet la génération de APC), la protéine S, le sulfate d'héparane (co-facteur de l'antithrombine) et la TFPI (voir tableau 1). Lors de dommage, l'endothélium perd ses capacités de régulation et cela peut prédisposer aux thromboses. De même, l'exposition du FT péri-vasculaire lance la formation de thrombus ;
- Une **stase sanguine**. Le ralentissement du flux sanguin empêche l'évacuation des éventuels molécules de thrombine formées. De plus, l'hypoxie qui en découle crée un environnement propice aux thromboses par l'expression de P-sélectine à la surface de l'endothélium dans les 30 minutes suivant l'hypoxie, et par l'expression du FT par les monocytes. On retrouve parmi ces causes : l'hypovolémie, les anomalies vasculaires, les cardiomyopathies, les néoplasmes et les désordres d'hyperviscosité ;
- Un **débalancement systémique entre les facteurs pro- et anticoagulants**. Cela peut inclure : une hyper-agrégation plaquettaire, une hyper-activation ou un défaut d'élimination des facteurs de coagulation, une déficience en anticoagulants naturels ou une fibrinolyse déficiente.

Les états hypercoagulables acquis sont plus fréquents en médecine vétérinaire, comparativement aux états hypercoagulables d'origine génétique. La plupart des causes sous-jacentes impliquent plus qu'un des 3 composants de la triade (Good & Manning, 2003), et il est admis que l'implication de 2 de ces critères prédispose aux tromboembolismes (de Laforcade, 2012).

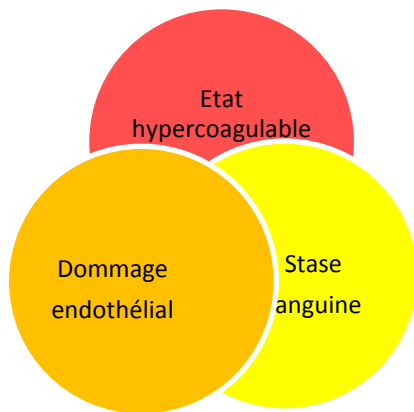


Figure 6 : Représentation schématique de la triade de Virchow.

Selon les conditions pathologiques sous-jacentes (voir chapitre II), l'implication de chacune des 3 parties de la triade de Virchow est plus ou moins importante.

3- Tests de laboratoire d'évaluation de l'hémostase

Parmi les tests de coagulation actuels, on rencontre (Herring & McMichael, 2012; Jandrey, 2012) :

- les tests évaluant l'hémostase primaire : temps de saignement buccal, numération plaquettaire, tests de fonction plaquettaire, dosage quantitatif et évaluation fonctionnelle du vWF, cytométrie de flux : évaluation quantitative des glycoprotéines de la membrane plaquettaire et/ou du contenu de leurs granules, du flux calcique intra-cellulaire
- les tests évaluant l'hémostase secondaire : PT, aPTT, évaluation de la protéine induite par l'absence de vitamine K (PIVKA), le temps de coagulation activé, inhibition de l'activité du FX
- les tests évaluant la fibrinolyse : le dosage du fibrinogène, des D-dimères, des produits de dégradation de la fibrine, le temps de thrombine
- les tests évaluant la coagulation dans sa globalité : la thromboélastographie, la génération de thrombine (thrombinogramme automatisé calibré, CAT), le dosage des complexes thrombine-antithrombine

Notre projet d'étude s'intéresse au rivaroxaban qui est un inhibiteur direct du FX. Pour cette raison, seuls les tests de coagulation pouvant être affecté par le rivaroxaban, c'est-à-dire les tests explorant l'hémostase secondaire et les tests d'évaluation globale de l'hémostase, seront ici détaillés (Doux fils et al., 2012).

L'anticoagulant de choix pour les tests de coagulation est le citrate de sodium. Les tubes EDTA ne sont pas recommandés en pratique pour l'évaluation de l'hémostase secondaire (Herring & McMichael, 2012).

- a. Les temps de coagulation : le temps de prothrombine (PT) et le temps partiel de thromboplastine activée (aPTT)

Une fois collecté, le sang citraté doit être analysé dans les 24 heures et conservé à température ambiante, sinon une prolongation des temps de coagulation allant jusqu'à 25% la limite supérieure est observée (Rizzo, Papasouliotis, Crawford, Dodkin, & Cue, 2008). D'autre part, la stabilité des temps de coagulation PT et aPTT lors d'une congélation du plasma citraté canin à -80°C durant 4 mois a été documenté (Kurata & Horii, 2004).

1. Principes

Le PT permet d'évaluer les voies extrinsèque et commune de la cascade de coagulation par l'entremise d'un analyseur automatisé détectant la formation de fibrine : détection optique ou électro-mécanique. Un mélange renfermant du FT (thromboplastine), du calcium et des phospholipides est ajouté au plasma citraté. La thromboplastine permet l'activation du FVII, qui active ensuite le FX. Avec le calcium et les phospholipides, le FXa se lie au FV pour former le complexe prothrombinase et assurer la formation de thrombine à partir de la prothrombine. Le PT s'exprime en secondes, et il est prolongé lors de déficience ou de dysfonction des FVII, FX, FV, FII, FI (Brainard & Brown, 2011; Herring & McMichael, 2012; Lubas, Caldin, Wiinberg, & Kristensen, 2010).

L'aPTT, quant à lui, permet l'évaluation des voies intrinsèque et commune. L'analyseur automatique est le même que celui utilisé pour le PT. Un mélange renfermant un activateur du FXII (kaolin, acide ellagique, silice), des phospholipides et du calcium est ajouté au plasma citraté. Cela permet alors l'activation du FXII et du FXI par la prékallikréine et le kininogène de haut poids moléculaire. A terme, les premières molécules de fibrine sont formées. L'aPTT s'exprime en secondes et il est prolongé lors de déficience ou de dysfonction des FVIII, FIX, FXI, FXII, prékallikréine, kininogène, FI, FII, FV et FX (Brainard & Brown, 2011; Herring & McMichael, 2012; Lubas et al., 2010).

Il est à noter que le temps de coagulation activé permet, comme l'aPTT, l'évaluation des voies intrinsèque et commune. Toutefois, ce test est réalisé par l'activation de sang total, et il peut être prolongé lors de thrombocytopenie ou de thrombocytopathie. Ce test n'a pas été retenu pour l'évaluation du rivaroxaban (Herring & McMichael, 2012).

2. Intérêts et limites

Le PT peut être prolongé lors de facteurs déficients ou non fonctionnels (voie extrinsèque/commune), d'atteinte hépatique, de CIVD, de la présence d'anticoagulant (comme l'héparine), d'intoxication par des rodenticides (anti-vitamines K) ou d'une hypofibrinogénémie. Toutefois, il est peu sensible pour la détection individuelle d'anomalie de facteur de coagulation (Herring & McMichael, 2012). L'aPTT peut être augmenté lors de facteurs de coagulation déficients ou non fonctionnels (voie intrinsèque/commune), d'atteinte hépatique, d'intoxication aux rodenticides, de CIVD, d'administration d'anticoagulant (Lubas et al., 2010).

Les PT et aPTT font partie des tests de dépistage d'atteinte d'un ou plusieurs facteurs de coagulation. D'autres tests s'avèrent nécessaires pour identifier le facteur incriminé et le corréler à la présentation clinique. Le degré de prolongation du PT est inversement proportionnel à la déficience en facteur. Toutefois, un PT normal n'exclut pas une déficience (Lubas et al., 2010). D'autre part, les déficiences en facteur de contact (prékallikréine, kininogène, FXII) cause une prolongation de l'aPTT, mais aucune répercussion clinique n'est observée : il n'y a pas de saignement (Angelos & Hamilton, 1986; Girolami, De Marco, Dal Bo Zanon, Patrassi, & Cappellato, 1985; Green & White, 1977).

Finalement, un raccourcissement des valeurs de PT et d'aPTT n'a pas été corrélé à une condition clinique particulière, hormis l'hyperfibrinogénémie (Kurata et al., 2003).

b. La thromboélastographie

1. Principe

La thromboélastographie reflète de manière plus physiologique ce qui se passe *in vivo*. Elle tient compte du modèle cellulaire de la coagulation en y incorporant les éléments cellulaires et plasmatiques (Kol & Borjesson, 2010).

En médecine vétérinaire, une analyse dans les 30 minutes est recommandée (Lubas et al., 2010). En effet, une étude évaluant la stabilité du sang entier citraté conservé à température ambiante pour 30 ou 120 minutes chez le chien a révélé une différence significative dans les résultats des paramètres de TEG®, avec une tendance à l'hypercoagulabilité à 120 minutes. Toutefois la variabilité analytique entre les deux temps restait faible, avec des coefficients de variation allant de 4.3 à 15.7% selon les paramètres de TEG® ; et les tracés obtenus à ces deux temps étaient distincts de ceux obtenus chez des patients hypo- ou hypercoagulables (Wiinberg et al., 2005). Des changements similaires ont été observés en médecine humaine : les résultats de TEG® ne sont pas différents entre 30 et 120 minutes, mais des différences sont

observées au-delà de 120 minutes (Zambruni, Thalheimer, Leandro, Perry, & Burroughs, 2004). Ainsi chez le chien, considérant cette variabilité statistique, il est recommandé de faire des mesures de TEG® à des moments fixes et identiques après la prise de sang pour le suivi de l'état de coagulation (Wiinberg et al., 2005).

Du sang citraté est déposé dans cupule en plastique maintenue à 37°C et renfermant une sonde rattachée à un fil de torsion. La cupule est angulée à 4°45'' par cycle de 10 secondes. Du calcium et du facteur tissulaire sont ajoutés pour initier la coagulation. Lorsque les brins de fibrine se forment entre la sonde et la cupule, la sonde commence à bouger avec la cupule. Ce signal est transmis via un transducteur au logiciel de traitement de l'information (Donahue & Otto, 2005).

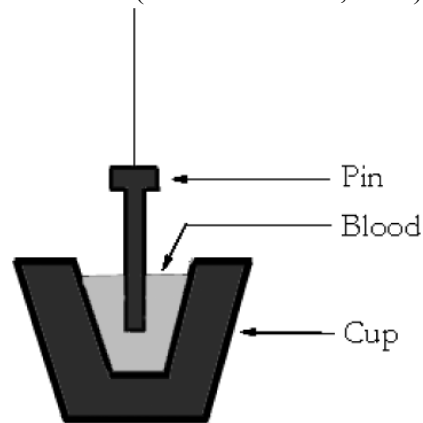


Figure 7 : Schématisation du fonctionnement de la thromboélastographie (Donahue & Otto, 2005).

Le tracé généré s'appelle un thromboélastogramme. Il fournit 5 paramètres (Donahue & Otto, 2005; Kol & Borjesson, 2010; Lubas et al., 2010)

- Le temps de réaction R: il correspond au temps s'écoulant entre le début du tracé et une divergence de 1 mm entre les 2 lignes. Il s'exprime en minutes. Ce paramètre est influencé par les FXII, FXI, FIX, FVIII, FX.
- Le temps de formation du caillot sanguin K: il correspond au temps entre la fin de R et une divergence de 20 mm entre les 2 lignes. Il s'exprime en minutes. Ce paramètre est influencé entre autre par le FII, le FVIII, FX, la fonction et le comptage plaquettaire, le fibrinogène (FI), la fibrine et l'hématocrite.
- L'amplitude maximale du caillot sanguin MA: il correspond à la distance maximale entre les 2 lignes et s'exprime en millimètres. Ce paramètre est influencé par le fibrinogène, la fibrine, le comptage et la fonction plaquettaire, la thrombine, le FXIII et l'hématocrite.
- L'angle de vitesse de formation du caillot sanguin α (en °) est influencé par les mêmes facteurs que K.

- L'indice de fibrinolyse LY30/60 : il correspond au pourcentage de lyse du caillot détecté à 30 ou 60 minutes après que le MA soit atteint.



Figure 8 : Thromboélastogramme et ses paramètres (Donahue & Otto, 2005).

2. Intérêt et limites

En théorie, ce test détecte aussi bien l'hypercoagulabilité, l'hypocoagulabilité que l'altération de la fibrinolyse (Donahue & Otto, 2005). Il peut être affecté par n'importe quel composant de la coagulation (plaquettes, facteurs de coagulation). Il peut être utilisé pour le suivi de certains anticoagulants comme l'héparine. Un état hypercoagulable sera donc caractérisé par une diminution de R, K et LY30/60, une augmentation de MA et de l'angle α ; à l'inverse, un état hypocoagulable sera caractérisé par une augmentation de R, K et LY30/60, une diminution du MA et de l'angle α .

Une étude évaluant l'influence de la technique de prélèvement de l'échantillon sanguin ne montre pas de différence significative entre les paramètres de TEG® activée par la kaolin pour les collectes à travers un cathéter périphérique 18 ou 20G, et un cathéter veineux central 14 ou 13G (Bauer, Er, & Moritz, 2011). Une autre étude montrait des différences significatives entre les sites de collection (veine saphène ou jugulaire) et la méthode (collecte de sang directe par une seringue montée d'une aiguille 20G à travers un cathéter veineux central ou une aiguille papillon 21G reliée à un tube). Toutefois, les différences observées étaient légères et toutes les médianes des paramètres R, K, MA et α restaient dans les valeurs de références établies pour la TEG® activée par le kaolin (Walker, Hanel, Hansen, & Motsinger-Reif, 2012). Par ailleurs, la taille du diamètre du cathéter utilisé pour la prélèvement peut affecter les résultats : une étude réalisée sur le porc a montré une tendance à un état pro-coagulable lorsque le sang est prélevé dans un cathéter de plus faible diamètre (14G versus 20G) : une standardisation de la méthodologie est alors recommandée lorsque des paramètres de coagulation sont comparés (Neate, Boysen, Wagg, Radics, & Caulkett, 2013).

La thromboélastographie peut détecter des états pré-thrombotiques, mais des études sont nécessaires pour déterminer si l'hypercoagulabilité détectée par la TEG® est suffisante pour prédire le développement de thromboses cliniques (Donahue & Otto, 2005).

D'autre part, la variabilité des résultats de TEG® est opérateur et analyseur dépendante (Kol & Borjesson, 2010). Ainsi, pour une étude donnée, les TEG® devraient toujours être réalisées par la même personne et sur le même appareil.

D'autres paramètres peuvent également affecter les résultats. Un hémocrite bas peut causer des états hypercoagulables artéfactuels (Kol & Borjesson, 2010). Un hémocrite augmenté est, quant à lui, associé à des tracés hypocoagulables : ceci a été documenté chez les Greyhound (Vilar et al., 2008). Pour une interprétation éclairée des tracés obtenus, une mesure de l'hémocrite devrait toujours être associée.

L'intervalle de temps entre le moment du prélèvement et l'analyse peut affecter le résultat. Une étude a montré une différence entre les paramètres de la TEG® soumis pour analyses 30 ou 120 minutes après le prélèvement; l'analyse plus tardive étant en faveur d'un état hypercoagulable (Wiinberg et al., 2005). Idéalement, l'analyse devrait toujours être faite au même moment après la ponction pour le suivi.

La fonction et le comptage plaquettaire peuvent affecter la TEG® : une hyper-réactivité des plaquettes peut mener à une diminution et une augmentation des paramètres K et MA respectivement. Une diminution du comptage plaquettaire peut causer une diminution du paramètre R (Bowbrick, Mikhailidis, & Stansby, 2003). Par ailleurs, la TEGPlateletMapping est un test dérivé de la TEG qui permet d'évaluer spécifiquement la fonction plaquettaire et l'effet des anti-agrégants plaquettaires (Kol & Borjesson, 2010). Une hémolyse présente dans l'échantillon peut causer une diminution des paramètres R et MA pour la TEG® activée par la kaolin (Bauer, Eralp, & Moritz, 2010).

Finalement, la race peut influencer les valeurs des paramètres de TEG®. Les Greyhound ont tendance à avoir une vitesse de formation du caillot ralentie : diminution de K et augmentation de l'angle α , et de force plus faible : diminution de MA, comparativement aux races non-Greyhound (Vilar et al., 2008). Ces différences observées peuvent être expliquées par la viscosité sanguine car l'hémocrite des chiens de races Greyhound étaient significativement plus élevé (Vilar et al., 2008).

c. Le temps de génération de thrombine

1. Principe

Le test de génération de thrombine correspond à un test global d'évaluation de la coagulation. Il permet d'évaluer les risques pro-thrombotiques et les effets des nouveaux anticoagulants disponibles sur le

marché. Le test permet de mesurer la quantité de thrombine générée *in vitro* dans un échantillon plasmatique (pauvre ou riche en plaquettes) auquel des activateurs de la coagulation (CaCl₂, facteur tissulaire recombinant humain), un substrat fluorogénique et des phospholipides sont ajoutés. L'automatisation du test (Calibrated Automated Thrombogram, CAT) est permis par l'utilisation d'un logiciel informatique (Thrombinoscope®) qui enregistre en continu la thrombine produite dans l'échantillon, et génère un thrombogramme (Herring & McMichael, 2012; Peters & Gothot, 2009). La génération de thrombine est mesurée en comparant la fluorescence générée dans l'échantillon après l'activation de la coagulation, à la fluorescence présente dans une solution de thrombine de concentration pré-calibrée.

Chaque évaluation requière deux ensembles de lecture: dans le premier, la génération de thrombine est observée (puits GT); dans le second, le calibrateur de thrombine est présent (puits calibrateur). Des microplaques contenant 96 puits sont utilisées pour le test. Les lectures sont faites en triplicata.

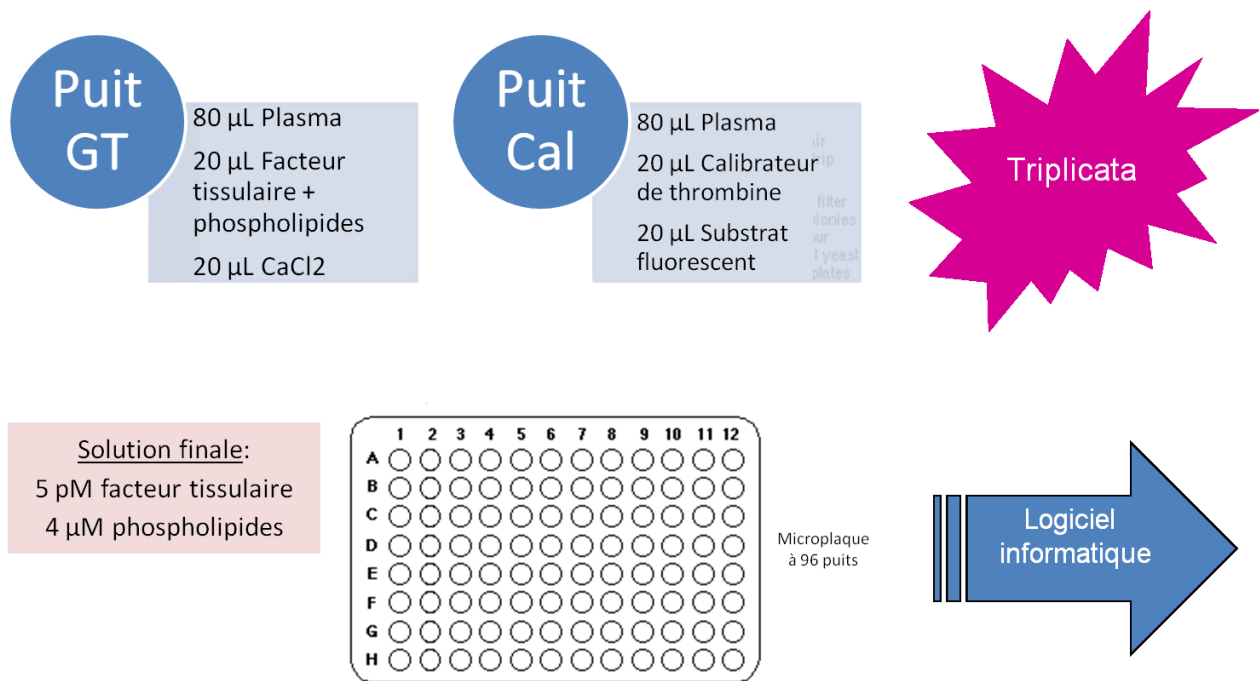


Figure 9: Les différentes étapes de la réalisation du test de génération de thrombine.

2. Les paramètres du test

Le thrombogramme matérialise la quantité de thrombine générée dans l'échantillon en fonction du temps. Différents paramètres sont issus du thrombogramme (Al Dieri, de Laat, & Hemker, 2012; Peters & Gothot, 2009):

- Lag time (exprimé en minutes): il correspond au temps requis pour générer 10 nanomolaires (nM) de molécules de thrombine.
- Peak (exprimé en nM): il correspond à la concentration maximale de thrombine générée dans l'échantillon sanguin.
- Time to peak (exprimé en minutes): il correspond au temps de concentration maximale de la thrombine.
- ETP (Endogenous Thrombin Potential, exprimé en nM/minute): il correspond à la synthèse totale des molécules de thrombine. Il est issu de l'aire sous la courbe et représente la « concentration de la thrombine en fonction du temps ».
- Rate index (exprimé en nM/minute): ce paramètre est calculé à partir de la formule suivante : $\text{peak}/(\text{Time to peak} - \text{lag time})$. Il correspond à la vitesse de formation de thrombine dans l'échantillon durant la phase de propagation de la coagulation.

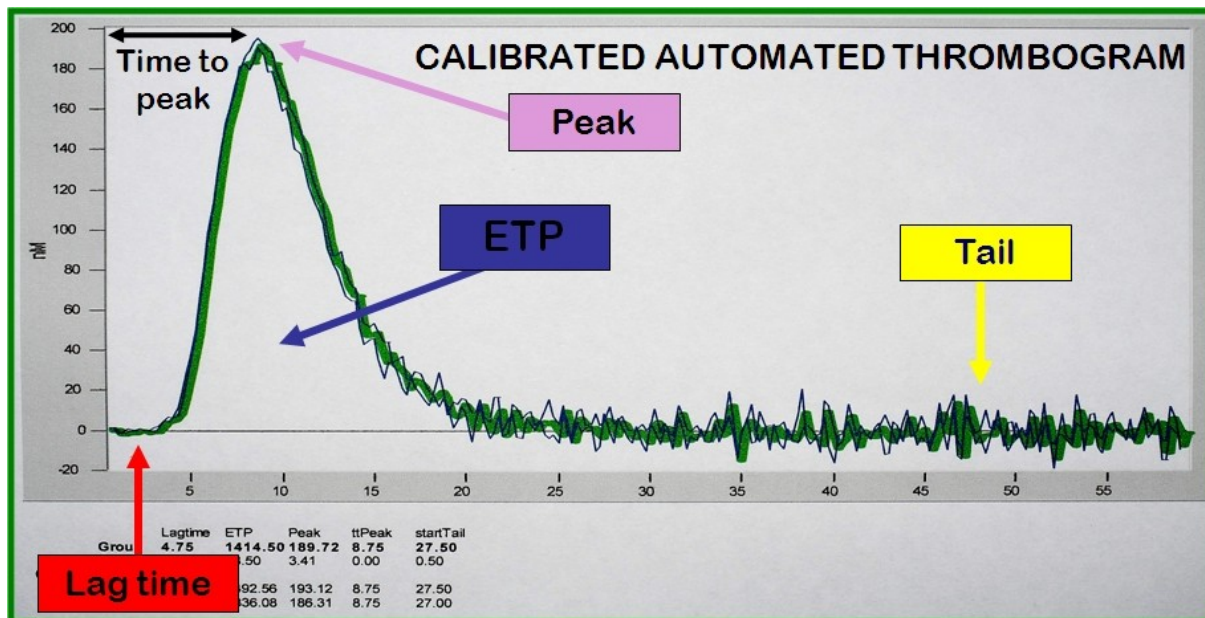


Figure 10 : Les différents paramètres du thromboélastogramme ([www.practical-haemostasis](http://www.practical-haemostasis.com)).

3. Intérêt et limites

Le test de génération de thrombine permet d'évaluer des états hyper- et hypo-coagulables, et de suivre les effets des médications anticoagulantes. Toutefois, une standardisation est nécessaire pour comparer les études cliniques. En effets, plusieurs facteurs peuvent faire varier les résultats (Dargaud et al., 2007; Gerotziafas et al., 2005).

Le facteur tissulaire recombinant humain (issu d'une thromboplastine diluée) est essentiel pour réaliser le CAT. Des concentrations comprises entre 3 et 6 pM sont physiologiques et sont recommandées. L'utilisation de concentrations supérieures à 12 pM cause une diminution du lag time, du time to peak, et une augmentation du rate index.

Les phospholipides permettent la formation des complexes tenase et prothrombinase. La concentration optimale à ajouter au plasma (pauvre ou riche en plaquettes) est de 4 μ M (Gerotziafas, 2007).

d. Activité anti-facteur Xa

1. Principe

Ce test reflète l'action inhibitrice de l'anticoagulant, le rivaroxaban par exemple, sur le facteur Xa de la coagulation. Le facteur Xa libre dans l'échantillon sanguin clive un substrat synthétique sur l'extrémité duquel un chromogène para-nitroaniline est fixé. Une fois le chromogène libéré, l'automate détecte le changement d'absorbance dans la solution à la longueur d'onde de 405 nm. Le rivaroxaban inhibe l'activité du facteur Xa, empêchant ainsi la libération du chromogène dans la solution. La quantité de para-nitroaniline à l'équilibre se retrouve inversement proportionnelle à la concentration de rivaroxaban dans l'échantillon testé (Harenberg et al., 2011; Lindhoff-Last, Samama, Ortel, Weitz, & Spiro, 2010). Dans le test utilisé (STAGO®), 50 μ L de plasma citraté est incubé avec 100 μ L de substrat chromogénique pour 4 minutes. Ensuite, 100 μ L de facteur X exogène sont ajoutés et sont potentiellement inhibés par l'anticoagulant plasmatique.

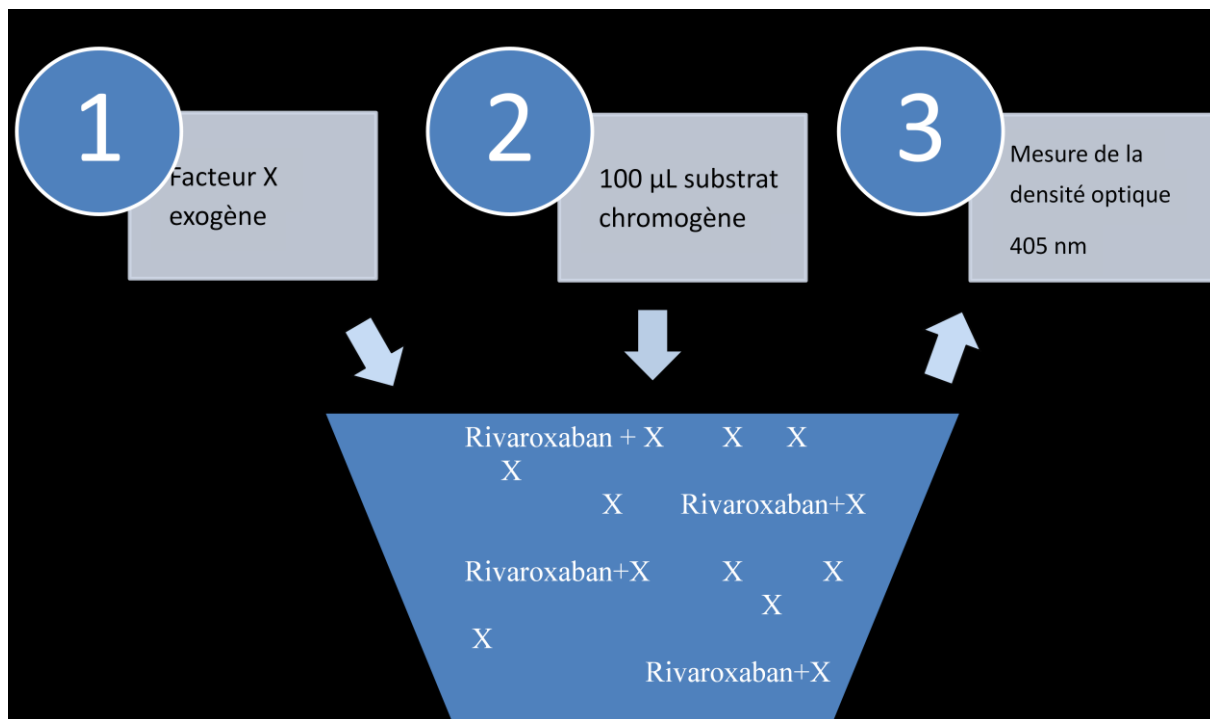


Figure 11 : Principe du test d'activité anti-facteur Xa.

2. Intérêt et limites

Ce test est fréquemment utilisé pour le suivi des patients traités avec de l'héparine et des HBPM (Lubas et al., 2010). L'automate utilise une courbe de calibration spécifique à l'anticoagulant en question afin de convertir la densité optique présente dans l'échantillon en une concentration d'anticoagulant présente dans la solution (Miyares & Davis, 2012).

Dans la présente étude, faute de la disponibilité d'un calibrateur spécifique au rivaroxaban, les échantillons sanguins ont été soumis au test utilisant la courbe de calibration de la daltéparine (STA Rotachrom®, Diagnostica Stago, Arrsenière-sur-Seine, France). C'est pourquoi, la densité optique est rapportée, car celle-ci reflète la réaction enzymatique et le résultat est plus approprié et précis. En effet, des études menées en médecine humaine sur le rivaroxaban ont montré que les résultats exprimés en U/mL (unités pour l'héparine de bas poids moléculaire) variaient considérablement entre les tests (Harenberg et al., 2011).

Etant donné que le rivaroxaban est un inhibiteur direct du facteur X de la coagulation, l'évaluation de ce test reflète directement l'activité de l'anticoagulant. Toutefois, le test utilisé dans l'étude ne nous permet pas de mesurer directement la concentration de rivaroxaban dans l'échantillon : les densités optiques sont

rapportées car le test utilise une courbe de calibration pour l'héparine de bas poids moléculaire. Afin de quantifier la concentration plasmatique en rivaroxaban, la spectrométrie de masse en chromatographie liquide à haute performance (HPLC-MS) demeure la méthode de référence (Asmis et al., 2012; Lindhoff-Last et al., 2010), mais n'était pas disponible pour cette étude.

D'autre part, récemment, un test chromogénique de mesure d'activité anti-facteur Xa utilisant une courbe de calibration spécifique au rivaroxaban est devenu disponible : il permet de convertir directement la densité optique présente dans l'échantillon en une concentration plasmatique en rivaroxaban en ng/mL (Mani et al., 2012; Samama et al., 2012). Toutefois, ce test n'était pas disponible au moment des manipulations du projet de recherche.

4- Influence de l'hémolyse, l'ictère et la lipémie sur les test de coagulation

Les tests de laboratoire disponibles détectent de la coagulation soit mécaniquement (comme le PT, l'aPTT, la TEG®), soit optiquement (comme l'activité anti-facteur Xa, la génération de thrombine, le PT, l'aPTT). Selon que la méthode de détection de la coagulation employée soit mécanique ou optique, les résultats peuvent être affectés respectivement par la lipémie, ou la lipémie et l'ictère (Lubas et al., 2010).

L'hémolyse peut également affecter les tests de coagulation par différents mécanismes (Lippi, Plebani, & Favalaro, 2013) : d'une part pour les tests utilisant une méthode de détection optique, l'hémoglobine libérée peut être absorbée à la longueur d'onde utilisée par l'automate ; et d'autre part, la lyse des globules rouges entraîne la libération de facteur tissulaire, de composants intra-cellulaires tels que les protéases, et de phospholipides membranaires qui peuvent activer la coagulation sanguine. Une étude a montré qu'un échantillon plasmatique humain ayant un pourcentage de lyse $\geq 0.9\%$, ce qui correspond à une concentration en hémoglobine libre de 1.7 g/L (0.105 mmol/L), influence la fiabilité des temps de coagulation. En effet, le pourcentage de variations des valeurs obtenues par rapport à la valeur normale (sans hémolyse) dépasse celui recommandé dans le cadre du contrôle qualité : une diminution significative de l'aPTT a été observée sur les échantillons ayant un pourcentage de lyse $\geq 0.9\%$, mais une augmentation significative a été notée sur les échantillons ayant un pourcentage de lyse $\geq 0.5\%$ (Lippi, Montagnana, Salvagno, & Guidi, 2006). De façon similaire, une étude menée chez le chien a révélé une sous-estimation de l'aPTT et une surestimation du PT dans des échantillons plasmatiques ayant une concentration en hémoglobine libre de 0.6 et 1.3 mmol/L, mais une surestimation de l'aPTT et une sous-estimation du PT dans des échantillons ayant une concentration en hémoglobine libre de 6.6 mmol/L (Bauer, Eralp, & Moritz, 2009). Dans une autre étude réalisée chez le chien, l'hémolyse évaluée pour des concentrations en hémoglobine plasmatique variant de 0.048 à 12.5 g/L, diminuait significativement les résultats d'aPTT. Mais cette variation n'avait pas de signification clinique car les résultats obtenus restaient dans les valeurs

de référence (Moreno & Ginel, 1999). Concernant la thromboélastographie avec activation par le kaolin chez le chien, une hémolyse mécanique de l'échantillon sanguin cause une diminution du paramètre R, mais la stabilité du caillot sanguin est diminuée, ce qui est matérialisé par une diminution de l'angle α et du paramètre MA (Inen, 2011). Il a été documenté que le test de génération de thrombine est également directement affecté par le nombre de microparticules créées par la lyse des érythrocytes lors de l'hémolyse d'échantillons plasmatiques humains. Leurs présences favorisent l'hypercoagulation par l'exposition des phosphatidylsérines et par l'initiation de la génération de thrombine *via* un mécanisme dépendant du FXI (Gao, Lv, Liu, Ma, & Su, 2013). Sur des échantillons plasmatiques canins hémolysés contenant une concentration en hémoglobine libre de 0.6, 1.3 ou 6.6 mmol/L, l'activité anti-facteur Xa est un test hautement modifié par rapport à l'échantillon contrôle et révèle un résultat augmenté d'environ 600% par rapport au contrôle (Bauer et al., 2009).

Comme pour l'hémolyse, l'hyperbilirubinémie peut causer un chevauchement spectral avec les automates utilisant une détection optique de la coagulation. Il a toutefois été montré en médecine humaine que ce biais est minimisé avec des automates employant des longueurs d'onde ≥ 650 nm avec des échantillons ayant une concentration en bilirubine ≤ 20 mg/dL (Lippi et al., 2013). Chez le chien, il a été documenté que la bilirubinémie, pour des concentrations allant de 0.0023 à 0.6 g/L, diminuait et augmentait significativement les mesures de PT et d'aPTT respectivement. Toutefois ces variations n'avaient pas de signification clinique car les résultats obtenus restaient des valeurs de référence (Moreno & Ginel, 1999).

Pour les automates utilisant une méthode de mesure optique, lors de lipémie, les triglycérides peuvent affecter les résultats en diffusant la lumière et en déplaçant les volumes cellulaires. Ce biais peut être minimisé en médecine humaine avec l'usage d'automates utilisant une longueur d'onde ≥ 650 nm, ou en diluant l'échantillon plasmatique, ou encore en réalisant une micro-centrifugation à haute vitesse, ou enfin en utilisant des solvants organiques d'extraction de lipide tels que l'n-hexane par exemple (Lippi et al., 2013). Chez le chien, une lipémie sévère (concentration en triglycérides > 1.25 g/L), occasionne une diminution légère mais non significative cliniquement du PT (Moreno & Ginel, 1999). Une seconde étude canine a montré que la lipémie, pour des proportions lipides:plasma de 1:1184, 1:296 et 1:74, n'affecte pas significativement les résultats du PT, de l'aPTT ni de l'activité anti-facteur Xa (Bauer et al., 2009). L'effet d'une hypertriglycémie sur les résultats de thromboélastographie et du test de génération de thrombine n'a pas été étudié en médecine canine.

A la lumière de toutes ces données, la collection sanguine en vue d'une évaluation de coagulation doit se faire de façon atraumatique afin de limiter l'hémolyse mécanique et sur un patient à jeun. Chez un patient ictérique, les résultats doivent être interprétés avec précautions, considérant les interférences avec les automates utilisant une méthode de détection optique de la coagulation.

II- Les thromboses chez le chien

1- Les thromboses veineuses *versus* artérielles

L'implication de l'endothélium vasculaire dans la pathogénie des thromboses artérielles est différente de celle des thromboses veineuses (Lopez & Chen, 2009).

