

Université de Montréal

**Évaluation de l'utilité des technologies destinées à l'évaluation de la résistance
physiologique aux antiplaquettaires en laboratoire.**

par
Normand Blais

Département de Sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître
en Sciences biomédicales

Août 2008

© Normand Blais, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Évaluation de l'utilité des technologies destinées à l'évaluation de la résistance
physiologique aux antiplaquettaires en laboratoire.**

présenté par :

Normand Blais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Eric Thorin, président-rapporteur
Dr. Yahye Merhi, co-directeur de recherche
Dr. Jean Gino Diodati, co-directeur de recherche
Dr. Érick Schampaert, membre du jury

Résumé

Introduction : L'effet biologique variable de l'aspirine a été attribué à un état de résistance pharmacologique. L'incidence de cette « résistance » varie selon la population ou la technologie étudiée.

Méthodes : Nous avons déterminé la performance de 5 techniques évaluant l'effet de l'aspirine chez des sujets sains, non fumeurs et ne prenant aucune médication pouvant interférer avec la fonction plaquettaire. Des spécimens de sang et d'urine ont été obtenus avant et après 8-10 jours de prise de 80 mg d'aspirine.

Résultats: Chez 45 sujets de 19-59 ans, la sensibilité (SE), la spécificité (SP), et la valeur optimale de coupure (CO) pour détecter l'effet de l'aspirine sont : agrégométrie par transmission optique induite avec 1,6 mM d'acide arachidonique (ATO-AA) - SE 100%, SP 95,9%, CO 20%; ATO-ADP 10 μ M - SE 84,4%, SP 77,7%, CO 70%; VerifyNow[®] Aspirin - SE 100%, SP 95,6%, CO 550 ARU; agrégation en tube - SE 82,2%, SP 86,7%, CO 55%; TEG[®] - SE 82,9%, SP 75,8%, CO 90%; et le dosage de 11-dehydrothromboxane B₂ urinaire - SE 62,2%, SP 82,2%, CO 60 pg/ml.

Conclusions: La résistance à l'aspirine chez les sujets sains définie par ATO-AA et VerifyNow[®] Aspirin est rare. Puisque les autres techniques étudiées discriminent de façon sous optimale l'effet de l'aspirine, leur utilité dans la définition de la résistance pharmacologique à l'aspirine semble marginale. Ces résultats suggèrent qu'une proportion de la variabilité de l'incidence rapportée de "résistance à l'aspirine" est artefactuelle et reliée aux limitations technologiques de certaines analyses.

Mots clés : agrégation, résistance, aspirine, chute du décompte plaquettaire, thromboélastographie, thromboxane, *VerifyNow*®

Summary

Background: Variable biological effect of aspirin is suggested to be related to pharmacological resistance. The incidence of this so-called “resistant” state varies with the study population and the assay used.

Methods: We determined performance features of five assays used to assess aspirin effects in non smoking healthy volunteers not taking any drug known to interfere with platelet function. Blood and urine samples were obtained immediately before and after 8-10 days of aspirin 80 mg intake.

Results: Forty-five participants 19-59 years old were enrolled. The sensitivity (SE), specificity (SP), and optimal cut-off (CO) value to detect the effect of aspirin were: light transmission aggregometry (LTA) with 1.6 mM arachidonic acid - SE 100%, SP 95.9%, CO 20%; LTA with ADP 10 μ M - SE 84.4%, SP 77.7%, CO 70%; VerifyNow[®] Aspirin - SE 100%, SP 95.6%, CO 550 ARU; platelet count drop - SE 82.2%, SP 86.7%, CO 55%; TEG[®] - SE 82.9%, SP 75.8%, CO 90%; and urinary 11-dehydrothromboxane B₂ levels - SE 62.2%, SP 82.2%, CO 60 pg/ml.

Conclusions: Aspirin resistance in normal individuals as defined by arachidonic acid-induced LTA and the VerifyNow[®] assay is rare. Because the other assays discriminate suboptimally aspirin effect, they should not be used to define pharmacological “aspirin resistance”. These results suggest that a proportion of the variability in the reported incidence of aspirin resistance is artefactual and related to technical limitations of some assays.

Key words: aggregometry, aspirin, resistance, platelet count drop, thromboelastography, thromboxane, VerifyNow[®]

Table des matières

Résumé.....	iii
Summary	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE	3
1.1 Le sang, les plaquettes et leur contribution à l'hémostase.....	3
1.2 Adhésion plaquettaire	12
1.3 Sécrétion plaquettaire.....	13
1.4 Agrégation plaquettaire.....	15
1.5 Voies de signalisation intraplaquettaires	16
CHAPITRE 2 ATHÉROTHROMBOSE ET ANTIPLAQUETTAIRES	20
2.1 L'athérombose.....	20
2.1.1 Pathophysiologie.....	20
2.1.2 Épidémiologie et impact social.....	23
2.1.3 Traitement.....	25
2.2 Les antiplaquettaires	27
2.2.1 Acide acétylsalicylique	27
2.2.2 Inhibiteurs des récepteurs de l'ADP	33
2.2.3 Antagonistes de l'intégrine α IIb β 3	36
2.2.4 Dipyridamole	38
2.3 La résistance aux thérapies antiplaquettaires.....	40
2.3.1 Définition	40
2.3.2 Étiologies et hypothèses.....	42
2.3.3 Impact clinique et recommandations	45

CHAPITRE 3 ÉVALUATION EN LABORATOIRE DES ANTIPLAQUETTAIRES	47
3.1 Évaluation globale de l'hémostase primaire	47
3.1.1 Temps de saignement.....	47
3.1.2 PFA-100®.....	48
3.2 Agrégométrie	49
3.2.1 Agrégométrie optique	49
3.2.2 Agrégométrie par impédance.....	53
3.2.3 Agrégométrie en tube.....	55
3.2.4 Agrégométrie automatisée	56
3.3 Mesure des métabolites de la thromboxane	59
3.4 Thromboélastographie (TEG).....	62
3.5 Cytométrie de flux	63
3.6 Génomique et protéomique.....	67
3.7 Caractéristiques de performance des tests de laboratoire	72
PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSE	77
CONTRIBUTION ORIGINALE	79
DISCUSSION	111
CONCLUSION.....	115
BIBLIOGRAPHIE	117

Liste des tableaux

Tableau I. Contenu et composantes de la membrane des granules plaquettaires ... 11

Tableau II. Causes et facteurs de risques possibles de résistance à l'aspirine et au clopidogrel 44

Tableau III. Détermination de la sensibilité et spécificité diagnostique 74

Liste des figures

- Figure 1.** Représentation schématique de la plaquette et de ces organelles..... 8
- Figure 2.** Mécanismes d'activation plaquettaire menant à la sécrétion plaquettaire et l'activation du récepteur $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ via la transmission de messages intracellulaires.. 17
- Figure 3.** Métabolisme de l'acide arachidonique. 31
- Figure 4.** Nombre de citations sur une base annuelle en utilisant les termes « aspirin resistance » et « clopidogrel resistance »..... 41
- Figure 5.** Tracé typique et variables obtenues d'un thromboélastogramme. 62
- Figure 6.** Étude de l'inhibition du récepteur P2Y_{12} par l'expression du VASP phosphorylé..... 66
- Figure 7.** Exemple d'un gel 2D de protéines sécrétées par des plaquettes lavées stimulées par 0,1 U/mL de thrombine..... 71

Liste des abréviations

AA :	Acide arachidonique
AAS :	Acide acétylsalicylique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AINS :	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
AVC :	Accident vasculaire cérébral
COX-2 :	Cyclooxygénase de type 2
DAG :	Diacylglycérol
11-dTxB ₂ :	11-dehydrothromboxane B ₂
EPO :	Érythropoïétine
FcR _γ :	Chaîne γ associée au récepteur Fc des immunoglobulines
fvW :	facteur von Willebrand
GDP :	Guanosine diphosphate
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GTP :	Guanosine triphosphate
ICAM-1 :	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICP :	Intervention coronarienne percutanée
ICT :	Ischémie cérébrale transitoire
IL-6 :	Interleukine-6
IL-11 :	Interleukine-11

IP ₃ :	Inositol-1,4,5-P ₃
JAM :	<i>Junctional adhesion molecules</i>
LDL :	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LIF :	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
OR :	<i>Odds ratio</i>
PAR :	<i>Protease-activated receptor</i>
PDGF :	<i>Platelet derived growth factor</i>
PECAM :	<i>Platelet and endothelial cellular adhesion molecule</i>
PFA-100:	<i>Platelet function analyzer – 100</i> ®
PGHS-1:	Prostaglandin G/H synthase-1
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol-4,5-P ₂
PKC:	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
PPP :	Plasma pauvre en plaquettes
PRP :	Plasma riche en plaquettes
PSGL-1 :	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
SCA :	Syndrome coronarien aigu
TP :	Récepteur de la thromboxane et de la prostaglandine H ₂
TPO :	Thrombopoïétine
TxA ₂ :	Thromboxane A ₂
VASP :	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1 :	<i>Vascular-cell adhesion molecule 1</i>

Remerciements

Ce travail résulte d'une collaboration cordiale et dévouée de deux co-directeurs de recherche, les Dr. Jean G. Diodati et Dr. Yahye Merhi, ainsi qu'à leurs collaborateurs des centres de recherche de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal et de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Au centre de recherche de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, le projet clinico-biologique sur la résistance à l'aspirine chez des sujets sains a été supporté par la collaboration du Dr. Chantal Pharand et de Mme. Marie Lordkipanidzé ainsi que du support clinique de Mme Céline Groulx et du support technique de M. Ying Sia. A l'Institut de Cardiologie de Montréal, le projet de mise en place d'une plate-forme protéomique pour l'évaluation des réponses interindividuelles à l'aspirine a été supporté par la collaboration de M. Haissam Abou-Saleh, Jean-François Théorêt et Daniel Yacoub. J'ai grandement apprécié leur collaboration à ce projet de maîtrise et désire les remercier chaleureusement de leur contribution.

La préparation et l'aboutissement d'un projet de maîtrise durant un congé sabbatique d'une pratique médicale en hémato-oncologie implique un grand degré de compréhension de la part de sa famille et des ses collègues de travail. J'apprécie sincèrement la patience et la compréhension de mon épouse, Gilline Pageau, et de mes deux enfants, Florence et Jean-Christophe qui ont su me respecter durant des soirées et des fins de semaine occupées à la préparation de ce projet. Je remercie finalement tous mes collègues hémato-oncologues du CHUM qui m'ont libéré de plusieurs activités cliniques afin que ce projet puisse se réaliser.

Introduction

De nombreuses contributions originales et plusieurs articles de revue concernant le phénomène de résistance à l'aspirine ont été publiés jusqu'à ce jour. Malgré l'abondance de littérature sur le sujet, la définition de la résistance à l'aspirine demeure controversée compte tenu qu'il existe plusieurs facteurs confondants provenant entre autres de la très grande variabilité des techniques et des méthodologies utilisées dans la description de ce phénomène. En fait, l'incidence des « résistants » en laboratoire a été chiffrée être entre $< 1\%$ et 83% selon la technique utilisée et la population évaluée [1].

Il est d'usage commun dans les publications antérieures sur le sujet de la résistance à l'aspirine de définir un état résistant par un résultat d'analyse provenant d'un sujet prenant de l'aspirine dont les résultats se situent dans les limites de la normale établies dans une cohorte d'individus ne prenant pas de médication antiplaquettaire. Cette approche est adéquate lorsque l'analyse utilisée démontre une excellente sensibilité à l'effet de l'aspirine, ce qui implique qu'elle permet de bien discriminer les individus sans médication et ceux prenant de l'aspirine. Par contre, une analyse peu sensible à l'effet de l'aspirine sera sous optimale dans l'évaluation d'une résistance médicamenteuse puisque des résultats faussement positifs ne pourront pas être distingués d'état « résistant ». Ceci pourrait donc être à l'origine d'une surestimation artificielle de l'incidence de la résistance à l'aspirine uniquement reliée à une performance sous optimale des analyses étudiées et non à un manque d'effet biologique du médicament.

Puisque la revue de la littérature suggère que la réponse biologique sous optimale à l'aspirine est surtout un phénomène acquis dans certaines pathologies métaboliques et vasculaires [2-5] et qu'elle est très rarement (<1% des individus normaux) observée chez des sujets sains [6], nous avons émis l'hypothèse que la sensibilité variable de différentes analyses étudiées à ce jour pourrait expliquer du moins partiellement la variabilité d'incidence rapportée de la « résistance à l'aspirine ».

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons entrepris d'étudier une cohorte de sujets sains sans facteur de risque cardiovasculaire et sans co-médication avant et après 8 à 10 jours de prise d'aspirine à une dose de 80 mg par jour en utilisant les technologies les plus étudiées jusqu'à présent pour définir la « résistance à l'aspirine » : l'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse avec l'acide arachidonique, l'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse avec l'adénosine diphosphate, la trousse VerifyNow®, une mesure de chute du décompte plaquettaire induite par l'AA, une trousse d'évaluation de l'aspirine par thromboélastographie (TEG® platelet mapping™ assay) et la 11-déhydrothromboxane B₂ urinaire (11-dTxB₂).

Les retombées prévues de ce projet sont de confirmer que l'effet biologique de l'aspirine est détectable chez la majorité des sujets sains, de démontrer les forces et les faiblesses des différentes techniques de laboratoire étudiées dans l'évaluation de l'effet de l'aspirine *in vitro* et, finalement, de permettre de critiquer la prévalence parfois élevée de résistance à l'aspirine rapportée dans certaines études.

Chapitre 1

Physiologie plaquettaire

1.1 Le sang, les plaquettes et leur contribution à l'hémostase

L'importance vitale du système cardio-vasculaire et plus particulièrement du sang chez l'être humain est bien établie. Son rôle le plus reconnu est certainement celui du transport de l'oxygène à partir de la microcirculation pulmonaire jusqu'aux mitochondries de chaque cellule de l'organisme. Cette fonction du sang est assurée par les érythrocytes (globules rouges) qui constituent une proportion variable mais importante du contenu total du volume sanguin total. Cette proportion correspond à l'hématocrite. La valeur normale de l'hématocrite varie entre 0,45-0,55 chez l'homme et 0,35-0,45 chez la femme. En plus des globules rouges, le sang contient d'autres cellules métaboliquement actives que sont les thrombocytes (plaquettes) et les leucocytes (globules blancs).

En comparaison avec les érythrocytes qui sont au nombre d'environ $5 \times 10^{12}/L$, les plaquettes figurent au deuxième rang de la densité parmi les éléments figurés du sang avec un décompte moyen de $250 \times 10^9/L$, suivi des leucocytes qui occupent le troisième rang avec un décompte moyen de $8 \times 10^6/L$. Tel que discuté en détail dans ce mémoire, les plaquettes ont un rôle primordial dans l'hémostase et la cicatrisation des plaies. Les leucocytes sont traditionnellement subdivisés en sous populations de neutrophiles, monocytes, lymphocytes, éosinophiles et basophiles possédant des rôles variés impliquant l'inflammation, l'immunité, la défense contre

les infections et l'atopie. Ces trois populations cellulaires baignent dans une phase fluide, le plasma, qui permet la circulation des éléments figurés et qui contribue aux échanges gazeux, électrolytiques, métaboliques et hormonaux de l'organisme. Le plasma contient de nombreuses protéines telles que l'albumine, qui permet la rétention du liquide dans le compartiment vasculaire en fournissant une pression oncotique; les immunoglobulines, qui assurent la fonction humorale de l'immunité; le fibrinogène et autres facteurs de la coagulation qui, avec les plaquettes, assurent l'hémostase.

L'hémostase est un terme provenant de la combinaison des mots grec *haima* (sang) et *stasis* (arrêt) signifie au sens strict « arrêt du saignement » mais désigne généralement un système complexe responsable à la fois de maintenir la fluidité sanguine ainsi que de réagir à une lésion vasculaire par la formation d'un caillot. Ce système implique des interactions diverses contrôlées par l'endothélium vasculaire, les plaquettes, les protéines impliquées dans la coagulation ainsi que les protéines de la fibrinolyse.

De façon sommaire, l'activation du système hémostatique survient suite au bris de la couche interne de la paroi vasculaire, l'endothélium, qui provoque la sécrétion des multimères de haut poids moléculaire du facteur von Willebrand (fvW) préalablement entreposés dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales; l'exposition du collagène normalement présent sur la membrane basale sous endothéliale; l'induction de la synthèse du facteur tissulaire par les cellules endothéliales et les monocytes; l'exposition sur les membranes cytoplasmiques de phospholipides chargés négativement; et la diminution des

mécanismes de protection anti-thrombogéniques physiologiques. Pendant que l'exposition du collagène et la présence d'une grande concentration locale de multimères de haut poids moléculaire du fvW favorisent l'adhésion plaquettaire à la région lésée de la paroi vasculaire, l'expression du facteur tissulaire et l'exposition de phospholipides chargés négativement sont à l'origine de l'initiation de la cascade de la coagulation menant à la formation de thrombine. La thrombine ainsi formée provoque à la fois une activation plaquettaire qui mène à la sécrétion des granules plaquettaires, l'aggrégation plaquettaire, la transformation enzymatique du fibrinogène en fibrine, l'amplification par activation des facteurs en amont de la cascade de la coagulation et l'activation du facteur XIII qui est responsable de la polymérisation de la fibrine. La diminution de la synthèse de prostacycline, facteur inhibiteur de l'activation plaquettaire, par l'endothélium de même que la diminution de l'expression au site d'insulte vasculaire des principaux inhibiteurs de la thrombine que sont le sulfate d'héparane et la thrombomoduline favorise ainsi la formation ultime d'un caillot composé d'un agrégat de plaquettes imbriquées dans un treillis de fibrine polymérisée. Cette réaction à caractère explosif sera limitée au site du dommage vasculaire grâce à la présence des mécanismes contre-régulateurs des vaisseaux sanguins normaux; la présence de protéines anticoagulantes telles que l'antithrombine, la protéine C et la protéine S et finalement l'activation de la voie fibrinolytique responsable de la digestion enzymatique de la fibrine. La fibrinolyse, la migration de cellules inflammatoires et de cellules souches pluripotentielles résulteront ultimement en un remodelage du caillot, une cicatrisation de la plaie et une réendothélialisation de la paroi vasculaire.

C'est à Max Schultze que l'on attribue la première identification au microscope des plaquettes en 1865 sous le terme de « sphérules » [7]. Il décrit que dans certaines circonstances, ces sphérules sont associées à l'apparition de rayons de protoplasme finement granulaire et la présence de matériel fibreux et suggère que cette accumulation de matériel granulaire soit à l'origine du processus de coagulation. Ces travaux sont repris de façon plus approfondie par Giulio Bizzozero qui publie à compter de 1881 plusieurs ouvrages sur ce qu'il nommera d'abord en italien « piastrine », puis en français « petites plaques » et finalement en allemand « blutplättchen ». A l'aide d'un microscope permettant l'étude de la circulation sanguine *in vivo*, il observe que ces plaquettes se concentrent rapidement à un site de lésion vasculaire générée par une aiguille fine. Il suggère que la présence d'un thrombus résulte d'une accumulation de plusieurs plaquettes devenues plus « collantes » que dans leur état physiologique normal [8].

Les connaissances sur les plaquettes ont évolué de façon vertigineuse depuis les cent dernières années et nous permettent d'apprécier l'évolution du rôle cellulaire de l'hémostase dans le règne animal. Alors qu'il y a seulement un type cellulaire dans la circulation sanguine ou du liquide coelomique des invertébrés dont les fonctions sont multiples et incluent une fonction hémostatique primitive, les vertébrés non mammifères possèdent des thrombocytes fusiformes et nucléés, possédant un rôle spécialisé pour l'hémostase. C'est chez les mammifères uniquement que l'on retrouve la plaquette sous une forme anucléée telle qu'elle est connue chez l'être humain.