En effet, les **thromboses aortiques** se forment dans des conditions de **hautes turbulences** qui endommagent l'endothélium vasculaire, exposant ainsi les ligands adhésifs, tels que le collagène, le FT et le vWF. Le corps du thrombus aortique est composé de **plaquettes**. Dans le cas de **thromboses veineuses**, celles-ci se forment lors de **basses turbulences** sans dommages directs de l'endothélium. Le corps du thrombus est alors composé de **fibrine** et de globules rouges, avec les plaquettes qui s'ajoutent secondairement. Le thrombus initial se rattache à l'endothélium non thrombogénique par plusieurs mécanismes, dont la stase veineuse et/ou l'inflammation. La stase veineuse promeut la formation de thrombi en empêchant l'évacuation de molécules de thrombine nouvellement formées, et par l'entremise de l'hypoxie (voir chapitre I.2.) L'inflammation cause la relâche de granules contenues dans les cellules endothéliales et contenant le vWF et la sélectine P. Ces deux dernières molécules ont la capacité de se lier aux leucocytes, et en particulier aux monocytes qui vont synthétiser le FT.

Dans le cas d'embolies pulmonaires, les thromboses sont mixtes (Donahue & Otto, 2005). Les thromboses spléniques s'apparentent aux thromboses veineuses.

Considérant les différentes compositions dans la formation des thromboses aortiques ou veineuses, la prise en charge thérapeutique reposera essentiellement sur l'usage d'antiagrégants plaquettaires (lors de thromboses aortiques) ou d'anticoagulants (lors de thromboses veineuses) (Dunn & Brooks, 2009).

2- Les conditions associées aux thromboses chez le chien

a. Entéropathie avec perte de protéines et entérite

La prévalence des thromboses associées aux entéropathies avec perte de protéines (PLE) est relativement faible : 1-3 % (Laurenson, Hopper, Herrera, & Johnson, 2010; Respass et al., 2012). Les PLE résultent de maladies intestinales sévères qui autorisent la fuite de protéines dans la lumière intestinale. L'état hypercoagulable des chiens diagnostiqués avec une entéropathie avec perte de protéines a été confirmé dans une étude (Goodwin, Goggs, Chan, & Allenspach, 2011): la TEG® de ces chiens montrait un raccourcissement des temps R, K, et une augmentation de l'angle α , et de l'amplitude MA du caillot sanguin.

La perte de protéines anticoagulantes, telles que l'anti-thrombine comme cause de l'hypercoagulabilité est suspectée par plusieurs auteurs. Mais d'autres données de la littérature montre l'implication d'autres composants dans l'hypercoagulabilité observée chez les chiens atteints de PLE. Dans l'étude de Goodwin (Goodwin et al., 2011), la concentration plasmatique en anti-thrombine chez les chiens atteints de PLE se situait dans la limite basse (65% ou moins), ce qui pourrait expliquer en partie l'état hypercoagulable de ces chiens. Toutefois la condition inflammatoire sous-jacente à l'entéropathie, documentée par une augmentation modérée de la fibrinogénémie plasmatique et par une corrélation entre le comptage leucocytaire et le paramètre MA de la TEG®, est également suspectée participer à la condition hypercoagulable de ces chiens. En revanche, le degré d'hypercoagulabilité n'était pas associé à la sévérité de l'hypoalbuminémie, et malgré l'amélioration de la concentration en albumine avec le traitement, il n'était pas noté d'amélioration dans le degré d'hypercoagulabilité mesurée par la TEG®, la fibrinogénémie ou la concentration en AT. L'évidence clinique de thromboembolisme était faible dans cette étude : confirmé pour 1/15 cas au niveau de l'artère fémorale, et suspecté (thrombose pulmonaire) sur 1/15 présentant une dyspnée aiguë. Dans d'autres études évaluant les conditions associées aux thromboses spléniques et portales chez le chien, 1% et 3% des cas étaient associés à des PLE respectivement (Laurenson et al., 2010; Respass et al., 2012). Un traitement anticoagulant peut être mis en place selon l'inquiétude et la discrétion du praticien, ou l'évidence d'un état hypercoagulable ou de thrombose.

Chez le chien, les entérites dues au parvovirus conduisent à un état hypercoagulable (documenté par la TEG®) et des thromboses cliniques sans CIVD (Otto, Rieser, Brooks, & Russell, 2000). Les causes semblent multi-factorielles : un effet pro-coagulant causé par des endotoxines ou des cytokines, une perte des anticoagulants naturels, une consommation de l'anti-thrombine et une augmentation de la concentration en fibrinogène sont suspectés contribuer à cet état hypercoagulable (Otto et al., 2000; Prittie, 2004). Des thromboses associées à la présence d'un cathéter ou d'une phlébite ont également été documentées chez les chiens atteints de parvovirose (Otto et al., 2000).

b. Néphropathie avec perte de protéines

L'incidence des thromboses chez les patients atteints de glomérulopathies oscille de 9 à 25% (Cook & Cowgill, 1996; Lake-Bakaar, Johnson, & Griffiths, 2012; Laurenson et al., 2010; Respass et al., 2012). Dans différentes études évaluant les conditions associées aux thromboses chez le chien, 35% des cas de thromboses aortiques, 9% des cas de thromboses spléniques et 9% des cas de thromboses portales étaient associés à des néphropathies avec perte de protéines (Laurenson et al., 2010; Respass et al., 2012; Winter, Sedacca, Adams, & Orton, 2012). Une étude a montré que la TEG® des chiens atteints de néphropathie

avec perte de protéines montre un profil hypercoagulable : raccourcissement du R et augmentation de l'angle α par rapport aux chiens contrôles (Lennon, Hanel, Walker, & Vaden, 2013). Une autre étude, qui par ailleurs confirme la présence d'un profil hypercoagulable par l'évaluation de la TEG®, n'a pu identifier par l'analyse de l'activité de l'AT, anti-plasmine, protéine C, plasminogène, la concentration en fibrinogène, D-dimères et vWF, de facteurs propres au développement de thromboses chez les chiens atteints de néphropathie comparativement aux patients avec une autre maladie systémique (Donahue, Brooks, & Otto, 2011). On suspecte d'autres mécanismes responsables de cet état hypercoagulable : une hyperagrégabilité plaquettaire secondaire à l'hypercholestérolémie accompagnant la glomérulopathie (Abdullah, 1988; Kittrell & Berkwitz, 2012a, 2012c), une dysfonction endothéliale, et/ou une stase sanguine (Donahue et al., 2011). La concentration en albumine, l'activité de l'anti-thrombine et le ratio protéines sur créatinine urinaire (RPCU) ne permettent pas à eux-seuls de prédire cet état hypercoagulable, ni l'apparition de thromboses (Lennon et al., 2013).

c. Les états inflammatoires

Lors de syndrome de réponse inflammatoire systémique, la prévalence des thromboses spléniques est de 26% (Laurenson et al., 2010), et celle des thromboses portales est de 39 % (Respass et al., 2012).

Normalement un équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse est maintenue pour éviter la formation de thrombose ou l'apparition de saignement. Cet équilibre est rompu lors d'état inflammatoire : un état pro-coagulable s'installe et ceci est permis par plusieurs mécanismes (Cheng et al., 2011; Cunningham, Rush, & Freeman, 2012; Esmon, 2005; Margetic, 2012; O'Brien, 2012):

- l'activation directe de la coagulation par les cytokines inflammatoires (Tableau II)

TNF	IL-1	IL-6
<ul style="list-style-type: none"> - supprime le t-PA - stimule la relâche de PAI-1 - inhibe l'expression des récepteurs endothéliaux de la protéine C et de la thrombomoduline - induit l'expression du FT sur les monocytes et les cellules endothéliales 	<ul style="list-style-type: none"> - inhibe l'expression des récepteurs endothéliaux de la protéine C et de la thrombomoduline 	<ul style="list-style-type: none"> - induit l'expression du FT sur les monocytes et les cellules endothéliales - stimule la production de plaquettes - augmente la thrombogénicité des plaquettes

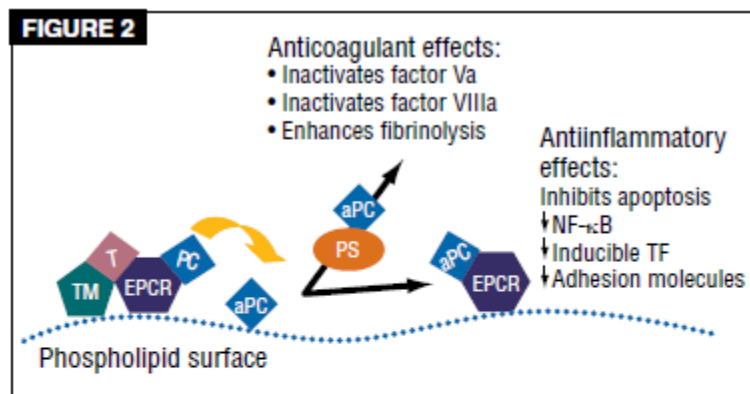
Tableau II: Implication des différentes cytokines inflammatoires dans l'activation de la coagulation (O'Brien, 2012).

Les leucocytes impliqués dans l'inflammation participent également à un état pro-coagulable. Les neutrophiles renferment l'élastase qui détruit l'anti-thrombine, et clive le TFPI et la thrombomoduline. Ils libèrent également une enzyme, la cathepsine G, qui a la propriété d'activer les plaquettes. Les monocytes activés quant à eux, expriment le FT et libèrent des micro-vésicules l'exprimant aussi.

En présence d'inflammation, le foie produit la protéine C réactive (CRP) et l'alpha-1 antitrypsine. La CRP induit l'expression du FT à la surface des neutrophiles, des macrophages et des cellules endothéliales. La CRP favorise également l'activation du complément afin de recruter les neutrophiles et de les attirer sur le site inflammatoire, de produire des cytokines inflammatoires, d'exposer les phospholipides à la surface des cellules et d'inactiver la protéine S. L'alpha-1 antitrypsine clive le TFPI.

- la répression des anticoagulants endogènes

Lors d'inflammation, l'AT est consommée et inactivée par la protéolyse. De plus, les cytokines inflammatoires et les produits libérés par les neutrophiles diminuent la quantité de glycosaminoglycans endothéliaux endogènes (héparine-like) qui normalement favorisent l'activité de l'AT. La protéine C est moins activée en raison de l'inhibition de la transcription des récepteurs endothéliaux à la protéine C : elle ne peut alors pas réaliser ses fonctions anticoagulantes et anti-inflammatoires. Par ailleurs, lors d'inflammation sévère, la synthèse de la protéine C est moindre en raison d'une capacité de synthèse protéique compromise par la dysfonction hépatique.



Functions of activated protein C (aPC). Activation of protein C (PC) is initiated by the binding of thrombin (T) to thrombomodulin (TM); however, this reaction is more efficient when PC forms a complex with endothelial cell protein C receptor (EPCR). Subsequent function of aPC depends on its associations. aPC that remains bound to EPCR exhibits antiinflammatory properties. Free aPC can complex with protein S (PS) to exert anticoagulant properties. *NF-κB* = nuclear factor κB; *TF* = tissue factor.

Figure 12: Activation et fonctions de la protéine C (Cheng et al., 2011).

- l'inhibition de la fibrinolyse

Les états inflammatoires altèrent le système fibrinolytique en augmentant la production de PAI-1 par les cytokines telles que le TNF et la CRP. Ensuite, l'inhibiteur de fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI) est produit, ce qui cause une diminution de l'activation de plasminogène, et une diminution subséquente de la génération de plasmine.

d. Les maladies à médiation immunitaire

i. Anémie hémolytique à médiation immunitaire (AHMI)

Lors d'AHMI, la prévalence des thromboses spléniques est de 10 % (Laurenson et al., 2010), et celles des thromboses pulmonaires est de 10.6% (Johnson, Lappin, & Baker, 1999). Une autre étude rapporte la présence de thrombi à l'examen post-mortem des chiens morts d'AHMI dans 80% des cas, avec comme site de prédilection la veine splénique (Carr, Panciera, & Kidd, 2002). Cet état hypercoagulable peut être mis en évidence par la TEG® où une diminution du K et une augmentation de MA et de l'angle α sont observés (Fenty, Delaforcade, Shaw, & O'Toole, 2011). Les mécanismes sous-jacents impliqués sont l'hémolyse qui cause une libération d'hémoglobine. Cette dernière, ainsi que l'hème, mènent à l'activation des cellules endothéliales (stress oxydatif et expression du FT), à une dysfonction de l'endothélium vasculaire et à une vaso-constriction. De plus, l'hémoglobine libre piège l'oxyde nitrique, réduisant ainsi sa disponibilité (l'oxyde nitrique possède des propriétés vasodilatatrices) et favorisant l'agrégation plaquettaire. Les cytokines libérées par les globules rouges lysés et les cellules endothéliales endommagées causent de l'inflammation et l'activation cellulaire. Les plaquettes activées, les globules rouges endommagés et les microparticules sont pro-coagulantes en raison de la présence de phospholipides anioniques, tels que les PS, à leur surface (Kidd & Mackman, 2013; Ridyard, Shaw, & Milne, 2010). L'état inflammatoire contribue à la formation de thrombose aussi bien aortique que veineuse.

Une étude rétrospective rapporte des taux de survie améliorés chez les patients canins traités avec de faibles doses d'aspirine (Weinkle et al., 2005). Une autre étude a montré que, en plus des immunosuppresseurs, l'utilisation de clopidogrel seul ou en combinaison avec l'aspirine à faible dose était sécuritaire et que le taux de survie des chiens traités ainsi était similaire à celui des chiens traités avec de faibles doses d'aspirine (Mellett, Nakamura, & Bianco, 2011). Toutefois, une revue systématique révisant les traitements de l'AHMI dont les anticoagulants au sens large, e.g: aspirine, clopidogrel, héparine, daltéparine, n'a pu déterminer si une molécule est plus efficace qu'une autre, en raison de

l'absence d'étude-contrôle et de standardisation des traitements (Swann & Skelly, 2013). La réalisation d'études-contrôles semble difficile à réaliser pour des raisons éthiques car il est communément admis qu'un traitement anti-thrombotique est recommandé chez les patients atteints d'AHMI.

ii. Thrombocytopénie à médiation immunitaire (TMI)

Trois pourcent des thromboses spléniques sont dues à une TMI associée à une AHMI (Laurenson et al., 2010). Il a été montré dans une étude que les chiens avec des AHMI, particulièrement ceux avec une thrombocytopénie sévère concomitante, présentaient une activation plaquettaire accrue (Ridyard et al., 2010). L'apparition d'un état pro-thrombotique a été documenté par la TEG® particulièrement lors de l'instauration du traitement à base de corticoïdes et d'un comptage plaquettaire supérieur à $40 \times 10^9/L$ (O'Marra, Shaw, & deLaforcade, 2012). Les mécanismes suspectés sont la condition inflammatoire, le changement dans le nombre et la fonction plaquettaire et l'effet du traitement (en particulier l'administration de corticoïdes).

iii. Autres

Les polyarthrites à médiation immunitaire, le pemphigus et le lupus ont été identifiés comme causes de thromboses spléniques (Laurenson et al., 2010). Les maladies à médiation immunitaires sont bien connues pour représenter un facteur de risque de thromboses chez l'humain : la production d'anticorps anti-phospholipides est suspectée être un des mécanismes sous-jacents (Laurenson et al., 2010). En plus de l'état inflammatoire associé à ces maladies auto-immunes, les corticoïdes représentent la médication la plus fréquemment prescrite, et prédisposent à la formation d'un état hypercoagulable (voir section j.). Une évaluation de la coagulation chez les patients traités pour ces maladies à médiation immunitaires devraient être considérée.

e. Les affections hépatobiliaires et pancréatiques

Les maladies hépato-biliaires et les pancréatites représentent respectivement 11% et 18% des cas de thromboses spléniques (Laurenson et al., 2010), et 42% et 3% des cas de thromboses portales (Kavanagh, Shaw, & Webster, 2011; Respass et al., 2012).

Lors de maladies hépato-biliaires, l'activation et l'agrégation plaquettaire dans le foie résulte en la formation de micro-thrombi. Ces petits thrombi causent des dommages tissulaires locaux et la progression de la maladie hépatique. Lors d'hypertension portale, le stress exercé par le flux sinusoidal altéré

contribue à cet état pro-thrombotique (de Laforcade, 2012; Kavanagh et al., 2011). Aussi, lors de maladies hépato-biliaires, la synthèse de l'AT et de la CRP peut être diminuée et contribuer au développement de thromboses (Kavanagh et al., 2011). Sinon, à l'inverse un état hypocoagulable peut être observé à cause d'un défaut de production des éléments pro-coagulants normalement synthétisés par le foie (Prins, Schellens, van Leeuwen, Rothuizen, & Teske, 2010).

Par ailleurs, une étude prospective montre que les patients canins présentant une obstruction biliaire extra-hépatique partielle ou totale sont dans un état hypercoagulable (augmentation des paramètres MA, α , et diminution des paramètres K et R de la TEG®). Cela pourrait contribuer en partie à la mortalité/morbidité des chiens traités chirurgicalement (Mayhew et al., 2013).

Les cytokines inflammatoires relâchées en présence de pancréatite (en particulier le TNF et l'IL1) entraînent une augmentation de la production des inhibiteurs de fibrinolyse : le PAI-1, l' α -2 antiplasmine et le facteur fibrinolytique activé par la thrombine (Kittrell & Berkwitz, 2012a). Cela contribue à un état hypercoagulable.

f. La septicémie

Le sepsis correspond, chez le chien, à la mise en évidence d'agent(s) pathogène(s) et d'au moins 2 des critères suivants : hypo- ou hyperthermie ($<37.8^{\circ}\text{C}$ ou $>39.4^{\circ}\text{C}$), tachycardie (fréquence cardiaque >140 battements par minute), tachypnée (fréquence respiratoire > 20 respirations par minute), leucopénie (< 6000 cellules/ μL), leucocytose (> 16000 cellules/ μL) ou $>3\%$ de neutrophiles immatures (band cells) (de Laforcade et al., 2003). Une étude a montré, lors de sepsis, une diminution de l'activité des protéines anticoagulantes circulantes. Cela favorise ainsi le développement d'un état procoagulable : 75% des chiens septiques avaient une activité d'AT $< 75\%$ (risque de thrombose considérée modérée lorsque l'activité de l'AT est comprise entre 50 et 75%), et 35% avaient une activité d'AT $< 50\%$ (risque de thrombose considérée extrême) (de Laforcade et al., 2003). D'autres études ont également montré une diminution de la CRP (de Laforcade, Rozanski, Freeman, & Li, 2008) et une augmentation de l'activité de l'inhibiteur de fibrinolyse activé par la thrombine (Jessen et al., 2010) comme causes sous-jacentes au développement de l'hypercoagulabilité chez les chiens septiques (de Laforcade, 2012).

g. Les néoplasmes

Dans des études rétrospectives, un néoplasme était présent dans :

- 21% des cas de thromboses portales (néoplasme hépatique, pancréatique, gastro-intestinal ou splénique) (Respass et al., 2012)

- 54% des cas de thromboses spléniques (tumeur des cellules rondes dans 25%, tumeur des cellules épithéliales dans 15% et tumeur des cellules mésenchymateuses dans 5%) (Laurenson et al., 2010)
- 19% des cas de thromboses aortiques (lymphome, ostéosarcome, carcinome surrenalien, autre tumeur surrenalienne, sarcome cardiaque) (Lake-Bakaar et al., 2012)
- 1.8% des cas de thromboembolie pulmonaire (lymphome, leucémie, tumeur cérébrale, ostéosarcome, histocytome splénique, carcinome des cellules transitoires de la vessie) (Johnson et al., 1999)

Dans une étude prospective évaluant la coagulation chez des chiens diagnostiqués avec des tumeurs bénignes ou malignes (à l'aide d'une TEG® activée par le FT recombinant humain), l'anomalie hémostatique la plus fréquente rencontrée chez les chiens avec des tumeurs malignes était un état hypercoagulable où une augmentation de l'angle α et du MA était documentée. Les principales tumeurs associées à un état hypercoagulable étaient l'hémangiosarcome, le lymphome, le mastocytome et l'ostéosarcome (Kristensen, Wiinberg, Jessen, Andreasen, & Jensen, 2008). Dans une autre étude répertoriant 71 chiens avec des tumeurs malignes, 66% montraient un profil hypercoagulable (TEG®). Le sarcome était la tumeur la plus fréquemment identifiée (42%) (Andreasen, Tranholm, Wiinberg, Markussen, & Kristensen, 2012). Finalement, une étude s'intéressant aux carcinomes canins montre la présence d'un état hypercoagulable et d'une thrombocytose dans 46% des cas. Dans cette dernière étude, l'étendue de la tumeur n'était pas associée à l'état hypercoagulable (Vilar Saavedra, Lara Garcia, Zaldivar Lopez, & Couto, 2011). Un dépistage devrait alors être considéré chez les patients diagnostiqués avec une tumeur.

Les mécanismes sous-jacents au développement d'un état pro-coagulable sont multi-factoriels et affectent les 3 aspects de la triade de Virchow. Les cellules tumorales peuvent en elles-mêmes induire la génération de thrombine en exprimant le FT, produisant du fibrinogène, ou en réprimant les protéines anticoagulantes endogènes (AT, protéine C, protéine S) (de Laforcade, 2012). L'hyper-réactivité plaquettaire a été documentée dans plusieurs types de cancer et l'augmentation de microparticules issues de plaquettes (exprimant le FT aussi) est associée à l'hypercoagulabilité et au développement de métastases (Blann & Dunmore, 2011; Kittrell & Berkwitt, 2012a).

h. L'hyperadrénocorticisme

Dans différentes études, l'hyperadrénocorticisme est responsable de 2.7 % des thromboses pulmonaires (Johnson et al., 1999), 6% des thromboses portales (Respass et al., 2012), 4% des thromboses spléniques (Laurenson et al., 2010) et 3.2 % des thromboses aortiques (Lake-Bakaar et al., 2012).

Chez l'humain, l'hyperadrénocorticisme est également connu comme un facteur de risque au développement de thromboses veineuses (Van Zaane et al., 2009). En médecine canine, plusieurs études ont été menées afin de caractériser la pathogénèse des thromboembolies associées à cette dysendocrinie. La pathogénie semble complexe.

Une étude prospective récente a mis en évidence, chez les chiens présentant un hyperadrénocorticisme spontané, un état hypercoagulable documenté par la TEG® montrant un MA prolongé chez de tous les patients, par une augmentation des complexes thrombine-antithrombine (ATA) et par une augmentation du fibrinogène, associé surprenamment à une dysfonction/hyporéactivité plaquettaire (Kol, Nelson, Gosselin, & Borjesson, 2013). Alors que la concentration en fibrinogène se normalise en cours de traitement, la TEG® montre un état hypercoagulable persistant chez les chiens contrôlés, suggérant un effet prolongé/idiosyncrasique des glucocorticoïdes endogènes, et que le fibrinogène n'est pas le seul responsable de l'augmentation du MA. Dans cette étude, 52% des chiens, ayant sur la TEG® un MA augmenté sans autre altération en faveur d'un état hypercoagulable, présentaient d'autres tests de laboratoires en faveur d'un état pro-coagulable dont une activité d'AT diminuée. Documentée également dans une autre étude (Jacoby, Owings, Ortega, Gosselin, & Feldman, 2001), cette diminution d'activité d'AT, associée à l'augmentation de la présence des complexes TAT, suggère une consommation de l'AT plutôt que sa perte (Kittrell & Berkwitz, 2012a).

La présence d'un état hypercoagulable chez les chiens Cushing a été documentée par la TEG®, la GT (Klose, Creevy, & Brainard, 2011; Rose, Dunn, & Bedard, 2013), et une augmentation de la concentration des facteurs activés de coagulation II, V, VII, IX, X, XII (de Laforcade, 2012; Jacoby et al., 2001).

En médecine humaine, les causes sous-jacentes au développement de thromboses sont multiples (Tableau III) et réfèrent à la triade de Virchow (Miljic, Miljic, Cain, Korbonits, & Popovic, 2012).

Changement de l'endothélium vasculaire	Hypercoagulabilité	Stase veineuse
- hypertrophie cardiaque et endothéliale induite par le cortisol et autres hormones (angiotensine II, aldostérone, IGF-I...) - Dysfonction endothéliale (élévation de l'endothéline, vascular endothelial growth factor...)	- Augmentation du vWF, du facteur VIII et du fibrinogène - Augmentation des complexes TAT - Augmentation de l'activité PAI-1	- Particulièrement en post-opératoire

Tableau III : Pathogénèse des complications thrombotiques chez les patients humains atteints d'hyperadrénocorticisme.

i. Le diabète mellitus

L'hypercoagulabilité a été documenté chez les chiens diabétiques (Christopher, 1995). Cette dysendocrinie était la cause sous-jacente à 3.2 % des cas de thromboses aortiques dans une étude rétrospective (Lake-Bakaar et al., 2012).

Plusieurs mécanismes sont en cause (Kittrell & Berkwitz, 2012a):

- hyper-agrégabilité plaquettaire due à la glycosylation du récepteur au fibrinogène GPIIb/IIIa et au stress oxydatif,
- diminution des niveaux d'héparan sulfate endothélial,
- altération du flux sanguin à cause du défaut de déformabilité des globules rouges,
- activation de la thrombine, hyperfibrinogénémie, augmentation des facteurs de coagulation VII, VIII, X, XI, XII et du vWF,
- diminution de la concentration des protéines C et S, et de l'AT.

j. L'administration de corticoïdes

Trois études ont montré l'association entre l'administration de corticoïdes (prednisone) à dose anti-inflammatoire ou immunosuppressive et le développement d'un état hypercoagulable chez le chien (Flint, Abrams-Ogg, Kruth, Bersenas, & Wood, 2011; O'Kell, Grant, Panciera, Troy, & Weinstein, 2012; Rose, Dunn, Allegret, & Bedard, 2011). Cet état a été documenté par l'évaluation de la TEG® (augmentation du MA), de la GT (augmentation de l'ETP), de l'activité de l'AT (diminution) et de la concentration en fibrinogène (augmentation).

L'administration de corticoïdes était la cause de 42% des thromboses portales (Respass et al., 2012), 43% des thromboses spléniques (Laurenson et al., 2010), 19% des thromboses aortiques (Lake-Bakaar et al., 2012), et 35% des cas de thromboses de la veine cave craniale (Palmer, King, & Van Winkle, 1998).

En médecine humaine, l'administration de glucocorticoïdes cause une augmentation de l'activité sanguine des facteurs VII (de 13%), VIII (de 27%), XI (de 6%), et du fibrinogène (de 11%) (Brotman et al., 2006).

Les praticiens devraient donc considérer le risque de développement de thromboses chez les chiens recevant des corticoïdes et ayant une condition sous-jacente pro-thrombotique.

k. L'insuffisance cardiaque congestive

L'incidence des thromboses chez les chiens souffrant d'une cardiomyopathie est faible. Dans un étude chez des chiens atteints d'une thrombose aortique, aucun ne présentait de maladie cardiaque structurale au moment du diagnostic (Winter et al., 2012). Toutefois, des thromboses sont rapportées chez des chiens souffrant de fibrillation atriale (formation de thrombus dans l'oreillette gauche) (Usechak, Bright, & Day, 2012). Par ailleurs, une étude s'intéressant à des chiens en insuffisance cardiaque congestive chronique secondaire à une maladie dégénérative valvulaire ou une cardiomyopathie dilatée, montre que ceux-ci sont dans un état pro-coagulable : augmentation de la concentration en fibrinogène, D-dimères, complexes TAT, et diminution des activités en AT et protéine C. Toutefois, aucun de ces paramètres hémostatiques n'était associé à la survie. La présence de cet état pro-coagulable dans la progression de la maladie cardiaque sous-jacente reste à être prouvée (Tarnow et al., 2007).

l. L'obésité

En médecine humaine, l'obésité représente une cause prédisposant au développement de thromboses. En effet, les adipocytes sécrètent de nombreuses substances favorisant l'angiogénèse (vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, platelet derived growth factor β ...), l'activation plaquettaire et le développement d'un état inflammatoire (macrophage chemoattractant protein-1, IL1, IL6, TNF...) (Lorenzet, Napoleone, Cutrone, & Donati, 2012). Bien qu'un tel lien n'a pas été étudié et établi en médecine vétérinaire, l'état de chair des patients pourrait être un critère à prendre en compte dans le risque de développement de thrombose.

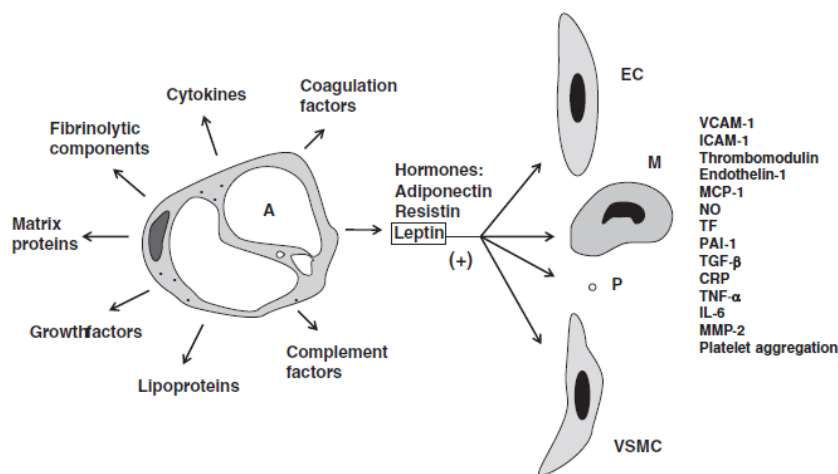


Fig. 1. Molecule overproduction in obesity. Mature adipocytes (A) release abnormal amount of molecules involved in atherothrombosis, among which the hormone-like substance leptin which, binding to endothelial cells (EC), monocytes (M), platelets (P) and vascular smooth muscle cells (VSMC), causes an increased synthesis of inflammatory molecules which further exacerbate the atherothrombotic process.

Figure 13 : Lien entre l'obésité et le développement d'un état hypercoagulable (Lorenzet et al., 2012).

m. Causes iatrogéniques

Les thromboembolies associées à la mise en place d'un cathéter sont rapportés chez le chien (Bliss, Bliss, & Harvey, 2002); toutefois une condition sous-jacente concomitante est souvent présente. Le rôle relatif du cathéter dans le développement des thromboses reste à être confirmée (de Laforcade, 2012).

Par ailleurs, des cas de thromboses associées à l'installation de pacemaker ont été décrits chez le chien (Mulz, Kraus, Thompson, & Flanders, 2010; Murray, O'Sullivan, & Hawkes, 2010).

Certains traitements devraient être considérés dans le risque pro-thrombotique, en particulier lorsque la condition sous-jacente est reconnue comme pouvant mener à une embolie. L'exemple le plus remarquable est celui de l'administration intra-veineuse d'immunoglobuline G (IgG) humaine dans le traitement de chiens présentant une AHMI ou une TMI. Une étude prospective a montré que l'administration d'IgG favorisait le développement d'un état pro-coagulable et inflammatoire chez le chien, avec une augmentation des complexes TAT et de la CRP (Tsuchiya et al., 2009).

III- Les anticoagulants en médecine vétérinaire

1- Les anti-vitamines K

a. Mécanisme d'action

Les facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K (facteurs II, VII, IX et X) et les protéines régulatrices (protéines C et S) sont formées sous la forme inactive de zymogènes. Ils sont convertis sous forme active grâce à l'action indirecte de la vitamine K époxide réductase. Les anti-vitamines K agissent sur cette enzyme, inhibant ainsi l'activation des facteurs de coagulation (Smith, 2012). Le début d'action est de 2-3 jours suivant leur administration (Kittrell & Berkwitz, 2012c).

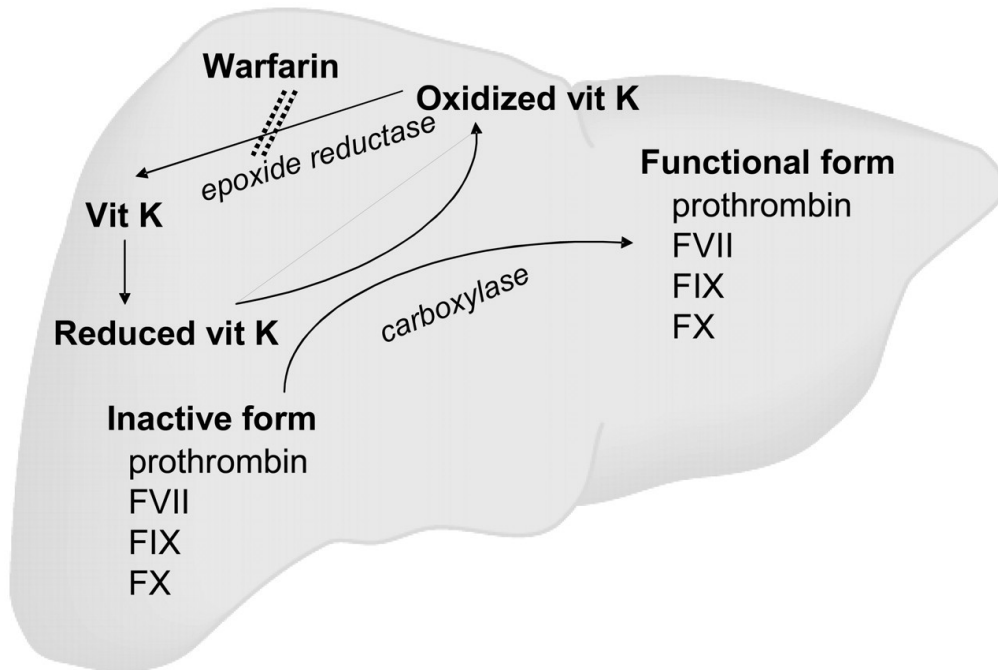


Figure 14 : Mécanisme d'action des anti-vitamines K. Exemple du warfarin.
<http://stroke.ahajournals.org/content/37/1/256/F3.large.jpg>

b. Suivi

Le PT est le test de laboratoire recommandé pour le suivi de traitement. Extrapolé des recommandations issues de la médecine humaine, l'ajustement des doses repose sur l'usage de l'INR (International Normalized Ratio). Cet index a été établi par l'organisation mondiale de la santé afin d'adresser les variations observées entre les différents réactifs de thromboplastine. L'INR est défini selon la formule

suivante : $PT \text{ du patient } / (PT \text{ d'un individu contrôle})^{ISI}$. L'ISI (index de sensibilité international) correspond à une valeur spécifique au réactif de thromboplastine utilisé (Kittrell & Berkwitt, 2012c). Un INR entre 2 et 3 est recommandé pour minimiser les risques d'hémorragies tout en assurant une efficacité de la médication.

Bien que cette pratique est communément admise en médecine vétérinaire, il reste important de garder en tête que les index de sensibilité des réactifs ont été déterminés avec du plasma humain. Ainsi, l'usage des systèmes INR et ISI peut être erroné chez le chien, et un suivi clinique est primordial (Smith, 2012). En alternative, certains auteurs recommandent donc d'utiliser comme objectif thérapeutique chez le chien une prolongations de 1.5 fois la valeur de base (Dunn & Brooks, 2009).

c. Usage et limites

Une récente étude rétrospective, décrivant les causes et la prise en charge de thromboses aortiques chez le chien, a montré qu'une administration orale initiale de warfarin de 0.05 à 0.2 mg/kg/jour, suivi d'un ajustement de dose pour obtenir un INR entre 2 et 3, semblait efficace et bien toléré (Winter et al., 2012). Une étude plus ancienne rapportait des doses de 0.2 mg/kg deux fois par jour chez le chien (Neff-Davis, Davis, & Gillette, 1981).

Un suivi du PT et de l'INR est recommandé quotidiennement pour la première semaine de traitement, puis 2 fois par semaine pour les 3 semaines suivantes, puis 1 fois par semaine pour les 2 mois suivants, et enfin chaque 2 mois par la suite (Dunn & Brooks, 2009).

Une étude comparant le tecarfarin au warfarin montre une efficacité anticoagulante des deux molécules. Toutefois, le tecarfarin semble présenter moins d'interaction possible avec des molécules inhibant le cytochrome P450. Ceci pourrait conférer au tecarfarin un profil anticoagulant plus sécuritaire chez le chien (Choppin et al., 2009).

L'inhibition rapide de la protéine C (protéine anticoagulante à faible durée de vie) par le warfarin mène initialement à un état pro-coagulable. Il est alors recommandé d'utiliser de l'héparine conjointement pour les 3 à 5 premiers jours de traitements afin d'éviter la survenue de thromboses (Kittrell & Berkwitt, 2012c; Monnet & Morgan, 2000).

Les effets secondaires de l'administration des anti-vitamines K sont des hémorragies potentiellement fatales et des effets tératogènes (Smith, 2012). Un suivi clinique et de laboratoire rapproché est recommandé chez les chiens traités car les effets anticoagulants peuvent grandement varier d'un patient à un autre et les hémorragies fatales sont redoutées (Dunn & Brooks, 2009; Kittrell & Berkwitt, 2012c).

2- L'héparine

a. Mécanisme d'action

L'héparine non fractionnée correspond à un mélange hétérogène de glycosaminoglycans de poids moléculaire variant de 5000 à 30000 daltons. Environ un tiers des molécules se lie à l'AT et accélèrent la liaison de cette dernière avec les facteurs II et X en particulier, mais également avec les facteurs IX, XI et XII (Dunn & Brooks, 2009). Un complexe se forme entre les molécules d'héparine, l'AT et le facteur de coagulation. La liaison de l'héparine avec l'AT est permise par une série de 5 résidus saccharides. Le mécanisme anticoagulant exercé par l'héparine se fait donc de façon indirecte sur les facteurs de coagulation libres (Smith, 2012).

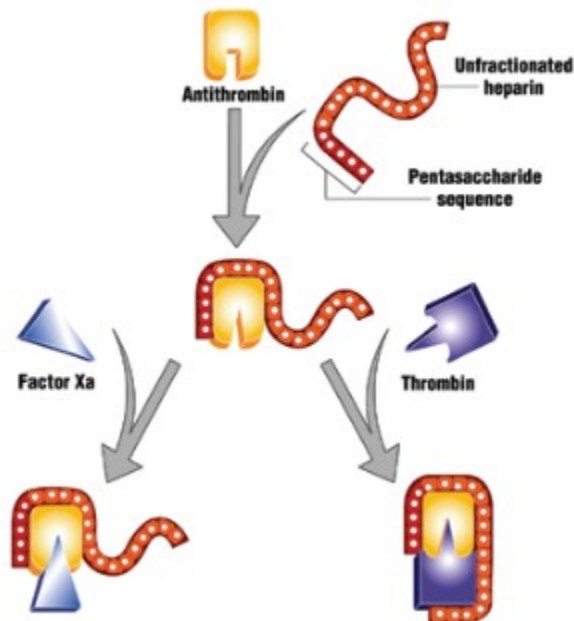


Figure 15 : Mécanisme d'action de l'héparine non fractionnée (Wong et al., 2009).

b. Suivi

Le suivi d'un traitement à base d'héparine se fait en général par l'évaluation de l'aPTT : une prolongation de 1.5 à 2 fois la valeur de base du patient est acceptée en pratique, mais reste controversée en raison des variations inhérentes aux laboratoires (Brainard & Brown, 2011; Kittrell & Berkwitz, 2012c; Mischke & Jacobs, 2001). L'évaluation de l'activité anti-facteur X est plus précise pour déterminer les concentrations

plasmatiques circulantes d'héparine. L'intervalle thérapeutique cible des concentrations plasmatiques d'héparine environ 4 heures après la dose est de 0.35 à 0.7 UI/mL (Brooks, 2004).

La TEG® (activation par du calcium) a été évaluée chez des chiens traités avec de l'héparine, mais elle ne permet pas de détecter des concentrations plasmatiques en héparine supérieures à 0.075 UI/mL (prolongation de R extensive rendant la TEG trop sensible aux effets de l'héparine), ce qui peut limiter son utilité dans le cadre d'un suivi (Pittman, Koenig, & Brainard, 2010). Une autre technique de laboratoire détectant les changements viscoélastiques du sang, le Sonoclot®, a également été évaluée. Ce test est sensible et spécifique pour le suivi de l'activité anticoagulante de l'héparine chez le chien, mais l'aPTT présente une corrélation et une sensibilité équivalente (Babski, Brainard, Ralph, Pittman, & Koenig, 2012).

Par ailleurs, il a été montré que la GT peut être utile dans l'évaluation du degré d'anticoagulation causée par l'héparine non fractionnée chez le chien (Allegret, Dunn, & Bedard, 2011).

c. Usage et limites

Les doses rapportées chez le chien sont très variables, s'étalant de 50 à 500 UI/kg par voie sous-cutanée toutes les 6-12 heures, et peu de données sont disponibles quant aux doses optimales à la fois sécuritaires et efficaces (Dunn & Brooks, 2009; Smith, 2012).

L'administration de l'héparine se fait par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Son usage est largement décrit en médecine canine dans le cadre de la thromboprophylaxie. Dans le cadre du traitement de l'AHMI, de plus hautes doses (> 150 UI/kg chaque 6-8h) sont nécessaires pour atteindre une concentration plasmatique thérapeutique et le traitement doit être ajusté individuellement (Breuhl, Moore, Brooks, & Scott-Moncrieff, 2009; Helmond, Polzin, Armstrong, Finke, & Smith, 2010). Enfin, une étude menée chez des chiens aux soins intensifs montrait la présence d'hémorragie chez 4 des 6 chiens ayant reçu une haute dose intraveineuse d'héparine (900 UI/kg/jour), alors qu'une dose plus faible (300 UI/kg/jour) ne permettait pas d'atteindre des valeurs d'activité anti-facteur X répétables (Scott, Hansen, & DeFrancesco, 2009).

La limite majeure de l'utilisation de l'héparine non fractionnée repose sur sa capacité de liaison à des protéines plasmatiques autres que l'AT (les lipoprotéines, le vWF, le fibrinogène, les protéines de la phase aiguë), aux cellules endothéliales (relâche de TFPI), aux macrophages et aux plaquettes. Cela rend son effet anticoagulant difficilement prévisible, en particulier lors d'une administration par voie sous-cutanée (Dunn & Brooks, 2009; Smith, 2012).

D'autre part, l'utilisation de l'héparine réduit les concentrations plasmatiques d'AT. Ainsi, afin d'éviter une hypercoagulabilité rebond, un sevrage graduel sur plusieurs jours est recommandé (Kittrell & Berkwitt, 2012c).

3- Les héparines de faible poids moléculaire (HBPM)

a. Mécanisme d'action

Les HBPM sont formées à partir de la dépolymérisation de l'héparine non fractionnée, permettant l'obtention de chaînes de moins de 18 saccharides et de poids moléculaire d'environ 5000 daltons. Ces molécules possèdent également une région pentasaccharidique autorisant la liaison à l'AT (Dunn & Brooks, 2009; Smith, 2012). Toutefois, la taille des HBPM ne permet pas la formation d'un complexe ternaire entre l'HBPM, l'AT et le facteur II. Par conséquent, le ratio d'inhibition du facteur X par l'AT comparativement à l'inhibition du facteur II est de 4 :1 (Dunn & Brooks, 2009). Les HBPM se lient peu aux autres protéines et cellules de l'organisme. Chez le chien, la daltéparine a une demi-vie de 123 minutes et une biodisponibilité calculée de 104% après une administration par voie sous-cutanée (Grebe, Jacobs, Kietzmann, & Mischke, 2000).

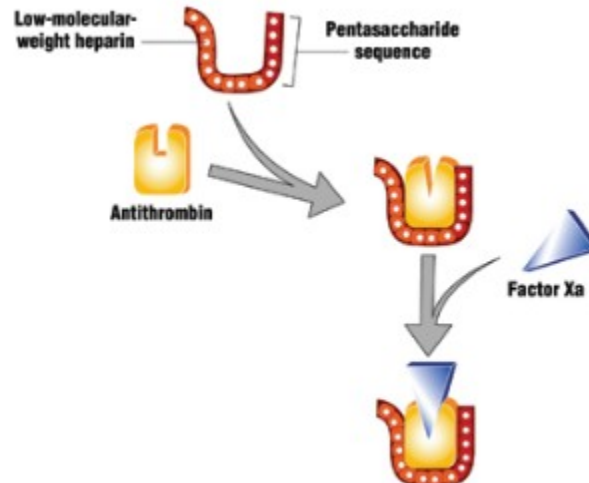


Figure 16 : Mécanisme d'action d'une héparine de bas poids moléculaire (Wong et al., 2009).

b. Suivi

Considérant la faible activité des HBPM sur le facteur II, l'aPTT est un test peu sensible pour détecter l'effet anticoagulant (Kittrell & Berkwitt, 2012c). L'activité anticoagulante des HBPM se fait par

l'évaluation de l'activité anti-facteur X. La thromboprophylaxie a été définie chez le chien lorsque l'activité anti-facteur X se situe aux alentours de 0.55 UI/mL (Mestre et al., 1985).

Chez des chiens en santé, une administration de dalteparin par voie sous-cutanée à la dose de 150 UI/kg chaque 8 heures mène à une inhibition de l'activité anti-facteur X de 0.2 à 1 U/mL (Mischke, Grebe, Jacobs, & Kietzmann, 2001). Chez des chiens malades, une administration sous cutanée de 150 UI/kg montre une activité anti-facteur X prévisible 3 heures après l'administration sous-cutanée (Charland, Thorneloe, & Dunn, 2006).

Une administration par voie sous-cutanée de 0.8 UI/kg d'enoxaparine chez le chien en santé permet d'obtenir une activité anti-facteur X entre 0.5 et 2 UI/mL de façon répétable 3-4 heures après l'administrations, sans évidence de complications hémorragiques (Lunsford, Mackin, Langston, & Brooks, 2009).

Le fondaparinux, un dérivé synthétique d'héparine, a été évalué et comparé à l'héparine non fractionnée chez le chien dans un modèle d'hémodialyse. Il a été conclu que le fondaparinux est efficace et peut être utilisé à la place de l'héparine pour maintenir le circuit fonctionnel. L'activité anti-facteur X peut être utilisée afin de suivre les concentrations de ce pentasaccharide (Hoppensteadt et al., 1999).

Etant donné que la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des HBPM sont différentes, l'administration d'une molécule n'est pas interchangeable avec une autre (Smith, 2012).

c. Usage et limites

Les mêmes effets secondaires que ceux décrits pour l'héparine peuvent être rencontrés, mais ils sont moins fréquents lors de l'usage des HBPM, vraisemblablement en raison d'une pharmacocinétique plus prévisible (Dunn & Brooks, 2009). Toutefois, le coût de la préparation est plus élevé ce qui peut limiter son utilisation (Smith, 2012).

La protamine sulfate reverse de façon partielle l'effet anticoagulant des HBPM et peut être utilisée en cas de surdose (Smith, 2012).

4- Les anti-agrégants plaquettaires

Comme précédemment décrit, l'administration des anti-agrégants plaquettaires est surtout recommandé elors de la présence de thrombose artérielle (Dunn & Brooks, 2009).

L'évaluation de l'activité anti-plaquettaire peut se faire par le biais de diverses méthodes: le temps de saignement buccal, le Platelet Function Analyzer-100, l'agrégométrie, le Sonolot®, le map-platelet

thromboélastographie (Jandrey, 2012). Les techniques *in vitro* sont plus souvent utilisées dans l'évaluation de l'activité des molécules anti-agrégant plaquettaire.

a. Aspirine

i. Mécanisme d'action

L'aspirine agit en inhibant de façon irréversible l'activité de l'enzyme cyclo-oxygénase (Kittrell & Berkwitz, 2012c). Cette inhibition prévient le métabolisme de l'acide arachidonique et la synthèse de thromboxane A2 qui amplifie le signal d'activation plaquettaire (voir figure 22).

ii. Usage et limites

En plus de ses propriétés anti-agrégant plaquettaire, l'aspirine possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-pyrétiques (Smith, 2012).

L'évaluation de faibles doses d'aspirine chez le chien en santé a montré des résultats variables. En effet, l'administration de 0.5 mg/kg semble affecter l'agrégation plaquettaire (agrégométrie optique, agrégométrie d'impédance) dans certaines études (Brainard et al., 2007; Hoh, Smith, McMichael, & Byron, 2011; Sharpe et al., 2010), alors qu'une dose de 1 mg/kg ne diminue pas de façon consistante la concentration des métabolites urinaires du thromboxane (Hoh et al., 2011).

Chez les chiens atteints d'AHMI, l'administration d'une faible dose d'aspirine à 0.5 mg/kg/j en plus de l'azathioprine et des corticoïdes était statistiquement associée avec un meilleur pronostic dans la prévention du développement de thromboses, comparativement aux les chiens recevant un traitement à base d'azathioprine et de corticoïdes, ou d'azathioprine, de corticoïdes et d'héparine (Weinkle et al., 2005). Cependant, une autre étude présentée dans une communication orale a montré que les chiens traités avec 0.5 mg/kg/j d'aspirine avait un pronostic de survie moins bon (40%) que ceux qui recevait une dose ajustée d'héparine non fractionnée (Orcutt, Polzin, Armstrong, Helmond, & Smith, 2009).

Comme en médecine humaine, des résistances à l'aspirine ont été décrites dans l'espèce canine. En effet, une étude rapporte que l'administration de faible dose d'aspirine (1 mg/kg une fois par jour pour 10 jours) à des chiens en santé entraînait une inhibition de la fonction plaquettaire évaluée par le PFA-100 dans seulement un tiers des cas; et cela malgré une diminution de la synthèse de thromboxane (Dudley et al., 2013). Une mutation dans le gène codant pour la protéine G associée au récepteur au thromboxane à la surface plaquettaire semble responsable de l'absence de fonction de l'aspirine chez les chiens résistants (Johnson, Leis, & Dunlop, 1993).

b. Clopidogrel

i. Mécanisme d'action

Le clopidogrel est une pro-drogue. Il est un dérivé de thienopyridine dont le métabolite actif se lie spécifiquement et irréversiblement au récepteur plaquettaire à l'ADP (P2Y₁₂), empêchant l'action de ce dernier. En temps normal, l'ADP permet le recrutement plaquettaire et l'activation du récepteur plaquettaire au fibrinogène (le GPIIb/IIIa) (Kittrell & Berkwitz, 2012c).

La figure 17 résume l'action du clopidogrel sur l'activité plaquettaire. En temps normal, la liaison de l'ADP à son récepteur libère la sous-unité α_{Gi} qui inhibe l'adénylate cyclase et donc diminue les concentrations d'AMPc. Ainsi, la phosphorylation médiée par l'AMPc de la protéine VASP (phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs) est réduite, empêchant l'inhibition de l'activation de la GPIIb/IIIa.

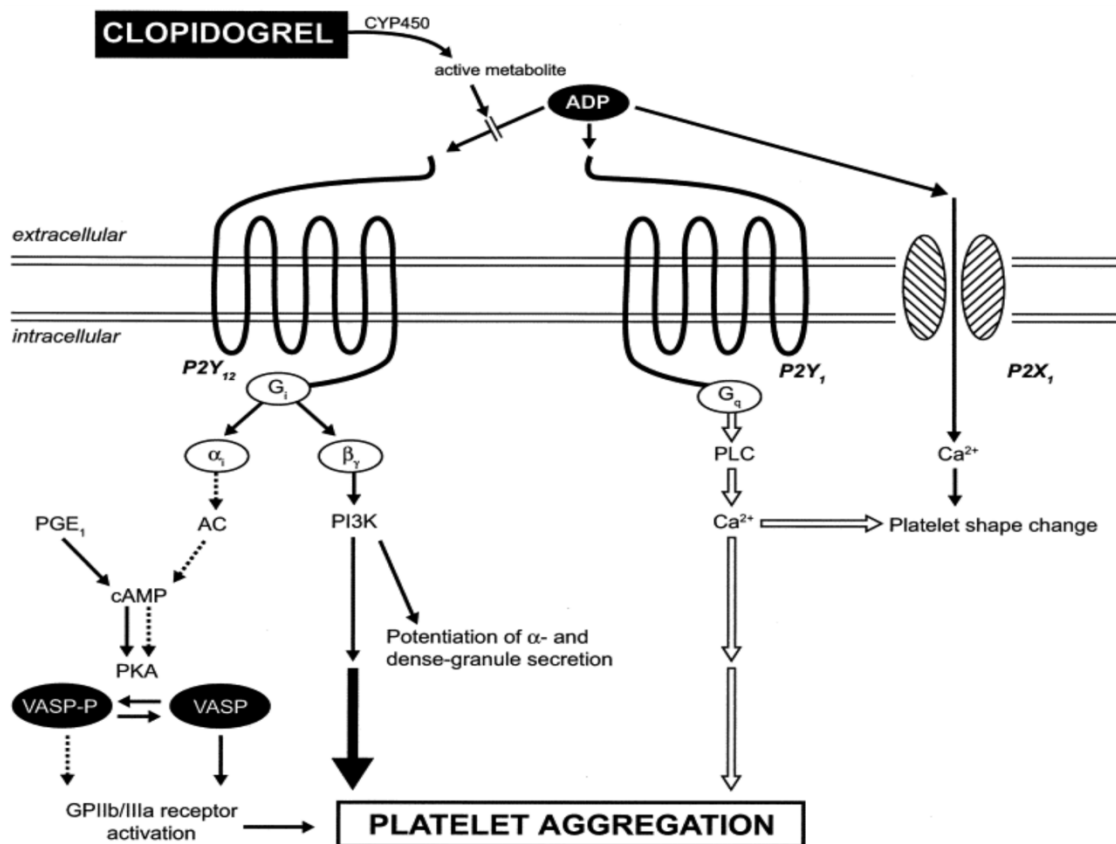


Figure 17: Mécanisme d'action du clopidogrel (Nguyen, Diodati, & Pharand, 2005).

ii. Usage et limites

Afin de déterminer la pharmacocinétique du clopidogrel, la concentration du métabolite principal, le SR 26334, est évaluée. Ainsi, il a été montré qu'une administration orale d'environ 1 mg/kg/j provoque une inhibition rapide, i.e. dans les 3 heures, et efficace de l'agrégation plaquettaire chez les chiens en santé. Cette inhibition est irréversible et le retour à l'activité plaquettaire initiale prend environ 8 jours. La plupart des chiens de l'étude montrait un maintien d'une activité plaquettaire minimale pendant au moins 3 jours après l'arrêt de l'administration du clopidogrel; ce qui suggère qu'une administration tous les 2 jours est envisageable après une période d'administration initiale quotidienne (Brainard, Kleine, Papich, & Budsberg, 2010).

Dans une autre étude chez des chiens en santé, une administration de clopidogrel de 10 mg/kg inhibe l'agrégation plaquettaire dans les 24 heures suivant l'administration orale, puis une administration de 2 mg/kg une fois par jour permet le maintien de l'activité anti-agrégante (Goodwin, 2007). L'administration de clopidogrel à 2mg/kg/j chez des chiens atteints d'AHMI est sécuritaire et offre le même taux de survie à 90 jours que celui des chiens traités avec de l'aspirine seule (ou en combinaison avec le clopidogrel) comme anticoagulant (Mellett et al., 2011).

En médecine humaine, il a été décrit que 4 à 30% des patients traités avec des doses conventionnelles de clopidogrel montrent une réponse anti-plaquettaire inappropriée se traduisant par un risque plus élevé de complications cardio-vasculaires. Cette variabilité inter-individuelle de l'effet du clopidogrel semble multifactorielle incluant entre autres une interaction avec d'autres médicaments et une mutation génétique du récepteur au clopidogrel (Nguyen et al., 2005).

c. Inhibiteurs du récepteur plaquettaire IIb/IIIa

i. Mécanisme d'action

Plusieurs molécules appartiennent aux inhibiteurs de la GPIIb/IIIa plaquettaire : l'abciximab, le tirofiban, l'éptifibatide. Ils bloquent la liaison du fibrinogène aux plaquettes, empêchant ainsi l'étape finale de l'agrégation plaquettaire (Kittrell & Berkwitz, 2012c).

i. Usage et limites

L'usage de ces molécules se fait uniquement par voie intraveineuse, et les données cliniques manquent chez le chien. L'ajout *in vitro* d'abciximab à du sang entier de chien cause une prolongation de

l'agrégation plaquettaire, matérialisé par une augmentation du temps de PFA-100 (Brainard, Abed, & Koenig, 2011). L'évaluation de l'apparition d'une thrombose dans un stent chez un modèle canin de shunt artério-veineux, montre que l'administration intraveineuse de tirofiban (0.3 µg/kg/min) ou d'eptifibatide (180 µg/kg pour 10 minutes, puis 2 µg/kg/min) inhibe de plus de 90% l'agrégation plaquettaire (Rukshin et al., 2002).

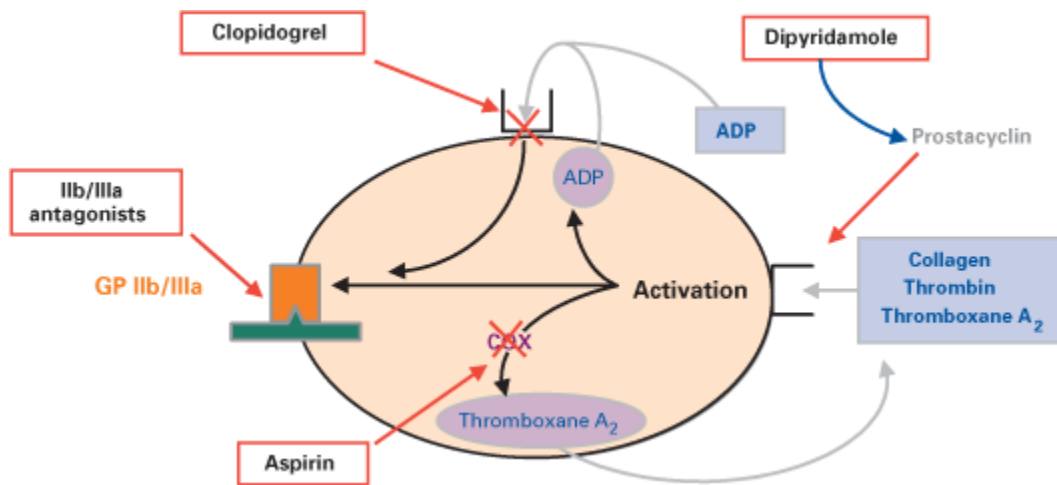


Figure 18 : Synthèse des mécanismes d'action des différents anti agrégants plaquettares <http://m.australianprescriber.com/magazine/30/4/92/6>.

IV- Le rivaroxaban

1- Caractéristiques du produit

Ces dernières années, de nouvelles classes d'anticoagulants visant un facteur spécifique de la coagulation ont été développées.

a. Description

Le rivaroxaban est une molécule de faible poids moléculaire (436 g/mol) quasiment insoluble dans l'eau (Kreutz, 2012). Il s'agit d'un anticoagulant oral, inhibiteur direct du facteur Xa. Il a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) dans la prévention des thromboses veineuses profondes après une chirurgie de prothèse de genou ou de hanche, et dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux chez des patients ayant un trouble du rythme cardiaque (Turpie, Kreutz, Llau, Norrving, & Haas, 2012). En 2008, le rivaroxaban a été approuvé par Santé Canada dans la prévention des thromboses associées aux arthroplasties de hanches ou de genoux. En 2012, il a reçu l'approbation dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux chez les patients atteints de fibrillation atriale ; et enfin en 2013, il a été approuvé dans le traitement et la prévention des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires récurrentes (Compagny, 2013).

Le modèle cellulaire de la coagulation montre le rôle important du facteur Xa dans les phases d'initiation et de propagation de la coagulation (Figure 3). Il catalyse la formation de milliers de molécules de thrombine à la surface plaquettaire, permettant ainsi la formation du caillot sanguin. Le facteur Xa est actif sous sa forme libre, mais également lorsqu'il est lié au caillot sanguin (McMichael, 2012; Perzborn, Roehrig, Straub, Kubitz, & Misselwitz, 2011; Weitz, 2011). Le rivaroxaban agit directement sur le site catalytique de la sérine protéase du facteur Xa : il inactive aussi bien le facteur Xa libre que le facteur Xa lié au complexe prothrombinase ou au caillot sanguin déjà formé (Perzborn et al., 2005). Étant donné que les facteurs Xa humain et canin possèdent la même séquence d'acides aminés sur la partie protéique qui interagit avec le rivaroxaban, il paraît intéressant d'évaluer l'efficacité anticoagulante de cette molécule chez le chien (Roehrig et al., 2005).

En médecine humaine, plusieurs études *in vitro* ont été effectuées et ont montré l'effet anticoagulant du rivaroxaban. De faibles doses de rivaroxaban (concentrations nanomolaires) affectent les phases d'initiation et de propagation de la GT (Gerotziakas et al., 2007). Une inhibition concentration dépendante de l'activité anti-facteur Xa et des temps de coagulation (PT/aPTT) ont également été documentés (Perzborn et al., 2005).

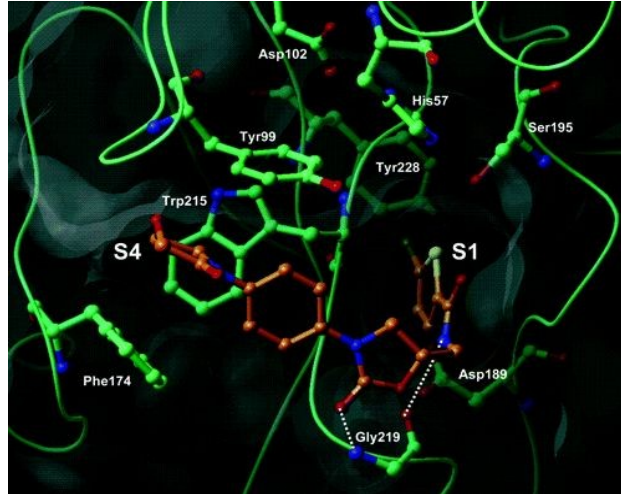


Figure 19 : Interaction moléculaire entre le rivaroxaban (en rouge) et le facteur Xa (en vert, séquence d'acides aminés identiques chez l'humain et le chien). *NCBI XP_534191.1*

b. Métabolisme

Une fois absorbé, le rivaroxaban subit une dégradation métabolique, suivi d'une élimination rénale et hépato-biliaire. La portion non métabolisée est éliminée sous forme inchangée au niveau des reins par une sécrétion active via des Glycoprotéines P (Mueck, Schwerts, & Stampfuss, 2013).

Les voies métaboliques du rivaroxaban sont une hydrolyse et une oxydation de la molécule (figures 20 et 21) :

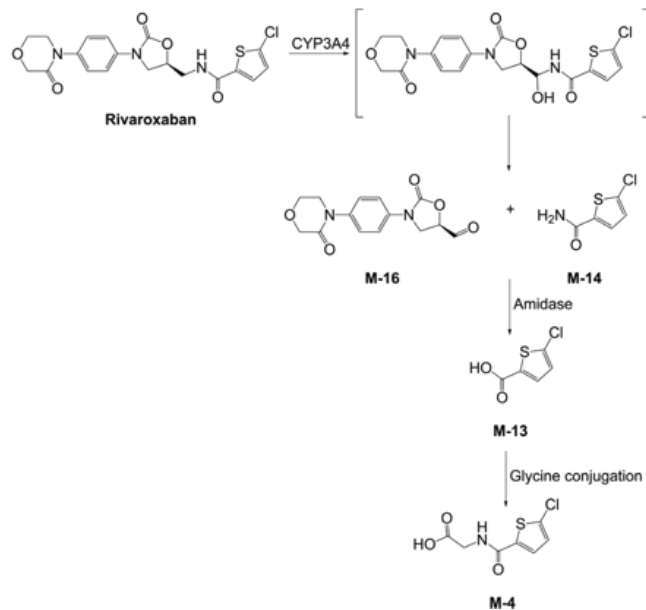


Figure 20 : Voie métabolique oxydative hépatique du rivaroxaban (Lang, Freudenberger, & Weinz, 2009).

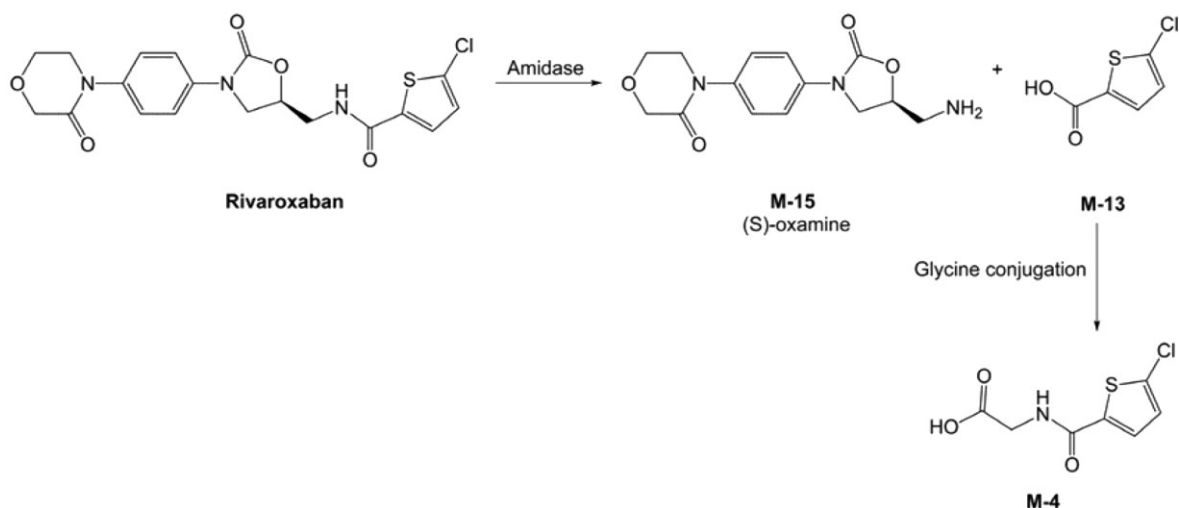


Figure 21 : Voie métabolique d'hydrolyse hépatique du rivaroxaban (Lang et al., 2009)

2- Usage en médecine humaine

a. Pharmacocinétique

Les études pharmacocinétiques réalisées ont montré l'innocuité et la tolérance de l'utilisation du rivaroxaban à un dosage fixe, et ce jusqu'à 50mg total (Kreutz, 2012). Les caractéristiques pharmacocinétiques du rivaroxaban chez l'humain sont résumées dans le tableau IV.

Une étude a montré que l'administration de nourriture concomitante au rivaroxaban retarde de 1,25h le pic plasmatique de la concentration en anticoagulant, mais que l'absorption est augmentée. De plus, la variabilité inter-individuelle des paramètres pharmacocinétiques est réduite lors que le médicament est administré avec de la nourriture (Kubitza, Becka, Zuehlsdorf, & Mueck, 2006). Une autre étude a montré que la biodisponibilité du rivaroxaban augmente lorsque l'administration se fait avec de la nourriture pour les doses de plus de 10 mg (Stampfuss, Kubitza, Becka, & Mueck, 2013).

L'administration d'un anti-acide, en l'occurrence la ranitidine, ne modifie pas la concentration plasmatique maximale de l'anticoagulant, ni son absorption (Kubitza et al., 2006).

Le rivaroxaban n'induit pas d'isoformes du cytochrome P450. Il est métabolisé par les enzymes CYP3A4 et CYP2J2, ainsi que par des mécanismes indépendants des cytochromes P, et des glycoprotéines P. Une étude évaluant les effets des inhibiteurs ou substrats du CYP3A4 ou de la glycoprotéine P sur les paramètres pharmacocinétiques du rivaroxaban a montré que le rivaroxaban peut être administré avec des substrats ou des inhibiteurs modérés de ces enzymes, tels que l'érythromycine, la clarithromycine ou le

fluconazole. En revanche, les inhibiteurs puissants, tels que les antifongiques (les « -azoles », comme le kétoconazole) ou les anti-viraux (ritonavir) augmentent significativement l'exposition au rivaroxaban et peut engendrer des conséquences cliniques (Mueck, Kubitz, & Becka, 2013).

L'âge ou le sexe comme unique variable n'affecte pas la pharmacocinétique du rivaroxaban. Bien que les personnes âgées (>75 ans) ont une exposition plasmatique à la molécule supérieure aux personnes jeunes, cela est attribuable à leur fonction rénale (Kubitz, Becka, Roth, & Mueck, 2013). Il a été montré que les patients présentant une insuffisance rénale ont une exposition plasmatique au rivaroxaban plus élevée mais que cette influence sur la clairance du médicament est modérée en raison de son excrétion rénale partielle (Kubitz et al., 2010). Le poids du patient > 120 kg n'affecte pas la pharmacocinétique de la molécule, mais un poids < 50kg augmente de 24% la concentration plasmatique maximale en rivaroxaban (Kubitz, Becka, Zuehlsdorf, & Mueck, 2007). Une insuffisance hépatique modérée, correspondant à un score de Child-Pugh B, cause une augmentation de la concentration en rivaroxaban et une prolongation de son exposition, ainsi qu'une diminution de sa clairance (Kubitz, Roth, et al., 2013).

b. Pharmacodynamique : effets sur les tests de la coagulation

L'effet anticoagulant du rivaroxaban a été évalué avec différents tests de coagulation.

Concernant les temps de coagulation, l'aPTT n'est pas considéré comme un test approprié pour déterminer l'effet pharmacodynamique du rivaroxaban. En effet, sa sensibilité est trop variable et faible (Hillarp et al., 2011; Lindhoff-Last et al., 2010).

Le rivaroxaban cause une prolongation concentration-dépendante du PT. Toutefois, les réactifs utilisés ne sont pas tous équivalents, et le réactif STA Neoplastin plus permet une détection plus sensible de l'effet du rivaroxaban (Doux fils et al., 2012) et plus précise de sa concentration plasmatique (Palareti et al., 2013). Considérant la sensibilité moindre de ce test par rapport à d'autres (activité anti-facteur Xa), le moment du prélèvement est important pour l'interprétation des observations cliniques (Doux fils et al., 2012; Mani, Hesse, Stratmann, & Lindhoff-Last, 2011). Le PT est utilisé comme un test d'évaluation qualitative de l'effet du rivaroxaban (Koscielny & Rutkauskaite, 2014; Palareti et al., 2013).

Pour l'activité anti-facteur Xa, il existe des kits commerciaux utilisant des calibrateurs et des contrôles spécifiques au rivaroxaban. Ces tests permettent alors une mesure quantitative du rivaroxaban plasmatique de façon sensible et précise (comparativement aux concentrations obtenues par HPLC) sur une grande étendue de concentrations (20 -662 ng/mL) (Mani et al., 2012; Samama et al., 2012). Étant donné la sensibilité de ce test, son utilisation est recommandée au pic de la concentration plasmatique du rivaroxaban (2-4h après l'administration). Une concentration sub-optimale peut expliquer les rechutes de

thrombose chez les patients concernés (Doux fils et al., 2012; Palareti et al., 2013). Par ailleurs, la détermination de la concentration plasmatique en rivaroxaban avant une prochaine dose permet d'évaluer s'il y a une accumulation de l'anticoagulant chez les patients ayant une insuffisance rénale ou hépatique (Koscielny & Rutkauskaite, 2014).

La thromboélastographie détecte les effets anticoagulants du rivaroxaban administré à des patients en santé (augmentation de R et K, diminution de MA, α , et LY30) ou ayant un accident vasculaire cérébral (modification de R, K et α) (Bowry et al., 2014; Casutt, Konrad, & Schuepfer, 2012). Ce test peut alors être utile dans l'évaluation de l'effet anticoagulant recherché.

Le rivaroxaban affecte les paramètres du test de GT. Il affecte, de par son mode d'action, plus particulièrement les phases d'initiation et de propagation de la GT. Les diverses études montrent la même tendance : les paramètres Peak et rate index sont les plus modifiés suite à l'administration du rivaroxaban. Toutefois la disponibilité du test, la variabilité inter-individuelle et la manque de standardisation sont des limites à son utilisation (Doux fils et al., 2012)

Tout comme pour la pharmacocinétique, l'âge ou le sexe comme unique variable n'affecte pas la pharmacodynamie du rivaroxaban. Bien que les personnes âgées (>75 ans) ont une prolongation du PT et de l'activité anti-facteur X comparativement aux personnes jeunes, cela est attribuable à leur fonction rénale (Kubitza, Becka, et al., 2013). Le rivaroxaban doit être utilisé avec précaution chez les patients ayant une insuffisance rénale sévère, ce qui correspond à une clairance en créatinine comprise entre 15 et 29 mL/min, et il est contre-indiqué chez les patients ayant une clairance < 15 mL/min (Kreutz, 2012).