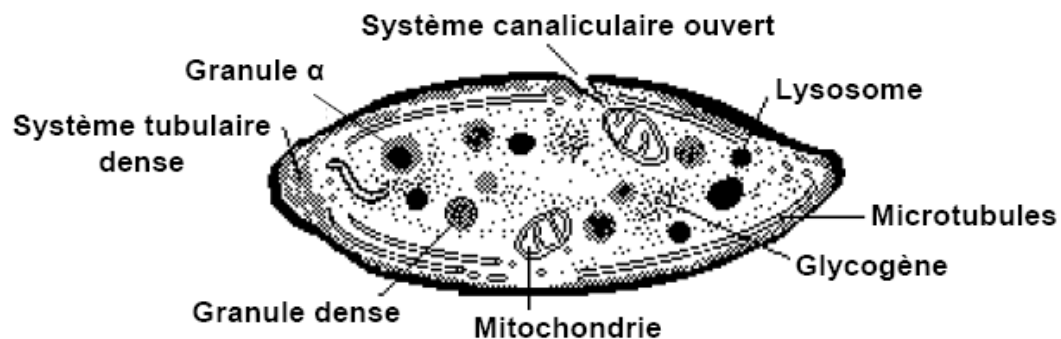
La synthèse des plaquettes chez l'humain est un processus complexe prenant origine des cellules souches pluripotentielles de la moelle osseuse qui subissent l'influence de nombreux facteurs solubles stimulant la prolifération et la maturation de cellules de plus en plus commises dans la voie menant à la formation de mégacaryocytes : les CMP (common myeloid progenitor), les MEP (MK/erythro progenitor), les BFU-Meg (burst forming unit-megakaryocyte), les CFU-Meg (burst forming unit-megakaryocyte), les promégacaryoblastes, les mégacaryoblastes et les promégacaryocytes [9]. A ce stade de maturation, les mégacaryocytes sont des cellules ultraspecialisées dont le rôle unique est de produire quotidiennement environ 1×10^{11} plaquettes requises à la circulation et d'augmenter cette production en situation de stress [10].

Sous l'influence de la TPO, de l'EPO, de l'IL-6, de l'IL-11, du LIF et de l'oncostatine M, la maturation du mégacaryocyte s'accompagne d'un processus unique d'endoréplication nucléaire, c'est-à-dire un processus de réplication de l'ADN répétitif sans division nucléaire ou cellulaire, transformant un précurseur 2N en une cellule géante d'environ 60 μm variant de 8-128N (ploïdie modale de 16N chez l'humain) dont le contenu cytoplasmique augmente de pair à son contenu nucléaire. A la fin de cette maturation, un système de démarcation membranaire se forme au sein du cytoplasme des mégacaryocytes suivi d'une évagination de pseudopodes cytoplasmique (proplaquettes) faisant protrusion au travers des capillaires de la moelle osseuse menant finalement à la formation de plaquettes à l'extrémité de ces proplaquettes qui seront libérées directement dans la circulation périphérique [9-11]. La survie moyenne de la plaquette est d'environ 10 jours dans

des conditions physiologiques normales. Après l'injection expérimentale de plaquettes marquées au ^{51}Cr , environ 70% des plaquettes administrées est retrouvé dans le pool du sang périphérique, tandis que 30% est emmagasiné au niveau splénique [12]. Il a également été suggéré que certains mégacaryocytes atteignent directement la microcirculation splénique et contribuent à la production *in situ* des plaquettes [13].

Prenant au repos une forme discoïde d'environ $0,5 \times 3 \mu\text{m}$, les plaquettes sont composées d'une membrane cytoplasmique, d'un contenu cytoplasmique incluant un riche réseau de microtubules, des organelles, des protéines, des réserves de glycogène et de l'ARN messenger mais ne contiennent aucun résidu nucléaire (figure 1) [14].

Figure 1. Représentation schématique de la plaquette et de ces organelles.



La membrane cytoplasmique est responsable des interactions avec le milieu environnant et est composée d'une double couche lipidique contenant plusieurs protéines transmembranaires ayant des fonctions importantes dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire, tel que décrit ultérieurement dans ce

mémoire. Les protéines les plus importantes sont les complexes de protéines formant le récepteur glycoprotéique Ib-V-IX (25,000 copies par plaquette) et l'intégrine α IIb β 3 (le complexe IIb-IIIa, 80,000 par plaquette). Ces nombreux récepteurs membranaires sont en intime relation avec un cytosquelette contractile formé de calmoduline, de myosine et de filaments d'actine qui a un rôle important dans l'étalement initial de la plaquette au cours du processus d'adhésion, de la formation de pseudopodes de la membrane plaquettaire ainsi que dans la contraction du caillot plaquettaire [14, 15].

Les organelles plaquettaires sont les mitochondries, le système canaliculaire ouvert, le système tubulaire dense ainsi que trois granules spécifiques: les granules denses, les granules α et les lysosomes (figure 1). Les mitochondries offrent un support énergétique essentiel aux activités métaboliques cellulaires, particulièrement marquées lors de l'agrégation et de la sécrétion. Alors que le système canaliculaire ouvert est un réseau membranaire ouvert au cytosol et permet le trafic du contenu cytoplasmique, le système tubulaire dense est une structure endomembranaire servant de réservoir pour le Ca^{++} , l'AMP cyclique et des enzymes importantes pour la régulation de l'activation plaquettaire, en relation intime avec le cytosquelette. Il s'agit du site principal du catabolisme de l'acide arachidonique et de synthèse de la thromboxane A_2 (TxA_2). En distinction aux structures essentielles au métabolisme intracellulaire décrites ci haut, les granules spécifiques possèdent une membrane qui sera fusionnée à la membrane cytoplasmique et contiennent des substances qui sont expulsées à l'extérieur de la plaquette lors de la sécrétion plaquettaire (tableau I) et contribuent à l'agrégation plaquettaire, la coagulation et

l'inflammation. Les granules denses, nommées en référence à leur densité observée en microscopie électronique, contiennent surtout de petites molécules non protéiniques. Les granules α , plus larges que les précédentes, correspondent à des vésicules de storage contenant à la fois des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux des mégacaryocytes ainsi que des protéines plasmatiques incorporées par la plaquette ou le mégacaryocyte par endocytose passive ou active, modulée par des récepteurs cytoplasmiques. Le troisième type de granule, les lysosomes, contient des enzymes actives en milieu acide qui proviennent d'une synthèse à l'intérieur du réticulum endoplasmique rugueux des mégacaryocytes [16, 17].

Tableau I. Contenu et composantes de la membrane des granules plaquettaires

Granule dense	Granule α	Lysosome
CONTENU GRANULAIRE		
Nucleotides : <ul style="list-style-type: none"> • ATP, ADP • GTP, GDP Amines : <ul style="list-style-type: none"> • Sérotonine • Histamine Cations bivalents : <ul style="list-style-type: none"> • Calcium • Magnésium Pyrophosphate	Proteoglycans : <ul style="list-style-type: none"> • Spécifiques aux plaquettes : β-TG, PF4 • Serglycin, HRGP • Dérivés de β-TG : PBP, CTAP-III, NAP-2 Glycoprotéines d'adhésion : <ul style="list-style-type: none"> • Fibronectine, vitronectine, vWF, thrombospondine Facteurs hémostatiques : <ul style="list-style-type: none"> • Fibrinogène, facteur V, VII, XI, XIII • Kininogènes, protéine S, plasminogène, multimérine Mitogènes : <ul style="list-style-type: none"> • PDGF, TGFβ, ECGF, VEGF/VPF, IGF, IL-β Inhibiteurs de protéases : <ul style="list-style-type: none"> • α2-macroglobuline, α2-antitrypsine, PDCI • α2-antiplasmine, PAI-1, TFPI, α1-PI, PIXI • PN-2/APP, C1 inhibiteur Divers : <ul style="list-style-type: none"> • Immunoglobulines • Albumine • GPIa • Gas6 	Protéases acides : <ul style="list-style-type: none"> • Cathepsines D,E • Carboxypeptidases (A,B) • Prolinecarboxypeptidase • Collagénase • Phosphatase acide • Arylsulphatase Glycohydrolases: <ul style="list-style-type: none"> • Heparinase • β-N-acetylglucosaminidase • β-glucuronidase • β-galactosidase • β-glycerophosphatase • α-D-glucosidase • β-D-glucosidase • α-L-fucosidase • β-D-fucosidase • α-L-arabinosidase • α-D-mannosidase
COMPOSANTE DE LA MEMBRANE GRANULAIRE		
Protéines liées au GTP : <ul style="list-style-type: none"> • Ral, Rab 27 Glycoprotéines : <ul style="list-style-type: none"> • GPIb, IIbIIIa Granulophysine/LIMP1 (CD63) LAMP2 Src P-sélectine (CD62)	Protéines liées au GTP : <ul style="list-style-type: none"> • Rab4, Rab6, Rab8, Rap1 Récepteurs et antigènes : <ul style="list-style-type: none"> • P-sélectine (CD62) • GPIIb/IIIa • GPIb-IX • GPV (CD36) • p24 (CD9) • PECAM (CD31) • GLUT-3 • Récepteur de la vitronectine Ostéonectine GMP33	LIMP1 (CD63) LAMP1 LAMP2

1.2 Adhésion plaquettaire

Quoique la majorité des plaquettes ne subissent pas d'adhésion ferme au cours de leur séjour dans la circulation sanguine, l'exposition de la matrice extracellulaire sous endothéliale secondaire à un traumatisme externe, une lésion endovasculaire ou une rupture de plaque athérosclérotique va déclencher l'adhésion étanche des plaquettes à la paroi vasculaire endommagée préalablement à l'activation des plaquettes et de la coagulation menant à la formation d'un thrombus.

Les conditions rhéologiques de la circulation favorisent une distribution centrale des globules rouges, plus denses, circulant à plus grande vitesse que les couches plus externes de la phase sanguine où les plaquettes, relativement moins denses que les globules rouges, se retrouvent. Cette variation de vitesse crée un gradient de force de cisaillement qui est maximal en bordure de la paroi sanguine, particulièrement marqué dans les vaisseaux sanguins de petite taille comme les petites artères et artérioles où les mécanismes d'adhésion plaquettaires semblent les plus importants. La première étape du processus d'adhésion provient donc d'une liaison du fvW de haut poids moléculaire, sécrété des corps de Weibel-Palade de la cellule endothéliale au moment de l'insulte vasculaire, au collagène sous endothélial. Les forces de cisaillement locales vont favoriser l'étirement des multimères du fvW et exposer des sites de liaison du fvW au récepteur glycoprotéine Ib (GPIb) des plaquettes. Cette liaison, facilement réversible, ralentit la vitesse de la plaquette, l'entraîne dans un processus de roulement sur la paroi vasculaire et favorise une deuxième interaction du collagène avec son principal récepteur plaquettaire, la glycoprotéine VI (GP VI) [18]. Malgré que ces dernières

interactions soient également de faible affinité, elles favorisent l'activation de la GPVI avec transmission de signaux intracellulaires menant à la fois à une augmentation de l'affinité de certains récepteurs plaquettaire pour leur ligand et à la sécrétion d'ADP et de TxA₂. La présence d'ADP et de TxA₂, deux agonistes de récepteurs d'activation plaquettaire, initie la phase suivante d'agrégation. L'adhésion est par la suite consolidée par des liaisons de haute affinité entre les intégrines plaquettaire du groupe β1 comme la α2β1 avec le collagène, la α5β1 avec la fibronectine, la α6β1 avec la laminine, ainsi que l'intégrine plaquettaire la plus importante, l'αIIbβ3 (glycoprotéine IIb/IIIa), qui interagit avec la fibronectine et le fvW lié au collagène [19].

1.3 Sécrétion plaquettaire

En plus de l'ADP et de la TxA₂, plusieurs autres agonistes physiologiques interagissent avec des récepteurs spécifiques sur la membrane cytoplasmique de la plaquette, soit précocement ou suite à la relâche complète du contenu des granules spécifiques (granules α, granules denses et lysosomes) de plaquettes adjacentes qui ont déjà été pleinement activées. Cette interaction mène à la transmission de signaux intracellulaires culminant en une relâche des granules spécifiques, une réorganisation du cytosquelette et une activation des mécanismes permettant l'agrégation des plaquettes entre elles.

L'activation de la région extracellulaire d'un récepteur par son agoniste provoque le clivage de PIP₂ en IP₃ et en DAG. La présence d'IP₃ semble dominante dans le processus de sécrétion en induisant la translocation du Ca⁺⁺ emmagasiné dans le système tubulaire dense vers le cytosol. Cette augmentation rapide et

importante de la concentration de Ca^{++} dans le cytosol est associée à la transformation du système tubulaire dense qui passe d'une forme allongée et mince à une forme vésiculaire [20] et à la mobilisation des granules spécifiques plaquettaires vers le centre de la cellule à l'intérieur d'un réseau organisé de microtubules qui entrent ultimement en contact avec le réseau d'invaginations de la membrane cytoplasmique, le système canaliculaire ouvert. De plus, la présence de DAG permet d'activer plusieurs isoformes de la PKC qui semblent agir de façon synergique avec la relâche de Ca^{++} pour induire la sécrétion [21].

Similairement au processus d'exocytose dans d'autres cellules ayant des fonctions excrétrices comme les neurones, le processus de sécrétion se divise en trois étapes : 1) le mouvement des granules vers la membrane cytoplasmique grâce à un réseau circonférentiel de microtubules et de protéines d'ancrage sur les granules pouvant se lier au GTP; 2) l'ancrage à la membrane cytoplasmique et 3) la fusion de la membrane granulaire et la membrane cytoplasmique ou la fusion de membranes de granules entre elles. Plus spécifiquement dans la plaquette, l'augmentation de la concentration du Ca^{++} cytosolique provoque la contraction du cytosquelette et le mouvement des granules vers la membrane cytoplasmique ou vers les invaginations de cette membrane nommées système canaliculaire ouvert. Les protéines de la famille Rabs sont des guanosine triphosphatases de petit poids moléculaire (tableau II) qui acceptent le transfert d'un groupe geranylgeranyl à un complexe Rab-GDP facilitant l'ancrage des granules à la membrane cytoplasmique [22]. La fusion des membranes s'effectue avec la participation des protéines du groupe SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein

receptor) divisées en plusieurs familles incluant les syntaxines, les VAMP (vesicle-associated membrane proteins) et les SNAP-25-related-genes [23]. Ce processus implique la translocation de matériel membranaire par des interactions des v-SNAREs (vesicle or membrane SNARE) et des t-SNAREs (target SNARE). Malgré que les mécanismes de translocation soient encore incomplètement élucidés, les protéines VAMP-8, SNAP-23, syntaxin-2 et syntaxin-4, modulées par phosphorylation par des mécanismes reliés à la PKC [17], semblent essentielles dans la fusion des membranes et la sécrétion du contenu des granules dans l'espace extracellulaire [24].

1.4 Agrégation plaquettaire

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ joue un rôle central dans l'agrégation plaquettaire. L'importance de l'agrégation plaquettaire dans la formation d'un caillot ferme et efficace est par ailleurs bien démontrée par la sévérité du phénotype hémorragique associé à la thrombasthénie de Glanzmann, une déficience héréditaire en $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [25].

Synthétisée uniquement au niveau du mégacaryocyte chez l'humain, l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est un hétérodimère formé à partir des précurseurs d'une chaîne protéique αIIb , clivée au niveau du corps de Golgi mégacaryocytaire en une chaîne légère et une chaîne lourde, ainsi que d'une chaîne β3 . On retrouve environ 80,000 copies d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sur la surface d'une plaquette au repos et ce nombre augmente après la sécrétion plaquettaire par la translocation d'hétérodimères supplémentaires situés sur la membrane des granules alpha [26]. La caractéristique fondamentale de l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est reliée au changement de la conformation tridimensionnelle de la région

extracellulaire de ce récepteur en réaction à l'expression des signaux intracellulaires générés lors du mécanisme d'activation. Cette caractéristique, connue sous le terme « inside-out signaling », témoigne de l'influence des signaux intracellulaires dans la modulation de la fonction de certains récepteurs de la surface cellulaire [27]. Cette modification de configuration expose un site de liaison du fibrinogène qui permet la création de ponts entre les plaquettes et qui génère une signalisation intracellulaire via la composante intracytoplasmique de l'intégrine (« outside-in signaling ») [28].

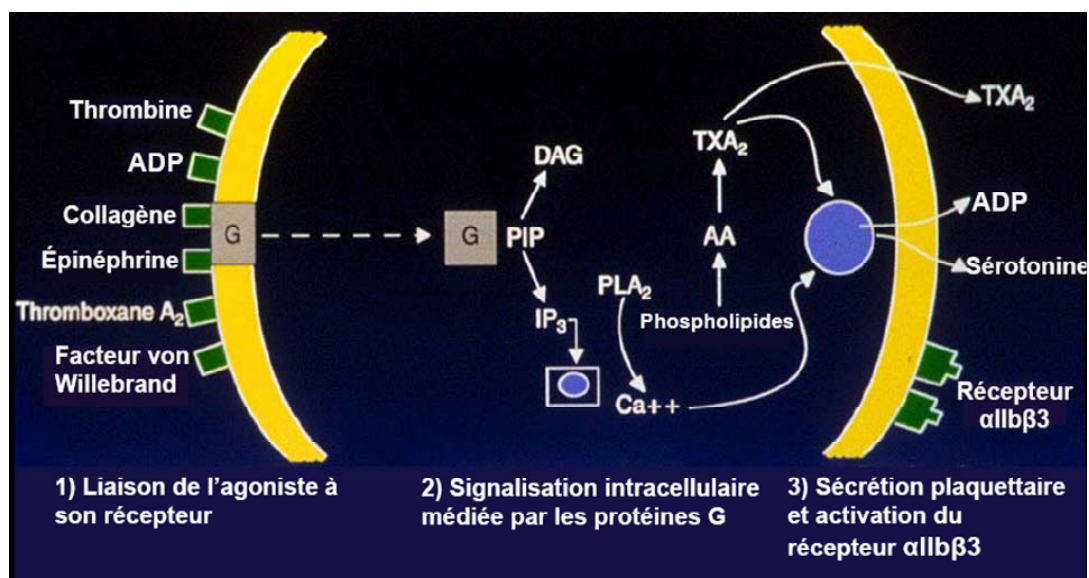
1.5 Voies de signalisation intraplaquettaires

L'activation plaquettaire se résume en trois étapes entre chevauchées : l'initiation, l'extension et la perpétuation [29]. L'initiation survient soit par l'adhésion des plaquettes au collagène ou au fvW, par la génération de thrombine et l'activation de ses récepteurs plaquettaires ou plus rarement par l'activation du récepteur FcR-IIA plaquettaire par un anticorps pathologique (eg.: anticorps anti-héparine/PF4). L'extension réfère au recrutement d'autres plaquettes et à la stabilisation du caillot provoqués par l'activation de la coagulation et la génération locale de thrombine ainsi que par la sécrétion plaquettaire d'ADP et de TxA₂. L'étape de perpétuation, stabilisant le caillot, provoque une troisième vague de signalisation suite à l'agrégation des plaquettes entre elles.

Le collagène et la thrombine sont les deux molécules les plus importantes sur le plan physiologique dans l'activation plaquettaire (figure 2). Le collagène possède quatre récepteurs dont deux sont directs ($\alpha 2\beta 1$ et GPVI) et deux sont indirects, via une liaison avec le fvW ($\alpha IIb\beta 3$ et GPIb). La GPVI, qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, semble la plus importante dans la transmission des signaux

intracellulaires, avec la participation de FcR γ qui est associé de façon constitutive avec la GPVI. La signalisation via GPVI entraîne la phosphorylation du FcR γ par des tyrosines kinases intracellulaires de la famille Src. Cette phosphorylation du complexe GPVI-FcR γ entraîne son association à Syk et provoque l'activation de la PLC γ_2 . Comme d'autres isoformes de PLC dans la plaquette, la PLC γ_2 hydrolyse l'IP $_2$ en IP $_3$ et en DAG (figure 2). Alors que l'IP $_3$ est à l'origine d'une augmentation de la concentration de Ca $^{++}$ intracytoplasmique (voir section 1.3), le DAG active plusieurs isoformes de la PKC, un intermédiaire important dans la génération de la TxA $_2$ et dans la modification de α Ib β 3 permettant sa liaison avec le fibrinogène (figure 2) [30]. Cette première phase de signalisation est à l'origine de la sécrétion et permet l'agrégation.