Un poids de patient > 120 kg n'affecte pas la pharmacodynamie du rivaroxaban. Chez les patients ayant un poids < 50 kg, le PT est prolongé mais pas de façon cliniquement significative, suggérant qu'il n'est pas nécessaire d'ajuster la dose du médicament selon le poids du patient (Kubitza et al., 2007). L'insuffisance hépatique modérée cause une augmentation de l'inhibition du facteur Xa comparativement aux individus en santé (Kubitza, Roth, et al., 2013).

c. Précautions d'emploi

L'insuffisance rénale cause une diminution de la clairance du rivaroxaban et donc une augmentation de l'exposition plasmatique de la molécule. Cette observation est corrélée à une augmentation des effets anticoagulants (activité anti-facteur Xa) (Kubitza et al., 2010). Ainsi, les recommandations sont d'utiliser avec précaution le rivaroxaban chez des patients ayant une insuffisance rénale modérée (clairance en créatinine 30-49 mL/min) et recevant des molécules pouvant affecter l'exposition plasmatique du rivaroxaban, ou bien chez des patients avec une insuffisance rénale sévère (clairance en créatinine 15-29

mL/min). L'administration du rivaroxaban est contre-indiquée chez les patients ayant une clairance en créatinine < 15mL/min (Kreutz, 2012; Palareti et al., 2013).

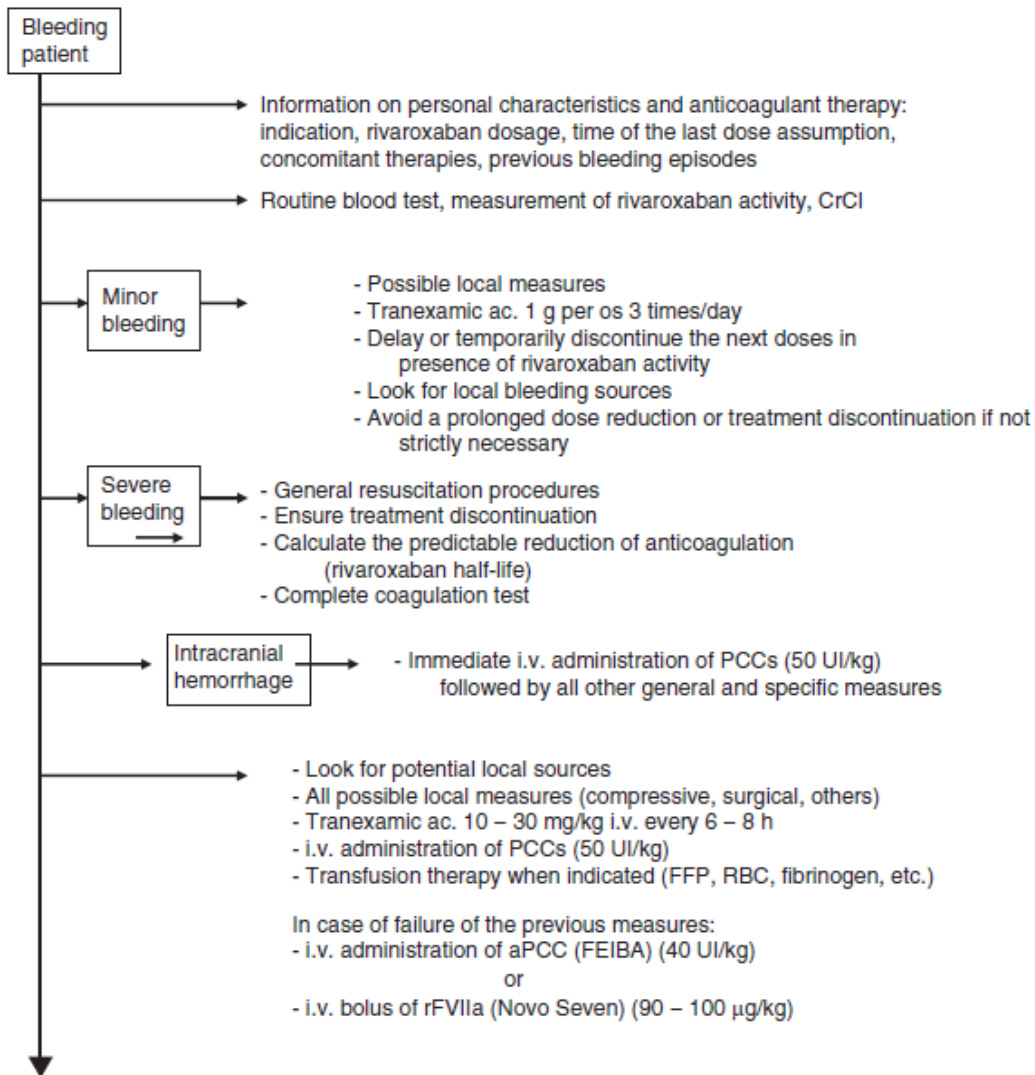
Une insuffisance hépatique modérée diminue la clairance du rivaroxaban, occasionnant une exposition accrue de la molécule et des répercussions pharmacodynamiques, à savoir une augmentation de l'activité anti-facteur Xa et du PT (Kubitza, Roth, et al., 2013). Ainsi, il est contre-indiqué d'utiliser le rivaroxaban chez des patients ayant une atteinte hépatique significative prédisposant aux saignements, et l'utilisation de l'anticoagulant doit se faire avec précaution chez ceux avec une insuffisance hépatique modérée (Kubitza, Roth, et al., 2013).

d. Prise en charge des saignements

Chez les patients traités pour une fibrillation atriale non valvulaire, l'étude comparant le rivaroxaban au warfarin montre un taux de saignements majeurs similaire entre les 2 groupes (3.6% par an chez les patients traités avec le rivaroxaban, versus 3.4 % par an chez les patients traités avec le warfarin). Un saignement majeur correspond à un saignement clinique et : une diminution > 2 g/dL d'hémoglobine ; ou > 2 unités transfusionnelles ; ou un saignement dans un site critique : crâne, moelle épinière, œil, péricarde, articulation, rétro-péritonéal ; ou un saignement fatal. Toutefois, l'administration du rivaroxaban causait significativement moins de saignements fatals (0.2 % par an) comparativement à l'administration de warfarin (0.5% par an) (Koscielny & Rutkauskaitė, 2014). Dans l'étude comparant l'énoxaparin au rivaroxaban chez les patients ayant subi une prothèse de genou ou de hanche, l'administration du rivaroxaban apporte moins de complications, incluant moins de saignements majeurs ou au site chirurgical (Levitan et al., 2014). Des cas d'hémorragie intracrânienne ont été décrites comme complications à l'utilisation du rivaroxaban (Mittal & Rabinstein, 2012; Molina, Hillard, & Fekete, 2014).

Il n'existe pas d'antidote universel à une intoxication au rivaroxaban. La prise en charge des saignements induits par un traitement à base de cet anticoagulant sont divers et transcrits dans la figure 22. Cet algorithme a été déterminé par un groupe d'expert en hémostase (Palareti et al., 2013). Récemment, un groupe de recherche a proposé un antidote spécifique aux inhibiteurs du facteur Xa : une protéine recombinante inactive. Il s'agit en fait du facteur X modifié (absence du domaine natif γ -carboxyglutamique du facteur X) qui conserve la capacité de se fixer sur les inhibiteurs du facteur X, tel que le rivaroxaban. L'évaluation de cet antidote chez le lapin traité au rivaroxaban montre une restauration de son hémostase. L'effet de cet antidote sur la réversion de l'inhibition du facteur X par le rivaroxaban est dose-dépendante (Lu et al., 2013). Son développement est prometteur pour un usage clinique d'urgence.

L'acide tranexamique, un dérivé synthétique de la lysine qui inhibe de façon compétitive l'activation du plasminogène en plasmine (anti-fibrinolytique), assure un support hémostatique. Sur un modèle lapin, l'utilisation du facteur VII activé recombinant ou du concentré de complexe prothrombine-facteur IV améliore seulement partiellement les paramètres de laboratoires (aPTT, TEG®) mais n'arrête pas les saignements induits par le rivaroxaban (Godier et al., 2012).



Suggested flow of treatments for rivaroxaban-treated patients presenting with bleeding complications.

Figure 22 : Guide pour la prise en charge des saignements chez un patient traité avec du rivaroxaban. (Palareti et al., 2013). Ac: acide, CrCl: clairance en créatinine, FFP: plasma frais congelé, PCC: concentré de complexe prothrombine-facteur IV, RBC: concentré de globules rouges.

e. Indications

Le rivaroxaban est utilisé dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux lors de fibrillation atriale non valvulaire et dans la prophylaxie et le traitement des thromboses veineuses profondes suivant une chirurgie de prothèse de hanche ou de genou. Une approbation de la molécule existe en Europe en tant que prévention anticoagulante secondaire suite à un syndrome coronarien aigu (Fenger-Eriksen, Munster, & Grove, 2014).

3- Données en médecine vétérinaire

a. Avantage d'une administration orale : observance et injections

Chez le chien, les thromboses représentent une complication majeure de nombreuses conditions et causent de la mortalité et de la morbidité en médecine vétérinaire (Lake-Bakaar et al., 2012; Respass et al., 2012). Les anticoagulants communément employés chez le chien sont les anti-vitamine K, l'héparine et la daltéparine, une héparine de bas poids moléculaire. Toutefois, leurs effets sont variables d'un patient à un autre et les risques de saignements représentent une préoccupation pour le praticien (Dunn & Brooks, 2009; Kitrell & Berkwitz, 2012; Smith, 2012). De plus, la voie d'administration sous-cutanée de l'héparine ou de la daltéparine peuvent constituer une limite pour des propriétaires réticents à donner des injections (Eymin & Jaffer, 2012). Ainsi, chez le chien, le rivaroxaban pourrait donc représenter une alternative à l'arsenal thérapeutique actuel et son mode d'administration par voie orale le rend très attrayant.

b. Données disponibles dans l'espèce canine

Peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'usage clinique du rivaroxaban chez le chien. Avant la mise sur le marché du produit, des études pré-cliniques ont été menées sur le rat, le lapin et le chien. Les données disponibles proviennent donc de ces études.

Une étude pharmacocinétique montre que le rivaroxaban est partiellement absorbé chez le chien (biodisponibilité de 60-86%) et que l'augmentation des concentrations plasmatiques est directement proportionnelle aux doses orales (0.3 à 3 mg/kg). La molécule est hautement liée aux protéines de façon réversible (Weinz et al., 2005). Trois voies métaboliques ont été identifiées : la dégradation oxydative de la partie morpholinone, l'hydrolyse du pont amide central et du pont lactame de l'anneau morpholinone (Lang et al., 2009). La clairance plasmatique est basse (0.3 L/kg/h) et la demi-vie d'élimination est

relativement courte (0.9 h). Toutefois une autre étude évaluant le métabolisme du rivaroxaban marqué radioactivement chez le chien a montré que son élimination dans les selles se poursuit jusqu'à 7 jours après une administration orale. L'élimination est rénale pour 52% et fécal/biliaire pour 43% (Weinz, Schwarz, Kubitza, Mueck, & Lang, 2009). Le rivaroxaban inchangé est le composant plasmatique principal chez le chien. Aucun métabolite circulant majeur ou actif du rivaroxaban n'a été documenté dans cette espèce (Weinz et al., 2009).

Le tableau suivant compare les données pharmacocinétiques et métaboliques issues chez le chien et l'humain.

	Homme	Chien
Absorption	100 %	92%
Biodisponibilité	80%	60-86 %
Pic plasmatique suivant une administration orale	2-4h	30 minutes
Demi-vie	5-9h (jeunes) 11-13h (seniors)	0.9h
Fraction liée aux protéines	92-95%	89.6%
Distribution tissulaire	Foie, reins	Foie, reins
Élimination	Rénale (36%) Biliaire/fécale (50%)	Rénale (52%) Biliaire/fécale (43%)

Tableau IV : Comparaison des données pharmacocinétiques et métaboliques du rivaroxaban chez l'humain et le chien (Kreutz, 2012; Weinz et al., 2005; Weinz et al., 2009).

Etant donné que le rivaroxaban est un anticoagulant efficace, sécuritaire et ne nécessite pas de suivi de laboratoire en médecine humaine, nous avons souhaité évaluer ce médicament oral chez le chien. La première étape de notre projet d'étude est de voir si la rivaroxaban exerce *in vitro* une activité anticoagulante sur du plasma canin, puis d'évaluer le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique (PKPD) de cette molécule chez des chiens en santé.

4- Etude du rivaroxaban chez le chien

Afin de faciliter la compréhension du modèle pharmacologique utilisé pour évaluer l'effet anticoagulant du rivaroxaban chez des chiens en santé, certains mécanismes et certaines notions vont être définis.

a. Notions de pharmacologie

L'évaluation d'une molécule chez un être vivant passe par une évaluation pharmacocinétique et pharmacodynamique. La pharmacocinétique (PK) évalue les changements plasmatiques de la molécule en fonction du temps, et la relation entre la concentration plasmatique, la dose et le mode d'administration : oral, intra-veineux.. La pharmacodynamie (PD) évalue l'effet produit par la molécule après son administration, c'est-à-dire pour notre étude le lien entre la concentration du rivaroxaban et son effet anticoagulant dans l'organisme. Les études PK/PD intègrent les changements de concentrations de la molécule en fonction du changements dans les effets.

Dans le cadre d'une évaluation pharmacocinétique, les concentrations plasmatiques de la molécule étudiée peuvent être déterminées par différentes méthodes (Covey, Lee, & Henion, 1986; Kukanich, 2011):

- La spectrométrie de masse qui est hautement sensible et spécifique, et constitue la méthode de choix. Toutefois, la disponibilité de cette méthode est limitée en raison des coûts inhérents à l'équipement.
- La chromatographie liquide sous haute pression qui a une sensibilité modérée et une spécificité faible à modérée : les molécules nécessitant une faible concentration pour atteindre l'effet pharmacologique, ou bien les molécules métabolisées en plusieurs parties sont difficilement mesurées avec précision avec cette méthode.
- Les tests immunologiques tels que les tests immuno-enzymatiques (ELISA) ou radio-immunologiques par exemples, sont sensibles mais de spécificité variables : des réactions croisées avec des métabolites d'autres molécules peuvent être observées. Toutefois, les molécules faiblement métabolisées sont donc moins concernées par ce biais. Le coût des équipements rend cette méthode plus accessible et disponible.

Les principaux paramètres pharmacocinétiques étudiés dans les modèles pharmacologiques sont les suivants (Kukanich, 2011; PHARMACOKINETICS, 2011) :

- La demi-vie correspond au temps nécessaire pour obtenir une diminution de 50% de la concentration plasmatique maximale. Ce paramètre est différent du temps nécessaire à l'élimination de la moitié de la molécule. En effet, la diminution de la concentration de la molécule peut être causée par son élimination, mais également par sa redistribution aux tissus environnants. La demi-vie permet une estimation du temps nécessaire pour l'obtention de l'état d'équilibre plasmatique de la molécule : 88% de l'état d'équilibre est atteint en 3 demi-vies, 97%

de l'état d'équilibre est atteint en 5 demi-vies, et 99% de l'état d'équilibre est atteint en 7 demi-vies.

- Le volume de distribution (Vd) correspond au volume dans lequel se dilue la molécule après son administration. Ce volume est spécifique de l'espèce, de l'âge de la population étudiée, et de la formulation médicamenteuse. Après une administration intra-veineuse, le volume de distribution se définit par la formule suivante : $Vd = \text{dose}/\text{concentration}$.
- La clairance (CL) plasmatique d'une molécule correspond à son élimination depuis le volume de distribution par unité de temps. L'élimination de la molécule peut être rénale, hépatique, intestinale ou métabolique. Lors d'une infusion continue de la molécule, la clearance se calcule avec la formule suivante : $\text{infusion} = CL \times \text{concentration de la molécule à l'état d'équilibre}$
- Cmax correspond à la concentration maximale de la molécule après une administration extravasculaire. Ce paramètre dépend de la dose administrée.
- Tmax correspond au temps nécessaire pour atteindre Cmax. Ce paramètre est en général constant pour une formulation médicamenteuse donnée, peu importe la dose.
- La biodisponibilité correspond à la fraction systémique disponible de la molécule

Dans l'étude du rivaroxaban, la pharmacodynamie correspond à son effet anticoagulant évalué par divers tests de coagulation. Parmi les notions pharmacodynamiques, on retrouve :

- La puissance qui décrit la concentration de la molécule requise pour susciter un effet.
- L'efficacité qui décrit l'effet maximal de la molécule lorsqu'elle est administrée à des doses croissantes.

b. Pharmaco-modélisation de l'évaluation ru rivaroxaban chez le chien

D'une manière générale, la modélisation pharmacocinétique peut être faite par une analyse non compartimentale (acceptable pour des études de bioéquivalences), ou compartimentale qui tient compte de la transformation de la molécule dans l'organisme. Un compartiment correspond à un ensemble homogène de molécule cinétiquement. Le plus souvent, il s'agit d'un espace virtuel défini par différentes données, par exemple une concentration plasmatique. L'analyse pharmacocinétique compartimentale utilise des modèles de pharmacocinétique capables de décrire et prédire la concentration de la molécule en fonction du temps.

Dans les modèles compartimentaux, il existe des échanges ou des transferts physiques ou chimiques entre les différents compartiments. Ces échanges entre compartiments sont symbolisés par des constantes de transfert qui permettent de calculer des débits massiques ou des vitesses de transfert. Le modèle compartimental le plus simple est celui à un compartiment qui implique que la concentration plasmatique de la molécule reflète sa concentration dans les autres tissus, et que son élimination est proportionnelle à sa concentration dans l'organisme. Le modèle à deux compartiments reflète un compartiment central dans lequel la distribution et l'équilibration de la molécule sont rapides (sang et /ou organes bien vascularisés), et un compartiment périphérique comportant les organes faiblement perfusé et le milieu interstitiel. Toutefois, ce dernier modèle ne permet pas de couvrir tous les voies métaboliques de la molécule. Les modèles multi-compartimentaux sont plus représentatifs de la réalité car il tiennent compte des réactions suivantes : l'absorption, la saturation enzymatique lors de biotransformation, l'induction ou l'inhibition enzymatique lorsque la molécule est capable d'inhiber ou d'activer son propre métabolisme, et l'élimination. Différents programmes informatiques ont été développés pour réaliser ces équations (Atkinson, Ruo, & Frederiksen, 1991; Balant & Gex-Fabry, 1990).

Pour certaines raisons, telles que l'absence d'équipement disponible pour mesurer la concentration plasmatique de la molécule étudiée, ou pour éviter les contraintes inhérentes aux études pharmacocinétiques (collections sanguines multiples), des modèles pharmacodynamiques K-PD ont été développés: ils décrivent la cinétique d'action de la molécule en l'absence de mesure de sa concentration. Les modèles K-PD sont nommés ainsi (omission du P) pour mettre l'emphase sur l'absence de données PK (Jacqmin et al., 2007).

C'est ce type de modèle qui va être utilisé dans l'évaluation de l'effet anticoagulant du rivaroxaban chez des chiens en santé. En effet, nous ne disposons pas du matériel nécessaire à la réalisation d'une étude pharmacocinétique standard. Le modèle utilisé est décrit dans la figure 23 :

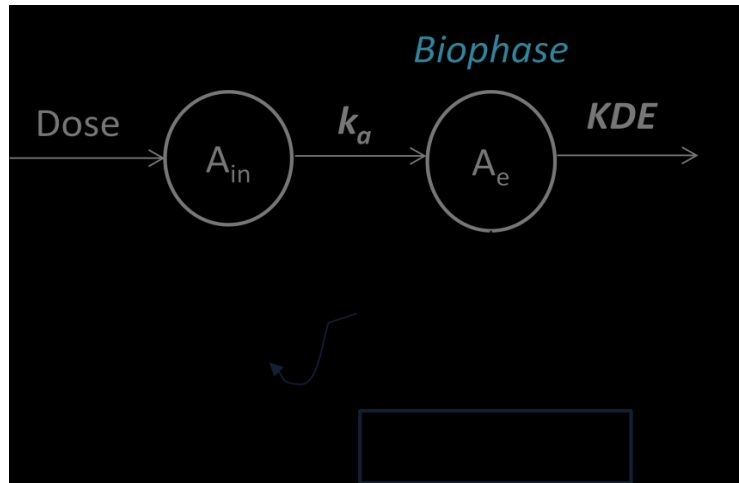


Figure 23 : modèle pharmacologique détaillant les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques utilisés dans l'étude du rivaroxaban oral chez des chiens en santé.

Trois parties composent ce modèle (Jacqmin et al., 2007; Tod, 2008):

- Comme les mesures de concentrations plasmatiques de la molécule étudiée sont absentes, la partie pharmacocinétique est limitée à l'expression d'un modèle simple limité au compartiment intestinal qui reçoit une certaine quantité de rivaroxaban par unité de temps (A_{in}) et à un compartiment principal : la biophase. Dans la biophase, le rivaroxaban est en équilibre (A_e) avec l'effet anticoagulant. Elle correspond de façon schématique à la zone d'action du rivaroxaban, c'est-à-dire aux zones d'interaction entre le rivaroxaban et ses récepteurs. Cette partie pharmacocinétique décrit la variation de la quantité de molécule $A(t)$ en fonction du temps :

$$dA(t)/dt = - KDE \cdot A(t)$$

KDE correspond au taux d'élimination constant de la molécule à partir de la biophase et ce paramètre est responsable de l'équilibre entre la constante d'administration de la molécule étudiée (k_a) et de sa quantité (A_e) dans la biophase.

- La partie pharmacodynamique décrit la relation entre la concentration $C(t)$ du rivaroxaban et l'effet anticoagulant $E(t)$ à un temps donné. On utilise un modèle sigmoïde quand l'effet est saturable, ce qui est le cas dans l'étude de l'effet anticoagulant du rivaroxaban. L'équation de Hill a été proposée comme modèle pour décrire la relation *in vivo* entre la concentration et l'effet pharmacologique d'une molécule (Burton, 2006). L'équation peut s'écrire comme suit :

$$E(t) = E_{max} \cdot C(t)^\gamma / (EC_{50}^\gamma + C(t)^\gamma)$$

E_{max} correspond à l'effet maximal: dans le cas de l'évaluation du rivaroxaban, ce sera l'effet anticoagulant maximal. EC_{50} correspond à la concentration de la molécule permettant d'obtenir la moitié de l'effet maximal: dans notre étude, il s'agira de la concentration plasmatique en rivaroxaban permettant d'obtenir la moitié de l'effet anticoagulant observé et décrit par les tests de coagulation. γ correspond au facteur de sigmoidicité.

Dans le modèle K-PD, une façon de contourner l'absence de données pharmacocinétiques, c'est-à-dire l'absence de valeur de $C(t)$, est d'utiliser 1- la relation $C(t) = A(t) / Vd$, 2- la relation entre la constante d'élimination KDE de la molécule, sa clairance d'élimination CL et le volume de distribution avec la formule suivante : $CL = KDE \cdot Vd$, et 3- la relation entre une infusion continue virtuelle (IR) de la molécule, sa constante d'élimination KDE et sa quantité massique par unité de temps ($A(t)$) : $A(t).KDE = IR(t)$.

Cela donne :

$$E(t) = E_{max}.A(t)^\gamma / (EC_{50}^\gamma \cdot Vd^\gamma + A(t)^\gamma)$$

$$E(t) = E_{max}.IR(t)^\gamma.Vd^\gamma/CL^\gamma / (EC_{50}^\gamma.Vd^\gamma + IR(t)^\gamma.Vd^\gamma/CL^\gamma) = E_{max}.IR(t)^\gamma / (EC_{50}^\gamma.CL^\gamma + IR(t)^\gamma)$$

Le produit $CL \times EC_{50}$ se nomme EDK50 et ce paramètre correspond à la puissance de la molécule à l'état d'équilibre. Il s'exprime en masse par unité de temps.

On obtient alors :

$$E(t) = E_{max}.IR(t)^\gamma / (EDK_{50}^\gamma + IR(t)^\gamma)$$

- La partie de réponse : dans notre étude, cela correspond à la synthèse de l'anticoagulation observée, *via* différents tests de coagulation. Les paramètres K_s et K_D correspondent les taux de production et de dissipation de la réponse pharmacologique, soit de l'anti-coagulation.

L'effet du rivaroxaban est d'inhiber une réponse physiologique : la coagulation. Dans ces circonstances, l'équation E_{max} sigmoïde est soustraite à l'effet de la coagulation basale physiologique. Cela correspond à un modèle sigmoïde d'inhibition de E_{max} :

$$K_s = K_{s0} - \{E_{max}.IR(t)^\gamma / (EDK_{50}^\gamma + IR(t)^\gamma)\}$$

Comme le rivaroxaban décrit une inhibition de la coagulation, les paramètres E_{max} et EC_{50} sont souvent renommés I_{max} et IC_{50} qui correspondent respectivement à l'inhibition maximale de la coagulation et à la concentration en rivaroxaban permettant d'obtenir 50% de l'inhibition maximale de la coagulation.

Comme l'effet maximal est l'inhibition totale de la coagulation basale, Emax et E0 ont la même valeur. La formule utilisée dans notre modèle pharmacologique décrivant la relation entre les valeurs des tests de coagulation et la pharmacocinétique du rivaroxaban est donc la suivante :

$$K_S = K_{S_0} \cdot \left(1 - \frac{IR^\gamma}{EDK_{50}^\gamma + IR^\gamma} \right)$$

Bien que ne se substituant pas au modèle de référence PK/PD, le modèle K-PD a déjà été utilisé et validé dans des études pharmacologiques en médecine vétérinaire (Gabrielsson, Jusko, & Alari, 2000; Jacqmin et al., 2007) et en médecine humaine (Bruno et al., 2003; Port, Ding, Fies, & Scharer, 1998).

PARTIE 2 : Rivaroxaban demonstrates *in vitro* anticoagulant effects in canine plasma

Rivaroxaban demonstrates in vitro anticoagulant effects in canine plasma

Journal

Published in Veterinary Journal 2013;198(2):437-444.

Authors

Bérénice Conversy ^a, Marie-Claude Blais ^{a*}, Marilyn Dunn ^a, Carolyn Gara-Boivin ^b, Lisa Carioto ^a, Jérôme R.E. del Castillo ^c

^a *Department of Clinical Sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada*

^b *Department of Pathology and Microbiology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada*

^c *GREPAQ – Department of Veterinary Biomedecine, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada*

* Corresponding author. Tel.: +1 450 778 8111

Conflict of interest statement

None of the authors has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

The study was supported by the Fonds du Centenaire research grant, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Results of this study were presented in abstract form at the Annual Conference of the American College of Veterinary Internal Medicine, New Orleans, LA USA, May 2012. The authors would like to thank Sandrine Cros and Anik Cormier from the Université de Montréal and from the Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine (Montréal), respectively, for their involvement in performing the coagulation assays.

I- Abstract

Rivaroxaban is an oral direct factor X inhibitor used in human thrombotic disorders. Its oral administration makes it an attractive anticoagulant for dogs. The objective of this study was to evaluate the in vitro anticoagulant effect of rivaroxaban on canine pooled platelet-poor plasma (PPP). Pooled PPP was collected from 20 healthy adult Beagle dogs. Aliquots of pooled citrated PPP were treated in vitro with DMSO solutions of rivaroxaban (98% purity) to obtain 19 final concentrations ranging from 0 to 1000 mg/L of drug. Samples were immediately submitted for the following coagulation assays: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), tissue factor-induced thrombin generation and anti-factor Xa activity. Concentration-effect data were analyzed with various nonlinear regression models for stimulatory or inhibitory effects. Rivaroxaban caused a concentration-dependent prolongation of all coagulation parameters. Rivaroxaban concentration for 50% baseline inhibition of the propagation phase of thrombin (rate index) was 0.024 mg/L, and for 50% baseline inhibition of the optical density in the anti-factor Xa activity assay was 0.053 mg/L. At these concentrations, PT and aPTT remained within the reference range. Two-fold prolongation from baseline of PT and aPTT was achieved with higher concentrations, i.e. 1.24 and 1.69 mg/L, respectively. Thrombin generation was completely suppressed by concentrations ≥ 0.8 mg/L. In conclusion, rivaroxaban showed an in vitro concentration-dependent anticoagulant effect on canine plasma. Thrombin generation and anti-factor Xa activity were more sensitive and accurate in detecting rivaroxaban's anticoagulant effect than PT and aPTT.

II- Introduction

In dogs, thrombosis is a major complication recognized in many conditions, such as neoplasia, corticosteroid administration, metabolic (systemic inflammatory response, disseminated intravascular coagulation (DIC), pancreatitis, immune-mediated disease, protein-losing enteropathy/nephropathy) and hormonal (hyperadrenocorticism) diseases (Kristenen et al., 2008; Laurenson et al., 2010; New et al., 2011). Changes in endogenous procoagulants and anticoagulants can lead to thrombus formation (Alcott et al., 2009; Dunn and Brooks, 2009; Cheng et al., 2011).

Among currently available anticoagulants in dogs, only vitamin K antagonists are given orally, but their effects vary from one dog to another and bleeding complications are of concern (Dunn and Brooks, 2009). Heparin and the low molecular weight heparins (LMWH) are given subcutaneously (SC), which limit their use due to owner compliance (Eymin and Jaffer, 2012).

Rivaroxaban (Xarelto, Bayer), a novel oral anticoagulant drug approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) in 2011 (Maan et al., 2012), is a specific factor X inhibitor that is used in humans for the prevention and treatment of deep vein thrombosis following orthopedic surgery (Perzborn et al., 2010) and for the prevention of stroke in non-valvular atrial fibrillation patients (Perzborn et al., 2011). Clotting factor X is a crucial factor that converts prothrombin molecules into thrombin molecules on the platelet surface via the prothrombinase complex (Perzborn et al., 2005; Alcott et al., 2009; Weitz, 2011). Rivaroxaban binds directly to the catalytic site of the serine protease factor X independently of the presence of antithrombin. It therefore inactivates free factor Xa, as well as clot associated factor Xa-prothrombinase complex (Perzborn et al., 2005). Moreover, inhibition of factor Xa activity limits thrombin-mediated activation of coagulation and platelets without affecting existing thrombin levels (Haas, 2009).

Prior studies in humans demonstrated a dose-dependent effect of rivaroxaban on prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), anti-factor Xa activity, thrombin generation (TG) kinetics, and thrombus formation (Perzborn et al., 2005; Hillarp et al., 2010; Lindhoff-Last et al., 2010; Perzborn et al., 2010; Asmis et al., 2011; Samama and Guinet, 2011a). In medical practice, although the anti-factor X activity assay is, in principle, the test of choice to assess rivaroxaban activity, it is substituted with a PT assay (using the STA Neoplastin Plus reagent, Stago), which is a more readily available and rapid assay in hospital settings (Douxflis et al., 2012; Palareti et al., 2013).

In humans, rivaroxaban exerts its anticoagulant effect for 24 h following oral administration. An important advantage is that administration of rivaroxaban does not require monitoring due to its predictable pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics (Perzborn et al., 2005; Perzborn et al., 2010). These aspects make rivaroxaban an attractive anticoagulant option in dogs; however, there is no available information on its effects on canine coagulation. To the authors' knowledge, only the pharmacokinetics and safety of rivaroxaban have been evaluated in dogs (Weinz et al., 2005). Because the predicted sequence of canine factor X¹ possesses an identical

¹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_534191.1

amino acid motif to the one that interacts with rivaroxaban in human factor X (Roehrig et al., 2005), we hypothesized that rivaroxaban could be a ligand of canine factor X that will inhibit its function in a dose-dependent manner.

The main objective of this study was to document the *in vitro* anticoagulant effect of rivaroxaban on canine plasma at increasing doses, as measured by commonly used coagulation assays (PT, aPTT, anti-factor Xa activity and TG). The second objective was to determine which of these assays is most sensitive at detecting the anticoagulant effects of rivaroxaban, and thus might be most useful to monitor rivaroxaban treatment in dogs.

III- Materials and methods

This prospective study was conducted at the Université de Montréal between July and November 2011. The study protocol was approved by the bioethics committee of the Université de Montréal (11-Rech-1610 approval).

1- Pooled plasma collection

Blood was collected from 20 healthy Beagle dogs from the veterinary teaching colony of the Université de Montréal to generate a platelet-poor canine pooled-plasma. The study group was composed of one intact male, 11 neutered females and 8 intact females. Mean age was 2.2 years old (median: 1.1 years; range: 0.9-6 years) and mean bodyweight was 9.7 kg (median: 9.4 kg; range: 7.7-12.5 kg). Dogs were included in the study if no abnormalities were detected on physical examination, as well as based on the absence of any exclusion criteria in the medical record. Exclusion criteria were estrus, thrombotic/hemorrhagic events, as well as medications or any manipulation that could affect coagulation assays during the month prior to blood collection. Blood (10 mL) was collected from each dog by jugular venipuncture into 4.5 mL evacuated tubes (9NC tube, BD Vacutainer) containing 0.105 M sodium citrate using a butterfly catheter system (21G x 3/4" x 12", BD Vacutainer) and a vacutainer (Standard Yellow Holder 364893, BD Vacutainer).

Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the supernatant fraction following double centrifugation (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) for 10 min at 2532g at room temperature. Individual PPP samples were mixed to obtain a single pooled-plasma solution that was then

aliquoted in 1.5 mL tubes (Screw cap Micro Tube 2 mL, Sarstedt Aktiengesellschaft) and immediately stored at -80 °C for < 3 months until analysis.

2- Rivaroxaban dilutions

Pooled-plasma aliquots were thawed and incubated at 37 °C for 10 min prior to use. Rivaroxaban powder (Rivaroxaban, Toronto Research Chemicals) of 98% purity was added to 100% DMSO solution (Dimethyl Sulfoxide USP 100% injection solution, Trutina Pharmacy) to obtain a 25,000 mg/L stock solution. Serial dilutions of the stock solution with DMSO were prepared, and 100 µL of each dilution was added to 2400 µL of pooled plasma to obtain the following final concentrations: 1000, 500, 250, 100, 62.5, 50, 25, 12.5, 6.25, 1.25, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0 (i.e. PPP + blank DMSO) mg/L. These samples were subjected to coagulation assays within a 2 h period.

3- Coagulation assays

Clotting time assays were performed on blank and rivaroxaban-fortified PPP samples with a semi-automated electro-mechanical clot detection system (Amelung KC 4 A Micro Coagulation Analyser, Trinity Biotech) according to the manufacturer's instructions. Conventional specific reagents were used for the evaluation of the PT (TriniCLOT PT Excel, Trinity Biotech) and aPTT (Dade Actin FS Activated PTT Reagent, Siemens Healthcare Diagnostics). Each clotting time parameter was assayed in duplicate and averaged prior to data analysis.

The PPP samples were additionally submitted to a chromogenic anti-factor Xa assay (STA Rotachrom heparin, Stago) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the test measures the inhibitory activity of rivaroxaban on factor Xa-mediated hydrolysis of a synthetic chromogenic peptide (Lyophilized chromogenic substrate CBS 52.44, Stago). This peptide carries a terminal, yellow-colored para-nitroaniline moiety that, upon release, is detected colorimetrically at an absorbance wavelength of 405 nm (STA-R Evolution, Stago). The buffer (STA-Owren-Koller, Stago) and reagents used were provided by the manufacturer. In the absence of a canine standard rivaroxaban calibrator, only anti-factor Xa optical densities are reported in this study (Lindhoff-Last et al., 2010; Harenberg et al., 2011).

TG kinetics were monitored by a fluorogenic calibrated automated thrombogram (CAT, Thrombinoscope BV) according to a previously described technique (Hemker et al., 2003). The

CAT assay consisted of the use of a fluorogenic thrombin substrate (Fluo-substrate, Thrombinoscope BV) and computer software (Thrombinoscope software, Thrombinoscope BV) connected to an automated fluorometric microplate reader (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) in order to measure TG in the sample. Generation of thrombin was measured in high-binding 96-well microplates (Immulon 2 HB, Thermo Scientific) by comparing fluorescence generated in the sample after clotting activation with tissue factor (in TG wells) to the fluorescence of a calibrated thrombin solution (in Cal wells). In each well, 80 μ L of PPP was added to 20 μ L of a buffer solution containing the trigger substrate (PPP Reagent 5 pM, Thrombinoscope BV) in TG wells, or 20 μ L of thrombin calibrator solution (Thrombin calibrator TS 20.0, Thrombinoscope BV) in Cal wells. Then, 20 μ L of the HEPES-CaCl₂ solution (Fluo-buffer, pH 7.35, Thrombinoscope BV) and the fluorescent substrate were added in the TG and Cal wells, respectively, in order to initiate TG. The final mixture contained 5 pM of tissue factor and 4 μ M of phospholipids. Fluorescence was measured in each well of the microplate and the software converted the signal to calculated molar concentrations of thrombin. All analyses were performed in triplicate as recommended by the manufacturer. The following parameters were recorded: (1) the lag time of TG (in min), which is the time required to generate 10 nM of thrombin molecules; (2) the time to peak (TTpeak, in minutes), i.e. the time required to reach maximal concentration of thrombin; (3) the maximal concentration of generated thrombin (Peak, in nM of thrombin); and (4) the endogenous thrombin potential (ETP, in nM/min), i.e. the area under the thrombin time-concentration curve, which represents the total enzymatic synthesis of thrombin. The rate index of the propagation phase of TG was calculated by the following formula: $\text{peak}/(\text{TTpeak} - \text{lag time})$ and expressed in nM/min (Gerotziafas, 2007b).