Figure 2. Mécanismes d'activation plaquettaire menant à la sécrétion plaquettaire et l'activation du récepteur α Ib β 3 via la transmission de messages intracellulaires.



L'extension de l'activation plaquettaire pourra donc se dérouler suite à la sécrétion d'ADP des granules denses, à la diffusion de la TxA_2 vers l'extérieur de la plaquette et suite à la génération de thrombine via l'exposition de phospholipides à charges négatives (phosphatidylserine en particulier) et l'activation de la coagulation sur les surfaces plaquettaire, endothéliale, monocyttaire ou celles des microparticules [31]. L'ADP, la TxA_2 et la thrombine ont des récepteurs transmembranaires spécifiques (ADP – $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$; TxA_2 – $TP\alpha$; thrombine – PAR1 et PAR4) qui sont tous couplés dans leur segment intracellulaire à des protéines de la famille « G ». Il existe plusieurs hétérotrimères de « G-protéines », composés de sous-unités $\alpha/\beta/\gamma$, de fonctions différentes et plusieurs G-protéines peuvent être associées à un récepteur. Ceci fait en sorte que la signalisation via cette famille de « récepteurs associés aux G-protéines » génère des messages à la fois redondants et uniques en fonction de leur association aux G-protéines. Brièvement, l'activation des récepteurs provoque le remplacement d'un GDP sur la sous unité α de la G-protéine par un GTP, à l'origine d'une signalisation par la phosphorylation de messagers effecteurs. Des exemples incluent l'activation de la $PLC\beta$ qui aura des effets synergiques à l'activation de la $PLC\gamma_2$ par le collagène; l'activation de l'adenylyl cyclase qui provoquera une suppression de l'activité inhibitrice de l'AMPC; l'activation des membres de la famille Rho et Rac impliqués dans la transformation du cytosquelette. L'importance des mécanismes de redondance est illustrée par l'existence d'au moins dix formes de la sous-unité α des G-protéines et par l'absence de phénotypes très manifestes de déficiences créées par élimination par « knock out » de certains de ces gènes chez la souris [29, 32].

La perpétuation de l'agrégation survient après l'établissement de ponts de fibrinogène entre les plaquettes et résulte, via une signalisation « outside-in » médiée par l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [33], en une fusion étanche entre les plaquettes et en la rétraction du caillot via l'interaction de complexes actine/myosine du cytosquelette. La liaison du fibrinogène à l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ résulte en une augmentation de la phosphorylation via les tyrosines kinases Src et Syk, impliquant des effecteurs importants dans la rétraction du caillot et dans la modulation de l'affinité d'autres molécules d'adhésion interplaquettaires (eg. : PECAM-1, JAM-A et JAM-C). Quoique l'importance relative du rôle de ces protéines soit encore peu comprise, certains couples récepteurs-ligands comme ceux de la famille Eph kinases/Eprines ou Gas6/récepteur de Gas6 ont un rôle potentiellement important dans la signalisation interplaquettaire et la création d'un caillot ferme [34, 35]. Enfin, la protéine transmembranaire CD40L, présente dans les granules α et exposée à la surface membranaire lors de l'activation plaquettaire, relâche un peptide de sa région extracellulaire lors de son exposition (CD40L soluble). Le CD40L soluble interagit avec son récepteur, le CD40, sur la surface plaquettaire et possiblement directement avec l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ via une séquence de liaison avec les intégrines « KGD » présente sur le CD40L [36]. Cette séquence offre le potentiel d'amplifier les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlés par cette intégrine.

Chapitre 2

Athéromatose et antiplaquettaires

2.1 L'athéromatose

2.1.1 Pathophysiologie

L'athéromatose est une pathologie dégénérative et inflammatoire de la paroi vasculaire qui débute par la formation d'une plaque athéromateuse et qui culmine par des manifestations thrombotiques aiguës telles que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ischémique ou la thrombose artérielle périphérique.

Les lésions d'athérosclérose sont des épaissements asymétriques de la paroi interne de la paroi artérielle, l'intima. La manifestation initiale de ces lésions consiste en la formation de stries lipidiques qui sont constituées principalement de macrophages chargés de matériel lipidique (cellules spumeuses) ainsi que de lymphocytes T. Cette lésion se transforme en athérome, une plaque composée de cellules spumeuses, d'amas lipidiques extracellulaires entourés d'une coque de cellules musculaires lisses et d'une matrice riche en collagène. Quoique l'accroissement de la taille de cette lésion, la prolifération musculaire lisse et le spasme coronarien puissent contribuer aux symptômes ischémiques et à l'occlusion artérielle, environ deux tiers des événements artériels occlusifs sont reliés à une activation de la plaque athéromateuse médiée par des cytokines pro-inflammatoires, une rupture de l'endothélium et une exposition de la surface sous endothéliale

menant ultimement à l'activation plaquettaire et la formation d'un thrombus endoluminal [37].

La thrombose d'une artère est l'événement culminant d'un long processus qui débute par le recrutement de monocytes et de lymphocytes dans la paroi vasculaire. L'infiltration et la rétention de LDL dans l'intima sont possiblement à l'origine de ce processus, en particulier dans des artères dont la force de cisaillement moyenne est faible mais dont la composante oscillatoire est élevée [38]. L'oxydation et la dégradation enzymatique de ces LDL provoquent l'activation des cellules endothéliales et la synthèse locale de cytokines inflammatoires, de chemokines et de protéases. L'adhésion des monocytes et des lymphocytes à la paroi vasculaire est facilitée par l'expression de contre-récepteurs de ICAM-1, VCAM-1 et de sélectines dont les récepteurs sont exprimés sur la surface des cellules endothéliales activées. Les chemokines localement produites provoquent la migration des cellules inflammatoires dans la région sous-intimale. Il s'en suivra une amplification de la réaction inflammatoire locale, un processus de remodelage local ainsi qu'une réaction systémique provoquant un phénotype prothrombotique.

Le phénomène de thrombose d'une plaque athéromateuse semble avoir une composante locale et systémique. D'une part, certaines plaques sont à haut risque de fissure de par leur grande quantité de lipides extracellulaires, une accumulation dense de macrophages et une coque fibreuse mince. Des cystéines protéases et plusieurs métalloprotéinases sont à l'origine du processus de remodelage de la paroi vasculaire et peuvent affaiblir la coque fibromusculaire de la plaque athéromateuse. Ceci est démontré par la formation particulière de fissures à l'endroit de la plaque

où la coque fibreuse est la plus mince et la plus infiltrée de cellules inflammatoire [39]. Cette fissure expose des phospholipides à charge négative, le facteur tissulaire et des protéines à propriétés adhésives pour les plaquettes, favorisant le développement d'un thrombus local [40].

D'autre part, plusieurs anomalies prothrombotiques ont été observées dans la population à risque de thrombose artérielle. Tout d'abord, plusieurs facteurs augmentent le risque de thrombose artérielle : le tabagisme [41], l'élévation des LDL [42] et l'hyperglycémie [43] sont souvent présents au moment de l'événement thrombotique. Cette thrombophilie artérielle est associée à une augmentation de l'expression du facteur tissulaire circulant [44], du nombre de microparticules circulantes [45] et du nombre de cellules apoptotiques circulantes [46]. On observe également une hyperagrégabilité plaquettaire [47] et une augmentation des marqueurs plasmatiques d'un état inflammatoire comme le fibrinogène et la protéine réactive C [48].

Le rôle des plaquettes dans l'évolution de la plaque athéromateuse demeure controversé et possiblement de nature secondaire alors qu'elles contribuent de façon majeure à la thrombose artérielle [49]. Certains modèles suggèrent en effet un rôle des plaquettes dans la progression de la plaque athéromateuse [50]. En réponse à des signaux inflammatoires, les cellules endothéliales sécrètent davantage de fvW, pouvant ainsi recruter et activer des plaquettes à proximité de lésions athéromateuses. Cette interaction pourrait influencer l'évolution de la plaque directement par la libération de facteurs d'inflammation (eg. ligand du CD40) et de croissance (eg. PDGF), ou indirectement par l'expression de P-sélectine sur la

membrane plaquettaire activée. Cette expression de P-sélectine pourrait contribuer au recrutement de monocytes portant son récepteur, le PSGL-1. Le rôle majeur des plaquettes dans la formation d'un thrombus est établi par la démonstration de la relâche abrupte de TxA₂ lors de thrombose coronarienne [51] et indirectement par la réduction de 50% du risque d'infarctus du myocarde chez des patients en angine instable prenant de l'aspirine [52]. En plus d'être soumises à l'adhésion médiée par l'exposition du collagène et autres molécules adhésives au niveau de la plaque rompue, les plaquettes sont activées suite à la génération de TxA₂, suite à la sécrétion d'ADP des granules denses plaquettaires et suite à la formation de thrombine liée à l'expression locale du facteur tissulaire.

2.1.2 Épidémiologie et impact social

Les maladies cardiovasculaires incluent les pathologies du cœur, des vaisseaux coronariens ainsi que des artères et veines de l'organisme. Malgré une diminution du taux de ces maladies d'environ 25% dans les 10 dernières années, elles demeurent la cause principale de décès en Amérique du Nord. Pour 2004, le nombre de décès par maladie cardiovasculaire au Canada était estimé à plus de 72,338 alors qu'il est chiffré à 869,700 aux États-unis, représentant environ 35% de tous les décès. Ces chiffres incluent les 39,311 et 451,300 décès par maladie cardiaque ischémique au Canada et aux États-unis respectivement. Au Canada, d'autres manifestations de l'athérombose sont à l'origine de 863 décès par infarctus cérébral et de 102 décès par thrombose ou embolie artérielle périphérique [53, 54].

En plus de représenter une cause importante de mortalité, les conséquences de l'athérombose constituent un fardeau médical significatif. En plus des 70,000

infarctus du myocarde traités annuellement au Canada, des 50,000 AVC ou des 40,000 arrêts cardiaques imprévus répertoriés, plusieurs ressources de soins de santé sont consommées pour le dépistage de l'athérombose, l'identification et le traitement des facteurs de risque, le traitement des épisodes aigus incluant la revascularisation par méthode endovasculaire ou chirurgicale ainsi que pour le traitement et la prise en charge des séquelles telles que l'insuffisance cardiaque congestive, l'hémiplégie, l'aphasie, l'amputation et ultimement la perte d'autonomie. On évalue que 2,8 millions d'hospitalisations ont eu lieu en 2004 (soit 15,4% du total de toutes les hospitalisations annuelles au Canada) en relation avec la maladie cardiovasculaire.

On évalue qu'il existe une manifestation de la maladie cardiovasculaire chez 5,6% des Canadiens âgés de plus de 20 ans. Cette prévalence augmente de façon importante avec l'âge, pour s'établir à 17,6% pour la strate des 65-79 ans et 28% chez les 80 ans et plus. De façon encore plus frappante, 8 canadiens sur 10 présentent au moins un facteur de risque de l'athérombose (tabagisme, éthylisme, inactivité physique, obésité, dyslipidémie, hypertension artérielle ou diabète). Le coût social des maladies cardiovasculaires a été estimé au Canada à environ 18 milliards de dollars annuellement lorsque l'on y inclut les frais médicaux, les coûts hospitaliers, la perte de revenu et la perte de productivité associée à la morbidité et à la mortalité cardiovasculaires [55]. Cette somme a été estimée à 449 milliards de dollars aux États-Unis [54].

2.1.3 Traitement

Le traitement de l'athérombose vise essentiellement à prévenir les complications ischémiques reliées aux sténoses vasculaires (angine stable, claudication des membres inférieurs) ainsi qu'à prévenir la thrombose elle-même (infarctus du myocarde, ICT, AVC, thrombose artérielle périphérique). On parlera ici de prévention primaire en l'absence de symptôme préalable de la maladie athérosclérotique et de prévention secondaire lorsqu'une complication sténotique ou ischémique est survenue chez un individu. Le traitement de l'athérombose diffère de façon importante en fonction du contexte clinique, du site de la thrombose et du délai de présentation entre l'initiation du processus pathologique et la prise en charge médicale.

Des recommandations concernant la prévention primaire et secondaire de l'athérombose font l'objet de mises à jour régulières par des sociétés Canadiennes [56], Américaines [57, 58] ainsi que par plusieurs autres sociétés savantes de la planète. Les recommandations les plus récentes proviennent de l'American College of Chest Physicians dans leur 8^e édition de ces guides de pratique et ne touchent que la prévention antithrombotique de l'athérombose. De façon très sommaire, l'aspirine à une dose de 75-100 mg par jour à long terme est recommandée autant pour la prévention primaire chez des individus à risque modéré (> 10% risque en 10 ans) d'un événement thrombotique que pour la prévention secondaire de l'angine stable, du SCA sans élévation du segment ST et de l'infarctus du myocarde. L'ajout de 75 mg de clopidogrel par jour pour 12 mois à l'aspirine est suggéré en présence d'un SCA avec ou sans élévation du segment

ST. Pour la prévention de la thrombose associée à la mise en place de tuteurs coronariens, une double thérapie à base d'aspirine et de clopidogrel pour au moins 4 semaines est suggérée si le tuteur est non médicamenté et pour au moins 12 mois si le tuteur est médicamenté. L'ajout d'antagonistes de la vitamine K est surtout recommandé, en association avec l'aspirine et le clopidogrel, en présence de pathologies concomitantes justifiant son emploi, comme la fibrillation auriculaire ou une thrombose intracardiaque. Une mise à jour de 38 pages en 2007 d'un guide de pratique rédigé en 2004 publié de façon conjointe par l'American College of Cardiology et l'American Heart Association en collaboration avec le Canadian Cardiovascular Society et appuyé par l'American Academy of Family Physicians fait état de plusieurs interventions essentielles à la prévention et au traitement de l'athérombose, incluant l'analgésie, les β -bloqueurs, la mise en place de soins d'intervention d'urgence, les interventions de reperfusion médicale (thrombolyse) et interventionnelle (ICP), la chirurgie coronarienne, les agents antithrombotiques (héparine non fractionnée, héparine de faible poids moléculaire, pentasaccharide), les antiplaquettaires, les antivitamines K, les mesures antitabagiques, le traitement de l'hypertension artérielle, la prise en charge diététique, la promotion de l'activité physique, le traitement de la dyslipidémie, le traitement de l'obésité et le traitement du diabète. Des guides de pratique ont également été rédigés pour la prévention et le traitement des AVC [59, 60] et de la maladie vasculaire périphérique [61, 62]. Ces guides de pratique soulignent le rôle central de l'aspirine dans la prévention de l'athérombose en association avec la prise en charge des facteurs de risque réversibles (obésité, diabète, hypertension artérielle, dyslipidémie, inactivité

physique, tabagisme). Encore en 2008, le clopidogrel est considéré comme une alternative valable aux patients allergiques ou intolérants à l'aspirine alors que la thérapie combinée aspirine et clopidogrel n'a pas démontré de bénéfices majeurs pour en justifier l'utilisation dans la plupart des indications [63].

2.2 Les antiplaquettaires

2.2.1 Acide acétylsalicylique

L'acide acétylsalicylique (AAS), mieux connu sous le nom d'aspirine, est un médicament aux propriétés analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et antiplaquettaires. Il s'agit du médicament le plus consommé à l'échelle mondiale. Environ 35,000 tonnes, soit 100 milliards de comprimés, sont produites chaque année. Il s'agit également d'un des plus vieux médicaments. Des extraits de l'écorce du saule (*salix* en latin) sont utilisés depuis l'Antiquité pour ses vertus analgésiques et anti-inflammatoires. Les premiers écrits sur papyrus décrivant cette utilisation des salicylates datent de 1550 av. J.-C., à l'époque des pharaons égyptiens de l'empire moyen. Le médecin Grec Hippocrate (460-377 av. J.-C.) a également décrit les effets thérapeutiques provenant de la chique de feuilles de saule. D'autres écritures au fil des âges traitent des salicylates, incluant l'enseignement des autochtones aux nouveaux colons Canadiens sur l'utilisation d'infusions de thé des bois pour soulager la fièvre. Le développement moderne de l'AAS est attribué au père Edward Stone qui étudie l'effet de l'écorce de saule sur des sujets humains et publie ses résultats au « Royal Society » en 1763. L'isolation de petites quantités de salicin débute en 1826 alors que sa synthèse est possible à compter de 1852. Kolbe, qui deviendra ultimement employé de la compagnie

Bayer, développe un procédé efficace de synthèse de l'acide salicylique en 1860 qui mène à une production de masse et sa commercialisation. Dans l'espoir de trouver un composé moins toxique pour l'estomac que l'acide salicylique et dans l'espoir d'aider son père atteint d'une arthropathie sévère, Hoffman décrit en 1897 la synthèse de l'AAS qui sera commercialisée par Bayer en 1899. Quoiqu'il fût suspecté dès 1891 que l'acide salicylique pouvait entraîner un saignement muco-cutané chez certains patients, l'effet antiplaquettaire de l'AAS n'a été établi qu'à partir de 1967 alors que Weiss a reconnu que l'AAS inhibe l'activation plaquettaire induite par le collagène. Ceci fut supporté par la découverte de Sir John Vane en 1969 de l'inhibition de la thromboxane synthétase par l'aspirine, lui valant le prix Nobel de médecine en 1982 [64, 65].

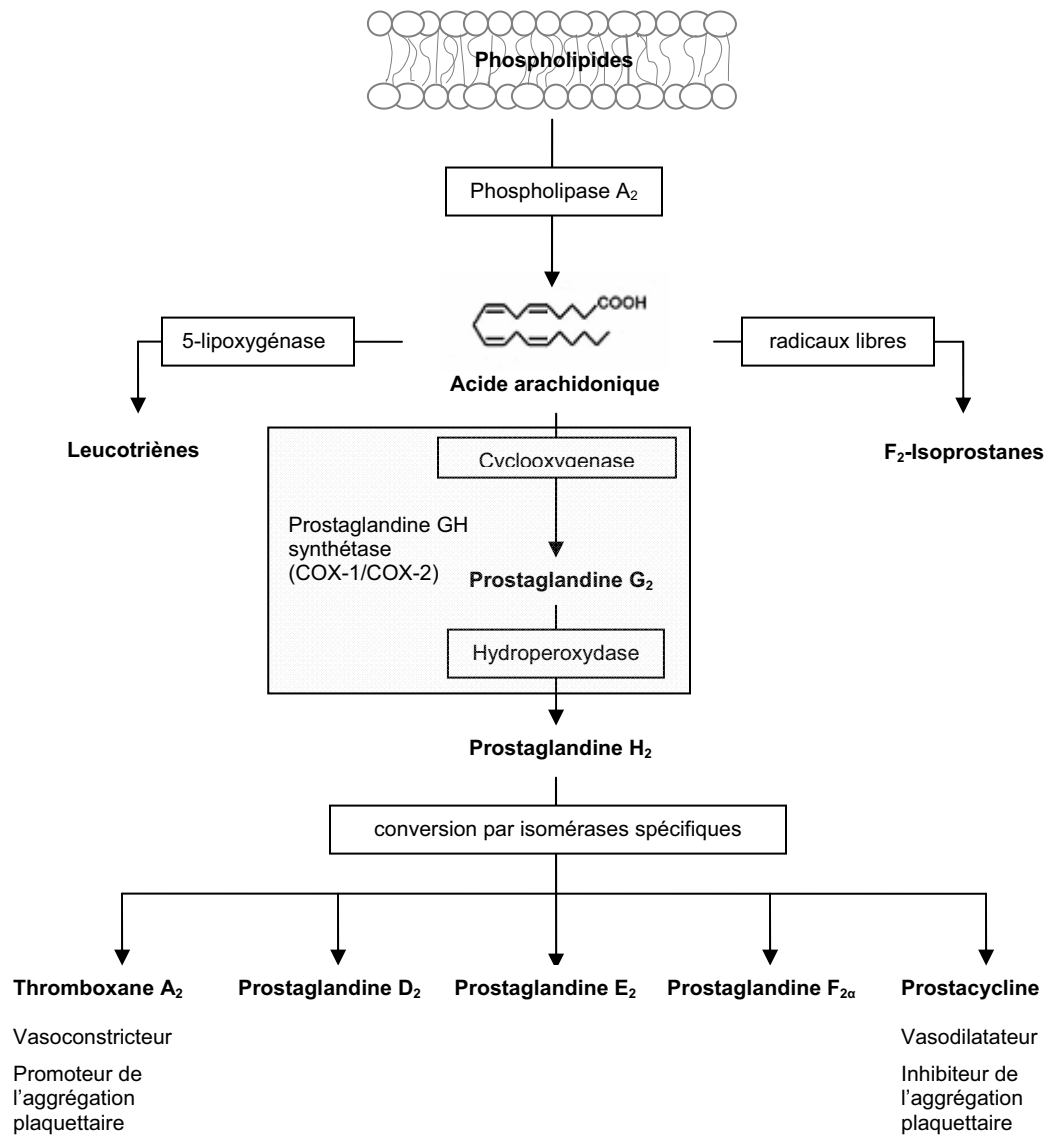
Loin du poétique saule blanc du Père Edward Stone, l'acide salicylique est de nos jours synthétisé à partir du fractionnement du goudron de charbon ou de produits pétroliers et acétylé par la suite pour former l'aspirine. L'aspirine est absorbée rapidement par l'estomac et l'intestin grêle proximal par diffusion passive. Le pic de la concentration plasmatique après la prise orale d'aspirine survient après 30 à 40 minutes alors qu'il peut être de 3 à 4 heures dans le cas d'un comprimé d'aspirine enrobé. La biodisponibilité orale de l'aspirine non enrobée est d'environ 40-50% malgré qu'une partie importante de l'inhibition de la COX semble survenir dans la circulation portale. Malgré une courte demi-vie de 20 minutes, l'effet de l'aspirine sur la COX plaquettaire est irréversible compte tenu de l'incapacité des plaquettes de synthétiser de nouvelle enzyme. L'effet de l'aspirine sur les plaquettes peut donc persister durant toute la durée de vie de la plaquette – soit environ 10

jours. La récupération clinique de l'activité COX après une prise unique d'aspirine sera donc d'environ 10% par jour.

Le mécanisme d'action principal de l'aspirine provient de l'inactivation de l'enzyme prostaglandine H (PGH) synthase. Cette voie métabolique débute par la libération d'acide arachidonique de la membrane cytoplasmique via l'enzyme phospholipase A₂. L'AA est ensuite transformé par deux voies métaboliques différentes; la première dépend de l'enzyme 12-lipoxygénase et résulte en la formation de plusieurs leucotriènes; la deuxième dépend de la PGH synthase, qui génère plusieurs prostaglandines (figure 3). La PGH synthase est une enzyme bifonctionnelle qui transforme via son activité cyclooxygénase l'AA en PGG₂ et qui par la suite transforme par peroxydation le PGG₂ en PGH₂. La transformation de la PGH₂ par des enzymes diverses va conduire à la synthèse de plusieurs médiateurs importants de la fonction cellulaire incluant le PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (la prostacycline) et la thromboxane A₂ (TxA₂). La PGH synthase, aussi connue sous le terme « cyclooxygénase » (COX), existe sous 2 isoformes, COX-1 et COX-2. La COX-1 est une enzyme constitutive de la majorité des cellules, incluant les cellules rénales, gastriques, vasculaires ainsi que les plaquettes. Elle joue un rôle important dans la régulation du flot rénal, dans la protection de la muqueuse gastrique ainsi que dans l'activation et l'agrégation plaquettaires. La COX-2 est retrouvée de façon constitutive dans l'endothélium de la microcirculation et est responsable de la synthèse de la prostacycline. Par ailleurs, sa production peut être induite dans des cellules inflammatoires afin de participer à la génération d'une réaction inflammatoire médiée par les prostaglandines. L'aspirine agit en diffusant au travers

d'un canal hydrophobe et se lie à l'arginine 120 de la COX. Elle acétyle par la suite le résidu sérine 529 de la COX-1 ou le résidu sérine 516 de la COX-2, bloquant ensuite l'accès de l'AA à l'enzyme [66]. L'effet inhibiteur de l'aspirine est environ 170 fois plus grand sur la COX-1 que sur la COX-2 [67], ce qui explique la nécessité de doses d'aspirine aussi faibles que 30 mg quotidiennement pour observer un effet anti-plaquettaire (médié par la COX-1). Des doses d'aspirine beaucoup plus élevées sont nécessaires pour obtenir un effet anti-inflammatoire (médié par la COX-2).

Figure 3. Métabolisme de l'acide arachidonique.



L'équilibre dans l'inhibition relative de la COX-1 par rapport à la COX-2 semble important dans l'index thérapeutique de l'aspirine. Il en est de même pour les inhibiteurs plus spécifiques pour la COX-2. Alors que les jeunes plaquettes (plaquettes réticulées) expriment la COX-1 et la COX-2 [68], les plaquettes matures n'expriment qu'une source non régénérable de COX-1 alors que l'endothélium

vasculaire exprime une source régénérable de COX-1 et de COX-2. Par ailleurs, les plaquettes produisent surtout de la TxA₂ à partir de la PGH₂ alors les cellules endothéliales génèrent surtout de la prostacycline. Alors que la TxA₂ possède des propriétés agonistes sur la fonction plaquettaire, vasoconstrictrices et prolifératives sur les cellules musculaires lisses vasculaires, la prostacycline a plutôt des effets antagonistes sur l'agrégation plaquettaire en plus d'induire une vasodilatation et d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Cette opposition des activités prothrombotiques et proathérogéniques de la TxA₂ et des propriétés inverses de la prostacycline pourrait théoriquement indiquer l'utilisation de faibles doses d'aspirine afin d'inhiber la COX-1 en affectant le moins possible la COX-2, d'autant plus que la COX-2 endothéliale peut être régénérée rapidement après la courte durée d'action de l'aspirine *in vivo*, contrairement à la COX-1 de la plaquette anuclée. Cependant, une diminution constante d'environ 25% des événements vasculaires majeurs en situation de prévention secondaire observée dans plusieurs études utilisant des doses d'aspirine variant de 80 à 325 mg par jour ne suggère pas d'effet de dose important dans cet intervalle thérapeutique quoique la toxicité, principalement gastrique, augmente de façon proportionnelle à la dose [52]. Ceci justifie la dose suggérée de 80-100 mg die pour la majorité des indications cliniques. Par ailleurs, l'effet prothrombotique récemment documenté des inhibiteurs sélectifs de COX-2 pourrait être imputable à un déséquilibre créé par génération soutenue de la TxA₂ face à une suppression de l'activité de la prostacycline [69, 70].

En plus de l'action prédominante de l'aspirine sur la fonction plaquettaire, des études ont aussi suggéré d'autres mécanismes pour expliquer ses effets cliniques dont l'importance demeure à établir. Ces effets incluent une diminution de l'inflammation par la régulation de la synthèse plaquettaire d'inteleukine-1 β [71]; une diminution de la génération de radicaux libres pouvant diminuer l'oxydation des LDL [72]; une amélioration de la dysfonction endothéliale [73] et un effet favorable sur les interactions plaquettes-neutrophiles [74]. Ces effets contribuent tous à divers niveaux dans la pathogenèse de l'athérombose.

2.2.2 Inhibiteurs des récepteurs de l'ADP

Le récepteur plaquettaire de l'ADP a un rôle important dans l'athérombose tel que démontré par l'efficacité démontrée des inhibiteurs de ce récepteur en clinique. Cette classe de molécules se divise en thiényridines, en antagonistes directs de P2Y₁₂ et en antagonistes du P2Y₁.

Les thiényridines comprennent trois molécules principales, soit la ticlopidine, le clopidogrel et le prasugrel. Ces trois molécules sont similaires sur le plan structurel et n'ont aucune activité directe *in vitro*. Leur activité est liée à un métabolite actif obtenu par une activation hépatique *in vivo* via le cytochrome P450. Ces métabolites actifs contiennent un radical thiol et agissent tous en formant un pont disulfure avec le récepteur P2Y₁₂ causant une inactivation irréversible du récepteur et empêchant la liaison de ce récepteur avec son agoniste, l'ADP. Tout comme l'aspirine, la récupération de la fonction plaquettaire après le sevrage du médicament dépend davantage de la production de nouvelles plaquettes par la

moelle osseuse que de l'élimination biologique du médicament. La demi-vie biologique des thiénoxyridines est par conséquent d'environ 7 jours.

La ticlopidine (Ticlid®) est rapidement absorbée et sa concentration plasmatique est maximale après 1 à 3 heures avec une dose de 250 mg. Les niveaux plasmatiques triplent et se stabilisent après une période de 2 à 3 semaines de prise quotidienne. La demi-vie d'élimination varie de 24 à 36 heures après une dose unique et est d'environ 96 heures après des doses répétées. Ces caractéristiques pharmacocinétiques ont été corrélées à une absence de protection clinique durant les deux premières semaines d'utilisation dans une étude portant sur le traitement de l'angine instable à la dose recommandée de 250 mg PO BID [75]. L'utilisation des thiénoxyridines a été freinée jusqu'à présent par la démonstration d'un bénéfice similaire ou marginalement supérieur à l'aspirine dans plusieurs études randomisées pour la prévention d'événements thrombotiques en situation de prophylaxie à long terme. L'approbation du clopidogrel ainsi que des effets adhésifs associés à la ticlopidine tels que l'hypercholestérolémie, la neutropénie, la thrombocytopénie, l'anémie aplastique et le purpura thrombotique thrombocytopénique ont mené au retrait de la ticlopidine du marché Canadien en 2007.

Le clopidogrel (Plavix®) est rapidement métabolisé en faveur de son métabolite actif, SR 26334, via l'action des isoenzymes CYP3A4 et 3A5 du cytochrome P450. Cette étape d'activation implique la possibilité d'interactions médicamenteuses, tel que suggéré de façon controversée avec l'atorvastatin [76]. L'effet biologique apparaît également à varier en fonction de polymorphismes des isoenzymes CYP 3A4 et 3A5 [77]. Afin de pallier au délai d'action maximal de 4 à 7 jours avec les

doses quotidiennes de 75 mg, plusieurs études suggèrent qu'une dose de charge orale de 600 mg de clopidogrel permette d'obtenir un effet antiplaquettaire maximal après 2 heures, offrant ainsi un avantage significatif en situation aiguë telle que dans le traitement des SCA [78] ou en préparation d'une ICP [79]. L'utilisation du clopidogrel en clinique est actuellement limitée à la thérapie combinée avec l'aspirine suivant une ICP avec mise en place d'un tuteur intra-coronarien et comme thérapie de remplacement à l'aspirine en situation d'intolérance ou d'allergie [57, 59, 62].

Le prasugrel est une substance en cours d'investigation possédant des avantages pharmacodynamiques sur le clopidogrel. La dose de charge suggérée pour le prasugrel de 60 mg offre une inhibition plaquettaire plus rapide que les 600 mg de clopidogrel alors que la dose d'entretien de 10 mg de prasugrel inhibe la fonction plaquettaire de façon plus importante que les 75 mg de clopidogrel [80]. Dans la première étude de phase III comparant le prasugrel au clopidogrel (TRITON-TIMI 38), une diminution statistiquement significative des événements vasculaires majeurs après ICP de 19% en faveur du prasugrel a été identifiée, au prix d'une augmentation de 32% des risques d'hémorragies majeures [81]. Une limitation importante de cette étude concerne l'utilisation d'une dose de charge de 300 mg de clopidogrel avant l'ICP alors que la dose actuellement d'usage est de 600 mg. La balance optimale des risques thrombotique et hémorragique demeure donc la considération principale dans la sélection de la thérapie antiplaquettaire.

D'autres inhibiteurs des récepteurs de l'ADP sont en développement. Le cangrelor (AR-C69931MX), l'AZD6140 et le PRT060128 sont des inhibiteurs

réversibles de P2Y₁₂ ne nécessitant pas d'activation biologique préalable et faisant l'objet d'études cliniques de phase II/III. Le cangrelor et le PRT060128 sont disponibles en formulation intraveineuse, offrant le potentiel d'une activité plus rapide en situation d'ICP ou de SCA [82]. Le MRS2179 et le MRS2500 sont deux inhibiteurs de P2Y₁ dont l'expérience se limite aux modèles animaux. Ils offriraient la possibilité d'un blocage des deux récepteurs principaux de l'ADP dans le futur [29].

2.2.3 Antagonistes de l'intégrine α IIb β 3

Contrairement à l'aspirine, aux thiényopyridines et au dipyridamole qui agissent en bloquant partiellement les mécanismes d'activation plaquettaire, les antagonistes de l'intégrine α IIb β 3 bloquent la voie finale commune de l'agrégation plaquettaire. Ces agents offrent la possibilité d'un blocage complet de l'agrégation plaquettaire de façon indépendante des mécanismes d'activation sous-jacents. Les inhibiteurs utilisés en clinique se résument aux agents intraveineux abciximab, tirofiban et eptifibatide. D'autres agents oraux ont fait l'objet d'études de phase III (sibrafiban, xemilofiban, orbofiban, lotrafiban) mais leur développement a été interrompu suite aux résultats décevants des études individuelles et suite à la conclusion d'une méta-analyse de quatre études suggérant une augmentation fortement significative de la mortalité associée à l'utilisation de ces agents oraux [83].

L'abciximab (ReoPro®) est un fragment Fab chimérique (murin/humain) dérivé de l'anticorps monoclonal murin 7E3. Il possède un site de liaison de haute affinité avec la sous-unité β 3 de l'intégrine et possède donc une liaison croisée avec le récepteur de la vitronectine (α v β 3) et possiblement avec la sous-unité β 2 de

l'intégrine leucocytaire $\alpha M\beta 2$ (CD11b/CD18). L'effet d'un blocage de ces deux dernières intégrines est inconnu mais pourrait suggérer un profil thérapeutique différent des autres inhibiteurs de cette classe. Une diminution de l'agrégation plaquettaire est observée lorsque $> 50\%$ des récepteurs $\alpha IIb\beta 3$ sont bloqués. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire est complète lorsque le taux d'occupation des récepteurs dépasse les 80%. Le fragment Fab possède une demi-vie plasmatique de 30 minutes quoique la liaison du fragment Fab aux plaquettes persiste pour plus de 14 jours, vraisemblablement par échange du fragment Fab entre les plaquettes. Malgré cela, l'agrégation plaquettaire revient généralement à la normale dans les 12 à 26 heures suivant la fin de l'infusion.

Le tirofiban (Aggrastat®) est un dérivé non peptidique de la tyrosine se liant de façon réversible à $\alpha IIb\beta 3$ sans réaction croisée significative avec d'autres intégrines. Son élimination rénale et hépatique détermine une demi-vie plasmatique de 1,6 heure avec un effet antiplaquettaire persistant environ 4 heures après la fin de la perfusion.

Le serpent *Sistrurus miliarius barbouri* sécrète un venin nommé barbourine qui contient une séquence KGD modifiée par substitution d'une lysine pour une arginine afin d'obtenir une molécule contenant une séquence RGD. Cette séquence lie de façon spécifique l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. L'eptifibatide (Integrilin®) est un heptapeptide dérivé de ce venin modifié. Son élimination est principalement rénale et sa demi-vie est d'environ 1 heure. La particularité de ce peptide concerne la surestimation de son effet biologique lorsqu'il est évalué *in vitro* avec du sang citraté.

Outre le saignement accru observé avec ces molécules, le traitement avec les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est parfois compliqué d'une thrombocytopénie dont le mécanisme semble immun et qui pourrait résulter de l'exposition d'un néoépitope sur la surface de l'intégrine modifiée par l'inhibiteur.

L'utilité des antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est généralement réservée aux ICP, particulièrement lors du traitement invasif précoce du syndrome coronarien aigu sans élévation du segment ST [84].

2.2.4 Dipyridamole

L'évolution en dent de scie du dipyridamole en clinique provient autant de la controverse persistante concernant son mécanisme d'action principal que des résultats contradictoires des études cliniques qui soutiennent ses indications. Il s'agit d'un dérivé pyrimidopyrimidine synthétisé il y a déjà plus d'une cinquantaine d'années. Les formulations initialement utilisées en clinique nécessitaient un pH gastrique aussi faible que 2 pour assurer une absorption optimale [85]. La reconnaissance d'une absorption pauvre, particulièrement marquée chez plusieurs sujets âgés présentant une hypochlorhydrie gastrique ou prenant une thérapie antiacide, a mené au développement d'une formulation à libération soutenue de microgranules de dipyridamole et d'acide tartarique enrobées d'une membrane protectrice de cellulose provoquant un pH ambiant de 2 assurant une absorption prévisible du médicament. La formulation actuellement utilisée en clinique, l'Aggrenox®, utilise ce principe de microgranules de dipyridamole et contient également 25 mg d'aspirine par comprimé. La demi-vie terminale de 10h du dipyridamole a suggéré le développement clinique en prise biquotidienne tel

qu'utilisé en clinique de nos jours. L'élimination du dipyridamole est principalement hépatique par un mécanisme de glucuronisation [52].

Initialement reconnu pour ses propriétés vasodilatatrices et toujours utilisé de nos jours en imagerie nucléaire pour cette fonction (test au thallium-dipyridamole) afin de détecter des zones de sténose coronarienne, les mécanismes d'action du dipyridamole sont vraisemblablement multiples. Un des mécanismes les plus étudiés est l'inhibition du transporteur cellulaire de l'adénosine résultant en une augmentation des concentrations interstitielles et plasmatiques d'adénosine. Via ses récepteurs A₂ sur la membrane cytoplasmique plaquettaire, l'adénosine provoque une augmentation de l'AMPc intraplaquettaire et inhibe l'activation plaquettaire. De façon intéressante, l'effet du dipyridamole n'est pas identifiable *in vitro* lorsqu'étudié sur du PRP. Cet effet est démontrable par contre sur des études en sang total, possiblement par la contribution de l'adénosine libérée des érythrocytes [86]. Deuxièmement, le dipyridamole est un inhibiteur des phosphodiésterases, particulièrement de l'isoforme PDE-5 responsable de l'inactivation du GMPc. Cet effet est associé à une potentialisation de l'effet du NO sur l'inhibition de l'activation plaquettaire [87]. Un effet sur la PDE de l'AMPc a également été décrit mais ne semble pas présent aux concentrations de dipyridamole obtenues par les doses conventionnelles utilisées en clinique. D'autres effets potentiels du dipyridamole incluent une augmentation de la synthèse de prostacycline des cellules endothéliales [88], des effets antioxydants, des propriétés anti-inflammatoires, la relâche *ex vivo* de l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA), la réduction de l'activité procoagulante des vaisseaux sanguins endommagés, l'inhibition de la

prolifération musculaire lisse et la modulation des récepteurs de la membrane plaquettaire [29].

Sur le plan clinique, l'utilité du dipyridamole a connu une renaissance suite à la publication des études ESPS-2 [89] et ESPRIT [90] démontrant une réduction des événements vasculaires majeurs de la formulation dipyridamole microgranulaire et aspirine (Aggrenox®) par rapport à l'aspirine seule en situation de prévention secondaire de sujets ayant présentés des AVC ou des ICT antérieurement. Curieusement, une méta-analyse Cochrane conclut que cet effet préventif est modeste et limité à une population ayant déjà présenté un AVC/ICT par rapport aux autres manifestations de la maladie athérotrombotique, suggérant un mécanisme d'action particulier et possiblement spécifique à la perfusion cérébrale [91].

2.3 La résistance aux thérapies antiplaquettares

2.3.1 Définition

Les termes « résistance à l'aspirine » et « résistance au clopidogrel » ont été utilisés largement dans la littérature pour désigner de façon variable soit l'absence d'effet biologique *in vitro* de ces agents antiplaquettares basé sur des technologies variées ou la survenue d'événements thrombotiques cliniques malgré l'utilisation des ces médicaments. La définition de résistance médicamenteuse pourrait effectivement être double. La *résistance biologique* pourrait être définie d'une part comme l'absence d'effet du médicament sur sa cible pharmacologique. Cette définition implique que la cible thérapeutique du traitement est bien connue et qu'il existe une technologie suffisamment précise pour y capturer l'effet. D'autre part, la résistance thérapeutique devrait davantage être considérée comme un *échec*

thérapeutique. Un échec thérapeutique est effectivement le résultat d'une combinaison de facteurs pathologiques culminant en la survenue d'un nouvel événement thrombotique pouvant évidemment être indépendant de l'effet thérapeutique du traitement antiplaquettaire.