4- Data analysis

Concentration-effect data were analyzed with the ADAPT v.5 software (Biomedical Stimulation Resource) using nonlinear regression with maximum-likelihood estimation of the regression coefficients. As defined in human medicine, the inhibitory potency of rivaroxaban was quantified for each coagulation assay, and the sensitivity of the assay was defined as the final rivaroxaban concentration needed to double or halve the coagulation parameter (Perzborn et al., 2005; Gerotziafas et al., 2007a; Perzborn et al., 2009a; Samama et al., 2010a; Samama and Guinet, 2011a; Douxfils et al., 2012; Wong et al., 2013).

The delay effects of rivaroxaban on the variables PT, aPTT, TG lag time and TT_{peak} were modeled with several stimulatory effect models, which allowed for calculation of the rivaroxaban concentration required for doubling (C_{doubling}) their baseline value (Table 1a).

The inhibitory effects of rivaroxaban on the variables ETP, Peak, rate index of the propagation phase of TG, and anti-factor Xa activity were all characterized with the sigmoid Hill model for inhibitory effects, which allowed for the calculation of the rivaroxaban concentration required for halving (C_{halving}) the baseline response value (Table 1b).

Model selection was based on the value of the Akaike goodness of fit information criterion (Yamaoka et al., 1978) and by inspecting the scattering of standardized regression residuals as a function of C and of predicted Y values (D'Argenio et al., 2009). The significance of dose-response relationships was verified by determining that the 95% confidence intervals (95% CI) of estimated regression coefficients excluded 0, and the sensitivity of coagulation parameters to the activity of rivaroxaban was statistically compared by examining the overlap of their respective 95% CI of C_{doubling} or C_{halving} (Cumming, 2009). Precision of each parameter tested was assessed with the range of their associated 95% CI.

IV- Results

Rivaroxaban caused in vitro concentration-dependent effects in all evaluated coagulation parameters. In general, the nonlinear regression models fit the recorded data accurately.

1- Clotting times: PT and aPTT

Rivaroxaban increased clotting times sigmoidally in the case of PT and monotonically in the case of aPTT (Fig. 1a). The estimated C_{doubling} for clotting times are reported in Figure 2. The reference range was 6-12 s for PT, and 10-17 s for aPTT.

2- Anti-factor Xa activity

The measured optical density for the anti-factor Xa activity assay decreased sigmoidally with increasing plasma rivaroxaban concentration (Fig. 1b). The estimated C_{halving} is reported in Figure 2.

3- *Thrombin generation kinetics*

Rivaroxaban had a dose-dependent effect on all TG parameters; it increased lag time and TTpeak, and decreased Peak, ETP and rate index (Fig. 1c,d). Rivaroxaban concentrations ≥ 0.8 mg/L completely suppressed TG (Fig. 3). Results were available within 12-14 min following initiation of coagulation. For each TG parameter, C_{doubling} for lag time and TTpeak, and C_{halving} for peak, ETP and rate index are reported (Figure 2).

The inhibition of the initiation and propagation phases of coagulation was demonstrated with the low rivaroxaban concentrations that were required to double baseline of lag time (0.105 mg/L) and TTpeak (0.154 mg/L), and inhibit 50% baseline of peak (0.042 mg/L) and rate index (0.024 mg/L).

4- *Assay sensitivity of each test*

The estimated C_{halving} or C_{doubling} values of coagulation parameters were in increasing order (i.e. from the most to the least sensitive assay): rate index, peak, anti-factor Xa activity, lag time of TG, TTpeak of TG, ETP of TG, PT, and aPTT (Fig. 2). Interestingly, clotting times remained within the reference range at the rivaroxaban concentrations that inhibited 50% of basal optical density (anti-factor Xa activity), inhibited 50% of peak TG and rate index baselines, and doubled lag time and TTpeak baselines. For the rivaroxaban concentration that inhibited 50% of baseline ETP (0.347 mg/L), PT remained within the reference range and aPTT was only mildly prolonged (18.14 s). For TG, ETP was the least sensitive parameter: its C_{halving} (0.347 mg/L) was 8-fold greater than the C_{halving} for peak and 14-fold higher than the C_{halving} for rate index. Precision of rivaroxaban C_{doubling} and C_{halving} , as assessed by their respective 95% CI were highest for lag time and lowest for ETP (Fig. 2).

V- Discussion

This in vitro pharmacodynamic study demonstrated that rivaroxaban had a dose-dependent anticoagulant activity on canine plasma, with TG being the most sensitive test to detect its anticoagulant effects followed by anti-factor Xa activity and clotting times.

In the present study, three different coagulation assays were evaluated to objectify the anticoagulant properties of rivaroxaban. These assays were chosen to in order to compare the

results with the human literature. Similarly to humans (Samama et al., 2010a; Hillarp et al., 2010; Lindhoff-Last et al., 2010; Asmis et al., 2011; Gerotziapas et al., 2011), in our study rivaroxaban produced a concentration-dependant prolongation of canine PT and aPTT with a weak potency: their C_{doubling} were the highest of the studied parameters. However, despite its lower sensitivity and possible influence of concurrent diseases (Prins et al., 2010; Eralp et al., 2011), the PT assay is currently recommended to assess rivaroxaban activity in humans as an emergency screening test because of its wide clinical availability (Palareti et al., 2013): cut-offs of the various plasma ranges from different pharmacokinetic studies were determined to evaluate risk of bleeding (Douxflis et al., 2012).

Anti-factor Xa activity reflects the final drug activity in the plasma and is theoretically the test of choice for monitoring in humans because of its better sensitivity. However it is rarely available in emergency settings (Douxflis et al., 2012; Palareti et al., 2013). As reported in humans, rivaroxaban had a dose-dependent sigmoid effect on anti-factor Xa activity (Favaloro et al., 2001; Perzborn et al., 2009a; Samama et al., 2009; Barrett et al., 2010; Samama et al., 2010a; Asmis et al., 2011; Harenberg et al., 2011). Several commercial chromogenic assays are available (Perzborn et al., 2009a) and the one chosen for the present study was found to be the most precise (Harenberg et al., 2011). We chose to express the results of this assay in optical density (Samama et al., 2009) instead of applying a LMWH-specific calibration curve, as previous studies showed that rivaroxaban concentrations expressed in IU anti-Xa/mL (units of LMWH) varied considerably between assays (Perzborn et al., 2009a; Harenberg et al., 2011).

In order to quantify rivaroxaban in the plasma, high-performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry (HPLC-MS) was reported as the gold standard (Lindhoff-Last et al., 2010; Asmis et al., 2011), but we did not have access to this analytical platform. A commercial chromogenic assay, which specifically measures rivaroxaban concentration (ng/mL) in the sample is now available; however it was not at the time of this study was conducted (Samama et al., 2010b; Samama et al., 2011b; Samama et al., 2011c). To assess the risk of bleeding in humans, it is currently recommended to screen patients receiving rivaroxaban with PT, and then confirm the plasma concentration of rivaroxaban using anti-factor Xa activity (Douxflis et al., 2012).

TG over time describes the 3 phases (initiation, propagation, neutralization) of coagulation (Gerotziafas, 2007b) and represents a more advanced assay to detect anticoagulation (Hemker et al., 2002). In a recent publication in humans, TG was a sensitive assay to monitor rivaroxaban's pharmacodynamics and pharmacokinetics (Wong et al., 2013). In our study, parameters involved in the initiation and propagation phases were the most sensitive to rivaroxaban, whereas ETP was the least sensitive parameter. As ETP represents the cumulative generation of thrombin in the sample during coagulation, this suggests that rivaroxaban has a greater effect on the initiation and propagation phases of coagulation than the neutralization phase. This is in accordance with studies in humans (Gerotziafas et al., 2007a; Samama et al., 2010a).

Endogenous thrombin potential was the least precise TG parameter in our study, but this was likely overestimated in part because of the lack of additional dilutions (i.e. rivaroxaban dilutions between 0.4 and 0.8 mg/L may have allowed for precise determination of the concentration that inhibited 50% of ETP baseline). In contrast to indirect anti-factor X inhibitors (Orfeo et al., 2010) such as fondaparinux, rivaroxaban is able to completely inhibit TG at high concentrations, as reported in our study with concentrations of ≥ 0.8 mg/L. One explanation could be the ability of rivaroxaban to access factor Xa within the prothrombinase complex in addition to free factor Xa (Gerotziafas, 2007; Weitz, 2011). Like in humans, the sensitivity of TG parameters was in descending order: rate index > peak > lag time > TTPeak > ETP (Gerotziafas, 2007b; Samama et al., 2010a; Wong et al., 2013).

When comparing our results with currently available data in humans, canine factor X appears to have a lower affinity for rivaroxaban (Table 2). This may be due to the three-dimensional structure of canine factor X, thereby making the binding sites for rivaroxaban less accessible. Depending on the parameter, rivaroxaban was 0.5-24 times more potent in vitro in human plasma than in canine plasma. Further studies are needed to determine whether these observations will persist in vivo.

According to previous studies conducted in animals, rivaroxaban appears to be a promising drug. In rats and rabbits, it showed anti-thrombotic activity in venous and arterial thrombosis models (Perzborn et al., 2005). In dogs, one study demonstrated that rivaroxaban oral absorption was

high (60-86%) with a linear and predictable pharmacokinetic profile (Weinz et al., 2005); however, no information are available with regard to its pharmacodynamics. Results from the present study and similar human data will help in selecting the coagulation assays with the greatest sensitivity for monitoring rivaroxaban in vivo pharmacodynamics in dogs.

This study has some limitations. All data were obtained in vitro, therefore in vivo studies are required to evaluate the clinical relevance of these results. Blood was collected from healthy Beagle dogs to create pooled plasma. The dogs used in this study have been part of the institution's colony for some time and receive regular health status evaluations. None of them have ever exhibited any coagulation abnormalities. Therefore, no individual PT or genetic screening was performed to rule out any factor VII deficient dogs prior to this study (Callan et al., 2006). Moreover, since all coagulation assays from the rivaroxaban-free pooled plasma sample were within the reference range, the bias associated with the inclusion of a factor VII-deficient dog would be mild at most. To obtain a final rivaroxaban concentration, we arbitrarily used 2.4 mL of canine plasma and 100 μ L of rivaroxaban diluted in DMSO. According to the TG interassay variability established in our laboratory (Allegret et al., 2011), the addition of DMSO seems to result in an insignificant difference compared to the results using DMSO-free PPP.

VI- Conclusion

The present study demonstrated that rivaroxaban has an in vitro concentration-dependent anticoagulant effect on all evaluated coagulation assays in canine plasma. TG and anti-factor Xa activity were more sensitive parameters than clotting times in detecting rivaroxaban's anticoagulant activity, with TG being completely suppressed in PPP. Because TG is not commonly available in most laboratories, anti-factor Xa activity, which is more readily available, represents a good alternative for the evaluation of rivaroxaban's anticoagulant effects. The clinical utility of these data requires further investigation.

VII- References

- Alcott, C., Broxkus, C., Sponseller, B., 2009. Hemostasis. *Compendium Equine: Continuing Education for Practicing Veterinarian* 4, 78-89.
- Allegret, V., Dunn, M., Bédard, C., 2011. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology* 40, 24-31.
- Asmis, L.M., Alberio, L., Angelillo-Scherre, A., Korte, W., Mendez, A., Reber, G., Seifert, B., Stricker, H., Tsakiris, D.A., Willemin, W.A., 2012. Rivaroxaban: quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests. A study in 9 Swiss laboratories. *Thrombosis Research* 129, 492-498.
- Barrett, Y.C., Wang, Z., Frost, C., Shanker, A., 2010. Clinical laboratory measurement of direct factor Xa inhibitors: anti-Xa assay is preferable to prothrombin time assay. *Thrombosis and Haemostasis* 6, 1263-1271.
- Callan, M.B., Aljamali, M.N., Margaritis, P., Griot-Wenk, M.E., Pollak, E.S., Werner, P., Giger, U., High, K.A., 2006. A novel missense mutation responsible for factor VII deficiency in research Beagle colonies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4, 2616-2622.
- Cheng, T., Mathews, K.A., 2011. The link between inflammation and coagulation: influence on the interpretation of diagnostic laboratory tests. *Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian* 33, 1-12.
- Cumming, G., 2009. Inference by eye: reading the overlap of independent confidence intervals. *Statistics in Medicine* 28, 205-220.
- D'Argenio, D.Z., Schumitzky, A., Wang, X., 2009. ADAPT 5 user's guide: pharmacokinetic/pharmacodynamic systems analysis software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles.
- Douxflis, J., Mullier, F., Loosen, C., Chatelain, C., Chatelain, B., Dogné, J.M., 2012. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thrombosis Research* 130, 956-966.
- Dunn, M., Brooks, M.B., 2009. Antiplatelet and anticoagulant therapy. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*, Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 24-28.
- Eralp, O., Yilmaz, Z., Failing, K., Moritz, A., Bauer, N., 2011. Effect of experimental endotoxemia on thromboelastography parameters, secondary and tertiary hemostasis in dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 3, 524-531.
- Eymin, G., Jaffer, A.K., 2012. Thromboprophylaxis in major knee and hip replacement surgery: a review. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 34, 518-525.

Favaloro, E.J., Lippi, G., Koutts, J., 2011. Laboratory testing of anticoagulants: the present and the future. *Pathology* 43, 682-692.

Gerotziapas, G.T., Elalamy, I., Depasse, F., Perzborn, E., Samam, M., 2007a. In vitro inhibition of thrombin generation, after tissue factor pathway activation, by the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, 886-888.

Gerotziapas, G.T., 2007b. Le test de génération de thrombine, un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *Biotribune* 24, 37-43.

Gerotziapas, G.T., Baccouche, H., Sassi, M., Galea, V., Chaari, M., Hatmi, M., Samama, M., Elalamy, I., 2012. Optimisation of the assays for the measurement of clotting factor activity in the presence of rivaroxaban. *Thrombosis Research* 129, 101-103.

Haas, S., 2009. Rivaroxaban – an oral, direct factor Xa inhibitor – lessons from broad clinical study programme. *European Journal of Haematology* 82, 339-349.

Harenberg, J., Krämer, R., Giese, C., Marx, S., Weiss, C., Wehling, M., 2011. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 32, 267-271.

Hemker, H.C., Giesen P., AlDieri, R., Regnault, V., de Smed E., Wagenvoord, R., Lecompte, T., Béquin, S., 2002. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 32, 249-253.

Hemker, H.C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoord, R., Lecompte, T., Béquin, S., 2003. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 33, 4-15.

Hillarp, A., Baghaei, F., Fagerberg Blixter, I., Gustafsson, K.M., Stigendal, M., Sten-Linder, M., Strandberg, K., Lidhal, T.L., 2010. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9, 133-139.

Josso, F., Prou-Wartelle, O., 1965. Interaction of tissue factor and factor VII at the earliest phase of coagulation. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica Supplementum* 17, 35-44.

Kristensen, A.T., Wiinberg, B., Jessen, L.R., Andreasen, E., Jensen, A.L., 2008. Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1, 140-147.

Laurenson, M.P., Hopper, K., Herrera, M.A., Johnoson, E.G., 2010. Concurrent diseases and conditions in dogs with splenic vein thrombosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24,1298-1304.

Lindhoff-Last, E., Samama, M., Ortel, T.L., Weitz, J.I., Spiro, T.E., 2010. Assays for measuring rivaroxaban: their suitability and limitations. *Therapeutic Drug Monitoring* 32, 673-679.

Maan, A., Padmanabhan, R., Shaikh, A.Y., Mansour, M., Ruskin, J.N., Heist, E.K., 2012. Newer anticoagulants in cardiovascular disease: a systemic review of literature. *Cardiology in Review* 20, 209-221.

New, H., Byers, C.G., 2011. Pulmonary thromboembolism. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 33, E1-7.

Orfeo, T., Butenas, S., Brummel-Ziedins, K.E., Gissel, M., Mann, K.G., 2010. Anticoagulation by factor Xa inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8, 1745-1753.

Perzborn, E., Strassburger, J., Wilmen, A., Pohlmann, J., Roehrig, S., Schelemmer, K.H., Straub, A., 2005. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939-an oral, direct factor Xa inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 514-521.

Perzborn, E., Harwardt, M., Samama, M., 2009a. Assessment of factor Xa chromogenic assays for measuring the pharmacodynamics of rivaroxaban – an oral, direct factor Xa inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis Suppl. 2*, 379, Abstract PP-MO-185.

Perzborn, E., Harwardt, M., 2009b. Inhibition of thrombin generation in human plasma by rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis Suppl.2*, 379, Abstract PP-MO-184.

Perzborn, E., Roehrig, S., Straub, A., Kubitza, D., Mueck, W., Laux, V., 2010. Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 376-381.

Perzborn, E., Roehrig, S., Straub, A., Kubitza, D., Misselwitz, F., 2011. The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Nature Reviews. Drug Discovery* 10, 61-75.

Prins, M., Schellens, C.J., van Leeuwen, M.W., Rothuizen, J., Teske, E., 2010. Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *The Veterinary Journal* 185, 163-168.

Rizzo, F., Papasouliotis, K., Crawford, E., Dodkin, S., Cue, S., 2008. Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) on canine citrated plasma samples following different storage condition. *Research in Veterinary Science* 85, 166-170.

Roehrig, S., Straub, A., Pohlmann, J., Lampe, T., Pernerstorfer, J., Schlemmer, K.H., Reinemer, P., Perzborn, E., 2005. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((Roehrig et al., 2005)methyl)thiophene- 2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 5900-5908.

Samama, M., Le Flem, L., Guinet, C., Perzborn, E., Amiral, J., Depasse, F., 2009. Suitability of chromogenic anti-factor Xa methods to measure rivaroxaban in human plasma. *Journal of Thrombosis and Haemostasis Suppl.2*, 379, Abstract PP-WE-199.

Samama, M., Martiloni, J.L., LeFlem, L., Guinet, C., Plu-Bureau, G., Depasse, F., Perzborn, E., 2010a. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban-an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis* 4, 815-825.

Samama, M., Amiral, J., Guinet, C., Perzbor, E., Depasse, F., 2010b. Specific and rapid measurement of rivaroxaban in plasma using a new, dedicated, chromogenic assay. Aniara, Poster P01-17 Ref 221030.

Samama, M., Guinet, C., 2011a. Laboratory assessment of new anticoagulants. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49, 761-772.

Samama, M., Contant, G., Spiro, T.E., Perzborn, E., Guinet, C., Gourmelin, Y., Le Flem, L., Rohde, G., Martinoli, J.L., 2011b. Evaluation of the anti-factor Xa chromogenic assay for the measurement of rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls. *Thrombosis and Haemostasis* 107, 379-387.

Samama, M., Contant, G., Spiro, T.E., Perzborn, E., Guinet, C., Gourmelin, Y., Le Flem, L., Rohde, G., Martinoli, J.L., 2012. Evaluation of the anti-factor Xa chromogenic assay for the measurement of rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and control. *Thrombosis and Haemostasis* 107, 379-387.

Weinz, C., Buetehorn, U., Daehler, H.P., Kohlsdorfer, C., Pleiss, U., Sandmann, S., Schlemmer, K.H., Schwarz, T., Steinke, W., 2005. Pharmacokinetics of BAY 59-7939 – an oral, direct factor Xa inhibitor – in rats and dogs. *Xenobiotica* 35, 891-910.

Weitz, J.I., 2011. Factor Xa and thrombin as targets for new oral anticoagulants. *Thrombosis Research* 127, 5-12.

Wong, P.C., White, A., Luetzgen, J., 2013. Inhibitory effect of apixaban compared with rivaroxaban and dabigatran on thrombin generation assay. *Hospital Practice* 41, 19-25.

Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T., 1978. Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the Evaluation of Linear Pharmacokinetic Equation. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 6, 165-175.

VIII- Tables and figures to accompany the article

Model name	Equation	$C_{doubling}$
Stimulatory sigmoid Hill	$Y = \left(Y_0 + \frac{E_{max} \cdot C^H}{EC_{50}^H + C^H} \right) \cdot (1 + \varepsilon)$	$C_{doubling} = \sqrt[H]{\frac{Y_0 \cdot EC_{50}^H}{E_{max} - E_0}}$
Reciprocal of natural logarithm	$Y = \left(\frac{1}{b_0 - b_1 \cdot \ln(C)} \right) \cdot (1 + \varepsilon)$	$C_{doubling} = e^{\left(\frac{1}{2 \cdot Y_0} - b_0 \right) / b_1}$
Power	$Y = (b_0 + b_1 \cdot C^{b_2}) \cdot (1 + \varepsilon)$	$C_{doubling} = \sqrt[b_2]{\frac{2 \cdot b_0}{b_1}}$

Model name	Equation	$C_{halving}$
Inhibitory sigmoid Hill	$Y = \left(Y_0 - \frac{I_{max} \cdot C^H}{IC_{50}^H + C^H} \right) \cdot (1 + \varepsilon)$	$C_{halving} = \sqrt[H]{2 \cdot \left(\frac{E_0 \cdot IC_{50}^H}{I_{max} - \frac{E_0}{2}} \right)}$

Table 1: Nonlinear regression models and formulas for calculating platelet poor plasma (PPP) drug concentration needed to double ($C_{doubling}$) or to halve ($C_{halving}$) baseline value of coagulation parameters.

Y : tested coagulation parameter; C : PPP studied drug concentration; Y_0 : value of the coagulation parameter for blank PPP; E_{max} : maximum delay effect; EC_{50} : PPP studied drug concentrations required to achieve half the value of E_{max} ; H : Hill sigmoidicity factor; b_0 , b_1 , and b_2 : nonlinear regression coefficients (intercept, slope and exponent, respectively); $(1 + \varepsilon)$: multiplicative random error term; I_{max} : maximum inhibitory effect; IC_{50} : PPP studied drug concentration required to achieve half the value of I_{max} .

[Rivaroxaban](mg/L)	Doubling baseline		50% baseline inhibition		
	Lag time	Time to peak	ETP	Rate index	Peak
Canine	0.105	0.154	0.347	0.024	0.042
Human data					
Perzborn et al., 2009b	0.037	0.021	0.644	-	0.025
Samama et al., 2010a	0.0514	0.045	0.305	0.0087	0.021
Douxfils et al., 2012	0.055	-	-	0.001	0.003
Wong et al., 2013	0.0214	0.0305	0.187	0.0096	0.021

Table 2: Comparison of required rivaroxaban concentrations to double or inhibit 50% baseline of thrombin generation parameters between normal canine plasma and human data.

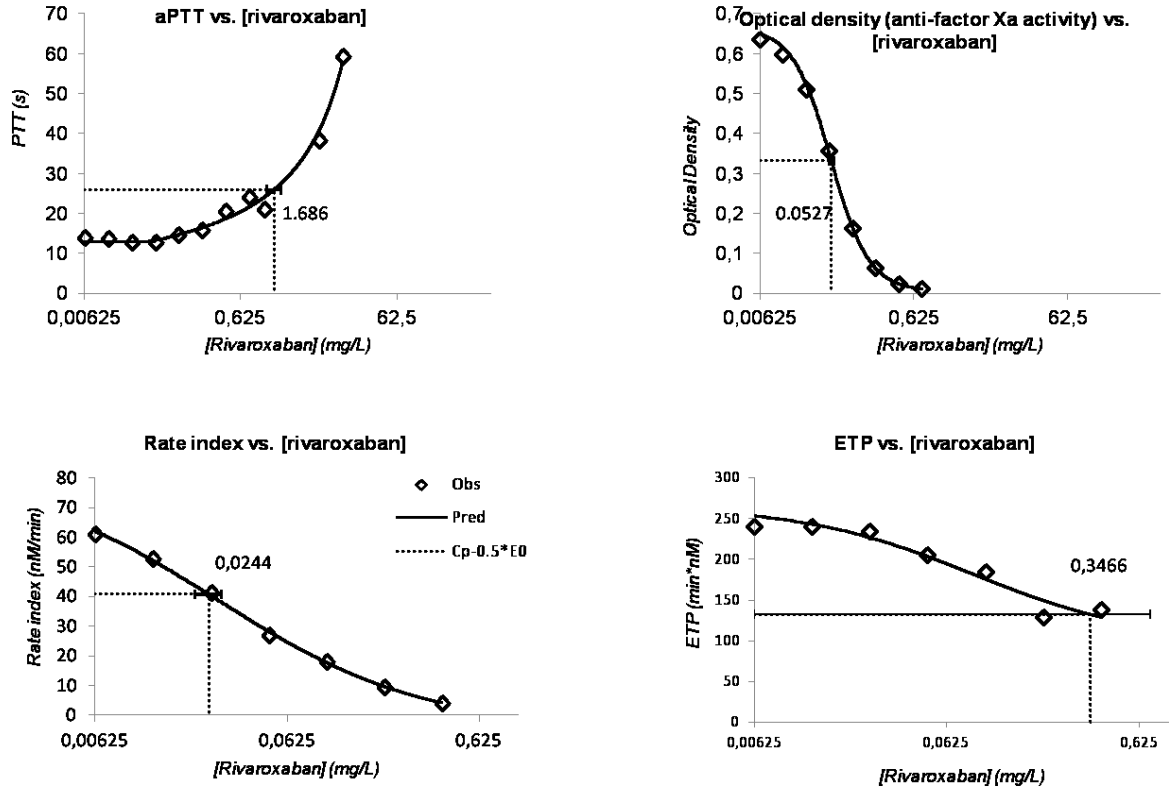


Figure 1: Examples of in vitro rivaroxaban concentrations determination that doubled (a) or inhibited 50 % baseline (b,c,d) assay value on canine PPP

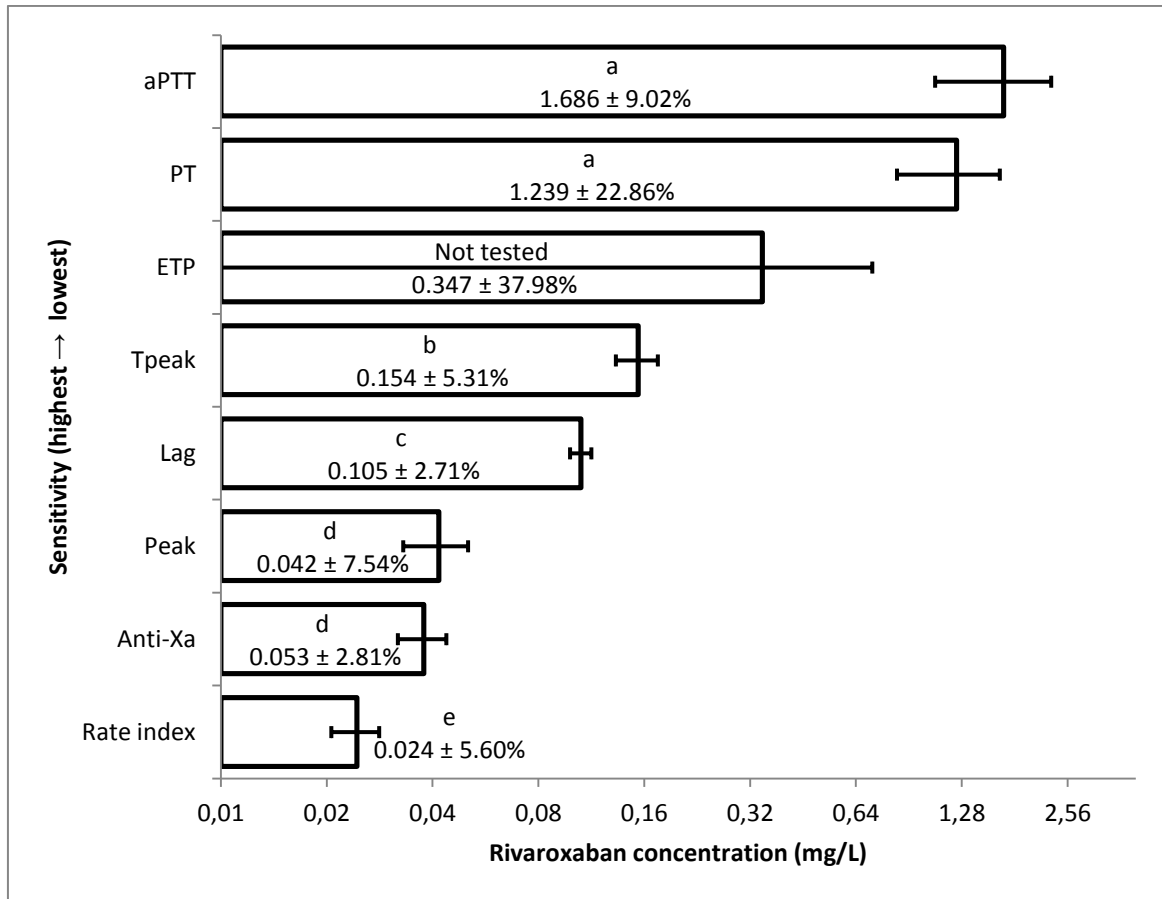


Figure 2: Assay sensitivity of each test to detect anticoagulant effect of rivaroxaban in canine PPP. Accuracy of each value with a 95% confidence interval is indicated with a horizontal line. Rivaroxaban concentrations required to double or inhibit 50% baseline coagulation assay in pooled canine plasma are reported (mean \pm coefficient of variation (CV) expressed in %) for each test.

The estimated coagulation parameters whose 95% confidence intervals significantly differ ($p < 0.05$) are identified with different small case letters. ETP was not included in the test because the tested rivaroxaban concentrations did not represent the lower half of the concentration-response relationship.

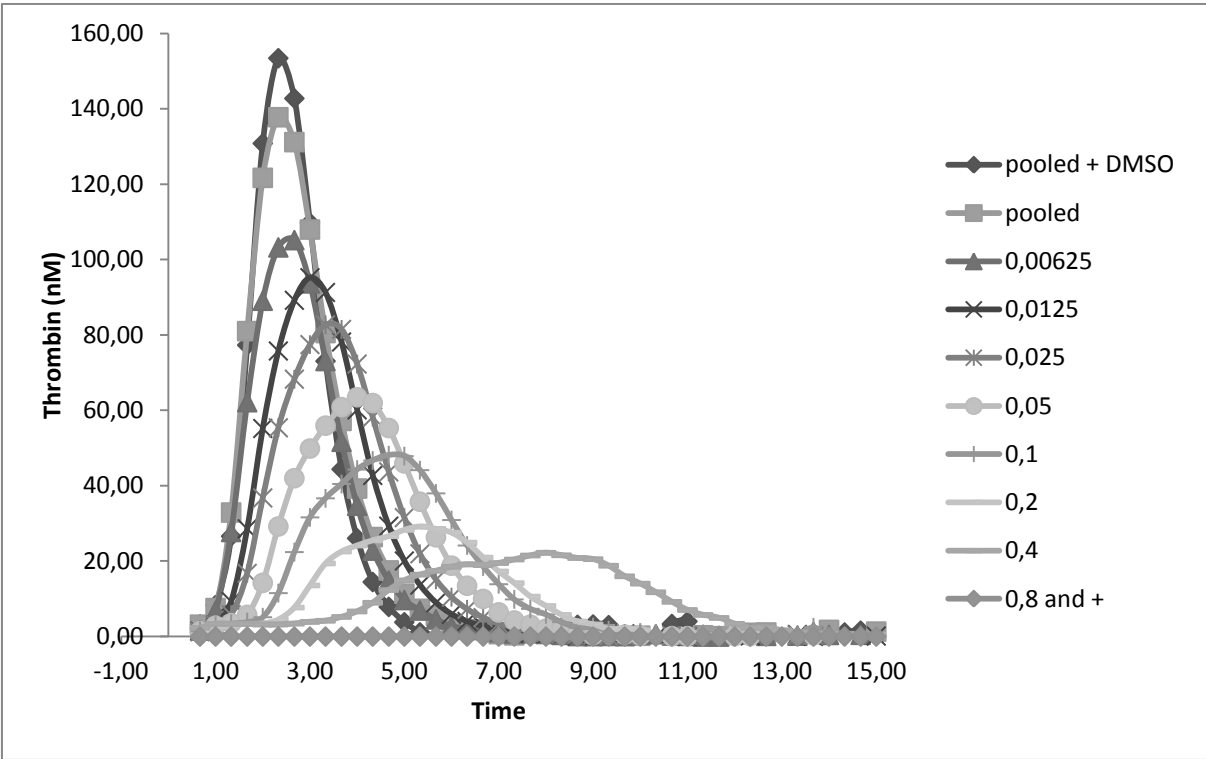


Figure 3: Thrombin generation versus time for different in vitro rivaroxaban concentrations in canine PPP.

PARTIE 3 : Rivaroxaban is an efficace oral anticoagulant in healthy dogs

Rivaroxaban is an efficace oral anticoagulant in healthy dogs

Journal:

This article is currently being reviewed by all authors for submission in Journal of Veterinary Internal Medicine.

Authors:

Bérénice Conversy ^{a*}, Marie-Claude Blais ^a, Marilyn Dunn ^a, Carloyn Gara-Boivin ^b, Jérôme R.E. del Castillo ^c

^a Department of Clinical Sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

^b Department of Pathology and Microbiology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

^c GREPAQ – Department of Veterinary Biomedecine, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

*** Corresponding author:**

Bérénice Conversy

Department of Clinical Sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada

Short title: rivaroxaban is efficient in healthy dogs

Keywords: rivaroxaban, anticoagulant, dogs, pharmacokinetics, pharmacodynamics

List of abbreviations

aPTT: partial thromboplastin time

Bpm: beats per minute

LMWH: low molecular weight heparin

Mpm: movement per minute

MA : maximal amplitude

PKPD: pharmacokinetic/pharmacodynamic

PPP: Platelet-poor plasma

PT: prothrombin time

TG: thrombin generation

TEG: thromboelastography

The study was performed at the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal. The study was supported by the Académie des médecins vétérinaires du Québec and an intramural research grant (Fonds en Santé des Animaux de Compagnie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal). The results of this study were presented in an abstract form at the Annual Conference of the American College of Veterinary Internal Medicine, Seattle, WA USA, June 2013, and was awarded the ACVIM resident research award. The authors would like to thank Sandrine Cros from the Diagnostic Laboratory of the Université de Montréal, and Anik Cormier and Annie Fontaine from the Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine (Haemostasis Laboratory, Montréal) for their aid in performing the coagulation assays.

I- Abstract

Background - Rivaroxaban is an oral, direct factor X inhibitor used in human thrombotic disorders. A previous *in vitro* study showed concentration-dependent effects of rivaroxaban on several coagulation parameters suggesting promising characteristics for use in dogs.

Hypothesis/Objectives – To test the hypothesis of an *in vivo* anticoagulant effect in healthy dogs, the pharmacodynamics of rivaroxaban was documented.

Animals – Twenty-four healthy Beagles from the veterinary teaching colony of the Université de Montréal were enrolled.

Methods – Dogs were randomized in 3 groups (n=8) and received orally either a placebo, 20mg rivaroxaban once or twice at 8h interval. Fifteen blood samples were collected over a 30h period, and blindly assayed for prothrombin time (PT), partial thromboplastin time (aPTT), tissue factor induced thrombin generation (TG), and anti-factor X activity. Thromboelastography (TEG) was evaluated at 0, 1, 4, 8 and 24h. Peak/baseline anticoagulant effect ratios were analyzed with generalized linear models using beta distributions, and times to return to baseline with survival analyses ($\alpha=0.05$).

Results – Peak/baseline anticoagulant effect ratios of PT, aPTT, anti-factor Xa activity, TG and R (TEG) differed significantly between placebo and both rivaroxaban groups ($p<0.0001$). The peak

anticoagulant effect of rivaroxaban appeared 1.5 to 2h after the dose. Median duration of action was significantly ($p < 0.01$) shorter after one rivaroxaban administration (7.9-18.7h) than after two administrations (17.5-26.8h). The inter-individual variability of the pharmacokinetic parameters was minimal unlike that of the pharmacodynamic parameters.