Malgré l'absence de définition consensuelle de la résistance aux antiplaquettaires, le nombre d'études croissant sur le sujet depuis le début des années 2000 (figure 4) génère beaucoup de discussions et de controverse. Tel que discuté extensivement ultérieurement dans ce mémoire (voir section 3.7), un test diagnostique définissant la résistance biologique à un médicament doit être suffisamment précis pour mesurer l'effet désiré. La controverse persistante sur ce sujet est en grande partie reliée au nombre important de technologies utilisées pour étudier ce phénomène avec des résultats largement discordants.

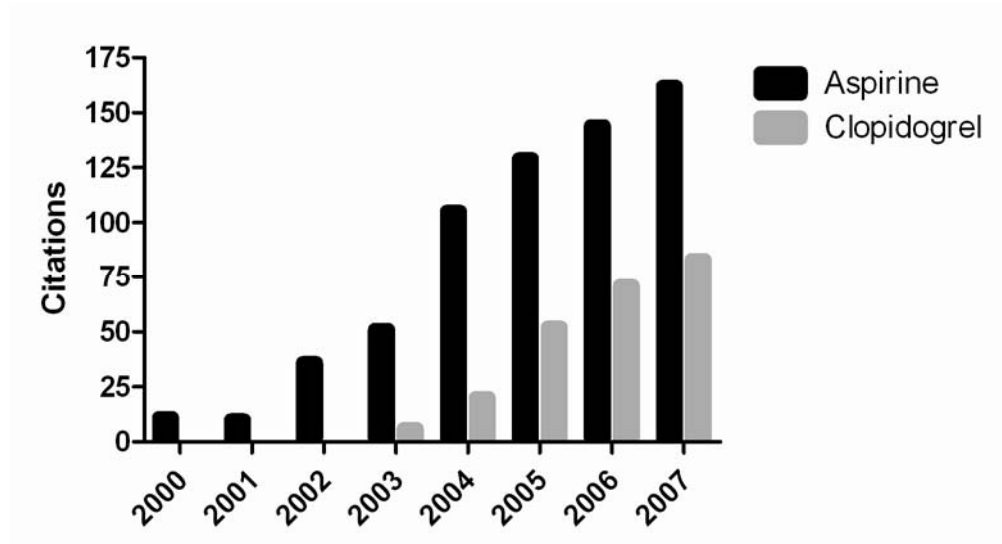


Figure 4. Nombre de citations sur une base annuelle en utilisant les termes « aspirin resistance » et « clopidogrel resistance » (source : HighWire Press®; recherche dans le manuscrit complet sous forme de phrase; inclut toutes les références indexées dans PubMed)

2.3.2 Étiologies et hypothèses

L'effet clinique de l'aspirine est bien établi. Une méta-analyse de plus de 100 études randomisées a démontré que des doses d'aspirine variant de 80 à 325 mg par jour diminuent d'environ 15% la mortalité vasculaire et d'environ 30% les événements vasculaires non fatals dans des populations à haut risque [92].

Des études ayant débuté dans les années 1990 ont suggéré que certains patients ne présentent aucune anomalie à certains tests de fonction plaquettaire malgré l'utilisation de l'aspirine. Des études datant des années 2000 ont démontré que le même phénomène survient avec l'utilisation du clopidogrel. Diverses études ont suggéré qu'un état potentiel de résistance pouvait être associé au sexe féminin [2, 93], à l'âge [2], au tabagisme [2, 94], au diabète [95] et à l'hypercholestérolémie [96]. La prévalence la plus élevée de résistance aux antiplaquettaires est habituellement retrouvée dans des situations d'hyperactivité plaquettaire telles qu'après une ICP ou un pontage coronarien.

La prévalence de la résistance à l'aspirine varie de 0.4-83% dans la littérature [1]. Cette prévalence varie surtout en fonction des techniques utilisées pour définir la résistance et semble plutôt rare dans une population saine lorsque des techniques sensibles à l'effet de l'aspirine sont utilisées [6], suggérant effectivement que des mécanismes acquis sont prédominants afin d'expliquer la variabilité de l'effet biologique de l'aspirine.

Une réponse d'apparence sous optimale à l'aspirine semble associée à un risque accru d'évènements vasculaires [93, 97-99]. Considérant la multitude de facteurs non reliés aux antiplaquettaires pouvant expliquer l'absence d'un effet biologique

durant un traitement, il demeure incertain à savoir si le risque d'un état de « résistance » soit relié à l'absence d'effet biologique d'un traitement ou plutôt à un effet non spécifique d'un état d'hyperactivité de la fonction plaquettaire.

Le facteur le plus important de résistance clinique est sans doute relié à la compliance médicamenteuse inadéquate et à la prescription sous optimale des traitements (tableau II). L'absorption de l'aspirine s'effectue rapidement en général quoiqu'elle puisse être retardée lorsqu'elle le comprimé est sous forme de préparation entérique « enrobée ». Ceci a un effet surtout sur la rapidité d'action du premier comprimé d'aspirine plutôt que sur l'effet d'un traitement chronique [100]. La prise concomitante d'AINS peut interférer de façon compétitive avec l'accès au canal de l'enzyme COX-1 où l'aspirine pénètre avant d'acétyler cette enzyme [101]. Le métabolisme du clopidogrel est plus complexe, nécessitant une activation hépatique par diverses sous fractions du cytochrome P450. Une interaction potentielle a été suggérée à ce niveau par compétition métabolique au niveau du complexe CYP2C19 par l'oméprazole [102] alors qu'un mécanisme similaire impliquant le CYP3A4 a été suggéré et infirmé par certains auteurs avec l'atorvastatin [103]. Le rôle des polymorphismes génétiques dans la réponse aux antiplaquettaires demeure controversé et discuté davantage dans la section 3.6. Quoique des mécanismes non reliés à l'effet thérapeutique des antiplaquettaires semblent l'hypothèse principale actuellement afin d'expliquer la variabilité de la réponse biologique aux antiplaquettaires, très peu d'études ont été publiées afin d'étudier les mécanismes potentiels sous-jacents. Cette hypothèse est supportée par la démonstration d'un état d'hyperactivité plaquettaire basal lorsque les facteurs de

risque présumés d'une réponse biologique sous optimale aux antiplaquettaires sont présents [104-106].

Tableau II. Causes et facteurs de risques possibles de résistance à l'aspirine et au clopidogrel

Causes – Aspirine	Causes - Clopidogrel	Facteurs de risque
<p>Relié à l'inhibition de COX-1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mauvaise compliance • Dose insuffisante • Diminution de l'absorption • Interaction compétitive avec des inhibiteurs réversibles de COX-1 • Production accrue de plaquettes • Polymorphismes de COX-1 et de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ • Glycosylation de COX-1 <p>Non relié à l'inhibition de COX-1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Expression plaquettaire de COX-2 • Libération de thromboxane par expression de COX-2 d'origine monocytaire ou endothéliale. • Libération d'isoprostanes par peroxydation de l'AA • Hyperagrégabilité plaquettaire acquise indépendante de l'activation par la TxA_2 • Hyperagrégabilité plaquettaire héréditaire 	<p>Relié à l'inhibition de P2Y₁₂</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mauvaise compliance • Dose insuffisante • Diminution de l'absorption • Interactions médicamenteuses • Polymorphisme de P2Y₁₂ (haplotype H2) • Polymorphisme de CYP3A4 <p>Non relié à l'inhibition de P2Y₁₂</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hyperagrégabilité plaquettaire acquise indépendante de l'activation de P2Y₁₂ • Hyperagrégabilité plaquettaire héréditaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexe féminin • Age avancé • Inflammation • Tabagisme • Diabète • Obésité • Hypercholestérolémie • Exercice • Syndromes coronariens aigus • Post pontage coronarien • Post ICP

2.3.3 Impact clinique et recommandations

L'importance de la thérapie antiplaquettaire pour le traitement et la prévention de l'athérombose est à l'origine du questionnement aussi marqué sur la variabilité potentielle de ses effets cliniques. La reconnaissance d'un effet sous optimal de l'aspirine ou du clopidogrel pourrait permettre d'ajuster le traitement. Ceci pourrait se faire en augmentant les doses du médicament, en changeant de traitement ou en adoptant une stratégie de thérapie combinée. Les connaissances actuelles sur le phénomène de résistance à l'aspirine ou au clopidogrel soulèvent la possibilité de certains risques en ce qui a trait à des modifications de doses empiriques de ces médicaments. En effet, il pourrait y avoir retrait d'un traitement efficace basé sur le résultat d'un test détectant une hyperactivité plaquettaire non reliée à l'effet thérapeutique du médicament ou bien d'un risque accru de saignement, de toxicité digestive ou autre effet adverse d'une augmentation non justifiée de l'intensité thérapeutique.

L'absence de résultats provenant d'études randomisées à ce sujet ou de sous études biologiques d'études randomisés fait en sorte qu'il est impossible à l'heure actuelle de produire des recommandations quant à la technique optimale pour évaluer l'effet de l'aspirine ou du clopidogrel et qu'il est encore plus difficile d'établir une recommandation basée sur l'évidence d'une modification thérapeutique à apporter en fonction d'un résultat d'une analyse quelconque. Pour ces raisons, des recommandations contre le monitoring de la fonction plaquettaire en pratique clinique ont été formulées par l'ACCP [52], l'ACC/AHA [58], l'ESC [107] et l'ISTH [108]. De nouvelles études cliniques servant à mieux définir le

phénomène de variabilité de la réponse biologique aux thérapies antiplaquettaires sont donc essentielles.

Chapitre 3

Évaluation en laboratoire des antiplaquettaires

3.1 Évaluation globale de l'hémostase primaire

3.1.1 Temps de saignement

Décrit pour la première fois en 1901 [109], le temps de saignement est une des analyses les plus anciennes encore utilisée en clinique de nos jours. Cette étude consiste à produire une incision, soit au niveau du lobe de l'oreille [110] ou de l'avant-bras avec mise en place d'un garrot à pression standardisée [111], et de mesurer l'intervalle du temps de saignement au niveau de la plaie. Cette étude a depuis ce temps été standardisée davantage par l'application de coupures de diamètre et de profondeur contrôlés par des dispositifs commerciaux possédant un mécanisme à ressort activé par un technologiste. Utilisé antérieurement pour prédire les risques de saignements péri opératoires, le temps de saignement souffre d'une pauvre performance dans ce contexte et n'est plus recommandé actuellement pour cette indication [112]. Plusieurs auteurs ont également tenté de prédire l'effet clinique des antiplaquettaires en fonction des résultats du temps de saignement avec des résultats dans l'ensemble décevants. Par exemple, une série d'études par Buchanan ne sont pas parvenues à corréler les résultats du temps de saignement avec d'autres marqueurs biologiques de l'effet de l'aspirine, comme l'agrégation en mode optique induite par l'ADP ou la suppression de la TxB₂ [113], ou à prédire des événements cliniques survenant en cours d'un traitement à l'aspirine. Dans cette dernière étude, 54,7% de 289 patients sous aspirine après une chirurgie de pontage

aorto-coronarien avaient un temps de saignement normal. Après un suivi de 2 ans, 9,5% des “non répondeurs” ont souffert de récurrences d’événements vasculaires par rapport à 6,9% dans le groupe avec un temps de saignement allongé ($p=0.526$) [114].

3.1.2 PFA-100®

La présence de nombreuses limitations pour le temps de saignement a mené au développement d’épreuves automatisées évaluant l’hémostase primaire. L’outil commercial le plus utilisé, le PFA-100® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Deerfield, Illinois), aspire du sang frais dans un tube capillaire provoquant une force de cisaillement constante ($4000-5000 \text{ sec}^{-1}$). La colonne de sang est exposée à une membrane de collagène enduite d’un agoniste plaquettaire (ADP ou épinéphrine) jusqu’au moment de l’occlusion du système par un clou plaquettaire, déterminant un « temps d’occlusion » mesuré en secondes par l’instrument. Cet appareil permet donc d’évaluer la fonction du fvW de même que la fonction plaquettaire d’un échantillon. En raison d’une sensibilité sous optimale, particulièrement à l’égard du dépistage des thrombopathies (sensibilité de 50%), son utilité comme outil de dépistage demeure controversée [115].

L’effet des thérapies antiplaquettaires sur le PFA-100® a été étudié par plusieurs auteurs. L’effet de l’aspirine a été évalué dans la majorité de ces études par la cartouche la plus sensible à l’effet de l’aspirine (collagène et épinéphrine). Une revue récente de 6450 sujets traités avec de l’aspirine a conclu qu’il existe une incidence médiane de « non répondeurs » de 27% et que le phénotype de non répondeur était associé à un risque relatif d’événements vasculaires subséquents de

1,63 (IC95% : 1,16-2,28) [116]. On a aussi conclu à un risque relatif similaire de 2,1 (IC95% : 1,4-3,4) dans une méta-analyse effectuée par un deuxième groupe de chercheurs [99].

Fontana et al. ont fait une évaluation du PFA-100® chez 96 sujets normaux et ont démontré une prévalence de 29% de non répondeurs. Cependant, il n'y avait pas de corrélation entre le statut de répondeur et le profil d'agrégation optique avec l'AA, l'ADP ou le degré de suppression de la TxB₂, suggérant que le PFA-100 est peu sensible aux effets de l'aspirine sur la COX-1. Par ailleurs, le profil de réponse du PFA-100® était plutôt corrélé avec l'activité cofacteur de la ristocétine du fvW (p<0.01) suggérant que l'état de « non répondant » est plutôt un état de pseudo-résistance relié à des facteurs détectés par le PFA-100® mais indépendants de l'effet de l'aspirine [6].

Alors que les deux cartouches du PFA-100® sont très sensibles aux effets des inhibiteurs de l'intégrine α IIb β 3 [117], ces deux cartouches sont relativement insensibles à l'effet du clopidogrel [118]. Ceci renforce l'impression générale que le PFA-100® est peu sensible aux thrombopathies légères.

3.2 Agréométrie

3.2.1 Agréométrie optique

Développées en 1962 par Born pour investiguer des diathèses hémorragiques [119], les technologies appliquées à l'étude de la fonction plaquettaire par agrégation se sont multipliées depuis. La technologie la plus répandue et la plus étudiée consiste en l'évaluation d'un plasma centrifugé, riche en plaquettes (PRP), soumis à l'effet d'un agoniste dans un milieu où une agitation constante est présente

et où la température est contrôlée. La densité optique du PRP est utilisée pour définir une ligne de base à 0% d'agrégation alors que la transmission optique définissant le 100% est établie à partir d'un PPP obtenu par une centrifugation à plus grande vitesse du plasma du même échantillon et donc de densité optique plus faible. Le profil d'agrégation est obtenu par la mesure dynamique de la transmission lumineuse après ajout d'un agoniste au spécimen dont la densité optique va diminuer de façon proportionnelle à l'agrégation des plaquettes. La description des nombreuses adaptations de cette technique, des particularités liées aux conditions de prélèvement et d'analyse ainsi que les nombreux agonistes étudiés dépassent le cadre de ce mémoire et font l'objet de manuels spécialisés [120].

L'utilisation de cette technologie dans l'évaluation de la réponse à l'aspirine varie selon les appareils, les conditions du prélèvement, le type et la concentration des agonistes ainsi que par la dose d'aspirine et la situation clinique des sujets évalués. Le travail le plus cité dans le domaine provient de Gum et al. qui ont évalué 326 sujets avec une maladie coronarienne prenant 325 mg d'aspirine [2]. Il est intéressant de noter que la définition de résistance à l'aspirine utilisée par ce groupe qui est reprise par plusieurs autres groupes, soit une agrégation avec 1,6 mM (0,5 mg/mL) d'AA \geq 20% et une agrégation avec 5 μ M d'ADP \geq 70%, a été basée sur la réponse de 40 sujets normaux analysés dans leur laboratoire, plutôt que sur les valeurs de réponse normale à l'aspirine chez des sujets normaux [2]. Basée sur cette définition, la prévalence de non-réponse à l'aspirine était de 5,5% (révisé en 2006 à 2,8%) [121, 122]. Un deuxième groupe constituant 23,8% de la cohorte a été classé comme semi-résistant, un seul des deux critères de résistance, en général

basé sur le critère de non suppression avec l'ADP. Alors qu'un effet prédictif du statut de non-réponse sur des événements vasculaires récidivants a initialement été publié sur la base de 17 patients non répondants (HR=3,12 IC95% : 1,10-8,90), une correction des données soumise à l'éditeur ne montre plus cette association significative (p=0.25). Cette correction, publiée comme erratum 3 ans après la publication originale, est importante puisque la publication originale est reprise par plusieurs articles de revue et est incluse dans plusieurs méta-analyses sur ce sujet. Pour ajouter à la confusion dans ce domaine, une étude subséquente du même groupe a conclu à une prévalence de « résistance » à l'aspirine de 29% à partir de 332 hommes ayant eu un infarctus du myocarde et ayant été soumis à une intervention coronarienne percutanée [123]. La résistance à l'aspirine était définie par une agrégation de plus de 20% avec 1,6 mM d'AA. Dans une population similaire de 200 patients avec une maladie coronarienne stable, Lordkipadnizé et al. ont démontré que seulement 4% des patients présentaient une agrégation de plus de 20% avec 1,6mM d'AA [124]. Cette variation importante dans l'incidence de « résistance à l'aspirine » suggère qu'il existe plusieurs facteurs techniques ou des circonstances cliniques acquises pouvant moduler la réponse biologique des plaquettes après l'ingestion d'aspirine. Parmi ces facteurs, certaines études ont démontré qu'une évaluation immédiatement après un pontage aorto-coronarien [125] ou après une intervention coronarienne percutanée augmente la prévalence de non-suppression de l'agrégation plaquettaire à l'AA sous aspirine. Le sexe féminin [126] et le diabète [116] ont également été variablement associés à un état de « résistance » à l'aspirine quoiqu'une large étude de 1282 patients arrive à la

conclusion qu'une telle association ne peut être faite lorsque l'agrégation avec l'AA est utilisée puisque la très grande majorité des sujets étudiés ne démontre aucune agrégation à l'AA lors de prise chronique d'aspirine [126]. La conclusion des auteurs suggère que l'aspirine est également efficace chez les hommes et les femmes dans l'inhibition de la COX-1 mais qu'il existe des facteurs plaquettaires indépendants de la COX-1 pouvant expliquer une plus grande réactivité plaquettaire avant et après la prise d'aspirine [126].

Malgré ces considérations, une méta-analyse de 20 études conclut qu'un état de « non réponse » à l'aspirine, défini par une étude en agrégation optique utilisant plusieurs agonistes différents, est possiblement davantage prédictif d'événements coronariens récidivants (incidence de résistance : 16%; OR 3,85; IC95% : 2,5-5,88) que lorsque défini par l'utilisation du PFA-100® (incidence de résistance : 33%; OR 2,94; IC95% : 1.88-4.55) [97].

L'effet sélectif du clopidogrel sur le récepteur P2Y₁₂ suggère que l'ADP soit l'agoniste de prédilection pour évaluer son effet pharmacologique. Par contre, la littérature concernant l'effet biologique du clopidogrel est encore jeune et plusieurs questions persistent quant à la dose optimale d'ADP à utiliser pour effectuer l'agrégation ainsi quant au profil normal de réponse à l'ADP chez des sujets normaux ayant absorbé du clopidogrel. Malgré ces limitations, une méta-analyse de 25 études suggère qu'il existe une relation entre un profil de « non réponse » au clopidogrel et le risque de récurrence d'événements vasculaires (incidence de « résistance » 21% : OR 8.0; 3.4-19.0) [127].

Les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ produisent de façon prévisible un profil en agrégation similaire au profil observé dans la thrombasthénie de Glanzmann. Ces agents, utilisés en clinique, incluent l'abciximab (Reopro®), l'eptafibatide (Integrilin®) et le tirofiban (Aggrastat®). L'abciximab est un anticorps monoclonal contre la sous-unité β3 des intégrines et présente une affinité à la fois pour $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. L'eptafibatide est un heptapeptide contenant une séquence KGD spécifiquement reconnue par $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et ne présente pas de réactivité croisée avec l' $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Le tirofiban est une molécule non peptidique bloquant le site de reconnaissance RGD du $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ uniquement, sans blocage d' $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Le profil d'agrégation plaquettaire de ces trois molécules diffère en fonction de leurs propriétés chimiques et pharmacocinétiques et est utilisé dans des études cliniques comme marqueur de leur activité. L'étude la plus importante a été réalisée par agrégométrie automatisée (voir 3.2.4).

3.2.2 Agrégométrie par impédance

L'agrégométrie optique nécessite plusieurs étapes de centrifugation qui ont le potentiel d'activer les plaquettes *ex vivo*. L'isolement des plaquettes de leur milieu naturel prévient également l'étude des interrelations naturelles entre les plaquettes, les leucocytes et les érythrocytes pouvant être importantes dans la compréhension de l'effet biologique global d'une intervention pharmacologique. L'agrégométrie par impédance permet d'éviter ces inconvénients par une méthode utilisant du sang total frais. Dans cette variation de l'agrégation optique, du sang total (ou des plaquettes isolées) est soumis à une agitation constante dans un milieu à température contrôlée et exposé à un agoniste de l'activation plaquettaire.

Contrairement aux techniques optiques, la mesure de l'agrégation plaquettaire se fera à l'aide d'une électrode présente dans la cuvette de réaction. L'agrégation plaquettaire résultera en une déposition d'amas plaquettaire sur l'électrode créant une augmentation de l'impédance électrique qui est mesurée de façon dynamique par l'appareil [128].

Dans une étude de 66 volontaires sains et de 144 patients coronariens stables sous aspirine [129], un état de non-réponse à l'aspirine a été conclu chez 15% des patients sous aspirine si l'état de non-réponse était défini par une impédance de $> 8 \Omega$ avec 1 mg/L de collagène et chez 12% si une définition de $> 2 \Omega$ avec 0,5 mM d'AA était utilisée. Aucune corrélation entre les valeurs d'impédance avec le collagène et l'AA n'était présente. A noter également que cette définition est dérivée de la réponse habituelle des sujets normaux n'utilisant pas de médicaments plutôt que de l'étude des paramètres de détection de l'effet de l'aspirine chez ces individus normaux.

Un deuxième groupe a effectué une corrélation entre l'agrégométrie par impédance et l'agrégométrie automatisée (*VerifyNow*®). Alors que tous les 50 sujets sains étaient considérés sensibles à l'aspirine selon *VerifyNow*®, 24% ont été jugés résistants selon une suppression insuffisante de l'impédance provoquée par l'AA et deux concentrations de collagène alors que 38% sujets supplémentaires ont été jugés semi-résistants par une inhibition d'agrégation de $< 30\%$ avec une de deux doses de collagène [130].

Afin d'évaluer l'effet du clopidogrel, Hochholzer et al. [131] ont comparé l'agrégométrie optique par impédance et automatisée à des études en cytométrie de

flux chez 27 sujets avant et après la prise de 600 mg de clopidogrel. Quoique ces techniques ont toutes démontré une suppression de l'activité plaquettaire après l'ingestion de clopidogrel, il existe un large degré de chevauchement des résultats obtenus avant et après la prise de clopidogrel, suggérant que ces techniques sont toutes sous optimales pour monitorer l'activité biologique du clopidogrel (voir 3.2.4). Par contre, l'effet des inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ semble être facilement identifiable en agrégométrie optique ou par impédance [132].

3.2.3 Agrégométrie en tube

L'agrégométrie en tube vise à minimiser la composante technique et complexe associée à l'utilisation des agrégomètres classiques. Cette technique simple s'effectue en comparant le décompte plaquettaire, obtenu avec un compteur cellulaire disponible dans tous les laboratoires d'hématologie, dans un tube citraté à un deuxième tube citraté dans lequel un agoniste plaquettaire a été ajouté. Puisque les amas plaquettaires générés par l'activation des plaquettes stimulées ne sont pas identifiés comme des plaquettes par l'appareil, la différence entre le tube sans agoniste et le second tube avec l'agoniste sera proportionnelle au taux d'agrégation plaquettaire [133].

Cette technique a été commercialisée sous le nom de Plateletworks® (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) et utilise l'ADP, le collagène et plus récemment l'AA comme agonistes possibles. Peu d'études utilisant cette technologie sont publiées pour évaluer l'effet biologique de l'aspirine. Dichiaro et al. ont évalué 110 patients coronariens stables et ont identifié 9% de non répondants à l'aspirine basé sur une cartouche d'AA en agrégométrie automatisée (VerifyNow®) et ont

démontré une corrélation du statut de non répondant avec l'agrégation optique l'AA, l'ADP et le collagène. Aucune corrélation n'a été démontrée avec la thromboélastographie, la cartouche « épinéphrine » du PFA-100® ou le tube en AA de Plateletworks® [134]. Cette technologie semble également sous optimale pour évaluer l'effet du clopidogrel [135] alors que l'effet des inhibiteurs du α IIb β 3 détectés par cette technique corrélient avec l'agrégation optique [136].

3.2.4 Agrégométrie automatisée

La compagnie Accumetrics® (San Diego, Californie) est la première à avoir produit un système automatisé d'évaluation de la fonction plaquettaire spécifiquement ciblé à l'évaluation rapide de la réponse clinique aux antiplaquettaires. Connu initialement sous le sigle RPPFA « Rapid Platelet Function Analyzer » et actuellement commercialisé sous la bannière *VerifyNow*®, ce système comporte un analyseur et trois différentes cartouches destinées à évaluer l'effet de l'aspirine (*VerifyNow*® Aspirin), des thiénoxyridines incluant le clopidogrel (*VerifyNow*® P2Y12) et des inhibiteurs du α IIb β 3 (*VerifyNow*® IIb/IIIa). Les cartouches sont disposées à recevoir un tube de sang citraté avec aspiration subséquente de sang dans une série de chambres de réaction contenant un agoniste spécifique et des billes enduites de fibrinogène. L'activation plaquettaire permet l'agglutination des billes et une diminution de la transmittance lumineuse qui sera mesurée après un temps fixe d'incubation.

La cartouche *VerifyNow*® Aspirin utilise l'AA (1mM) comme agoniste plaquettaire. Le changement de transmittance mesuré par l'appareil sera exprimé par l'appareil en « aspirin reactive units – ARU ». Contrairement à plusieurs autres

technologies décrites dans ce mémoire, les valeurs de référence et les caractéristiques de performance ont été obtenues à l'aide de 400 sujets normaux étudiés avant et après l'ingestion d'aspirine. Ces études ont permis d'établir un seuil de référence de 550 ARU avec une sensibilité de 91,4% et une spécificité de 100% (fiche technique de *VerifyNow*® Aspirin). Ceci a récemment été confirmé par un groupe indépendant qui a observé une sensibilité de 96,6% et une spécificité de 100% pour ce seuil de 550 ARU chez 29 sujets sains étudiés avant et après la prise de 7 jours de 80 mg d'aspirine [137]. En utilisant ce seuil, Lordkipanidzé et al. ont trouvé une prévalence de 6,7% de non-répondants dans une population de 195 patients coronariens suivant un traitement à long terme de ≥ 80 mg d'aspirine non associé à d'autres antiplaquettaires [124]. Il est possible que la majorité des 13/195 patients jugés non répondants soit non observants au traitement ou des faux positifs en égard de la sensibilité connue de cette technique et du fait que seulement 3 des 13 non répondants présentaient un taux d'agrégation optique à l'AA supérieur à 20%. Malgré cela, Chen et al. ont démontré une prévalence de 19,2% de «résistance à ≥ 80 mg d'aspirine» chez 151 patients se présentant pour une intervention coronarienne percutanée non urgente. Suite à cette procédure, l'incidence de myonécrose définie par une augmentation des CK-MB était de 51,7% chez les «résistants» et de 24,6% chez les «répondants» ($p=0,006$) alors qu'une augmentation des troponines I était notée chez 65,5% des «résistants» et 38,5% des «répondants» ($p=0,012$). En analyse multivariée, le statut de «résistant» était identifié comme un facteur de risque indépendant de myonécrose après l'intervention coronarienne [93].

La cartouche *VerifyNow*® P2Y12 utilise l'ADP (20 µM) comme agoniste avec l'ajout de prostaglandine E₁ (PGE₁ – 22 nM) servant à limiter l'augmentation intracellulaire de calcium médiée par le deuxième récepteur de l'ADP, le P2Y₁. Les résultats sont exprimés en terme de « P2Y12 reaction units – PRU ». Un canal supplémentaire présent dans la cartouche contenant de l'iso-TRAP permet de déterminer l'activation maximale des plaquettes (de BASE) puisque cet agoniste active les plaquettes maximalement malgré la présence d'inhibiteurs de P2Y₁₂. Contrairement à la cartouche *VerifyNow*® Aspirin, la cartouche *VerifyNow*® P2Y12 ne permet pas de clairement séparer les résultats avant et après prise de clopidogrel chez des sujets sains. L'intervalle de référence (194-418 PRU) qui est donc suggéré par le manufacturier a été déterminé en fonction de résultats obtenus chez des sujets sains avant la prise de clopidogrel. L'appareil fournit également un deuxième résultat correspondant au taux d'inhibition de la fonction plaquettaire imputable au blocage du P2Y₁₂ calculé par la formule : $(\text{BASE-PRU})/\text{BASE} (\%)$. Les valeurs obtenues par cette formule corrélaient favorablement à celles obtenues par des études similaires en agrégation optique. Une étude indépendante a observé un intervalle de référence différent de celui suggéré par le manufacturier (264-422 PRU) à partir de 98 sujets sains non traités et une proportion de 24,7% de « non répondants » dans une cohorte de 1267 patients coronariens sous double thérapie antiplaquettaire. Puisque la sensibilité de cette mesure est inconnue et qu'il existe un chevauchement des résultats entre les sujets sains et les sujets sains ayant absorbé du clopidogrel, il est impossible de distinguer par cette étude les « non répondants » des faux positifs, ce qui constitue une limite de cette analyse [138].

Une étude comparant des spécimens obtenus avant la prise de 600 mg de clopidogrel, immédiatement avant une intervention coronarienne percutanée et 24 heures après chez 27 patients coronariens a démontré des changements peu importants des valeurs d'unité d'agrégation arbitraire après la prise de clopidogrel (pré 164 +/-45; pré-ICP 139+/-50; 24h post 139+/-47) alors qu'une diminution plus significative était démontrable en agrégation optique avec 20µM d'ADP (pré 65+/-9%; pré-ICP 42+/-12%; 24h post 45+/-13%). Des études de validation sont donc nécessaires avant de définir un statut de réponse sous optimal aux thiénoxyridines par cette technologie.

La cartouche VerifyNow® IIb/IIIa utilise l'iso-TRAP ([iso-S]FLLRN – 4 µM) comme agoniste et les résultats sont exprimés en terme de « platelet aggregation units » (PAU). Il est généralement recommandé de comparer la valeur de base à celle obtenue après un traitement afin d'obtenir un taux d'inhibition par les inhibiteurs de α IIb β 3. Cette technique démontre une excellente corrélation avec l'agrégométrie optique utilisant l'ADP à 20µM ainsi qu'avec une épreuve de liaison des récepteurs α IIb β 3 avec l'abciximab [139]. Dans une étude clinique de 500 patients subissant une ICP et portant sur l'utilité de monitorer l'effet biologique de l'abciximab, un taux d'inhibition de $\geq 95\%$ mesuré à 10 minutes du début du traitement avec abciximab était associé à une réduction significative du risque d'événements coronariens majeurs après l'ICP (OR 0,46, IC95% : 0,22-0,96) [140].

3.3 Mesure des métabolites de la thromboxane

La demi-vie de 30 secondes de la TxA₂ empêche toute mesure directe de la formation de ce métabolite *in vivo*. Dans l'optique de mesurer l'activité COX-1 de

l'enzyme PGHS-1 des plaquettes, des métabolites plus stables de la TxA_2 dont la mesure est possible par immunoassay ou par spectrométrie de masse ont été identifiés. Le métabolite le plus étudié est le 11-dehydro- TxB_2 qui est dérivé de l'hydrolyse par le H_2O_2 de la TxA_2 en TxB_2 et de l'action de la 11-dehydrogenase sur le TxB_2 . Alors que seulement 2,5% du TxB_2 est excrété inchangé dans l'urine, le 11-d TxB_2 est le principal dérivé de la TxB_2 et représente environ le tiers de ses métabolites [141]. Le 11-d TxB_2 a une demi-vie de 60 minutes et n'est pas dégradé par la congélation, permettant une analyse en série de plusieurs spécimens. Le dosage du 11-d TxB_2 a été pratiqué pour la mesure indirecte de la capacité de la COX-1 à former de la TxA_2 *ex vivo* en laissant tout simplement un prélèvement sanguin frais coaguler durant 30 minutes et en mesurant le 11-d TxB_2 généré au niveau du sérum ou en étudiant le surnageant d'un plasma riche en plaquettes activé par un agoniste. Par contre, la mesure directe du 11-d TxB_2 sérique est difficile à réaliser compte tenu du potentiel important de contamination du 11-d TxB_2 qui peut être généré par les plaquettes du prélèvement après que la ponction veineuse soit réalisée. Pour éviter les limites d'un prélèvement sanguin, une évaluation de la 11-d TxB_2 urinaire a été utilisée par plusieurs auteurs comme mesure indirecte de la formation physiologique de la TxA_2 . Par contre, les limites de cette étude proviennent de la concentration variable du métabolite en fonction de la densité urinaire et d'une source d'environ 30% des métabolites urinaires de la TxA_2 qui proviennent de sources non plaquettaires et dont l'ampleur peut augmenter de façon importante en présence de pathologies inflammatoires [142].

Zimmermann a comparé le dosage de la TxB_2 par radioimmunoassay dans un surnageant de PRP stimulé par l'AA ou par le collagène à l'agrégation optique induite par l'AA. Cette étude de 20 patients opérés d'un pontage aorto-coronarien a démontré une augmentation parallèle de la génération de TxB_2 *in vitro* et de l'agrégation induite par l'AA au cinquième jour post-opératoire en comparaison aux valeurs obtenues avant l'opération et au premier et au dixième jour post-opératoire, suggérant un phénomène de résistance transitoire à l'aspirine provoqué par la chirurgie [125]. Une évaluation de l'excrétion urinaire du 11-d TxB_2 chez 24 sujets sains avant et après 2 jours de prise de 100 mg d'aspirine a démontré une importante variabilité interindividuelle des niveaux de 11-d TxB_2 avant (179,5+/-142,0 ng/mmol de créatinine) et après (39,8+/-22,9) la prise d'aspirine mais une réduction relative plus uniforme des valeurs individuelles par l'aspirine (75,1+/-9,1%) [143]. Cette étude suggère que les valeurs isolées de 11-d TxB_2 sous traitement ne permettent pas de témoigner d'un effet thérapeutique de l'aspirine si aucune valeur pré traitement récente n'est disponible pour cet individu. Une analyse du 11-d TxB_2 urinaire dans un sous-groupe de l'étude HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) de 488 patients ayant développé un infarctus du myocarde, un AVC ou une mortalité cardio-vasculaire et 488 patients sans événement, appariés pour l'âge et le sexe, a démontré que le rapport des quotes (OR) des événements augmente progressivement pour chaque quartile de 11-d TxB_2 urinaire. Le premier quartile présentait un OR de 1.0 alors que le quatrième quartile un OR de 1,8 d'évènements [98]. Cette étude ne permet par contre pas de différencier un mécanisme de résistance à l'aspirine et une induction systémique de la synthèse de

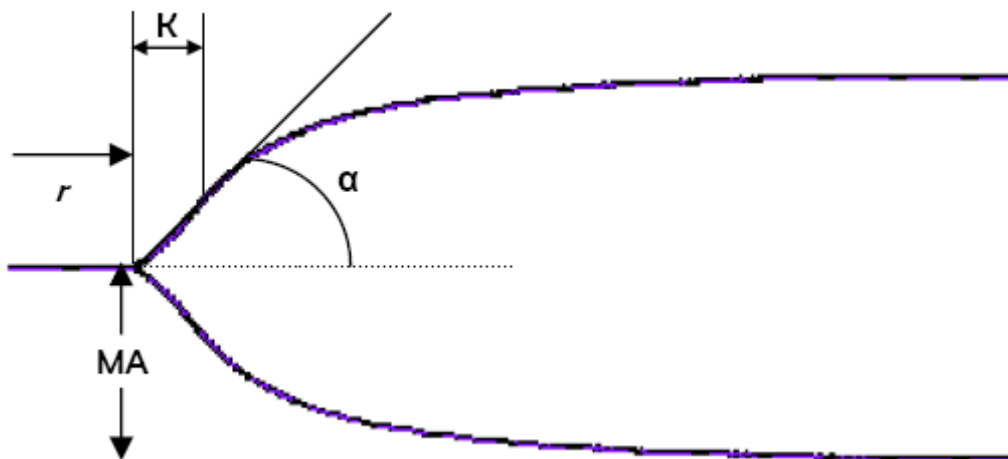
la thromboxane comme médiateur potentiel du risque d'évènements vasculaires récidivants.

3.4 Thromboélastographie (TEG)

Introduite en 1948 par Hartert [144] pour évaluer l'hémostase de façon globale, la popularité de la TEG a resurgi suite à l'introduction sur le marché d'appareils semi-automatisés et plus compacts. Il s'agit d'une technologie où du sang, du plasma ou un PRP est déposé dans une cupule où baigne une tige suspendue. Suite à l'activation de l'hémostase, un mouvement de la cupule génère une torsion de la tige qui sera proportionnelle à la force tensile du caillot généré. Cette force tensile appliquée sur la tige sera mesurée par un capteur dont l'information sera transformée de façon dynamique sur un graphique (figure 5).

Figure 5. Tracé typique et variables obtenues d'un thromboélastogramme.

Variables : r = temps au début de la réaction; K = temps du début de la réaction jusqu'à une amplitude de 20 mm du tracé; angle α = taux de formation du caillot; MA = amplitude maximale du tracé.



Une adaptation de la TEG a été développée pour l'analyse de la fonction plaquettaire [145]. Commercialisée sous le terme Platelet Mapping AssayTM pour le TEG® (Haemoscope, Niles, Indiana), cette trousse utilise du sang frais hépariné auquel on ajoute de la reptilase, du facteur XIII activé et de l'AA. Ceci permettra la génération d'un caillot de plaquettes et de fibrine dont l'amplitude maximale sera dépendante de l'activation plaquettaire induite par l'AA. La sensibilité de cette trousse à l'aspirine a été démontrée dans une étude de 26 sujets sains [146]. Une étude de 7 sujets sains étudiés avant et après une prise d'aspirine et de 196 patients coronariens compliant à une prescription d'aspirine a démontré que le Platelet Mapping AssayTM était sensible à l'effet de l'aspirine. Les valeurs d'agrégation mesurées par la TEG étaient de 86+/-14% avant l'aspirine et de 5+/-7% après chez les sujets sains et de 4+/-9% sous aspirine chez les patients coronariens [147].

Peu d'études ont utilisé la TEG pour évaluer l'effet des thiénoxydines et les inhibiteurs du $\alpha IIb\beta 3$ malgré qu'une technique sur le Sonoclot® (Sienco, Arvada, Colorado) a permis de valider l'utilité potentielle de la TEG pour monitorer l'effet du tirofiban, en autant qu'il n'y ait pas d'héparine dans le spécimen ou que celle-ci soit neutralisée par une héparinase [148].