Conclusions and clinical importance – No adverse effects were recorded. Rivaroxaban PKPD data support twice daily administration at a dose of 2 mg/kg to maintain 24h anticoagulant efficacy, but larger safety studies are needed to establish guidelines.

II- Introduction

In dogs, thrombosis is a major complication detected in many acquired conditions, such as hyperadrenocorticism, diabetes mellitus, chronic administration of corticosteroids, systemic inflammatory response syndrome, disseminated intravascular coagulation, immune-mediated hemolytic anemia, pancreatitis and protein-losing enteropathy/nephropathy.¹⁻⁶ Hypercoagulable states and thromboembolism cause significant morbidity and mortality in veterinary medicine.^{7,8} Anticoagulants commonly used in canine practice are vitamin-K antagonists, heparin and low-molecular weight heparin (LMWH), however their effects are variable from one patient to another and bleeding complications are of concern.^{9,10} Moreover, heparin must be administered subcutaneously which may not be possible for some owners and patients.¹¹

Rivaroxaban is a specific factor Xa inhibitor approved by the FDA in 2011 for the prevention and treatment of thrombosis in human.¹² The cell-based description of the coagulation model shows the pivotal role of factor X in the initiation and the propagation phases of coagulation.¹³ It converts thousands of molecules of prothrombin into thrombin on the platelet surface via the prothrombinase complex. Moreover, factor X has few functions outside of coagulation.^{13,14} Rivaroxaban acts on free factor X, as well as prothrombinase complex and clot bound factor X, making it a powerful anticoagulant.¹⁵ Canine factor X possesses the same amino-acid sequence as human factor X which is known to interact with rivaroxaban, making this drug potentially effective in dogs.¹⁶ An *in vitro* study confirmed the anticoagulant activity of rivaroxaban on canine plasma. In this study, anti-factor Xa activity and thrombin generation were the most sensitive parameters to detect anticoagulant effect of the drug.¹⁷ Similarly, the same coagulation assays were found to be the most sensitive to detect its anticoagulant activity in human medicine,

although monitoring is not considered essential because of the predictable pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of rivaroxaban.¹⁸⁻²⁰

Scarce data is available in the literature on the clinical use of rivaroxaban in dogs. A pharmacokinetic study showed that rivaroxaban was rapidly absorbed (60-86%) and that plasmatic concentrations evolved linearly.²¹ Three metabolic pathways were identified: oxidative degradation of morpholinone moiety, amide hydrolysis of the central amide moiety and of the morpholinone ring.²² The plasmatic clearance was slow (0.3 L/kg/h) and the half-elimination time was short (0.9h), although another canine study evaluating its metabolism showed that radioactive doses of rivaroxaban were present in the feces seven days after an oral administration. Rivaroxaban has a double elimination: renal (52%) and biliary/fecal (43%).²³

To our knowledge, there is no study evaluating the pharmacodynamics of rivaroxaban in dogs. The goals of the present study are (i) to evaluate the pharmacodynamics of rivaroxaban in healthy dogs after oral administration and to confirm its anticoagulant effect, (ii) to determine the duration of the anticoagulant effect, (iii) to characterize the inter-individual variability, and (iv) to determine the most sensitive assay to evaluate rivaroxaban-induced anticoagulation. We hypothesize that an oral dose of 2 mg/kg of rivaroxaban in healthy dogs will provide a significant anticoagulant effect.

III- Materials and methods

This prospective study was conducted at the Université de Montréal between July and December 2012. The study protocol was approved by the bio-ethics committee of the Université de Montréal (12- Rech – 1649 approbation).

I- Dogs

Twenty-four healthy Beagles from the veterinary teaching colony of the Université de Montréal were enrolled in the study. They were determined to be healthy based on physical examination, hematology, biochemistry and urine specific gravity (free catch) within reference range. Before the entry in the study, 5 mL of whole and EDTA anticoagulated blood were collected for CBC

and biochemistry analyzes. Exclusion criteria were estrus, thrombotic and/or hemorrhagic events, as well as the administration of medications (anti-inflammatory, anticoagulant, anti-platelet drug, omegas-3 fatty acids, hormone therapy...) or manipulations (surgery) that could affect coagulation assays during the month prior to blood collection.

Twenty-four hours prior to the entry in the study, a central venous catheter^a was placed in all dogs under sedation (dexmedetomidine^b (3 µg/kg IV) which was then reversed with atipamezole^c (0.03mg/kg IM)). Catheters were not heparinized, but saline was used during the study. A dry low fat diet^z was offered 12 hours before and 15 hours after the beginning of the study. Dogs were randomly divided into 3 equal groups and followed for 30 hours. Dogs in the *control group* received a placebo pill^d *per os* at the beginning of the study (T0) and 8 hours after (T8). Dogs in *group 1* received 20 mg of rivaroxaban^e *per os* at the beginning of the study (T0), and dogs in *group 2* received 20 mg of rivaroxaban^e *per os* at the beginning of the study (T0) and 8 hours after (T8). Drugs were administered at 8 hours interval for practicable reasons.

All dogs remained under medical supervision throughout the study (B.C.) and in the same environment with free access to water.

2- Determination of oral rivaroxaban dosage

Considering that the efficient concentration of rivaroxaban and its bioavailability are similar in humans and dogs, the following formula was used to determine the 2 to 3 mg/kg oral dosage of rivaroxaban needed in dogs based on data of the human required dose, as well as canine and human clearances from pharmacologic studies^{21,23,28}:

Rivaroxaban required dose = (efficient concentration x clearance) / bioavailability.

3- Blood collection

For each dog, 4.5 mL of citrated blood^f were directly collected from the central venous catheter at 16 different time-points (in hours): T0 (beginning of the study), T0.1, T0.33, T0.66, T1, T1.5, T2, T4, T6, T8, T8.5, T9, T11, T15, T24 and T30. Blood sampling was done after flushing the catheter with 5mL of saline solution and then discarding the first 5 mL of blood collected. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the supernatant fraction following a double centrifugation^g (2532 g for 10 minutes at room temperature). Individual PPP were aliquoted in 1.5 mL plastic tubes^h, identified and immediately stored at -80°C until they were submitted for

the following coagulation assays: prothrombin time (PT), partial thromboplastin time (aPTT), anti-X activity and thrombin generation (TG) kinetic.

At T0, T1, T4, T8 and T24 times, additional 2.7 mL citrated blood samplesⁱ were collected from the central venous catheter for immediate thromboelastography (TEG) assays and microhaematocrit determination.

4- Coagulation assays

Clotting time assays were performed with an automated clot detection-based system^j. Conventional specific reagents were used for the evaluation of PT^k and aPTT^l.

The PPP samples underwent additionally a chromogenic anti-Xa assay^m. Briefly, the test measured the inhibitory activity of rivaroxaban on factor X-mediated hydrolysis of a synthetic chromogenic peptide.ⁿ This peptide carries a terminal, yellow-colored para-nitroaniline moiety that, upon release, is detected colorimetrically^j at an absorbance wavelength of 405 nm. Buffer^o and reagents provided by the manufacturer were used.

Thrombin generation kinetics were monitored by a fluorogenic calibrated automated thrombogram (CAT) system^p according to a previously described technique.²⁵ The CAT assay consisted of the use of a fluorogenic thrombin substrate^q and computer software^r connected to an automated fluorometric microplate reader^s in order to measure thrombin generation in the sample. Generation of thrombin was measured in high-binding 96-well microplates^t by comparing fluorescence generated in the sample after clotting activation with tissue factor (in TG wells) to the fluorescence of a calibrated thrombin solution (in Cal wells). In each well, 80 μ L of PPP was added to 20 μ L of a buffer solution containing the trigger substrate^u (in TG wells) or 20 μ L of thrombin calibrator solution^v (in Cal wells). Then, 20 μ L of the hepes-CaCl₂ solution^w and the fluorescent substrate^q were added in the TG and Cal wells respectively in order to initiate TG. The final mixture contained 5 pM of tissue factor and 4 μ M of phospholipids. Fluorescence was measured in each well of the microplate, and the software converted the signal into calculated molar concentrations of thrombin. All analyses were performed in triplicata as recommended by the manufacturer. The following parameters were recorded: (i) the *lag time* of thrombin generation (in minutes) which is the period between the start of the assay and generated thrombin

molecules emergence, (ii) the time to peak (TT_{peak} , in minutes), i.e. the time required to reach maximal concentration of thrombin (TT_{peak} , in minutes), (iii) the maximal concentration of generated thrombin ($Peak$, in nM of thrombin), and (iv) the endogenous thrombin potential (ETP or area under curve, in nM/min) that is the area under the thrombin time-concentration curve, and represents the enzymatic work of active thrombin. The rate index of the propagation phase of TG was calculated by the following formula: $peak/(TT_{peak} - \text{lag time})$ and expressed in nM/min.

Thromboelastography was performed within a 45 minute-window following blood collection. An automated recalcified method, previously validated for dogs²⁶, was used^x. Briefly, recombinant human tissue factor^y was diluted 1:100 in phosphate-buffered saline containing 4% bovine serum albumin at pH 7.4. Citrated-whole blood (320 μ L) was placed into a plastic cup containing a mixture of 10 μ L tissue factor and 20 μ L $CaCl_2$ (0.2M). The assay was run for 1 hour at 37°C in duplicata. TEG tracings and variables were provided by a software. R (in minutes) represents the period from the start of the assay until the first fibrin polymers amplitude reaches 2 mm. K (in minutes) corresponds to the time from the end of R period until the blood clot amplitude reaches 20 mm. α (in degree) is the angle between the midline and the tangent to the curve drawn from the end of K . MA (in millimeter) is the maximal amplitude between the both diverging branches and reflects the strength of the blood clot. $LY30$ corresponds to the percent of clot lysis detected 30 minutes after MA is reached.

5- Anticoagulant effect modeling

To evaluate the anticoagulant effect of rivaroxaban in dogs, a pharmacologic model named K-PD (Figure 1) that could be applied when the plasmatic drug concentration is not available was used.²⁷ It is applicable to all dogs regardless of their group and it has three parts. Briefly, the pharmacokinetic part consists of a first intestinal compartment in which rivaroxaban dose is administered, and a central compartment that is a virtual biophase in which rivaroxaban amount is in equilibrium with the anticoagulant effect. The biophase corresponds to the pharmacological target of rivaroxaban. k_a and KDE refer to the pharmacokinetic parameters. They correspond to the rivaroxaban input and output rate to the biophase, and they are partly determined by rivaroxaban absorption and elimination rates respectively.

The kinetic profile is described as follows:

$$dA(t)/dt = -KDE \cdot A(t)$$

The pharmacodynamic part describes the relation between rivaroxaban amount from the biophase and the anticoagulant effect (E(t)). A sigmoid Emax model described this saturable pharmacologic effect, as follow:

$$E(t) = E_{max} \cdot C(t)^\gamma / (EC_{50}^\gamma + C(t)^\gamma)$$

As rivaroxaban concentration over time are not available data in the study, the relations between the constant of rivaroxaban elimination *KDE*, its clearance (CL) and its volume of distribution ($CL = KDE \times \text{volume of distribution}$); between rivaroxaban concentration, its amount and its volume of distribution ($C(t) = A(t) / \text{volume of distribution}$); and between the constant of rivaroxaban elimination *KDE* and rivaroxaban concentration ($IR = KDE \times Ae$) will be used to describe the synthesis rate constant of the anticoagulation (K_s). *IR* corresponds to a virtual infusion rate of rivaroxaban. Anticoagulant effect could be described as follow:

$$E(t) = E_{max} \cdot IR(t)^\gamma / (EC_{50}^\gamma \cdot CL^\gamma + IR(t)^\gamma) = E_{max} \cdot IR(t)^\gamma / (EDK_{50}^\gamma + IR(t)^\gamma)$$

EDK_{50} corresponds to rivaroxaban potency at steady state.

Finally, the response part is materialized by the evaluation of different coagulation assays. K_s and K_D parameters refer to the pharmacodynamics. They correspond to the synthesis and the dissipation rate of the anticoagulant effect. As rivaroxaban inhibits the coagulation, the drug effect should be subtracted to the basal coagulation:

$$K_s = K_{s_0} - \{E_{max} \cdot IR(t)^\gamma / (EDK_{50}^\gamma + IR(t)^\gamma)\}$$

As the maximal effect is the total inhibition of the coagulation, the maximal anticoagulant effect and the basal coagulation have the same value. Finally, the following formula dictated the relation between the coagulation assay values and the pharmacokinetics of rivaroxaban:

$$K_s = K_{s_0} \cdot \left(1 - \frac{IR^\gamma}{EDK_{50}^\gamma + IR^\gamma} \right)$$

The modeling response time profile of rivaroxaban was analyzed with ADAPT v.5 software².

6- *Statistical analysis*

Comparison of age, sterilization status, vital and hemato-biochemical data between the three groups was determined using the appropriate statistical test according to the variables, i.e. Poisson regression (age), Pearson Chi-2 (sterilization status), median test (weight, pulse, lymphocytes, monocytes, basophils, glucose, bilirubin, ALT, ALP, total solids, albumin/globulin ratio), ANOVA (rectal temperature, respiratory rate, hematocrit, platelet count, creatinin, GGT, calcium, phosphorus, sodium and chloride), and logarithmic transformation (with red blood cells, neutrophils, eosinophils, urea, albumin, globulin, potassium, urine specific gravity). In order to observe the influence of the sterilization status on pharmacokinetic and pharmacodynamic data, an ANOVA analysis with both inputs (treatment group, sterilization state) was used. With each coagulation assay, rivaroxaban half-lives were determined from pharmacokinetic parameters with the following formula: $\ln 2/\text{pharmacokinetic parameter value}$. To evaluate the group effect on coagulation, an *a posteriori* test was applied. To determine the duration of action of rivaroxaban's effect, the time to return to baseline for each coagulation assay was used, depending whether the rivaroxaban was administered once or twice. The wilcoxon test compares times to return to baseline between groups 1 and 2. Finally, the inter-individual variability was determined with the standard deviation for each coagulation assay.

IV- Results

1- *Dogs*

The study group consisted of 16 neutered females (6 in the placebo group, 5 in group 1, and 5 in group 2) and 8 intact females (2 in the placebo group, 3 in group 1, and 3 in group 2), ranging from 17 months to 6.5 years of age (mean: 27 months old, median: 2 years old) and weighing 7.5 to 13.1 kg (mean: 10.27 kg, median: 10.5 kg).

There was no significant difference between groups for age, sex, weight, urine and blood test results, except for serum albumin ($p=0.0425$) which was higher in the placebo group, but this difference was not clinically significant (mean serum albumin in the placebo group: 33.7 g/L, mean serum albumin in the rivaroxaban groups: 31.8 g/L).

In placebo group, coagulation assays results didn't significantly varied over time. At baseline, all groups had similar coagulation assays results.

Haematocrit values evaluated with TEG measurement remained within reference range for all dogs of the study.

2- Rivaroxaban oral dose

In groups 1 and 2, dogs received a mean of 1.94 mg/kg per dose of rivaroxaban (median: 1.85, SD: 0.24).

3- Modelisation

By comparing the coagulation assay results with the data predicted by the population model, we confirmed that the model adequately fitted the data, even if it was better for some coagulation assays than others (Figure 2).

4- Pharmacokinetic data

The pharmacokinetic parameters k_a , which were partly determined by the rivaroxaban absorption rate, and KDE , which was partly determined by the rivaroxaban elimination rate, allowed the determination of rivaroxaban half-lives (Table 1). Rivaroxaban output rate was shorter than the input rate. In addition, rivaroxaban elimination was rapid.

For each coagulation assay, there was no significant difference in PK parameters values between spayed and sexually intact dogs with groups 1 and 2 analyzed together ($p>0.05$).

5- Pharmacodynamic data

Group effect, ie. rivaroxaban administration frequency, significantly affected all coagulation assay results compared to the placebo group ($p<0.0001$) except for TEG. EDK_{50} , which refers to the anticoagulant potency of rivaroxaban at steady-state, was evaluated for all the coagulation assays (Table 1). Rivaroxaban was an efficace anticoagulant: affecting all the coagulation assays but with a different sensitivity. Anti-Xa activity, lag time and rate index of TG were the most sensitive assays to reflect the anticoagulant effect, as they were affected by lower rivaroxaban concentrations.

The peak of action, as determined in group 1, appeared 1.5 to 2 hours after the dose (Figure 3).

To determine the duration of action of the anticoagulant effect, the time to return to baseline for each coagulation assay was used in both rivaroxaban administration groups (Figure 4 and Figure 5). The duration of action of the anticoagulant effect varied significantly between group 1 and 2 ($p < 0.01$). The second administration of rivaroxaban prolonged the anticoagulant effect by 8-10 hours, and a twice daily administration of rivaroxaban appeared appropriate to exert a 24 hour anticoagulant effect.

For each coagulation assay, there was no significant difference in EDK_{50} and the duration of action of the anticoagulant effect between spayed and sexually intact dogs with groups 1 and 2 combined ($p > 0.05$).

For the TEG assay, rivaroxaban only significantly affected the R parameter which was longer in rivaroxaban groups compared to placebo group ($p < 0.05$, Figure 6).

During the study, only one dog from group 1 and group 2 did not empty their food bowl (15 hours after the beginning of the study).

6- *Inter-individual variability*

Standard deviations of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters are reported in Table 1. The inter-individual variability for pharmacokinetic parameters is low (Table 1) in contrast to that of the pharmacodynamic parameters (Figure 5). Among pharmacokinetic data, variability in output rate (which includes rivaroxaban elimination) was greater than input rate (which includes drug absorption).

V- Discussion

Results of the study confirmed our hypothesis: rivaroxaban significantly affects all the studied coagulation assays after an oral dose of 2mg/kg, except TEG®. The second oral administration of rivaroxaban had a similar effect as the first, however it significantly prolonged the anticoagulant effect. In the present study, dogs of the group 2 received rivaroxaban twice at 8h interval for practical reason. The pharmacodynamic evaluation of the drug suggested that an oral administration twice a day seems appropriate to exert a 24 hour anticoagulant effect.

As we did not have access to an analytic chemistry laboratory to determine plasmatic rivaroxaban concentrations in each dog, i.e. high-performance liquid chromatography, a pharmacologic model that analyzed the kinetics of rivaroxaban without pharmacokinetic data was used. Although this is not a substitute for a state-of-the-art pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model, the use of such a model performed well given our long observation period, and large number of samples and of subjects in our study.²⁷

In our study, rivaroxaban affected all coagulation assays except TEG®. As suggested by Hemker in his article on the development and the interest of thrombin generation to assess haemostasis, “it is an educated guess that any compound that can inhibit TG for 40-60% is an efficient antithrombotic that does not cause bleeding”³³. In our study, oral rivaroxaban administration caused a 60% reduction of ETP baseline, consolidating the antithrombotic drug efficiency in dogs and its clinical observations (no bleeding).

In this study, the pharmacokinetic profile of rivaroxaban in healthy dogs was predictable as pharmacokinetic parameter variability between dogs was low to moderate (Table 1). The same observation was noted in healthy humans, in which inter-individual variability (CV%) were 52.9% and 17.4% for k_a and KDE , respectively³¹. In sick humans (hip surgery, deep vein thrombosis, atrial fibrillation, acute coronary syndrome), the CV% of KDE remained between 31-40%.³²

In the present study, rivaroxaban was given on an empty stomach to avoid interference between lipemia and coagulation assays²⁹. Although the pharmacokinetic profile was overall predictable, the predictability may have been increased if pill had been administered with food, as observed in humans.³⁰ Rivaroxaban has a limited solubility in water that could produce variability in drug absorption when taken with food (rivaroxaban plasmatic concentration would be increased but delayed). Rivaroxaban is not affected by changes in gastric pH induced by antacids^{30,32}.

In contrast to pharmacokinetics, inter-individual variability of the pharmacodynamic parameters was greater, and so, the pharmacodynamics was less predictable than the pharmacokinetics in healthy dogs. In humans, studies evaluating the pharmacodynamic effect of rivaroxaban showed a predictable dose-dependent effect.³⁵ Although it is claimed that rivaroxaban has a predictable

pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, human studies reporting rivaroxaban's anticoagulant effect over time showed moderate to large inter-individual variability for PT, anti-Xa activity and thrombin generation.^{30,36,37} This inter-individual variability is one of the criteria advanced by some authors to recommend laboratory monitoring in patients receiving oral rivaroxaban.³⁴ Monitoring could help the clinician improve the efficacy and the safety of the medication, or it could be useful in emergency situations (bleeding, urgent surgery, drug interactions...)²⁰ In the light of these observations, we believe that further studies are needed to confirm the claim that the PK/PD responses of rivaroxaban are sufficiently predictable to waive the need for monitoring.

Like in humans²⁰, our study showed that anti-factor Xa activity assay had a higher sensitivity to detect the anticoagulant effect of rivaroxaban as compared to the commonly used PT/aPTT. This information must be taken into account when managing patients. For instance, in case of hemorrhagic events, it is not necessary to use the most sensitive assay to determine rivaroxaban effect as rivaroxaban excess is expected: readily available clotting times could be measured. However, when facing a relapse of thrombosis, the use of anti-factor Xa activity is more appropriate as it is most sensitive to detect anticoagulant effect of rivaroxaban. In humans, PT assay (particularly with STA Neoplastin Plus reagent) may provide qualitative measurements of maximal rivaroxaban concentrations in suspected overdose cases, but it lacks precision at low rivaroxaban concentrations, therefore it is recommended to perform this test at the peak rivaroxaban concentration.^{28,37,40} Anti-factor Xa activity, notably when using specifically rivaroxaban calibrators and controls, is the test of choice to measure a wide range of plasmatic rivaroxaban concentrations, but the interpretation of the value depends on the timing of blood sampling.^{20,28,37,40}

In our study, thrombin generation, particularly lag time and rate index, was more sensitive and had lower inter-individual variability than anti-factor Xa activity to detect anticoagulant activity, but the availability of the test and the lack of standardization limits its use in clinical practice

Rivaroxaban did not exert a significant effect on TEG® parameters, except for *R*, which corresponds to the fibrin rate formation, which in turn is dependent on coagulation factors affected by factor Xa inhibition. Study design (few samples collected per dog and timing of collection) may explain this absence of effect on *K*, *α* and *MA*. In the literature, the evaluation of

rivaroxaban in healthy humans showed significant changes from baseline values in R , K and α (rotational thromboelastography).³⁹ In addition, rivaroxaban-treated patients with stroke had an increased R and K , and reduced MA , α and $LY30$. Moreover, contrary to others parameters, R remained prolonged at 18 hours.³⁸ In the present study, as haematocrit values evaluated with TEG® assays remained within reference range, they don't seem to explain the absence of significant effect of rivaroxaban on TEG®. An inadequate anticoagulant dose doesn't seem to be the cause either as other coagulation assays were affected.

No major adverse effects, i.e. bleeding events, were noticed during the study. For the two dogs from groups 1 and 2 that didn't finish their food bowl, it could be due to environmental stress or an adverse effect of the drug: in humans treated with rivaroxaban for symptomatic thromboembolism, abdominal pain upper, dyspepsia and toothache were reported in 1.7%, 1.3% and 1% of cases respectively.⁴¹

One limitation of the study is the small number of dogs in each group, a larger study is recommended to see if the anticoagulant inter-individual variability persists. The study was done on healthy dogs, so rivaroxaban evaluation in sick dogs is needed to determine its PK/PD profile. Moreover, the study didn't evaluate if there is a cumulative effect over time after a long period administration.

VI- Conclusion

In conclusion, the data of the present study support that rivaroxaban is an efficacious and safe oral anticoagulant in dogs at 2mg/kg/dose. Anti-Xa activity and TG are the most sensitive assays to detect rivaroxaban anticoagulant potency. The duration of action of one rivaroxaban oral administration of 2mg/kg is between 7.9 and 18.6 hours, therefore twice daily administration appears appropriate to exert a 24 hour effect. The pharmacokinetic profile is predictable, but the anticoagulant effect varies among dogs, Coagulation monitoring is recommended to adjust the dose according to the patient. Future studies are needed to evaluate the anticoagulant effect and the safety of rivaroxaban in an extended period and in sick dogs.

VII- Footnotes

- a. Central venous catheterization product set with blue Flextip® catheter, 16G One lumen CVC, 16 cm catheterlength, ES-04306, Arrow® international, Reading, PA, USA.
- b. Dexdomitor®, Pfizer® Animal Health, Madison, NJ, USA.
- c. Antisedan®, Pfizer® Animal Health, Madison, NJ, USA.
- d. Lactose tablets, 100 mg, Odan Laboratories, Montreal, Québec, Canada.
- e. Xarelto®, 20 mg tablets, Bayer, Leverkusen, Germany.
- f. 4.5 mL buffered sodium citrate (9NC) sterile blood collection tube, Becton, Dickinson and Compagny, Franklin Lakes, NJ, USA.
- g. Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Harburg, Germany.
- h. Screw cap Micro Tube 2 mL, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Germany.
- i. 2.7 mL buffered sodium citrate (0.129 M) sterile blood collection tube, Kandall Healthcare Products, Mansfield, MA, USA.
- j. STA-R EVOLUTION®, Diagnostica Stago, Asnière-sur-Seine, France.
- k. Neoplastine® CI Plus, STAGO, Arsenières sur Seine, France.
- l. Dade® Actin® FS Activated PTT Reagent, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, USA.
- m. STA Rotachrom® heparin, Diagnostica Stago, Asnière-sur-Seine, France.
- n. Lyophilized chromogenic substrate CBS 52.44, Diagnostica Stago, Asnière-sur-Seine, France.
- o. STA® - Owren-Koller, Diagnostica Stago, Asnière-sur-Seine, France.
- p. CAT, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands.
- q. Fluo-substrate, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands.
- r. Thrombinoscope™ software, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands.
- s. Fluoroskan Ascent®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.
- t. Immulon 2 HB, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.
- u. PPP-Reagent 5 pM, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands
- v. Thrombin calibrator TS 20.0, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands.
- w. Fluo-buffer, pH 7.35, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands.
- x. Thromboelastograph Hemostasis Analyzer TEG 5000, Haemonetics Corporation, Haemoscope division, Niles, IL, USA.
- y. Dade® Innovin®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, USA.
- z. ADAPT v.5, Biomedical Stimulations Resource, Los Angeles, USA
- z' Gastrointestinal low fat veterinary diet, Royal Canin®, St-Charles, MO, USA

VIII- References

1. Heidi N & Byers CG. Pulmonary thromboembolism. *Compend Contin Educ Vet* 2001;33:E1-7.
2. Laurenson M.P, Hopper K, Herrera M.A, Johnson E.G. Concurrent diseases and conditions in dogs with splenic vein thrombosis. *J Vet Intern Med* 2010;24:1298-1304.
3. Kristensen A.T, Wiinberg B, Jessen L.R et al. Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *J Vet Intern Med* 2008;1:140-147.
4. Kittrell D and Berkwitz L. Hypercoagulability in dogs: pathophysiology. *Compend Contin Educ Vet* 2012;34(4):E1-5.
5. de Laforcade A. Diseases associated with thrombosis. *Top Companion Anim Med* 2012;27(2):59-64.
6. Kavanagh C, Webster CRL. Coagulation in hepatobiliary disease. *J Vet Em Crit Care* 2011;21(6):589-604.
7. Lake-Bakaar GA, Johnson EG, Griffiths LG. Aortic thrombosis in dogs: 31 cases (2000-2010). *JAVMA* 2012;241(7):910-915.
8. Respass M, O'Toole TE, Taeymans O et al. Portal vein thrombosis in 33 dogs: 1998-2011. *J Vet Intern Med* 2012;26:230-237.
9. Kittrell D and Berkwitz L. Hypercoagulability in dogs: treatment. *Compend Contin Educ Vet* 2012;34(5):E1-5.
10. Smith SA. Antithrombotic therapy. *Top Companion Anim Med* 2012;27(2):88-94.
11. Eymen G and Jaffer AK. Thromboprophylaxis in major knee and hip replacement surgery: a review. *J Thromb Thrombolysis* 2012;34:518-525.
12. Turpie AGG, Kreuz R, Llau J et al. Management consensus guidance for the use of rivaroxaban - an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost* 2012;108(5):1-11.
13. McMichael M. New models of hemostasis. *Top Compan An Med* 2012;27:40-45.
14. Weitz J.I. Factor Xa and thrombin as targets for new oral anticoagulants. *Thrombosis research* 2011;127:5-12.
15. Weitz J.I. Factor Xa and thrombin as targets for new oral anticoagulants. *Thrombosis research* 2011;127:5-12.

16. Roehrig S, Straub A, Pohlmann J et al. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((2-(2008)methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Med Chem*;48:5900-5908.
17. Conversy B, Blais MC, Dunn M et al. Rivaroxaban demonstrates in vitro anticoagulant effects in canine plasma. *Vet J* 2013;2:437-443.
18. Samama M, Martiloni J.L, LeFlem L e tal. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban-an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb haemost* 2010;4:815-825.
19. Harenberg J, Krämer R, Giese C et al. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. *J Thromb Thrombolysis* 2011;32:267-271.
20. Douxfils J, Mullier F, Loosen C et al. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thromb Res* 2012;130:956-966.
21. Weinz C, Buetehorn U, Daehler HP et al. Pharmacokinetics of BAY 59-7939 – an oral, direct factor Xa inhibitor – in rats and dogs. *Xenobiotica* 2005;35(9):891-910.
22. Lang D, Freudenberger C and Weinz C. In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs, and humans. *Drug metabolism and disposition* 2009;37:1046-1055.
23. Weinz C, Schwarz T, Kibitza D et al. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug metabolism and disposition* 2009;37:1056-1064.
25. Hemker H.C, Giesen P, Al Dieri R et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.
26. Wiinberg B, Jensen AL, Rojkjaer R et al. Validation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Vet Clin Pathol* 2005;34:389-393.
27. Jacqmin P, Snoeck E, van Schaick EA et al. Modelling response time profiles in the absence of drug concentrations: definition and performance evaluation of the K-PD model. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 2007;34:57-85.
28. Palareti G, Ageno W, Ferrari A et al. Clinical management of rivaroxaban-treated patients. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14:655-667.

29. Lippi G, Plebani M, Favalaro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:258-266.
30. Kubitzka D, Becka M, Zuehlsdorf M et al. Effect of food, an antacid, and the H₂ antagonist ranitidine on the absorption of BAY 59-7939 (rivaroxaban), an oral, direct factor Xa inhibitor, in healthy subjects. *J Clin Pharm* 2006;46:549-558.
31. Mueck W, Becka M, Kubitzka D et al. Population model of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007;45:335-344.
32. Mueck W, Schwers S, Stampfuss J. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring. *Thromb J* 2013;11:10.
33. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2008;6:219-226.
34. Mismetti P, Laporte S. New oral antithrombotics: a need for laboratory monitoring. *For. J Thromb Haemost* 2010;8:621-626.
35. Kreutz R. Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. *Fundam Clin Pharmacol* 2012;26:27-32.
36. Freyburger G, Macouillard G, Labrousse S et al. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thromb Res* 2011; 127: 457-465.
37. Mani H, Kasper A, Lindhoff-Last E. Measuring the anticoagulant effects of target specific oral anticoagulants-reasons, methods and current limitations. *J Thromb Thrombolysis* 2013;36:187-194.
38. Bowry R, Fraser S, Archeval-Lao JM et al. Thromboelastography detects the anticoagulant effect of rivaroxaban in patients with stroke. *Stroke* 2014;3:883-883.
39. Casutt M, Konrad C, Schuepfer G. Effect of rivaroxaban on blood coagulation using the viscoelastic coagulation ROTEMTM. *Anaesthesist* 2012;61:948-953.
40. Samama MM, Contant G, Spiro TE et al. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. *Thrombosis J* 2013;11:11
41. Romualdi E, Donadini MP, Ageno W. Oral rivaroxaban after symptomatic venous thromboembolism: the continued treatment study (EINSTEIN-extension study). *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011;9(7):841-844.

IX- Tables and figures to accompany the article

	PT	aPTT	OD (anti-X activity)	Thrombin generation				
				Lag	Peak	TTpeak	ETP	Rate index
Input half-life (mean) SD as CV%	1.7 h ± 6.6 %	1.8 h ± 9.7 %	1.5 h ± 0.6 %	1 h ± 48.5 %	2.7 h ± 0.7 %	1 h ± 33%	2.6 h ± 4.7 %	2.6 h ± 18.6 %
Output half-life (mean) SD as CV%	0.3 h ± 68 %	0.3 h ± 124 %	0.4 h ± 0.8 %	0.5 h ± 6 %	0.35 h ± 4 %	0.6 h ± 75%	0.4 h ± 22.6 %	0.4 h ± 35.8 %
EDK_{50} (mean; mg/h) SD as CV%	0.96 ± 85.6 %	1.18 ± 71.6 %	0.039 ± 97 %	0.028 ± 69.8 %	0.092 ± 57.3 %	0.041 ± 4.8 %	0.27 ± 68.8 %	0.036 ± 58.7 %

Table 1: Determination of rivaroxaban input and output half-lives, and its anticoagulant potency at steady-state (EDK_{50}) with different coagulation assays in healthy dogs after an oral dose.

Input (partly determined by absorption) and output half-lives (partly determined by elimination) were respectively calculated from k_a and KDE values from groups 1 and 2 combined.

SD: standard deviation, CV, coefficient of variation, OD: optical density

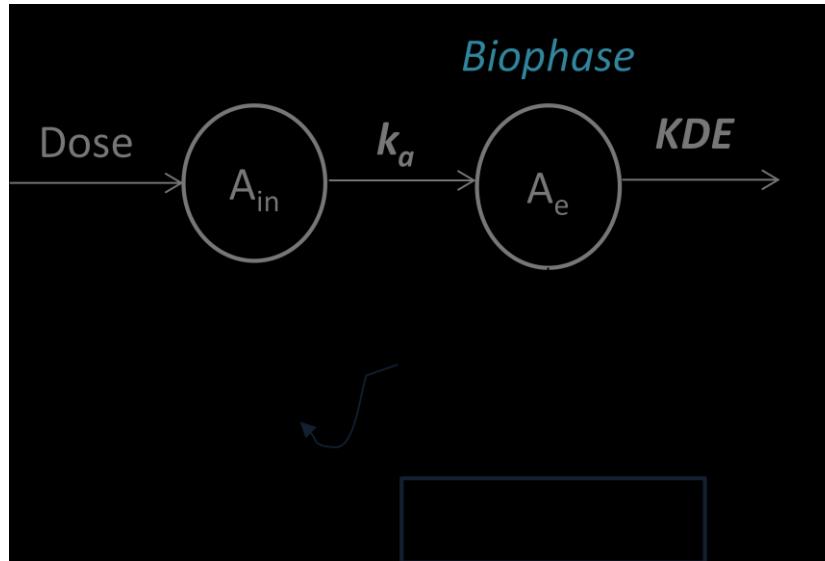


Figure 1: Schematic representation of the K-PD model used to evaluate the anticoagulant effect in healthy dogs after oral rivaroxaban administration.