3.5 Cytométrie de flux

Cet outil très versatile permet d'évaluation de nombreuses cellules à l'état fluide. L'instrument de lecture permet l'analyse de multiples cellules isolées circulant en file dans une fine colonne fluide. A l'aide d'une quantité variable de lasers de longueurs d'onde différentes, l'appareil permet d'évaluer la taille, la

complexité ou la granularité cellulaire et la présence sur chaque cellule d'une substance fluorescente généralement couplée à un ou plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques à l'analyse voulue. Lors du passage de la cellule devant les lasers, la présence d'un fluorophore spécifique à la longueur d'onde émise par l'un des lasers émettra une fluorescence qui sera captée par des détecteurs et dont l'intensité sera proportionnelle à la densité de l'antigène visé par l'anticorps monoclonal utilisé. La présence de plusieurs fluorophores de spécificités différentes permettra l'analyse combinée de plusieurs caractéristiques d'une même cellule. L'analyse de plusieurs milliers de cellules dans un échantillon permet donc d'évaluer la distribution et le profil d'expression de plusieurs antigènes dans des populations cellulaires spécifiques, triées en fonction de leur taille, leur complexité cellulaire ou avec un des anticorps monoclonaux choisi pour sa spécificité envers la population cellulaire visée.

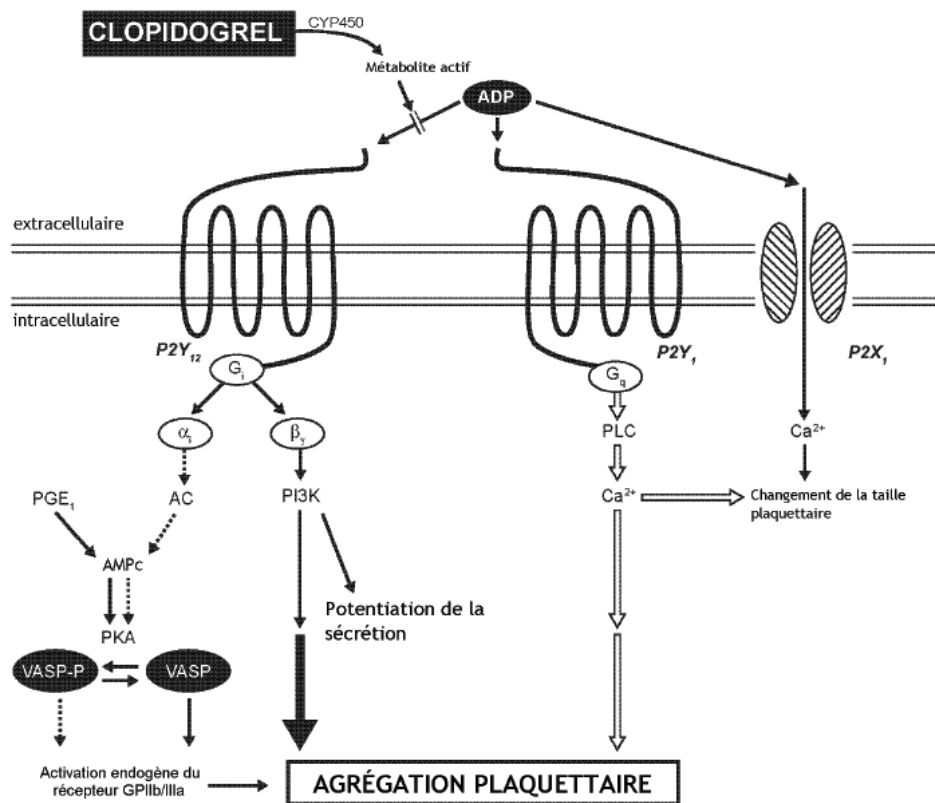
L'évolution de la cytométrie de flux permet l'évaluation des plaquettes en sang total avec l'aide d'au moins deux anticorps monoclonaux dont un permet d'identifier la plaquette (e.g., glycoprotéine Ib-, GPIX-, intégrine α Ib-, ou intégrine β 3) et l'autre permet d'évaluer des changements reliés à l'activation des intégrines, l'exposition en surface des membranes granulaires, la présence à la surface plaquettaire de protéines sécrétées par la plaquette, l'apparition de surface procoagulante sur la membrane plaquettaire, la formation d'agrégats entre plaquettes et d'autres plaquettes ou de leucocytes, ou la phosphorylation de protéines intraplaquettaires.

L'application la plus étudiée de la cytométrie de flux dans l'évaluation de la réponse aux antiplaquettaires utilise une trousse commercialisée pour l'étude des thiéno-pyridines par l'analyse de la phosphorylation du VASP (Biocytex, Marseille, France) dont le principe est résumé sur la figure 6.

Dans une étude de 47 sujets sains non traités, le taux de réactivité plaquettaire (PRI – platelet reactivity index) était de 78,3 +/- 4,6% alors qu'il était de 79,0 +/- 4,1% chez 34 patients coronariens ne recevant pas de clopidogrel et de 61,1 +/- 17% chez 33 patients coronariens recevant le clopidogrel. Les auteurs suggèrent que la grande variabilité de la réponse sous clopidogrel pourrait représenter un état de résistance chez presque 30% des sujets [149]. Similairement, Jakubowski et al. ont étudié 41 sujets sains recevant successivement 60 mg de prasugrel en dose de charge; 300 mg de clopidogrel ; et 600 mg de clopidogrel par étude du VASP et de l'agrégation plaquettaire optique induite par l'ADP à 10 μ M 24 heures après la prise du médicament. Le PRI avec la trousse VASP était de 79,3% +/- 7,6% avant toute médication et de 8,9% avec le prasugrel, de 54,7% avec 300 mg de clopidogrel et de 9,0% avec 600 mg de clopidogrel. Selon la même définition qu'Aleil, 100% des patients sous prasugrel avaient une suppression du VASP-PRI à < 50% alors que 33% et 66% des sujets recevant 300 mg et 600 mg de clopidogrel avaient une suppression du même ordre. Une bonne corrélation du VASP-PRI avec l'agrégation optique induite par l'ADP 20 μ M a également été démontrée [150]. Puisque cette dernière étude démontre une inhibition marquée de l'activité du VASP par un antagoniste sélectif de P2Y₁₂, elle suggère que les résultats obtenus avec le

clopidogrel sont le reflet d'une inhibition sous optimale du récepteur plutôt que d'une limite technique de l'analyse à détecter cette inhibition.

Figure 6. Étude de l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ par l'expression du VASP phosphorylé. Non phosphorylé à l'état basal, le VASP est phosphorylé par la protéine kinase A (PKA) en présence d'AMPC. Le PGE₁ est utilisé pour augmenter l'AMPC cytoplasmique et activer la phosphorylation de VASP. L'ajout d'ADP va moduler la phosphorylation de VASP via la stimulation de P2Y₁₂ en inhibant l'adenylate cyclase et la formation d'AMPC. L'inhibition du P2Y₁₂ par les thiénopydine sera proportionnelle à la formation de VASP-P mesurée par un anticorps monoclonal spécifique au VASP-P (adapté avec permission de Nguyen et al. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. J Am Coll Cardiol. 2005).



La cytométrie de flux peut également étudier l'effet des inhibiteurs de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ de plusieurs façons : par l'utilisation de l'inhibiteur du $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ conjugué au fluorophore FITC ou biotinisé; par l'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquant le site actif de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$; par la détection de la liaison du $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ au fibrinogène par un anticorps anti-fibrinogène; par la détection de la liaison de l'inhibiteur par un anticorps dirigé contre lui; ou par des mesures indirectes d'activation plaquettaire.

Une étude récente a également démontré l'intérêt de la cytométrie de flux pour l'étude de l'aspirine. Les auteurs ont démontré l'effet inhibiteur de l'aspirine sur l'induction par l'AA de l'expression de la P-sélectine avec l'anticorps monoclonal spécifique (CD62P) à cette protéine [151].

3.6 Génomique et protéomique

Diverses innovations technologiques développées au cours des dix dernières années rendent possible l'analyse simultanée de plusieurs gènes, de multiples produits de transcription (ARN messenger) ainsi que de multiples protéines interagissant dans des fonctions cellulaires complexes. Ces applications peuvent effectivement s'appliquer à l'étude des mécanismes physiologiques, soit plaquettaires ou autre, responsables de la réponse ou de la variabilité de la réponse, aux thérapies antiplaquettaires.

La génomique réfère à l'analyse de l'ADN constitutif d'un individu. Parmi les 21,662 gènes du bagage chromosomique humain identifiés par le projet de cartographie du génome humain [152], il existe environ 5 millions de polymorphismes d'un nucléotide simple correspondant à des variations de la séquence génomique pouvant avoir des impacts d'importance variable sur la

fonction des protéines codées par ces gènes. La mise en place de banques de données des polymorphismes présents dans le génome ainsi que de nouvelles technologies de sondage de masse de l'ADN (« puces à ADN » ou gene microarray) ont permis l'émergence de stratégies d'analyse visant à déterminer le rôle de plusieurs combinaisons de polymorphismes dans la pathogenèse de pathologies complexes comme l'athérombose [153, 154]. Plusieurs petites études ont été effectuées afin de démontrer une association entre certains polymorphismes sélectionnés et la réponse à l'aspirine. Une revue du sujet incorporant 31 études et 50 polymorphismes de 11 gènes différents a mené à la conclusion d'une association entre le polymorphisme P1A1/A2 (du gène encodant la sous unité β_3 unique à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) et le phénotype de résistance à l'aspirine (OR 2,36, IC95% 1,24-4,49) [155]. La force de cette association semble par contre diminuer dans une population atteinte de maladie vasculaire et varie selon la technologie utilisée pour définir un état de résistance. Aucune autre association avec les autres polymorphismes étudiés n'a pu être démontrée. Cette évaluation souligne l'hétérogénéité importante des études publiées et le risque important de biais de publication dans ce genre d'étude où plusieurs analyses peuvent être effectuées, provoquant un risque fortement accru de résultats statistiques faussement positifs. Dans ce même ordre d'idée, certains polymorphismes de gènes impliqués dans le métabolisme et dans le mécanisme d'action du clopidogrel, incluant les gènes du CYP2C19, des récepteurs P2Y₁₂ et P2Y₁, ont été étudiés avec certaines suggestions d'associations mais sans conclusion claire quant à leur rôle dans la variabilité de la réponse thérapeutique au clopidogrel [156]. De façon surprenante, très peu d'études

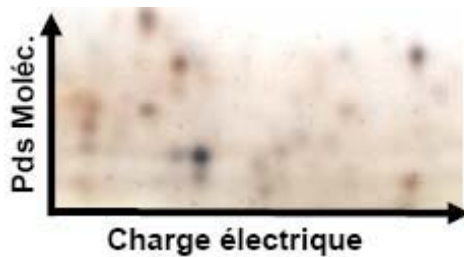
ont été effectuées étudiant l'association d'une réponse des inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ aux polymorphismes de certaines protéines plaquettaires, incluant ceux associés à cette intégrine.

Le transcriptome correspond au contenu en ARN messenger d'un spécimen. L'analyse du contenu en ARN messenger dans une population cellulaire donnée permet d'évaluer les gènes qui y sont exprimés et peut ainsi servir de marqueur indirect de son contenu protéique. La technologie d'analyse multigénique par « puces à ADN » permet d'évaluer le contenu et également d'estimer de façon semi-quantitative le contenu en ARN messenger d'un spécimen. Cette technologie offre donc la possibilité de classer divers spécimens selon un profil d'expression de cet ARN messenger qui pourrait théoriquement être relié à certaines réponses physiologiques. Puisque l'expression de l'ARN messenger peut être relié à certains polymorphismes génétiques, une corrélation génome-transcriptome peut également s'avérer d'intérêt. Environ 5000 gènes transcrits sont détectables dans les plaquettes avec les technologies actuelles, soit environ la moitié de ce qui est détectable dans une population purifiée de mégacaryocytes. Le faible signal des transcrits de plaquettes souligne le faible contenu en ARN messenger de ces cellules et rend l'analyse par puces à ADN plus complexe [157]. L'évaluation de l'association du transcriptome avec la réponse thérapeutique d'un antiplaquettaire pourrait se révéler utile dans la précision des mécanismes sous-tendant la variabilité de cette réponse.

La troisième composante cellulaire d'intérêt dans l'évaluation des processus de régulation intracellulaire est le protéome, soit l'expression des protéines d'un tissu ou d'une population cellulaire isolée. Nettement plus complexe que l'analyse de

l'ADN ou de l'ARN messenger, la protéomique désigne l'ensemble des technologies utiles à caractériser le protéome. Cette analyse peut s'avérer complémentaire aux technologies de l'ADN et de l'ARN puisque les mécanismes translationnels sont nombreux faisant en sorte que le contenu en ARN messenger d'une cellule ne reflète pas parfaitement son contenu protéique. La protéomique offre également l'avantage d'étudier les mécanismes de modifications protéiques post-translationnelles. En fait, l'épissage et les modifications post-translationnelles font en sorte que les quelques 22,000 gènes humains génèrent environ 50 fois plus de protéines fonctionnelles [158]. L'étape cruciale et la plus délicate d'une analyse protéomique consiste à isoler avec précision la fraction protéique d'intérêt. Une évaluation du protéome plaquettaire devra par exemple exclure toute contamination par les protéines du plasma provenant du spécimen. Selon l'objectif visé par l'étude, les protéines plaquettaires peuvent être séparées (sous-protéomes) physiquement afin d'étudier les protéines membranaires, les protéines granulaires ou les protéines sécrétées (sécrétome) après l'activation. Une évaluation des protéines de cellules au repos par rapport à celles de cellules activées permet d'identifier des changements de localisation des protéines par l'activation ou des modifications protéiques comme la phosphorylation (phosphoprotéome). La façon traditionnelle de séparer les protéines d'un spécimen est l'électrophorèse dimensionnelle en gel (2D-GE) qui permet la migration des protéines selon leur charge électrique dans une dimension et leur poids moléculaire dans l'autre (figure 7).

Figure 7. Exemple d'un gel 2D de protéines sécrétées par des plaquettes lavées stimulées par 0,1 U/mL de thrombine. La séparation des protéines est obtenue par focalisation au point isoélectrique (abscisse) et secondairement en fonction du poids moléculaire dans un gel en polyacrylamide solubilisé au SDS (ordonnée).



Compte tenu des complexités techniques des électrophorèses en 2 dimensions, cette technique a été remplacée par des méthodes automatisées comme la chromatographie liquide multidimensionnelle ou la technique MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technique). Suite à l'isolation des protéines d'intérêt, celles-ci peuvent être caractérisées grâce au perfectionnement de la spectrométrie de masse. La caractérisation d'une protéine d'intérêt s'effectue par la digestion tryptique de cette protéine suivi de l'introduction du spécimen dans une source d'ionisation telle que le MALDI (matrix-assisted laser-desorption ionization) ou l'ESI (electrospray ionization). Les peptides ionisés seront analysés par le spectromètre afin d'identifier leurs masses (m) et leurs charges (z) et seront caractérisés par leurs ratios m/z . Les spectres obtenus des différents peptides d'une protéine donnée sont relativement spécifiques à celle-ci. Le profil de spectres de ces peptides sont confrontés à des banques de données disponibles sur l'internet (MS-

Fit, Mascot, GlobalServer, Profound, etc...) permettant d'identifier la protéine d'intérêt lorsque celle-ci a déjà été caractérisée [159].

Dans la seule application de la protéomique connue de la littérature pour l'évaluation de l'effet des antiplaquettaires, Coppinger et al. ont étudié l'effet de différents agonistes sur le sécrétome plaquettaire avant et après la prise d'aspirine. Après séparation des protéines dans une dimension par électrophorèse en gel de polyacrylamide solubilisé en SDS, les gels ont été coupés en lanières, étudiés par spectrométrie de masse en tandem et ce spectre a été soumis à un algorithme d'identification des protéines par informatique (SEQUEST). Cette étude a permis de démontrer que le sécrétome contient plus de 100 protéines dont le profil n'est pas modifié par l'exposition des plaquettes à l'aspirine. L'aspirine semble diminuer les protéines du sécrétome des plaquettes stimulées de façon diffuse. Par contre, le profil de sécrétion semble changer en fonction de l'agoniste utilisé pour activer les plaquettes suggérant qu'il existe des voies métaboliques plaquettaires pouvant contrôler de façon différente le produit de sécrétion des granules α [160].

3.7 Caractéristiques de performance des tests de laboratoire

L'abondance de la littérature sur l'effet de l'aspirine et autres antiplaquettaires sur la physiologie plaquettaire et sur ses importants effets cliniques mérite une réflexion sur le rôle éventuel de tests de laboratoire pouvant prédire une réponse adéquate ou non à ces thérapies. L'adoption d'un test diagnostique requiert une évaluation intégrale sous plusieurs aspects [161].

Tout d'abord, le test doit être *précis*. Ceci réfère à la capacité du test à mesurer ce qui a été prévu. Ceci implique une bonne *sensibilité analytique*, c'est-à-dire qu'il

détecte de façon adéquate l'effet mesuré. La *spécificité technique* implique la capacité du test à ne détecter que ce qu'il est prévu pour détecter, sans générer de résultats faussement positifs. La *reproductibilité* fera référence à la capacité du test de générer les mêmes résultats lors de mesures répétées.

Par la suite, le test doit s'intégrer dans un algorithme clinique pertinent. Il pourra être identifié comme un nouveau test diagnostique ou remplacer une stratégie existante.

Troisièmement, le test doit être fidèle au diagnostic établi selon la règle de l'art (le « gold standard »). Les caractéristiques diagnostiques seront établies par la *sensibilité* et la *spécificité diagnostique* (tableau III).

Le quatrième élément essentiel d'un nouveau test diagnostique concerne son impact thérapeutique. Par exemple, on pourra se questionner si le test amènera un changement diagnostique ayant un impact sur le traitement du patient et le cas échéant, s'il aura un impact sur sa survie, sur la sécurité du traitement, sur la qualité de vie ou au recours à d'autres tests diagnostiques plus invasifs.

Enfin, l'analyse de coût-efficacité devra être favorable. Plusieurs indices économiques pourront être évalués dont l'analyse du coût par année de vie sauvée, du coût par année de vie sauvée ajustée pour la qualité de vie, coût par procédure sauvée ou le coût associé à des économies sur d'autres interventions ou traitements.

Tableau III. Détermination de la sensibilité et spécificité diagnostique. *a*

a représente le nombre d'individus malades avec un test positif (les vrais positifs); *b* représente le nombre d'individus non malades avec un test positif (les faux positifs); *c* représente le nombre d'individus malades avec un test négatif (les faux négatifs); *d* représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif (les vrais négatifs).

	Malade	Non malade
Test positif	<i>a</i>	<i>b</i>
Test négatif	<i>c</i>	<i>d</i>

La **sensibilité**, ou la probabilité que le test soit positif si la maladie est présente se mesure comme suit :

$$\text{Sensibilité} = a / (a + c).$$

La **spécificité**, mesurée chez les non-malades, détermine la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non-malades, est donné par :

$$\text{Spécificité} = d / (d + b).$$

Utilisant cette stratégie d'évaluation pour déterminer l'impact d'un test diagnostique évaluant l'état de résistance aux antiplaquettaires, quelques questionnements vont émerger. Le test diagnostique devra tout d'abord détecter de façon précise l'effet de l'antiplaquettaire. L'absence de précision sur le plan analytique pourra témoigner d'une faiblesse technologique du test ou d'un manque de détection par l'analyse de l'effet biologique du médicament. Plusieurs études ont en effet suggéré que la « résistance » aux antiplaquettaires est plutôt un reflet d'un

état d'hyperactivité plaquettaire n'ayant aucune interaction avec l'effet biologique du traitement. Cette distinction demeure à ce jour le point de controverse le plus important sur le rôle des tests d'évaluation des antiplaquettaires en clinique. En ce qui concerne l'intégration dans un algorithme clinique, les tests de monitoring des antiplaquettaires doivent être considérés comme des nouveaux tests puisqu'aucun des tests actuellement disponibles n'est accepté comme un standard de pratique. La venue du test implique que ces résultats seront meilleurs que la pratique actuelle d'ajustement des traitements en fonction du questionnaire médical du patient et des symptômes cliniques. L'étape suivante de la caractérisation diagnostique devient problématique puisqu'il n'existe aucune définition acceptée de la résistance à l'aspirine ou à d'autres antiplaquettaires. L'utilisation d'une population saine exposée aux antiplaquettaires pourrait ultimement servir de population de référence s'il est possible de démontrer qu'il n'existe pas de phénomène de résistance dans cette population. Dans cette situation, la réponse physiologique des antiplaquettaires dans une population saine devra être bien étudiée avant de définir un phénomène de résistance dans une population pathologique. Des études cliniques randomisées seront ultimement nécessaires afin de démontrer si un changement thérapeutique, soit un changement de traitement ou une modification de la dose du traitement, pourra améliorer le profil d'événements cliniques dans une population à risque de complications athérotrombotiques. L'analyse des coûts reliés dépendra ultimement de la performance des tests utilisés dans ces études cliniques randomisées de large échelle. Parmi les deux études cliniques randomisées planifiées pour étudier une telle stratégie diagnostique, une seule est toujours en cours. L'étude GRAVITAS

évalue le rôle d'une augmentation de dose de clopidogrel par rapport au traitement standard dans une population de patients présentant un test de résistance au clopidogrel anormal basé sur le VerifyNOW® P2Y₁₂ [162]. L'analyse des événements à 30 jours, à 6 mois et à un an suivant une ICP sera rapportée. Une deuxième étude conçue pour évaluer le rôle de l'ajout de l'eptifibatide chez les patients jugés résistants à l'aspirine dans un contexte d'ICP n'a pas pu se réaliser faute de financement.