A_{in} (mg): amount of rivaroxaban in intestine

A_e (mg): amount of rivaroxaban at equilibrium

IR (mg/h): virtual infusion rate of rivaroxaban

k_a (h^{-1}): rivaroxaban input rate to the biophase

KDE (h^{-1}): rivaroxaban output rate from the biophase

K_s (nM/h): zero-order coagulation generation rate

Ks_0 (nM/h): basal coagulation generation rate

K_D (h^{-1}): first order coagulation dissipation rate

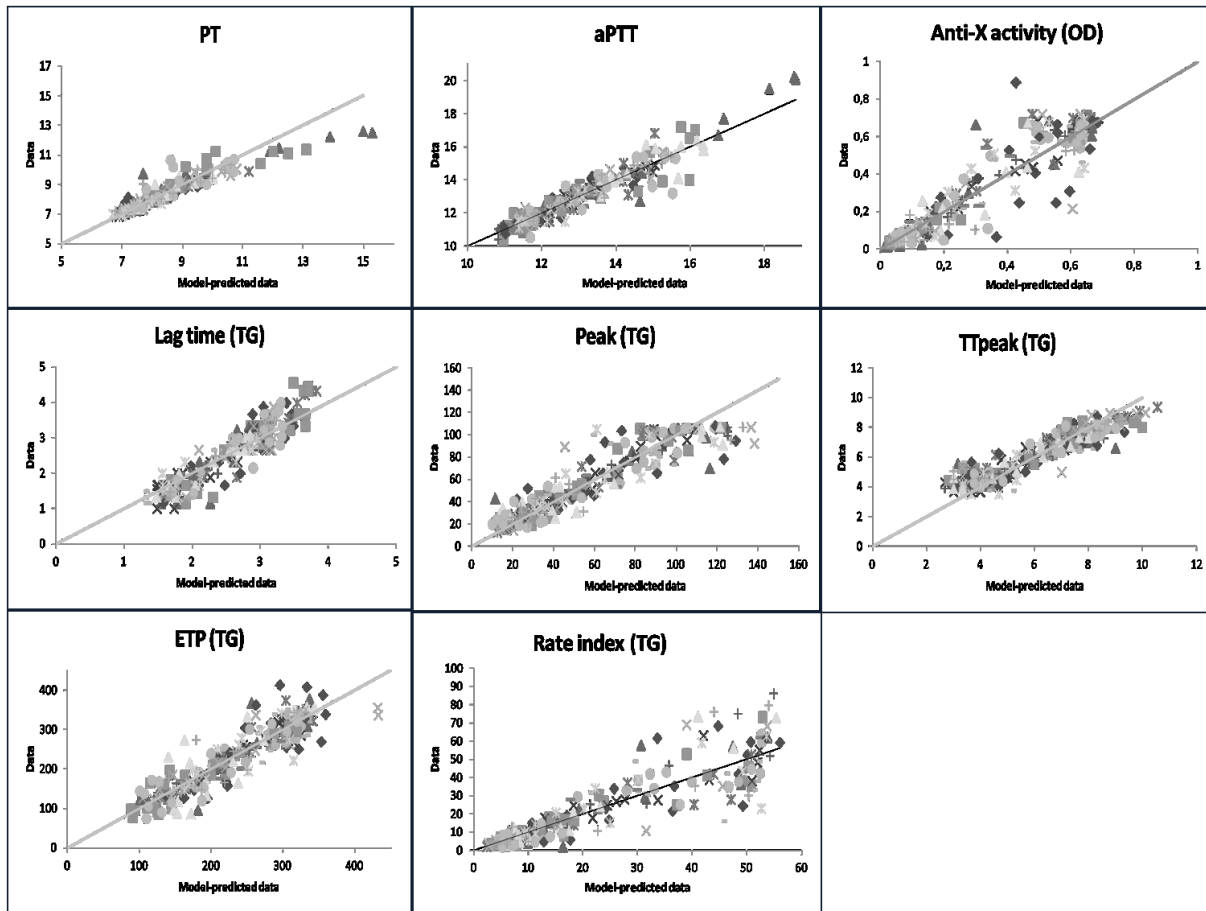


Figure 2: Comparison of coagulation assay results of each dog from groups 1 and 2 with model-predicted data for oral rivaroxaban evaluation in healthy dogs.

Each symbol materializes one dog from group 1 and 2 (n=16).

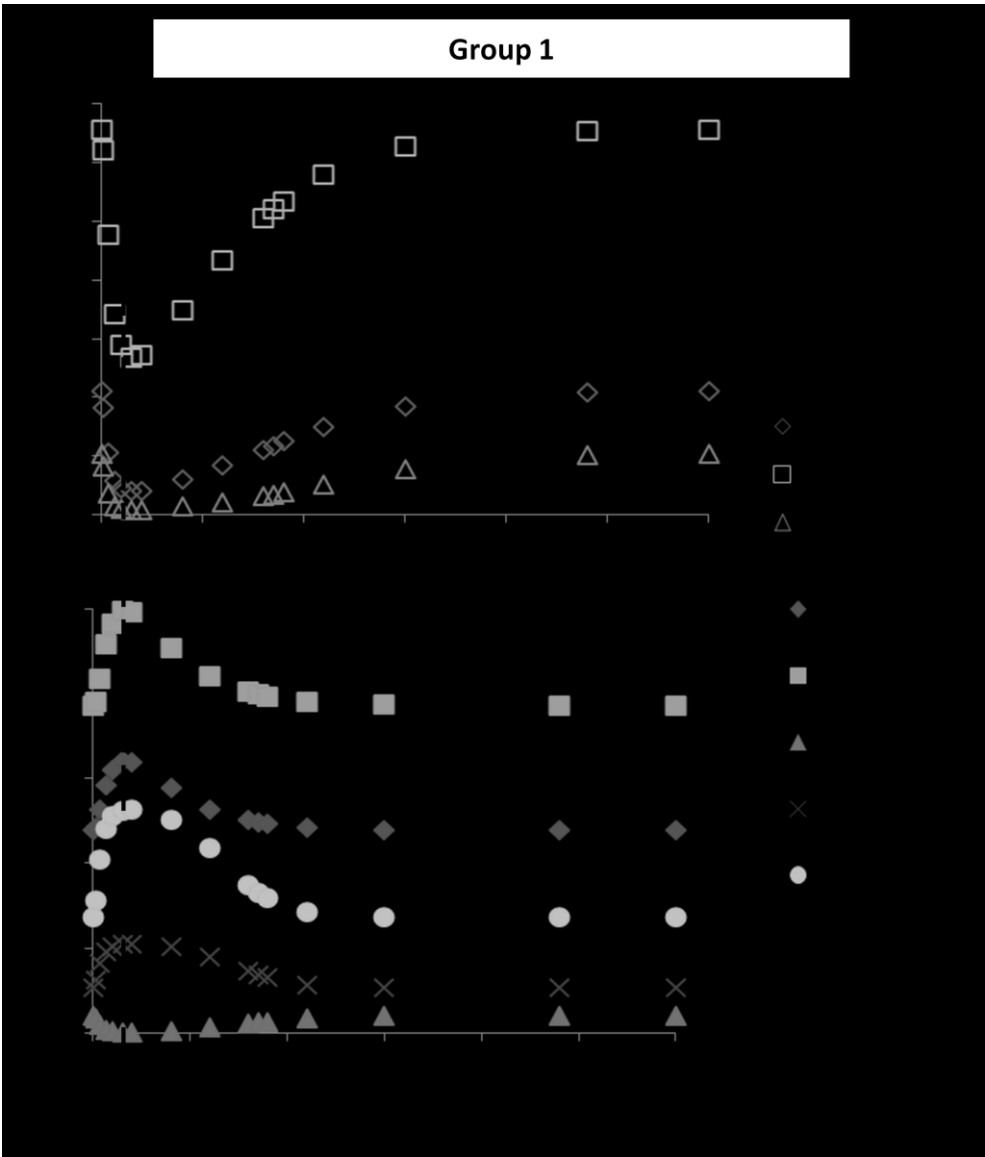


Figure 3: Model-predicted coagulation assay values over time for dogs in group 1 (n=8). The dashed line represents rivaroxaban peak of action.

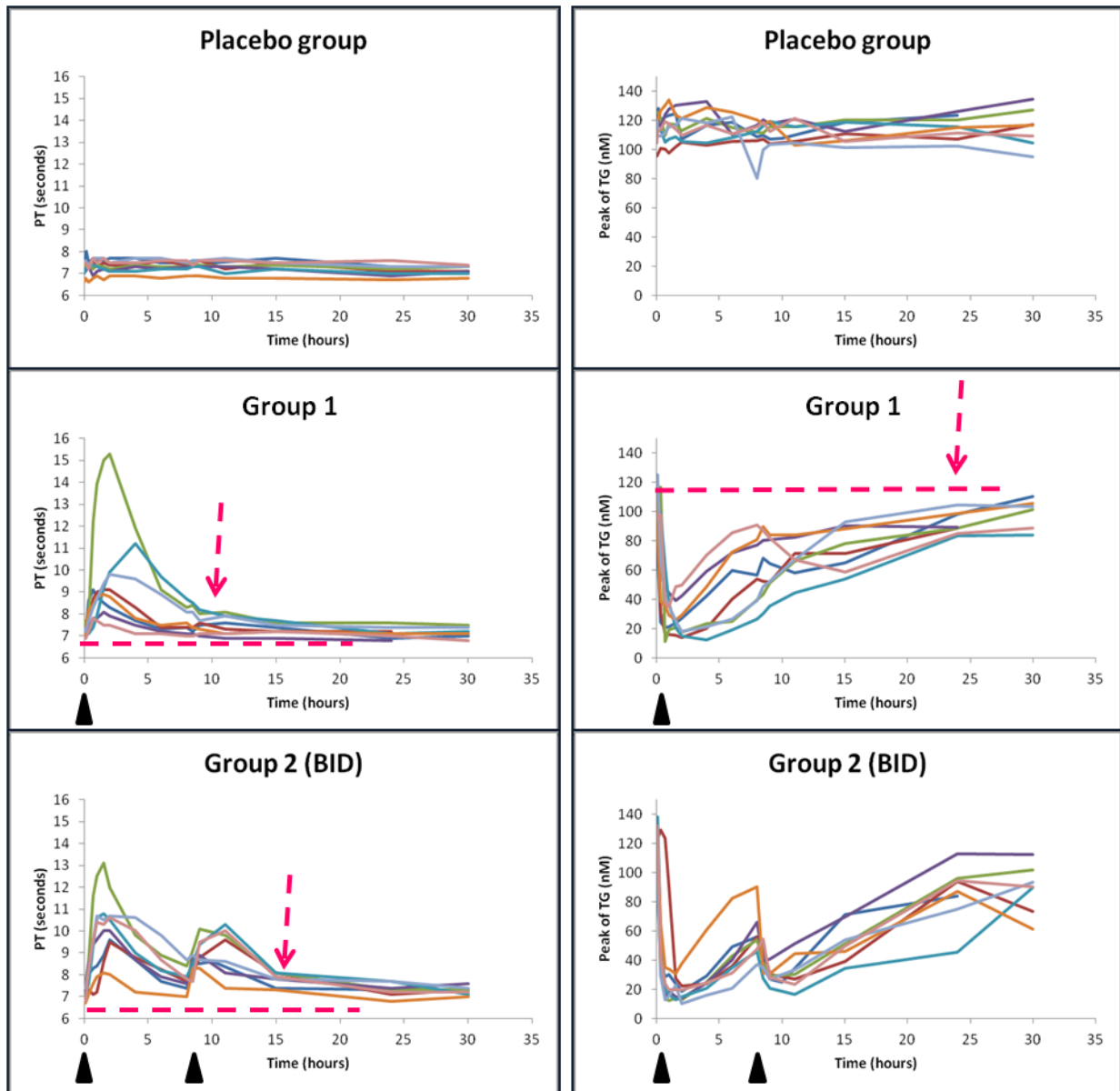


Figure 4: Rivaroxaban anticoagulant effect duration determination, by evaluating time to return to baseline in groups 1(n=8) and 2 (n=8).

Example for PT and Peak of TG assays. Arrowheads represent the oral administration of 20 mg of rivaroxaban. Dashed arrows represent the return to baseline of the coagulation assay.

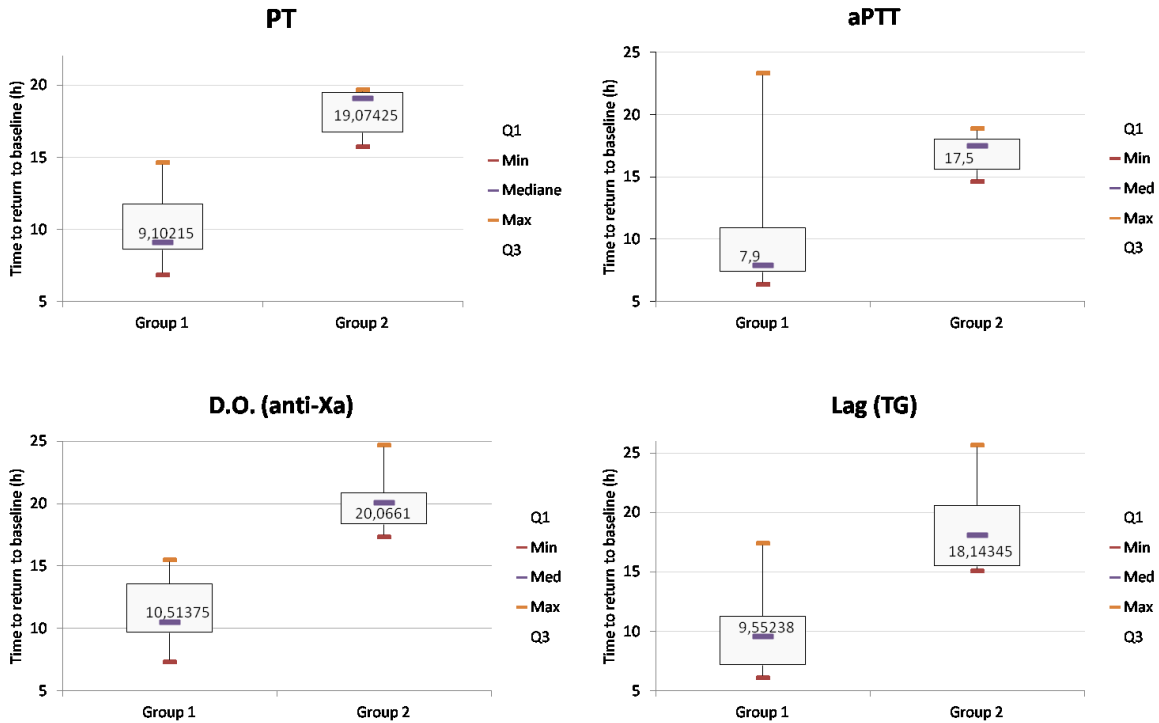


Figure 5: Rivaroxaban duration of action determination by evaluating time to return to baseline of coagulation assay values in groups 1 and 2. Results are expressed by median (IQR). Example of PT, aPTT, anti-Xa and lag of TG assays.

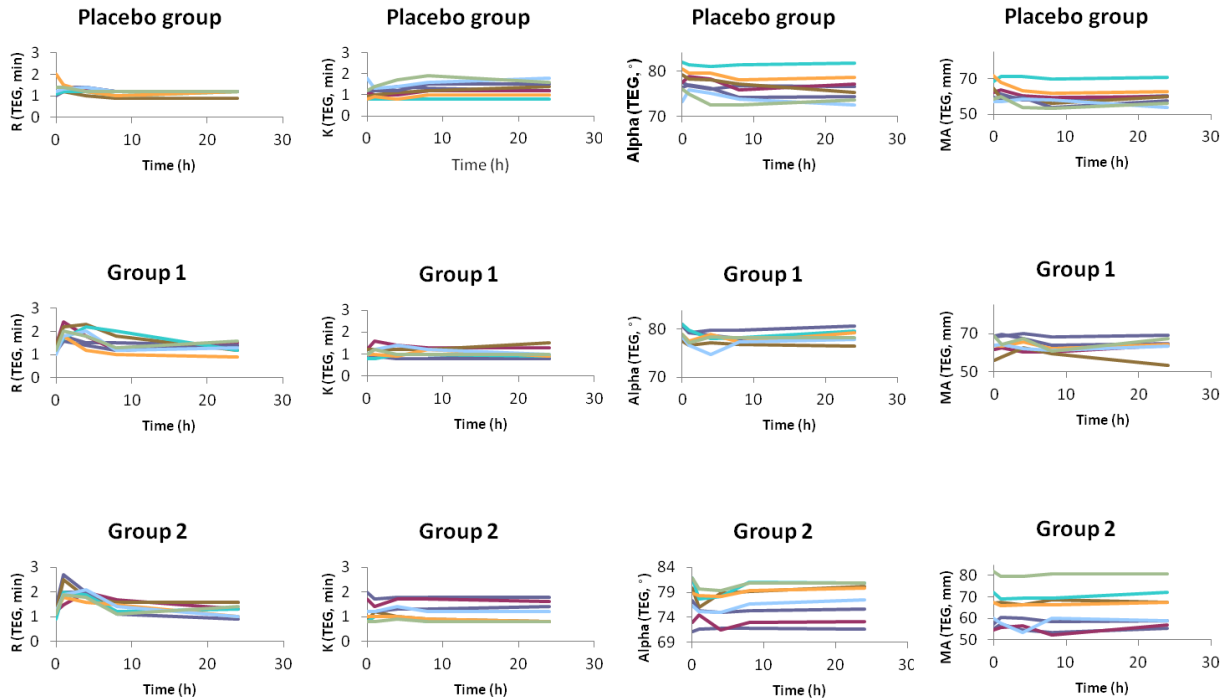


Figure 6: Oral rivaroxaban effects on TEG® parameters in healthy dogs.

Group 1 (n=8): dogs received 20 mg rivaroxaban once.

Group 2 (n=8): dogs received 20 mg rivaroxaban twice at 8 hours interval.

R (min) parameter refers to the period from the start of the assay until the first fibrin polymers amplitude reaches 2 mm.

K(min) refers to the time from the end of *R* period until the blood clotamplitude reaches 20 mm.

A (°) refers to the angle between the midline and the tangent to the curve drawn from the end of *K*.

MA (mm) is the maximal amplitude between the both diverging branches.

DISCUSSION

L'évaluation du rivaroxaban dans l'espèce canine s'est faite en deux étapes. L'étude *in vitro* sur du plasma de chien était préliminaire et indispensable pour des raisons éthiques afin de confirmer l'effet anticoagulant avant la réalisation d'une étude clinique. En comparant les données de l'étude et celle de la littérature humaine (tableau 2 de l'article 1), on se rend compte que la concentration en rivaroxaban nécessaire pour doubler la valeur de base du patient est plus élevée chez le chien. Cette observation peut être due à la structure tri-dimensionnelle du facteur X canin rendant le site de liaison de l'anticoagulant moins disponible. Les doses de rivaroxaban à administrer chez le chien pour obtenir un effet anticoagulant semblent donc plus élevées que celles administrées à l'humain. L'étude clinique a permis de dégager plusieurs informations importantes quant à l'utilisation du rivaroxaban chez le chien : la dose de 2 mg/kg deux fois par jour apparaît sécuritaire et efficace. En effet, aucun effet secondaire majeur n'a été noté durant l'étude, et le dosage utilisé était adéquat pour exercer un bon effet anticoagulant, en causant une diminution de 60 % de la valeur basale de l'ETP (Hemker, 2008). Le pic d'activité anticoagulante de la molécule se situe 2 heures après une administration à jeun. Les tests de coagulation PT, aPTT, activité anti-facteur X et GT reflètent l'activité anticoagulante du rivaroxaban. *In vitro*, ces tests sont affectés de façon concentration-dépendante. Ils peuvent donc être utilisés dans le suivi de coagulation d'un chien traité avec le rivaroxaban.

Le modèle pharmacologique que nous avons développé a permis de mettre en évidence que la pharmacocinétique du rivaroxaban chez les chiens en santé est prévisible avec une variabilité inter-individuelle faible à modérée. Cela a également été observé en médecine humaine chez des patients sains et malades (Mueck, Becka, Kubitz, Voith, & Zuehlsdorf, 2007; Mueck, Schwers, et al., 2013). Dans notre étude, le comprimé de rivaroxaban a été administré à jeun. Chez l'humain, l'administration de la médication avec de la nourriture améliore son absorption, mais retarde l'apparition du pic de la concentration plasmatique d'1h15. En administrant le médicament avec un repas, on peut donc espérer diminuer davantage la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique chez le chien (Kubitz et al., 2006). Toutefois, le pic d'action de l'anticoagulant, évalué à 2h après l'administration du comprimé dans notre étude, devra être redéfini.

Contrairement à la pharmacocinétique, la pharmacodynamie du rivaroxaban chez le chien est moins prévisible, la variabilité inter-individuelle étant modérée à importante. En médecine humaine, un des points attrayants de l'utilisation du rivaroxaban est que son profil PKPD est prévisible et qu'aucun suivi de coagulation n'est nécessaire, sauf dans des contextes particuliers, tels que la nécessité d'une chirurgie d'urgence, l'apparition de saignements, une rechute de thrombose chez un patient traité ou un suivi de l'observance médicamenteuse chez un patient psychiatrique (Mani, Kasper, & Lindhoff-Last, 2013). Il a

été conclu en médecine humaine que la pharmacodynamie du rivaroxaban est prévisible car l'effet anticoagulant est dose-dépendant (Mueck, Schwers, et al., 2013). Toutefois, les études rapportant l'effet anticoagulant en fonction du temps chez des humains en santé ou malades montrent que la variabilité inter-individuelle est modérée à importante, comme dans notre étude (Freyburger, Macouillard, Labrouche, & Sztark, 2011; Kubitzka et al., 2006; Mani et al., 2013). Pour cette raison, et parce que certaines conditions comme l'insuffisance rénale et hépatique, ou encore l'administration de certains médicaments, peuvent modifier le profil PKPD du rivaroxaban, certains auteurs recommandent un suivi de coagulation (Mismetti & Laporte, 2010). Ainsi, basé sur notre évaluation clinique chez le chien, l'absence de données chez des chiens malades, et les données issues d'études humaines (évaluation de l'effet du rivaroxaban en fonction du temps), nous pensons que d'autres études sont nécessaires afin de confirmer l'affirmation selon laquelle la PKPD du rivaroxaban est suffisamment prévisible pour renoncer à un suivi de coagulation chez les patients traités.

Bien que l'examen clinique et les analyses sanguines et urinaires ne montraient pas d'anomalie sur les chiens de notre étude, les causes pouvant expliquer cette variabilité inter-individuelle de l'effet anticoagulant du rivaroxaban sont : la concentration en protéines sériques (le rivaroxaban est fortement lié aux protéines), une cause sous-jacente pouvant affecter la coagulation (cathéter intra-veineux, néoplasme ou désordre métabolique débutant), la configuration tri-dimensionnelle du facteur X, et, bien que minimisés au maximum, des considérations pré-analytiques, telles que le stockage de l'échantillon, la proportion sang/anticoagulant, l'hémolyse, la stase sanguine suivant la collection de l'échantillon sanguin (Doux fils et al., 2012; Lippi et al., 2006; Lippi, Salvagno, Montagnana, & Guidi, 2005).

Face à cette variabilité inter-individuelle de la pharmacodynamie du rivaroxaban chez le chien, un suivi de coagulation semble indiqué afin de déterminer si la dose administrée est suffisante pour exercer une anti-coagulation, ou à l'inverse, pour s'assurer qu'il n'y a pas de sur-traitement. La phase *in vitro* de notre étude a montré que les tests de coagulation variaient de façon concentration-dépendante. On peut donc prédire que le pic d'action du rivaroxaban a lieu au moment où la concentration plasmatique du médicament est au plus haut.

D'après l'analyse de nos résultats, dans les 2 phases de notre projet de recherche, la génération de thrombine et l'activité anti-facteur X sont les tests de coagulation les plus sensibles pour détecter un effet anticoagulant. Cela est également observé en médecine humaine (Doux fils et al., 2012). Toutefois, la précision des résultats de ces tests est moindre dans l'étude clinique comparativement à la phase *in vitro*, en raison de la grande variabilité inter-individuelle. Par ailleurs, la précision des temps de coagulation (PT et aPTT) reste dans le même ordre de grandeur que celle de l'activité anti-facteur X et de la GT, mais leur sensibilité à détecter l'effet anticoagulant est moins bonne (détermination de l' EDK_{50}). Ce critère est à

considérer pour un usage clinique. En effet, lors d'un suivi de coagulation, plusieurs paramètres sont importants à prendre en compte : le moment du prélèvement sanguin par rapport à l'administration du médicament et à la valeur de base, la sensibilité et la précision du test de coagulation, l'information donnée par le test et le contexte d'évaluation (Doux fils et al., 2012; Mani et al., 2013; Samama et al., 2013).

Les temps de coagulation PT et aPTT sont les tests les moins sensibles mais les plus facilement accessibles en médecine vétérinaire. On a pu noter dans notre étude, au pic d'action du rivaroxaban, une prolongation de la valeur de base du PT et de l'aPTT par un facteur d'environ 1,3. Etant donné que le PT est plus sensible que l'aPTT, il est envisageable de considérer que son évaluation seule est appropriée pour confirmer l'effet anticoagulant du médicament. L'activité anti-facteur Xa est idéalement le test de choix pour déterminer indirectement la portion de facteur X inactive. Dans notre étude, au pic d'action du rivaroxaban, on a mis en évidence une diminution par environ 0.075 la valeur de base de la densité optique. Nous avons rapporté la densité optique du test, car nous ne disposons pas des calibrateurs et des contrôles spécifiques au rivaroxaban. En effet, il existe depuis peu un kit commercial fournissant ces réactifs spécifiques au rivaroxaban et dont le résultat exprimé est une concentration plasmatique de médicament (le test utilise une courbe de calibration convertissant la densité optique en une concentration plasmatique). Il serait intéressant de déterminer la correspondance entre les densités optiques obtenues dans notre étude et les concentrations plasmatiques de rivaroxaban afin de définir un intervalle thérapeutique cible au pic d'action du médicament, d'autant plus qu'il a été montré en médecine humaine que ce test est sensible, précis et montre une faible variabilité entre les laboratoires (Samama et al., 2013). En revanche, la détermination d'une concentration plasmatique ne détermine en rien l'activité de l'anticoagulant, elle permet seulement d'estimer si un risque de sur- ou de sous-traitement est possible chez le patient en question. Le test de GT est le plus sensible de tous mais sa disponibilité rend son utilisation peu pratique pour dégager des lignes de recommandations cliniques.

Basé sur nos résultats, la facilité d'accès des tests de laboratoire, et des indications actuelles en médecine humaine (Mani et al., 2013; Palareti et al., 2013; Samama et al., 2013), les recommandations suivantes peuvent être proposées pour le suivi d'un chien traité avec du rivaroxaban :

*Chien chez qui on **initie** le traitement à base de rivaroxaban*

Considérant la faible sensibilité des temps de coagulation, la prolongation du PT (par 1.5 la valeur basale) au pic d'action du rivaroxaban (2h après l'administration) confirme la bonne observance de la médication. Une absence de prolongation peut traduire une mauvaise observance du médicament, ou bien l'insensibilité du test à refléter l'activité de l'anticoagulant. Pour préciser la puissance anticoagulante de la dose de rivaroxaban administrée, la mesure de l'activité anti-facteur Xa serait indiquée.

La détermination des valeurs cibles attendues des tests de coagulation au pic d'action du rivaroxaban ne peut être définie avec précision à partir de notre étude en raison de la grande variabilité inter-individuelle observée. La détermination d'intervalles de confiance définis à partir d'un échantillon canin plus important serait idéal pour améliorer la précision.

*Chien recevant un traitement à base rivaroxaban présenté avec une **rechute de thrombose***

Au pic d'action du médicament, une prolongation du PT confirme l'activité anticoagulante du rivaroxaban et laisse suggérer qu'un autre anticoagulant ou qu'un anti-agrégant plaquettaire doit être ajouté (en raison de la rechute de thrombose). En cas d'absence de prolongation du PT, peuvent être suspectés : une observance inadéquate du traitement, une activité sous-thérapeutique du médicament, une insensibilité du PT à détecter l'effet anticoagulant adéquat du rivaroxaban. Dans ce cas, la mesure de l'activité anti-facteur Xa pourra aider le praticien à décider si la dose de rivaroxaban doit être augmentée.

La prolongation du PT juste avant la prochaine administration (i.e. au creux d'activité du rivaroxaban) montre la persistance de l'activité anticoagulante du médicament, suggérant l'ajout d'un autre anticoagulant/anti-agrégant plaquettaire (face à la rechute de thrombose). L'absence de prolongation du PT ne permet pas de conclure. La mesure de l'activité anti-facteur Xa permettrait de voir si une anticoagulation induite par le rivaroxaban est toujours présente ou non.

*Chien sous traitement à base de rivaroxaban présenté avec des **saignements***

Au pic d'action du rivaroxaban, une absence de prolongation du PT peut refléter l'insensibilité du test à détecter l'effet anticoagulant du rivaroxaban, ou bien que le médicament n'est pas la cause des signes cliniques. Si le PT est prolongé, l'administration du médicament devrait être cessée en raison de sa possible implication clinique, car le PT présente dans notre étude une sensibilité relativement faible à détecter l'effet anticoagulant du rivaroxaban. La mesure de l'activité anti-facteur Xa permettrait de déterminer la concentration plasmatique du médicament : si celle-ci n'est pas augmentée, il y a peu de chance que le rivaroxaban soit en cause dans les saignements observés car le test est très sensible, et une autre raison devrait être recherchée.

Au creux d'activité du rivaroxaban, la prolongation du PT traduit une probable surdose de l'anticoagulant, nécessitant l'arrêt du traitement. Une absence de prolongation du PT ne permet pas de conclure quant à l'implication du rivaroxaban. La mesure de l'activité anti-facteur X est recommandée.

Surprenamment, l'évaluation de l'activité anticoagulante du rivaroxaban par la thromboélastographie n'a pas été concluante dans notre étude. Le faible nombre d'échantillons soumis à des temps relativement éloignés est probablement la cause de cet absence d'effet, car chez l'humain, la TEG® est un test de

coagulation dynamique efficace pour détecter l'effet anticoagulant du rivaroxaban (Bowry et al., 2014). Toutefois, bien que minimisé dans le protocole d'étude, d'autres conditions pré-analytiques, telles que la température de l'échantillon avant son analyse, et le délai entre la collection de l'échantillon et l'analyse, peuvent expliquer l'absence d'effet observé (Kol & Borjesson, 2010). Tel que réalisé dans notre étude, un prélèvement sanguin issu d'un cathéter veineux central représente un échantillon adéquat pour l'interprétation du résultat de TEG (Walker et al., 2012).

Suite aux connaissances acquises par le biais de notre recherche et des données tirées de la littérature humaine, il serait intéressant d'évaluer l'effet du rivaroxaban chez des chiens ayant certaines maladies pouvant affecter le métabolisme de l'anticoagulant (insuffisance rénale, hépatique, traitement concomitant), chez des chiens malades dans un état thrombotique, et dans le traitement des thromboses. De plus, bien qu'aucun saignement n'ait été constaté durant l'étude réalisée, il serait intéressant d'évaluer l'effet du rivaroxaban sur une période prolongée afin de déterminer si un effet cumulatif est possible. L'inclusion d'un plus grand nombre de chiens permettrait également d'évaluer plus précisément l'indidence d'effets adverses mineurs et/ou majeurs.

CONCLUSION

Notre projet d'étude a permis de confirmer l'efficacité *in vitro* puis *in vivo* du rivaroxaban comme anticoagulant oral chez le chien. Les tests de coagulation évalués dans l'étude *in vitro* ont montré un effet concentration dépendant. A la dose de 2 mg/kg, aucun effet secondaire n'a été noté. En comparant notre étude *in vitro* avec l'étude clinique, on a pu noter que les mêmes tests de coagulation (l'activité anti-facteur Xa et la GT) étaient les plus sensibles à détecter un effet anticoagulant. La pharmacocinétique du rivaroxaban chez le chien est prévisible contrairement à sa pharmacodynamique où une variabilité inter-individuelle modérée à marquée est observée. C'est pourquoi, un suivi de coagulation semble nécessaire pour s'assurer de l'efficacité du traitement et de l'absence de surdosage chez les patients traités. Bien que peu sensible, les temps de coagulation trouvent tout de même une utilité clinique, en particulier dans les cas de rechute de thrombose ou de saignement chez les patients traités.

Le rivaroxaban représente alors une alternative thérapeutique à l'arsenal anticoagulant actuellement disponible.

Ceci dit, d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'efficacité du rivaroxaban chez des chiens malades, et préciser les intervalles de références des résultats de tests de coagulation au pic d'action du rivaroxaban pour améliorer le suivi clinique.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdullah, R. (1988). Hemostatic abnormalities in nephrotic syndrome. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 18(1), 105-113.
- Al Dieri, R., de Laat, B., & Hemker, H. C. (2012). Thrombin generation: what have we learned? *Blood Reviews*, 26(5), 197-203. doi: 10.1016/j.blre.2012.06.001
- Alcott, C., Wong, D. M., Brockus, C., & Sponseller, B. (2009). Hemostasis. *Compendium Equine*, 4(2), 78-89.
- Allegret, V., Dunn, M., & Bedard, C. (2011). Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Vet Clin Pathol*, 40(1), 24-31. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00282.x
- Andreasen, E. B., Tranholm, M., Wiinberg, B., Markussen, B., & Kristensen, A. T. (2012). Haemostatic alterations in a group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54, 3. doi: 10.1186/1751-0147-54-3
- Angelos, M. G., & Hamilton, G. C. (1986). Coagulation studies: prothrombin time, partial thromboplastin time, bleeding time. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 4(1), 95-113.
- Asmis, L. M., Alberio, L., Angelillo-Scherrer, A., Korte, W., Mendez, A., Reber, G., . . . Wuillemin, W. A. (2012). Rivaroxaban: Quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests: a study in 9 Swiss laboratories. *Thrombosis Research*, 129(4), 492-498. doi: 10.1016/j.thromres.2011.06.031
- Atkinson, A. J., Jr., Ruo, T. I., & Frederiksen, M. C. (1991). Physiological basis of multicompartmental models of drug distribution. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(3), 96-101.
- Babski, D. M., Brainard, B. M., Ralph, A. G., Pittman, J. R., & Koenig, A. (2012). Sonoclot(R) evaluation of single- and multiple-dose subcutaneous unfractionated heparin therapy in healthy adult dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), 631-638. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00907.x
- Balant, L. P., & Gex-Fabry, M. (1990). Physiological pharmacokinetic modelling. *Xenobiotica*, 20(11), 1241-1257. doi: 10.3109/00498259009046841
- Barr, J. W., & McMichael, M. (2012). Inherited disorders of hemostasis in dogs and cats. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 53-58. doi: 10.1053/j.tcam.2012.07.006
- Bauer, N., Eralp, O., & Moritz, A. (2009). Reference intervals and method optimization for variables reflecting hypocoagulatory and hypercoagulatory states in dogs using the STA Compact automated analyzer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(6), 803-814.
- Bauer, N. B., Er, E., & Moritz, A. (2011). Influence of blood collection technique on platelet function and coagulation variables in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 72(1), 64-72. doi: 10.2460/ajvr.72.1.64
- Bauer, N. B., Eralp, O., & Moritz, A. (2010). Effect of hemolysis on canine kaolin-activated thromboelastography values and ADVIA 2120 platelet activation indices. *Vet Clin Pathol*, 39(2), 180-189. doi: 10.1111/j.1939-165X.2010.00224.x
- Blann, A. D., & Dunmore, S. (2011). Arterial and venous thrombosis in cancer patients. *Cardiol Res Pract*, 2011, 394740. doi: 10.4061/2011/394740
- Bliss, S. P., Bliss, S. K., & Harvey, H. J. (2002). Use of recombinant tissue-plasminogen activator in a dog with chylothorax secondary to catheter-associated thrombosis of the cranial vena cava. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(5), 431-435.
- Bockenstedt, P. (2003). D-dimer in venous thromboembolism. *New England Journal of Medicine*, 349(13), 1203-1204. doi: 10.1056/NEJMp030084
- Boudreaux, M. K. (2010). Platelet structure (*Schalm's Veterinary Hematology (6th Edition)*) (p. 561-568). Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell.
- Boudreaux, M. K., & Catalfamo, J. L. (2010). Platelet biochemistry, signal transduction, and function (*Schalm's Veterinary Hematology (6th Edition)*) (p. 569-575). Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell.

- Bowbrick, V. A., Mikhailidis, D. P., & Stansby, G. (2003). Influence of platelet count and activity on thromboelastography parameters. *Platelets*, *14*(4), 219-224. doi: 10.1080/0953710031000118849
- Bowry, R., Fraser, S., Archeval-Lao, J. M., Parker, S. A., Cai, C., Rahbar, M. H., & Grotta, J. C. (2014). Thrombelastography detects the anticoagulant effect of rivaroxaban in patients with stroke. *Stroke*, *45*(3), 880-883. doi: 10.1161/strokeaha.113.004016
- Brainard, B. M., Abed, J. M., & Koenig, A. (2011). The effects of cytochalasin D and abciximab on hemostasis in canine whole blood assessed by thromboelastography and the PFA-100(R) platelet function analyzer system. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*(4), 698-703. doi: 10.1177/1040638711407898
- Brainard, B. M., & Brown, A. J. (2011). Defects in coagulation encountered in small animal critical care. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, *41*(4), 783-803, vii. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.04.001
- Brainard, B. M., Kleine, S. A., Papich, M. G., & Budsberg, S. C. (2010). Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of clopidogrel and the carboxylic acid metabolite SR 26334 in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, *71*(7), 822-830. doi: 10.2460/ajvr.71.7.822
- Brainard, B. M., Meredith, C. P., Callan, M. B., Budsberg, S. C., Shofer, F. S., Driessen, B., & Otto, C. M. (2007). Changes in platelet function, hemostasis, and prostaglandin expression after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs with various cyclooxygenase selectivities in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, *68*(3), 251-257. doi: 10.2460/ajvr.68.3.251
- Breuhl, E. L., Moore, G., Brooks, M. B., & Scott-Moncrieff, J. C. (2009). A prospective study of unfractionated heparin therapy in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Animal Hospital Association*, *45*(3), 125-133.
- Brooks, M. B. (2004). Evaluation of a chromogenic assay to measure the factor Xa inhibitory activity of unfractionated heparin in canine plasma. *Vet Clin Pathol*, *33*(4), 208-214.
- Brooks, M. B. (2010). Hereditary coagulopathies (*Schalm's Veterinary Hematology* (p. 661-667). Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell.
- Brotman, D. J., Girod, J. P., Posch, A., Jani, J. T., Patel, J. V., Gupta, M., . . . Kickler, T. S. (2006). Effects of short-term glucocorticoids on hemostatic factors in healthy volunteers. *Thrombosis Research*, *118*(2), 247-252. doi: 10.1016/j.thromres.2005.06.006
- Bruno, R., Baille, P., Retout, S., Vivier, N., Veyrat-Follet, C., Sanderink, G. J., . . . Antman, E. M. (2003). Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of enoxaparin in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *56*(4), 407-414.
- Burton, M. E., Shaw, L.E., Schentag, J.J., Evans, W.E. (2006). *Applied pharmacokinetics and pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring*. (4th^e éd.). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Carr, A. P., Panciera, D. L., & Kidd, L. (2002). Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *16*(5), 504-509.
- Casutt, M., Konrad, C., & Schuepfer, G. (2012). Effect of rivaroxaban on blood coagulation using the viscoelastic coagulation test ROTEM. *Anaesthetist*, *61*(11), 948-953. doi: 10.1007/s00101-012-2091-4
- Charland, C., Thorneloe, C., & Dunn, M. (2006). L'utilisation d'héprine de faible poids moléculaire chez 6 chiens. *Méd Vét du Québec*, *36*(86).

- Cheng, T., Mathews, K. A., Abrams-Ogg, A. C. G., & Wood, D. (2011). The link between inflammation and coagulation: influence on the interpretation of diagnostic laboratory tests. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 33(2), 1-12.
- Choppin, A., Irwin, I., Lach, L., McDonald, M. G., Rettie, A. E., Shao, L., . . . Druzgala, P. (2009). Effect of tecarfarin, a novel vitamin K epoxide reductase inhibitor, on coagulation in beagle dogs. *British Journal of Pharmacology*, 158(6), 1536-1547. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00420.x
- Christopher, M. M. (1995). Hematologic complications of diabetes mellitus. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 25(3), 625-637.
- Cimmino, G., & Golino, P. (2013). Platelet Biology and Receptor Pathways. *J Cardiovasc Transl Res*. doi: 10.1007/s12265-012-9445-9
- Compagny, B. (2013). Xarelto® (comprimés de rivaroxaban) de Bayer maintenant approuvé au Canada pour le traitement de la thromboembolie veineuse et la prévention de la thrombose veineuse profonde et de l'embolie pulmonaire récurrentes *Communiqué de presse*.
- Cook, A. K., & Cowgill, L. D. (1996). Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 32(4), 313-322.
- Covey, T. R., Lee, E. D., & Henion, J. D. (1986). High-speed liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of drugs in biological samples. *Analytical Chemistry*, 58(12), 2453-2460.
- Cunningham, S. M., Rush, J. E., & Freeman, L. M. (2012). Systemic inflammation and endothelial dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), 547-557. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00923.x
- Dargaud, Y., Luddington, R., Gray, E., Negrier, C., Lecompte, T., Petros, S., . . . Baglin, T. (2007). Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *British Journal of Haematology*, 139(2), 303-309. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06785.x
- de Groot, P. G., Urbanus, R. T., & Roest, M. (2012). Platelet interaction with the vessel wall. *Handb Exp Pharmacol*(210), 87-110. doi: 10.1007/978-3-642-29423-5_4
- de Laforcade, A. (2012). Diseases associated with thrombosis. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 59-64. doi: 10.1053/j.tcam.2012.07.002
- de Laforcade, A. M., Freeman, L. M., Shaw, S. P., Brooks, M. B., Rozanski, E. A., & Rush, J. E. (2003). Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(5), 674-679.
- de Laforcade, A. M., Rozanski, E. A., Freeman, L. M., & Li, W. (2008). Serial evaluation of protein C and antithrombin in dogs with sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(1), 26-30. doi: 10.1111/j.1939-1676.2007.0021.x
- Donahue, S. M., Brooks, M., & Otto, C. M. (2011). Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 21(4), 346-355. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00656.x
- Donahue, S. M., & Otto, C. M. (2005). Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 15(1), 9-16.
- Douxflis, J., Mullier, F., Loosen, C., Chatelain, C., Chatelain, B., & Dogne, J. M. (2012). Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thrombosis Research*, 130(6), 956-966. doi: 10.1016/j.thromres.2012.09.004
- Dudley, A., Thomason, J., Fritz, S., Grady, J., Stokes, J., Wills, R., . . . Lunsford, K. (2013). Cyclooxygenase expression and platelet function in healthy dogs receiving low-dose aspirin. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(1), 141-149. doi: 10.1111/jvim.12022

- Dunn, M., & Brooks, M. B. (2009). Antiplatelet and anticoagulant therapy (*Current Veterinary Therapy XIV* (p. 24-28): Saunders Elsevier.
- Esmon, C. T. (2005). Coagulation inhibitors in inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 2), 401-405. doi: 10.1042/bst0330401
- Eymin, G., & Jaffer, A. K. (2012). Thromboprophylaxis in major knee and hip replacement surgery: a review. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 34(4), 518-525. doi: 10.1007/s11239-012-0751-5
- Fenger-Eriksen, C., Munster, A. M., & Grove, E. L. (2014). New oral anticoagulants: clinical indications, monitoring and treatment of acute bleeding complications. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. doi: 10.1111/aas.12319
- Fenty, R. K., Delaforcade, A. M., Shaw, S. E., & O'Toole, T. E. (2011). Identification of hypercoagulability in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia by means of thromboelastography. *J Am Vet Med Assoc*, 238(4), 463-467. doi: 10.2460/javma.238.4.463
- Flint, S. K., Abrams-Ogg, A. C., Kruth, S. A., Bersenas, A. M., & Wood, R. D. (2011). Independent and combined effects of prednisone and acetylsalicylic acid on thromboelastography variables in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 72(10), 1325-1332. doi: 10.2460/ajvr.72.10.1325
- Freyburger, G., Macouillard, G., Labrousche, S., & Sztark, F. (2011). Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thrombosis Research*, 127(5), 457-465. doi: 10.1016/j.thromres.2011.01.001
- Furie, B., & Furie, B. C. (2007). In vivo thrombus formation. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, 12-17. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02482.x
- Gabrielsson, J., Jusko, W. J., & Alari, L. (2000). Modeling of dose-response-time data: four examples of estimating the turnover parameters and generating kinetic functions from response profiles. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 21(2), 41-52.
- Gao, Y., Lv, L., Liu, S., Ma, G., & Su, Y. (2013). Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells. *Vox Sanguinis*, 105(1), 11-17. doi: 10.1111/vox.12014
- Gerotziafas, G. T. (2007). Le test de génération de thrombine, un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *Biotribune*, 24, 37-43.
- Gerotziafas, G. T., Depasse, F., Busson, J., Leflem, L., Elalamy, I., & Samama, M. M. (2005). Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thromb J*, 3, 16. doi: 10.1186/1477-9560-3-16
- Gerotziafas, G. T., Elalamy, I., Depasse, F., Perzborn, E., & Samama, M. M. (2007). In vitro inhibition of thrombin generation, after tissue factor pathway activation, by the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban. *J Thromb Haemost*, 5(4), 886-888. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02429.x
- Girolami, A., De Marco, L., Dal Bo Zanon, R., Patrassi, G., & Cappellato, M. G. (1985). Rarer quantitative and qualitative abnormalities of coagulation. *Clinics in Haematology*, 14(2), 385-411.
- Godier, A., Miclot, A., Le Bonniec, B., Durand, M., Fischer, A. M., Emmerich, J., . . . Samama, C. M. (2012). Evaluation of prothrombin complex concentrate and recombinant activated factor VII to reverse rivaroxaban in a rabbit model. *Anesthesiology*, 116(1), 94-102. doi: 10.1097/ALN.0b013e318238c036
- Good, L. I., & Manning, A. M. (2003). Thromboembolic disease: physiology of hemostasis and pathophysiology of thrombosis. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 25(9), 650-659.
- Goodwin, J. C. H., D.F.; Green, H.W. (2007). The pharmacodynamics of clopidogrel in the dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 609.

- Goodwin, L. V., Goggs, R., Chan, D. L., & Allenspach, K. (2011). Hypercoagulability in dogs with protein-losing enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 273-277. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0683.x
- Grebe, S., Jacobs, C., Kietzmann, M., & Mischke, R. (2000). [Pharmacokinetics of low-molecular-weight heparins Fragmin D in dogs]. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 113(3), 103-107.
- Green, R. A., & White, F. (1977). Feline factor XII (Hageman) deficiency. *American Journal of Veterinary Research*, 38(6), 893-895.
- Harenberg, J., Kramer, R., Giese, C., Marx, S., Weiss, C., & Wehling, M. (2011). Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 32(3), 267-271. doi: 10.1007/s11239-011-0622-5
- Helmond, S. E., Polzin, D. J., Armstrong, P. J., Finke, M., & Smith, S. A. (2010). Treatment of immune-mediated hemolytic anemia with individually adjusted heparin dosing in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), 597-605. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0505.x
- Hemker, H. C. (2008). Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost*, 6(2), 219-226. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02864.x
- Herring, J., & McMichael, M. (2012). Diagnostic approach to small animal bleeding disorders. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 73-80. doi: 10.1053/j.tcam.2012.07.004
- Hillarp, A., Baghaei, F., Fagerberg Blixter, I., Gustafsson, K. M., Stigendal, L., Sten-Linder, M., . . . Lindahl, T. L. (2011). Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *J Thromb Haemost*, 9(1), 133-139. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04098.x
- Hoh, C. M., Smith, S. A., McMichael, M. A., & Byron, J. K. (2011). Evaluation of effects of low-dose aspirin administration on urinary thromboxane metabolites in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 72(8), 1038-1045. doi: 10.2460/ajvr.72.8.1038
- Hoppensteadt, D. A., Jeske, W. P., Walenga, J. M., Fu, K., Yang, L. H., Ing, T. S., . . . Fareed, J. (1999). Laboratory monitoring of pentasaccharide in a dog model of hemodialysis. *Thrombosis Research*, 96(2), 115-124.
- Inen, O. E. (2011). *Establishment of reference intervals for kaolin-activated TEG and the STA compact automated analyzer for dogs and coagulation response in a canine model of endotoxemia.* (Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen).
- Jacoby, R. C., Owings, J. T., Ortega, T., Gosselin, R., & Feldman, E. C. (2001). Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing syndrome; discussion 1006-7. *Archives of Surgery*, 136(9), 1003-1006.
- Jacqmin, P., Snoeck, E., van Schaick, E. A., Gieschke, R., Pillai, P., Steimer, J. L., & Girard, P. (2007). Modelling response time profiles in the absence of drug concentrations: definition and performance evaluation of the K-PD model. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*, 34(1), 57-85. doi: 10.1007/s10928-006-9035-z
- Jandrey, K. E. (2012). Assessment of platelet function. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 22(1), 81-98. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00707.x
- Jessen, L. R., Wiinberg, B., Kjølgaard-Hansen, M., Jensen, A. L., Rozanski, E., & Kristensen, A. T. (2010). Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activity in healthy and diseased dogs. *Vet Clin Pathol*, 39(3), 296-301. doi: 10.1111/j.1939-165X.2010.00230.x
- Johnson, G. J., Leis, L. A., & Dunlop, P. C. (1993). Thromboxane-insensitive dog platelets have impaired activation of phospholipase C due to receptor-linked G protein dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 92(5), 2469-2479. doi: 10.1172/jci116855
- Johnson, L. R., Lappin, M. R., & Baker, D. C. (1999). Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(4), 338-345.

- Kavanagh, C., Shaw, S., & Webster, C. R. (2011). Coagulation in hepatobiliary disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 21(6), 589-604. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00691.x
- Kidd, L., & Mackman, N. (2013). Prothrombotic mechanisms and anticoagulant therapy in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 23(1), 3-13. doi: 10.1111/j.1476-4431.2012.00824.x
- Kitrell, D., & Berkwitz, L. (2012). Hypercoagulability in dogs: treatment. *Compend Contin Educ Vet*, 34(5), E3.
- Kittrell, D., & Berkwitz, L. (2012a). Hypercoagulability in dogs: pathophysiology. *Compend Contin Educ Vet*, 34(4), E1-5.
- Kittrell, D., & Berkwitz, L. (2012b). Hypercoagulability in dogs: treatment. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 34(5), 1-5.
- Kittrell, D., & Berkwitz, L. (2012c). Hypercoagulability in dogs: treatment. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 34(5), 1-5.
- Klose, T. C., Creevy, K. E., & Brainard, B. M. (2011). Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 21(6), 625-632. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00696.x
- Kol, A., & Borjesson, D. L. (2010). Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol*, 39(4), 405-416. doi: 10.1111/j.1939-165X.2010.00263.x
- Kol, A., Nelson, R. W., Gosselin, R. C., & Borjesson, D. L. (2013). Characterization of thrombelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism. *Veterinary Journal*, 197(3), 675-681. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.05.047
- Koscielny, J., & Rutkauskaite, E. (2014). Rivaroxaban and Hemostasis in Emergency Care. *Emerg Med Int*, 2014, 935474. doi: 10.1155/2014/935474
- Kreutz, R. (2012). Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 26(1), 27-32. doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00981.x
- Kristensen, A. T., Wiinberg, B., Jessen, L. R., Andreasen, E., & Jensen, A. L. (2008). Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(1), 140-147. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0030.x
- Kubier, A., & O'Brien, M. (2012). Endogenous anticoagulants. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 81-87. doi: 10.1053/j.tcam.2012.07.003
- Kubitza, D., Becka, M., Mueck, W., Halabi, A., Maatouk, H., Klause, N., . . . Bruck, H. (2010). Effects of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 70(5), 703-712. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03753.x
- Kubitza, D., Becka, M., Roth, A., & Mueck, W. (2013). The influence of age and gender on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct Factor Xa inhibitor. *Journal of Clinical Pharmacology*, 53(3), 249-255. doi: 10.1002/jcph.5
- Kubitza, D., Becka, M., Zuehlsdorf, M., & Mueck, W. (2006). Effect of food, an antacid, and the H2 antagonist ranitidine on the absorption of BAY 59-7939 (rivaroxaban), an oral, direct factor Xa inhibitor, in healthy subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46(5), 549-558. doi: 10.1177/0091270006286904
- Kubitza, D., Becka, M., Zuehlsdorf, M., & Mueck, W. (2007). Body weight has limited influence on the safety, tolerability, pharmacokinetics, or pharmacodynamics of rivaroxaban (BAY 59-7939) in healthy subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47(2), 218-226. doi: 10.1177/0091270006296058
- Kubitza, D., Roth, A., Becka, M., Alatrach, A., Halabi, A., Hinrichsen, H., & Mueck, W. (2013). Effect of hepatic impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose of

- rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 76(1), 89-98. doi: 10.1111/bcp.12054
- Kukanich, B. (2011). Clinical interpretation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in zoologic companion animal species. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 14(1), 1-20. doi: 10.1016/j.cvex.2010.09.006
- Kurata, M., & Horii, I. (2004). Blood coagulation tests in toxicological studies--review of methods and their significance for drug safety assessment. *Journal of Toxicological Sciences*, 29(1), 13-32.
- Kurata, M., Sasayama, Y., Yamasaki, N., Kitazawa, I., Hamada, Y., & Horii, I. (2003). Mechanism for shortening PT and APTT in dogs and rats--effect of fibrinogen on PT and APTT. *Journal of Toxicological Sciences*, 28(5), 439-443.
- Lake-Bakaar, G. A., Johnson, E. G., & Griffiths, L. G. (2012). Aortic thrombosis in dogs: 31 cases (2000-2010). *J Am Vet Med Assoc*, 241(7), 910-915. doi: 10.2460/javma.241.7.910
- Lang, D., Freudenberger, C., & Weinz, C. (2009). In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs, and humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 37(5), 1046-1055. doi: 10.1124/dmd.108.025551
- Laurenson, M. P., Hopper, K., Herrera, M. A., & Johnson, E. G. (2010). Concurrent diseases and conditions in dogs with splenic vein thrombosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(6), 1298-1304. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0593.x
- Lennon, E. M., Hanel, R. M., Walker, J. M., & Vaden, S. L. (2013). Hypercoagulability in dogs with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(3), 462-468. doi: 10.1111/jvim.12067
- Levitan, B., Yuan, Z., Turpie, A. G., Friedman, R. J., Homering, M., Berlin, J. A., . . . DiBattiste, P. M. (2014). Benefit-risk assessment of rivaroxaban versus enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip or knee arthroplasty. *Vasc Health Risk Manag*, 10, 157-167. doi: 10.2147/vhrm.s54714
- Lindhoff-Last, E., Samama, M. M., Ortel, T. L., Weitz, J. I., & Spiro, T. E. (2010). Assays for measuring rivaroxaban: their suitability and limitations. *Thrombotic Drug Monitoring*, 32(6), 673-679. doi: 10.1097/FTD.0b013e3181f2f264
- Lippi, G., Montagnana, M., Salvagno, G. L., & Guidi, G. C. (2006). Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 130(2), 181-184. doi: 10.1043/1543-2165(2006)130[181:iobclo]2.0.co;2
- Lippi, G., Plebani, M., & Favaloro, E. J. (2013). Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39(3), 258-266. doi: 10.1055/s-0032-1328972
- Lippi, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., & Guidi, G. C. (2005). Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 16(6), 453-458.
- Lopez, J. A., & Chen, J. (2009). Pathophysiology of venous thrombosis. *Thrombosis Research*, 123 Suppl 4, S30-34. doi: 10.1016/s0049-3848(09)70140-9
- Lorenzet, R., Napoleone, E., Cutrone, A., & Donati, M. B. (2012). Thrombosis and obesity: cellular bases. *Thrombosis Research*, 129(3), 285-289. doi: 10.1016/j.thromres.2011.10.021
- Lu, G., DeGuzman, F. R., Hollenbach, S. J., Karbarz, M. J., Abe, K., Lee, G., . . . Sinha, U. (2013). A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nature Medicine*, 19(4), 446-451. doi: 10.1038/nm.3102
- Lubas, G., Caldin, M., Wiinberg, B., & Kristensen, A. T. (2010). Laboratory testing of coagulation disorders (*Schalm's Veterinary Hematology (6th Edition)*) (p. 1082-1100). Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell.

- Lunsford, K. V., Mackin, A. J., Langston, V. C., & Brooks, M. (2009). Pharmacokinetics of subcutaneous low molecular weight heparin (enoxaparin) in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(6), 261-267.
- Mani, H., Hesse, C., Stratmann, G., & Lindhoff-Last, E. (2011). Rivaroxaban differentially influences ex vivo global coagulation assays based on the administration time. *Thrombosis and Haemostasis*, 106(1), 156-164. doi: 10.1160/th10-10-0667
- Mani, H., Kasper, A., & Lindhoff-Last, E. (2013). Measuring the anticoagulant effects of target specific oral anticoagulants-reasons, methods and current limitations. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 36(2), 187-194. doi: 10.1007/s11239-013-0907-y
- Mani, H., Rohde, G., Stratmann, G., Hesse, C., Herth, N., Schwerts, S., . . . Lindhoff-Last, E. (2012). Accurate determination of rivaroxaban levels requires different calibrator sets but not addition of antithrombin. *Thrombosis and Haemostasis*, 108(1), 191-198. doi: 10.1160/th11-12-0832
- Margetic, S. (2012). Inflammation and haemostasis. *Biochem Med (Zagreb)*, 22(1), 49-62.
- Martinez, M. C., Tual-Chalot, S., Leonetti, D., & Andriantsitohaina, R. (2011). Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(11), 659-665. doi: 10.1016/j.tips.2011.06.005
- Mayhew, P. D., Savigny, M. R., Otto, C. M., Brown, D. C., Brooks, M. B., Bentley, A. M., . . . Callan, M. B. (2013). Evaluation of coagulation in dogs with partial or complete extrahepatic biliary tract obstruction by means of thromboelastography. *J Am Vet Med Assoc*, 242(6), 778-785. doi: 10.2460/javma.242.6.778
- McMichael, M. (2012). New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 40-45. doi: 10.1053/j.tcam.2012.07.005
- Mellet, A. M., Nakamura, R. K., & Bianco, D. (2011). A prospective study of clopidogrel therapy in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 71-75. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0656.x
- Mestre, M., Clairefond, P., Mardiguan, J., Trillou, M., Le Fur, G., & Uzan, A. (1985). Comparative effects of heparin and PK 10169, a low molecular weight fraction, in a canine model of arterial thrombosis. *Thrombosis Research*, 38(4), 389-399.
- Miljic, P., Miljic, D., Cain, J. W., Korbonits, M., & Popovic, V. (2012). Pathogenesis of vascular complications in Cushing's syndrome. *Hormones (Athens)*, 11(1), 21-30.
- Mischke, R., Grebe, S., Jacobs, C., & Kietzmann, M. (2001). Amidolytic heparin activity and values for several hemostatic variables after repeated subcutaneous administration of high doses of a low molecular weight heparin in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4), 595-598.
- Mischke, R., & Jacobs, C. (2001). The monitoring of heparin administration by screening tests in experimental dogs. *Research in Veterinary Science*, 70(2), 101-108. doi: 10.1053/rvsc.2000.0447
- Mismetti, P., & Laporte, S. (2010). New oral antithrombotics: a need for laboratory monitoring. *For. J Thromb Haemost*, 8(4), 621-626. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03764.x
- Mittal, M. K., & Rabinstein, A. A. (2012). Anticoagulation-related intracranial hemorrhages. *Curr Atheroscler Rep*, 14(4), 351-359. doi: 10.1007/s11883-012-0258-8
- Miyares, M. A., & Davis, K. (2012). Newer oral anticoagulants: a review of laboratory monitoring options and reversal agents in the hemorrhagic patient. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 69(17), 1473-1484. doi: 10.2146/ajhp110725
- Molenaar, P. J., Dinkelaar, J., & Leyte, A. (2012). Measuring Rivaroxaban in a clinical laboratory setting, using common coagulation assays, Xa inhibition and thrombin generation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50(10), 1799-1807. doi: 10.1515/cclm-2012-0055
- Molina, M., Hillard, V. H., & Fekete, R. (2014). Intracranial hemorrhage in patient treated with rivaroxaban. *Hematol Rep*, 6(1), 5283. doi: 10.4081/hr.2014.5283

- Monnet, E., & Morgan, M. R. (2000). Effect of three loading doses of warfarin on the international normalized ratio for dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 61(1), 48-50.
- Moreno, P., & Ginel, P. J. (1999). Effects of haemolysis, lipaemia and bilirubinaemia on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and thrombin time in plasma samples from healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 67(3), 273-276. doi: 10.1053/rvsc.1999.0321
- Mueck, W., Becka, M., Kubitz, D., Voith, B., & Zuehlsdorf, M. (2007). Population model of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct factor xa inhibitor--in healthy subjects. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 45(6), 335-344.
- Mueck, W., Kubitz, D., & Becka, M. (2013). Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 76(3), 455-466. doi: 10.1111/bcp.12075
- Mueck, W., Schwes, S., & Stampfuss, J. (2013). Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring. *Thromb J*, 11(1), 10. doi: 10.1186/1477-9560-11-10
- Mulz, J. M., Kraus, M. S., Thompson, M., & Flanders, J. A. (2010). Cranial vena caval syndrome secondary to central venous obstruction associated with a pacemaker lead in a dog. *J Vet Cardiol*, 12(3), 217-223. doi: 10.1016/j.jvc.2010.09.001
- Murray, J. D., O'Sullivan, M. L., & Hawkes, K. C. (2010). Cranial vena caval thrombosis associated with endocardial pacing leads in three dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(3), 186-192.
- Neate, S. L., Boysen, S. R., Wagg, C. R., Radics, S. L., & Caulkett, N. A. (2013). Comparison of thromboelastography parameters between different catheter lumen diameters in an uncontrolled haemorrhagic shock model in swine. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. doi: 10.1097/MBC.0b013e32835fad68
- Neff-Davis, C. A., Davis, L. E., & Gillette, E. L. (1981). Warfarin in the dog: pharmacokinetics as related to clinical response. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 4(2), 135-140.
- Nelson, O. L. (2005). Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic disease in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41(3), 145-149.
- Nguyen, T. A., Diodati, J. G., & Pharand, C. (2005). Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(8), 1157-1164. doi: 10.1016/j.jacc.2005.01.034
- Ni, H., Denis, C. V., Subbarao, S., Degen, J. L., Sato, T. N., Hynes, R. O., & Wagner, D. D. (2000). Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 385-392. doi: 10.1172/jci9896
- Nomura, S., Ozaki, Y., & Ikeda, Y. (2008). Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thrombosis Research*, 123(1), 8-23. doi: 10.1016/j.thromres.2008.06.006
- O'Brien, M. (2012). The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 46-52. doi: 10.1053/j.tcam.2012.06.003
- O'Kell, A. L., Grant, D. C., Panciera, D. L., Troy, G. C., & Weinstein, N. M. (2012). Effects of oral prednisone administration with or without ultralow-dose acetylsalicylic acid on coagulation parameters in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 73(10), 1569-1576. doi: 10.2460/ajvr.73.10.1569
- O'Marra, S. K., Shaw, S. P., & deLaforcade, A. M. (2012). Investigating hypercoagulability during treatment for immune-mediated thrombocytopenia: a pilot study. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 22(1), 126-130. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00658.x
- Orcutt, E., Polzin, D., Armstrong, P., Helmond, S., & Smith, S. (2009). *Comparison of individually monitored unfractionated heparin versus low-dose aspirin on survival of dogs with immune mediated hemolytic anemia*. Communication présentée ACVIM Forum, Montréal, Canada.

- Otto, C. M., Rieser, T. M., Brooks, M. B., & Russell, M. W. (2000). Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J Am Vet Med Assoc*, 217(10), 1500-1504.
- Palareti, G., Ageno, W., Ferrari, A., Filippi, A., Imberti, D., Pengo, V., . . . Toni, D. (2013). Clinical management of rivaroxaban-treated patients. *Expert Opin Pharmacother*, 14(5), 655-667. doi: 10.1517/14656566.2013.773310
- Palmer, K. G., King, L. G., & Van Winkle, T. J. (1998). Clinical manifestations and associated disease syndromes in dogs with cranial vena cava thrombosis: 17 cases (1989-1996). *J Am Vet Med Assoc*, 213(2), 220-224.
- Perzborn, E., Roehrig, S., Straub, A., Kubitz, D., & Misselwitz, F. (2011). The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Nat Rev Drug Discov*, 10(1), 61-75. doi: 10.1038/nrd3185
- Perzborn, E., Roehrig, S., Straub, A., Kubitz, D., Mueck, W., & Laux, V. (2010). Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(3), 376-381. doi: 10.1161/atvbaha.110.202978
- Perzborn, E., Strassburger, J., Wilmen, A., Pohlmann, J., Roehrig, S., Schlemmer, K. H., & Straub, A. (2005). In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost*, 3(3), 514-521. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01166.x
- Peters, P., & Gothot, A. (2009). [Thrombinography: towards a globalization of coagulation tests]. *Revue Medicale de Liege*, 64(4), 199-203.
- PHARMACOKINETICS, A. w. g. (2011). [Collection of terms, symbols, equations, and explanations of common pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters and some statistical functions]. Communication personnelle.
- Pittman, J. R., Koenig, A., & Brainard, B. M. (2010). The effect of unfractionated heparin on thrombelastographic analysis in healthy dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 20(2), 216-223. doi: 10.1111/j.1476-4431.2010.00519.x
- Port, R. E., Ding, R. W., Fies, T., & Scharer, K. (1998). Predicting the time course of haemoglobin in children treated with erythropoietin for renal anaemia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46(5), 461-466.
- Prins, M., Schellens, C. J., van Leeuwen, M. W., Rothuizen, J., & Teske, E. (2010). Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *Veterinary Journal*, 185(2), 163-168. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.05.009
- Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 14(3), 167-176.
- Respass, M., O'Toole, T. E., Taeymans, O., Rogers, C. L., Johnston, A., & Webster, C. R. (2012). Portal vein thrombosis in 33 dogs: 1998-2011. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(2), 230-237. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00893.x
- Ridyard, A. E., Shaw, D. J., & Milne, E. M. (2010). Evaluation of platelet activation in canine immune-mediated haemolytic anaemia. *Journal of Small Animal Practice*, 51(6), 296-304. doi: 10.1111/j.1748-5827.2010.00935.x
- Rizzo, F., Papisoulitis, K., Crawford, E., Dodkin, S., & Cue, S. (2008). Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) on canine citrated plasma samples following different storage conditions. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 166-170. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.10.001
- Roehrig, S., Straub, A., Pohlmann, J., Lampe, T., Pernerstorfer, J., Schlemmer, K. H., . . . Perzborn, E. (2005). Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(19), 5900-5908. doi: 10.1021/jm050101d

- Rose, L., Dunn, M. E., & Bedard, C. (2013). Effect of canine hyperadrenocorticism on coagulation parameters. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *27*(1), 207-211. doi: 10.1111/jvim.12005
- Rose, L. J., Dunn, M. E., Allegret, V., & Bedard, C. (2011). Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy Beagle dogs. *Vet Clin Pathol*, *40*(4), 426-434. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00364.x
- Rosser, E. J., Jr. (2009). Use of the D-dimer assay for diagnosing thrombosis in cases of canine cutaneous vasculitis. *Vet Dermatol*, *20*(5-6), 586-590. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00829.x
- Rukshin, V., Shah, P. K., Cercek, B., Finkelstein, A., Tsang, V., & Kaul, S. (2002). Comparative antithrombotic effects of magnesium sulfate and the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors tirofiban and eptifibatid in a canine model of stent thrombosis. *Circulation*, *105*(16), 1970-1975.
- Samama, M. M., Contant, G., Spiro, T. E., Perzborn, E., Guinet, C., Gourmelin, Y., . . . Martinoli, J. L. (2012). Evaluation of the anti-factor Xa chromogenic assay for the measurement of rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls. *Thrombosis and Haemostasis*, *107*(2), 379-387. doi: 10.1160/th11-06-0391
- Samama, M. M., Contant, G., Spiro, T. E., Perzborn, E., Le Flem, L., Guinet, C., . . . Martinoli, J. L. (2013). Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. *Thromb J*, *11*(1), 11. doi: 10.1186/1477-9560-11-11
- Scott, K. C., Hansen, B. D., & DeFrancesco, T. C. (2009). Coagulation effects of low molecular weight heparin compared with heparin in dogs considered to be at risk for clinically significant venous thrombosis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, *19*(1), 74-80. doi: 10.1111/j.1476-4431.2008.00339.x
- Sharpe, K. S., Center, S. A., Randolph, J. F., Brooks, M. B., Warner, K. L., Stokol, T., . . . Felipe, M. J. (2010). Influence of treatment with ultralow-dose aspirin on platelet aggregation as measured by whole blood impedance aggregometry and platelet P-selectin expression in clinically normal dogs. *American Journal of Veterinary Research*, *71*(11), 1294-1304. doi: 10.2460/ajvr.71.11.1294
- Smith, S. A. (2009). The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, *19*(1), 3-10. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x
- Smith, S. A. (2012). Antithrombotic therapy. *Top Companion Anim Med*, *27*(2), 88-94. doi: 10.1053/j.tcam.2012.08.002
- Stampfuss, J., Kubitzka, D., Becka, M., & Mueck, W. (2013). The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *51*(7), 549-561. doi: 10.5414/cp201812
- Swann, J. W., & Skelly, B. J. (2013). Systematic review of evidence relating to the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *27*(1), 1-9. doi: 10.1111/jvim.12028
- Tarnow, I., Falk, T., Tidholm, A., Martinussen, T., Jensen, A. L., Olsen, L. H., . . . Kristensen, A. T. (2007). Hemostatic biomarkers in dogs with chronic congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *21*(3), 451-457.
- Tod, M. (2008). Evaluation of drugs in pediatrics using K-PD models: perspectives. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, *22*(6), 589-594. doi: 10.1111/j.1472-8206.2008.00649.x
- Tsuchiya, R., Akutsu, Y., Ikegami, A., Scott, M. A., Neo, S., Ishikawa, T., . . . Yamada, T. (2009). Prothrombotic and inflammatory effects of intravenous administration of human immunoglobulin G in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *23*(6), 1164-1169. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0402.x
- Turpie, A. G., Kreutz, R., Llau, J., Norrving, B., & Haas, S. (2012). Management consensus guidance for the use of rivaroxaban--an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis*, *108*(5), 876-886. doi: 10.1160/th12-03-0209

- Usechak, P. J., Bright, J. M., & Day, T. K. (2012). Thrombotic complications associated with atrial fibrillation in three dogs. *J Vet Cardiol*, *14*(3), 453-458. doi: 10.1016/j.jvc.2012.04.003
- Van Zaane, B., Nur, E., Squizzato, A., Dekkers, O. M., Twickler, M. T., Fliers, E., . . . Brandjes, D. P. (2009). Hypercoagulable state in Cushing's syndrome: a systematic review. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(8), 2743-2750. doi: 10.1210/jc.2009-0290
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, *93*(1), 327-358. doi: 10.1152/physrev.00016.2011
- Vilar, P., Couto, C. G., Westendorf, N., Iazbik, C., Charske, J., & Marin, L. (2008). Thromboelastographic tracings in retired racing greyhounds and in non-greyhound dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *22*(2), 374-379. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0061.x
- Vilar Saavedra, P., Lara Garcia, A., Zaldivar Lopez, S., & Couto, G. (2011). Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: a thromboelastographic characterization of hypercoagulability. *Veterinary Journal*, *190*(2), e78-83. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.02.025
- Walker, J. M., Hanel, R. M., Hansen, B. D., & Motsinger-Reif, A. A. (2012). Comparison of venous sampling methods for thromboelastography in clinically normal dogs. *American Journal of Veterinary Research*, *73*(12), 1864-1870. doi: 10.2460/ajvr.73.12.1864
- Weinkle, T. K., Center, S. A., Randolph, J. F., Warner, K. L., Barr, S. C., & Erb, H. N. (2005). Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc*, *226*(11), 1869-1880.
- Weinz, C., Buetehorn, U., Daehler, H. P., Kohlsdorfer, C., Pleiss, U., Sandmann, S., . . . Steinke, W. (2005). Pharmacokinetics of BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor--in rats and dogs. *Xenobiotica*, *35*(9), 891-910. doi: 10.1080/00498250500250493
- Weinz, C., Schwarz, T., Kubitza, D., Mueck, W., & Lang, D. (2009). Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, *37*(5), 1056-1064. doi: 10.1124/dmd.108.025569
- Weitz, J. I. (2011). Factor Xa and thrombin as targets for new oral anticoagulants. *Thrombosis Research*, *127* Suppl 2, S5-S12. doi: 10.1016/s0049-3848(10)70147-x
- Wiinberg, B., Jensen, A. L., Rojkjaer, R., Johansson, P., Kjølgaard-Hansen, M., & Kristensen, A. T. (2005). Validation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Vet Clin Pathol*, *34*(4), 389-393.
- Wiinberg, B., Jessen, L. R., Tarnow, I., & Kristensen, A. T. (2012). Diagnosis and treatment of platelet hyperactivity in relation to thrombosis in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, *22*(1), 42-58. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00708.x
- Winter, R. L., Sedacca, C. D., Adams, A., & Orton, E. C. (2012). Aortic thrombosis in dogs: presentation, therapy, and outcome in 26 cases. *J Vet Cardiol*, *14*(2), 333-342. doi: 10.1016/j.jvc.2012.02.008
- Wong, D. M., Brockus, C., Alcott, C., & Sponseller, B. (2009). Modifying the coagulation cascade: available medications. *Compendium Equine: Continuing Education for Veterinarians*, *4*(5), 224-236.
- Zambruni, A., Thalheimer, U., Leandro, G., Perry, D., & Burroughs, A. K. (2004). Thromboelastography with citrated blood: comparability with native blood, stability of citrate storage and effect of repeated sampling. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, *15*(1), 103-107.