Problématique et hypothèse

Le syndrome de résistance aux antiplaquettaires est devenu au fil des années un concept bien implanté dans l'interprétation de l'effet des antiplaquettaires en thérapeutique humaine. Ce concept implique dans son interprétation la plus large que certains antiplaquettaires, dont l'aspirine et le clopidogrel, offrent un bénéfice thérapeutique important chez certains individus alors que leurs effets sont absents chez d'autres. Il apparaît d'emblée qu'une définition de l'état de résistance basée sur la survenue d'évènements athérombotiques cliniques récidivants malgré une thérapie antiplaquettaire implique que toutes les récurrences cliniques sont intimement reliées à une activité plaquettaire non inhibée par cette médication. Puisque les récurrences d'évènements ischémiques peuvent être le résultat isolé ou combiné de plusieurs mécanismes dont un spasme coronarien, une rupture de plaque athéromateuse ainsi qu'une thrombose, cette définition basée sur la clinique s'avère trop simpliste et ne peut pas capter de façon isolée la contribution des antiplaquettaires sur la récurrence clinique.

Les limitations d'une définition clinique de la résistance à l'aspirine ont mené à l'apparition de définitions basées sur l'effet *in vitro* des antiplaquettaires tel qu'évalué par des tests de fonction plaquettaire ou par la mesure de la production de TxA₂. Tel que discuté dans le chapitre 3 de ce mémoire, l'utilisation actuelle de la définition biologique de la résistance à l'aspirine souffre du manque de standardisation des instruments, des procédures instrumentales ainsi que des conditions de prélèvement diverses qui sont très variées dans les études publiées à ce jour sur le sujet. De plus, les valeurs de référence d'une réponse adéquate aux

antiplaquettaires en utilisant ces diverses technologies ont été obtenues soit de façon empirique en fonction d'une réponse typique d'un antiplaquettaire, soit en considérant anormal l'absence de réponse biologique d'un test donné avec l'antiplaquettaire évalué, soit par la comparaison à une cohorte de patients sans traitement alors qu'elles n'ont pas été déterminées du tout dans certaines études.

L'hypothèse principale de ce projet de maîtrise est que les diverses technologies d'évaluation des fonctions plaquettaires ou du dosage des métabolites urinaires de la TxA₂ n'ont pas les mêmes caractéristiques de performance en ce qui concerne la capacité de détecter la présence d'un effet *in vitro* de l'aspirine. Plus spécifiquement, nous avons émis l'hypothèse que la sensibilité analytique de certaines technologies d'évaluation de l'effet biologique de l'aspirine était sous optimale et ne permettait pas dans certains cas de départager de façon fiable une absence de réponse biologique à l'aspirine et un faux positif. L'étude effectuée pour tester cette hypothèse vise donc à définir les caractéristiques de performance de diverses technologies potentiellement utiles à démontrer un effet biologique de l'aspirine dans une population de référence, soit une population saine ne prenant aucune médication et ne présentant aucune morbidité pouvant nuire à l'interprétation des analyses évaluées. Il était prévu que cette évaluation pourrait contribuer à préciser la valeur respective de ces techniques dans la définition du syndrome de résistance à l'aspirine et pourrait également proposer des valeurs de référence « normales » d'un effet de l'aspirine en laboratoire.

Contribution originale

Normal response to aspirin in healthy individuals: cross-comparison of light transmission aggregometry, VerifyNow[®] system, platelet count drop, thromboelastography (TEG[®]) and urinary 11-dehydrothromboxane B₂.

N. BLAIS^{*‡}, C. PHARAND^{†,§,¶}, M. LORDKIPANIDZÉ^{†,§,¶}, Y. K. SIA[§], Y. MERHI^{††}, J. G. DIODATI^{‡,§,**}

*Hematology and blood bank department, CHUM; Faculties of †Pharmacy and ‡Medicine, Université de Montréal; §Research Center, ¶Department of Pharmacy, and **Division of Cardiology, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal; ††Montreal Heart Institute Research Center, Montréal, Canada

Running title: Normal laboratory effects of aspirin

KEY WORDS: aggregometry, aspirin, platelet count drop, thromboelastography, thromboxane, *VerifyNow*.

Word count: abstract (250 words), original article (5329 words)

Address correspondance to: Normand Blais, CHUM - Hôpital Notre-Dame, 6ième étage, Pavillon Deschamps, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Canada, H2L 4M1.

Tel: (514) 890-8000. Fax: (514) 412-7572. e-mail: n.blais@umontreal.ca

Summary. *Background:* Variable biological effect of aspirin is suggested to be related to pharmacological resistance. The incidence of this so-called “resistant” state varies with the study population and the assay used. *Methods:* We determined performance features of five assays used to assess aspirin effects in non smoking healthy volunteers not taking any drug known to interfere with platelet function. Blood and urine samples were obtained immediately before and after 8-10 days of aspirin 80 mg intake. *Results:* Forty-five participants 19-59 years old were enrolled. The sensitivity (SE), specificity (SP), and optimal cut-off (CO) value to detect the effect of aspirin were: light transmission aggregometry (LTA) with 1.6 mM arachidonic acid - SE 100%, SP 95,9%, CO 20%; LTA with adenosine diphosphate 10 μ M - SE 84,4%, SP 77,7%, CO 70%; VerifyNow[®] Aspirin - SE 100%, SP 95,6%, CO 550 ARU; platelet count drop - SE 82,2%, SP 86,7%, CO 55%; TEG[®] - SE 82,9%, SP 75,8%, CO 90%; and urinary 11-dehydrothromboxane B₂ levels - SE 62,2%, SP 82,2%, CO 60 pg/ml. Gender, exercise level, body mass index, and oral contraceptive use did not interact with any assay results. *Conclusions:* Aspirin resistance in normal individuals as defined by arachidonic acid-induced LTA and the VerifyNow[®] assay is rare. Because the other assays discriminate suboptimally aspirin effect, they should not be used to define pharmacological “aspirin resistance”. We suggest that the variability in the reported incidence of aspirin resistance is related to variations in platelet function that are independent of aspirin mediated COX-1 inhibition.

Introduction

Several studies using many different laboratory methodologies for measuring platelet function have shown a strikingly wide variability in the prevalence of apparently normal platelet function despite daily therapy with aspirin (1-5). This phenomenon, coined as aspirin resistance, has been linked to female gender (3, 6, 7), active smoking (8, 9), recent exercise(10), type II diabetes (11) and hypercholesterolemia (12, 13). The highest prevalence of aspirin resistance is usually associated with conditions related to predictable platelet activation such as coronary artery bypass surgery or percutaneous coronary interventions (6, 14). The prevalence of aspirin resistance in a healthy population is felt to be low as one study of 96 healthy men showed resistance in only 1 subject (15). This is further supported by a study in 1131 asymptomatic patients at risk for coronary heart disease in whom 5 subjects were found to be aspirin resistant, resulting in a prevalence of 0.4% (16). Although some of the variability in platelet reactivity after aspirin exposure may be genetically defined (17, 18), the major contributors to this variability may more closely depend on underlying platelet function pathways that are insensitive to aspirin. Considering that aspirin significantly inhibits arachidonic acid (AA)-induced platelet activity in most healthy individuals, genetic factors linked to aspirin resistance, particularly modifications of the cyclooxygenase-1 (COX-1) gene, would be expected to be rare.

Ideally, aspirin resistance should be identified by assays that are highly sensitive to aspirin effects. Lack of sensitivity creates uncertainty about the ability of the assay to capture aspirin exposure and creates false positive results that artefactually

inflate the prevalence of aspirin resistance. Knowledge of a normal reference range for aspirin effects in a healthy population without risk factors for atherosclerotic disease could contribute to better define acquired resistance in different clinical settings and set limitations in the interpretation of such assays.

This study was therefore designed to define the normal response profile of five different assays to aspirin in healthy subjects without significant cardiovascular risk factors and not taking any other medication known to alter platelet function testing or thromboxane metabolism. Test sensitivity was considered the most important end point. We also evaluated assay specificity and optimal cut-off values as suggested by ROC curve analysis. Finally, we analyzed demographic data, habits and pre/post differences in test measures as potential predictors of assay performance.

Methods

Volunteers

This prospective clinical trial was approved by the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal Scientific and Ethics Review Board. Each volunteer gave written informed consent before participation.

Volunteers, between 18-60 years of age willing to comply with up to 10 days of 80 mg of aspirin and to submit themselves to two blood and urine samples were considered for enrolment. Exclusion criteria consisted of any previous evidence of atherosclerotic disease, arterial hypertension, diabetes or dyslipidemia; use of tobacco products within the previous 6 months; use of any medication suspected of interfering with platelet function tests within 1 month of enrolment; any major illness or surgery in the previous 6 months or abnormal blood counts.

We systematically collected demographic data, alcohol and exercise habits, body mass index (BMI) and reviewed with the subject an exhaustive list of drugs known to interfere with platelet function tests including the different formulations of aspirin, NSAIDs, COX-2 inhibitors, antidepressants, antibiotics, antihistamines and non-prescription drugs/supplements.

Baseline urine and blood samples were collected before noon in eligible subjects who were thereafter given a first dose of 80 mg of aspirin. They were then given 9 extra doses of 80 mg aspirin to be taken daily. The last dose was to be taken in the morning of and at least 2 hours before the follow-up blood and urine sampling planned 8-10 days later. An interview for study compliance and unused pill count was performed at the follow-up visit.

Evaluated assays

Light transmission aggregometry (LTA)

Light transmission aggregometry was performed at 37°C within 4 hours of blood collection on citrated platelet-rich plasma adjusted to 200-300 x 10⁹/L with platelet-poor plasma on a ChronoLog aggregometer (model 540, PA, USA). Based on the results of previous studies, aggregation was induced by AA (ChronoLog, PA, USA) at 1.6 mM (0.5 mg/mL) and adenosine diphosphate (ADP; Sigma Aldrich, ON, Canada) at 10 µM (1 and 5 µM of ADP were also used in a subset of the cohort) (3, 19, 20).

VerifyNow® Aspirin assay

The VerifyNow® system (Accumetrics, CA, USA) was used as suggested by the manufacturer with the VerifyNow® Aspirin cartridge, which contains AA as

platelet agonist and to which was added citrated whole blood within 4 hours of specimen collection. Results were expressed as “aspirin response units” (ARU).

Platelet count drop

This in-house assay was performed using a Coulter A^CT Series Analyzer (Beckman Coulter Inc, CA, USA). Platelets from citrated fresh whole blood were counted after 15 minutes of gentle agitation and after incubation with 1.6 mM of AA. Since platelet aggregates induced by AA are not recognized as platelets by the counter (21, 22), the extent of platelet aggregation can be calculated as the ratio of the platelet count obtained after activation over the count of platelets in a resting state (22). Final results reflecting percent aggregation are calculated with the following formula: **Percent platelet count drop = 1- platelet count ratio.**

Thrombelastography

The TEG® Platelet Mapping™ Assay (Haemoscope Corporation, IL, USA) was used as previously described, including a recent modification of the technique suggested by the manufacturer (23, 24). In this assay, 340 µl of heparinized whole blood is mixed in a cup containing activated factor XIII (activator F), reptilase and AA to generate a fibrin clot independent of thrombin generation. This clot develops tensile strength that is measured by the TEG® 5000 analyser using different variables, including the maximal strength developed by the clot, called maximal amplitude (MA_{AA}). Similarly, 340 µl of heparinized whole blood is mixed with activator F and reptilase (without AA) in a cup to generate a baseline value for a clot without platelet activation or thrombin formation (MA_{fibrin}). Finally, 1 ml of citrated whole blood is added to a vial containing kaolin and mixed by inversion.

From this mixture, 340 μ l is transferred in a cup containing 0.2 M CaCl₂ to generate a thrombin-induced clot (MA_{thrombin}). %MA_{AA} is obtained from the following formula and represents the relative contribution of AA to clot strength generation:

$$\%MA_{AA} = ([MA_{AA} - MA_{fibrin}] / [MA_{thrombin} - MA_{fibrin}]) * 100.$$

Exploratory evaluations of other TEG® parameters such as the time to the start of clot onset (“r”) and angle (“ α ”) of the clot generation curve were also carried out. Calculation of %r_{AA} and % α _{AA} were performed with a formula similar to the one used for %MA_{AA}.

Urinary 11-dehydrothromboxane B₂

Considering the very short half-life of serum thromboxane A₂ and its in vitro instability, 11-dehydrothromboxane B₂ (11-dTxB₂) has been proposed as a clinically suitable surrogate marker of COX-1 inhibition (25). The enzyme immunoassay (Cayman Chemical, MI, USA) for the detection of urinary 11-dTxB₂ was used (26). Samples were tested in duplicate with a mean intra-assay variation coefficient of 14.7% \pm 10.5%. The interpretable range of the standard curve of this assay is in the 16 to 1000 pg/ml range, according to the manufacturer.

Sample size and statistical analysis

The ideal sample size was derived from the approved recommendation from the Expert Panel on Theory of Reference Values from the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and the International Committee for Standardisation in Haematology (ICSH) (27). The guidelines are also used by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (28). Based on these guidelines, at least 39 subjects were necessary to obtain a fair estimation of a 95% reference range.

Statistical analyses were performed with SPSS 15.0 for Windows (SPSS institute, IL, USA) and Prism 5 for Windows (GraphPad, CA, USA). As Kolmogorov-Smirnov analysis of the data sets for all the evaluated parameters showed that they were unlikely to be following a normal distribution, summary statistics are presented as medians with corresponding 5th and 95th percentiles. Wilcoxon signed rank test was used for paired analysis. Nonparametric Spearman correlation coefficients were obtained to evaluate inter-assay associations.

Optimal cut-off values were initially set as proposed by several authors for AA-induced LTA (LTA-AA; 20%), ADP-induced LTA (LTA-ADP) at 10 μ M (70%) and as suggested by the manufacturer for the *VerifyNow*[®] Aspirin assay (550 ARUs) (3, 20, 29). ROC analyses of the six assays were done to validate cut-off values for the three former assays and to obtain optimal values for the platelet count drop, TEG[®] and 11-dTxB₂.

Results

Patient population

A total of 45 patients were recruited, mostly from poster and intranet invitation at the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal. They consisted mainly of working and physically fit individuals with no acquired cardiovascular disease risk factors (Table 1). Partial non-compliance was limited to 4 subjects who had forgotten 1 (n=3) or 2 (n=1) doses of aspirin, none of which occurred in the last three days before follow-up visit. Time from last aspirin dose to follow-up sample varied from 1-12 hours, with only 5 samples obtained after an interval of more than 6 hours. Partial non

compliance and interval of sampling of more than 6 hours did not appear to influence assay results.

Platelet function testing results

A total of 45 pairs of samples were available for sensitivity and specificity analyses. While LTA, VerifyNow®, platelet count drop and urinary thromboxane values were obtained and evaluable in all patients, TEG® results were not interpretable in 8 subjects in the pre-aspirin cohort and 3 subjects in the post-aspirin one. Figure 1 and Table 2 show overall results obtained with these assays. Matching pre- and post-aspirin results in paired analysis demonstrated that within each assay, drug exposure led to significant changes in platelet function, as shown in Table 2.

Light transmission aggregometry / VerifyNow®

LTA-AA and VerifyNow® were both 100% sensitive to aspirin effects at the cut-off level previously defined and specificity could not be increased by revisiting these values (Table 3). As shown in Figures 1 and 2, two false positive results suggestive of aspirin intake were found in the pre-aspirin samples with both LTA-AA and VerifyNow®. These did not originate from the same samples suggesting that these results derive from technical limitations of the assays rather than from pre-study antiplatelet drug exposure in these volunteers. No false negative result was found in the post-aspirin samples with these two assays. Correlation coefficients between the assays are shown in Table 4 and highlight the close association between LTA-AA and VerifyNow® results ($r=0.793$).

Figure 3 shows performance of LTA done with ADP at the three different doses. Performance was optimal at 10 μ M (n=45 pre-aspirin and post-aspirin

samples) compared to the 1 μM and 5 μM concentrations (n=26 pre-aspirin and post-aspirin samples). Although ROC analysis of the 10 μM results suggest that the previously proposed cut-off value of 70% seems optimal to balance optimal sensitivity (84.4%) and specificity (75.6%), the cut-off value should be raised to 74.5% to optimize sensitivity (95.6%) at the cost of decreased specificity (68.9%).

Platelet count drop

Although this assay showed good correlation with LTA-AA ($r=0.708$), sensitivity at the optimal value of the ROC curve was suboptimal (82.2%). The proposed cut-off level of 55% would need to be elevated to 62.4% for optimal sensitivity (95.5%) but would decrease specificity (76.7%).

Thromboelastography

TEG® results were not interpretable in 8 subjects, mostly due to very small differences between the $\text{MA}_{\text{thrombin}}$ and the $\text{MA}_{\text{fibrin}}$ results which made it difficult to estimate the relative contribution of the addition of AA to platelet activity. Results are therefore shown excluding the subjects for whom the results could not be calculated. Although results were stable for $\text{MA}_{\text{thrombin}}$ (pre-aspirin: $62.9 \pm 4.3\%$ and post-aspirin: $62.7 \pm 5.0\%$), there was wide variability in $\text{MA}_{\text{fibrin}}$ results (pre: $40.2 \pm 19.4\%$ and post: $38.4 \pm 17.7\%$) and in post-aspirin MA_{AA} results (pre: $63.5 \pm 7.4\%$ and post: $47.0 \pm 18.1\%$).

Optimal sensitivity (94.7%) could not be achieved as this could only be obtained with aberrant values ($< 130\%$) and with markedly poor specificity (18.2%). Figure 4 compares the performance of $\% \text{MA}_{\text{AA}}$ to $\% \alpha_{\text{AA}}$. Close to optimal

sensitivity of $\% \alpha_{AA}$ for aspirin effect could be achieved at the 70% cut-off level (92.5%; specificity 89.7%).

Urinary 11-dehydrothromboxane B₂

Considering the broad overlap of pre-aspirin and post-aspirin values and the poor sensitivity (62.2%) of the optimal value on the ROC curve, the assay was of limited value in predicting aspirin exposure. Optimal sensitivity (95.6%) to aspirin exposure was only possible if the cut-off value was raised from 60 to 454 pg/ml but resulted in a dramatic reduction in specificity (17.8%). Nonetheless, we observed a significant 53.3% (95%CI: 27.3-79.3) decrease urinary 11-dehydrothromboxane B₂ concentrations after aspirin therapy on paired analysis.

Assay interactions with demographic variables.

Gender, age, exercise level, BMI and oral contraceptive use were evaluated as potential interaction variables of assay results. Correlation analysis was done with pre-aspirin values, post-aspirin values as well as with percent variation of the pre/post-aspirin results. No significant interaction was found.

Discussion

This study shows that aspirin effects can be seen in most healthy subjects taking aspirin but that assay performance is quite variable and may explain some discrepancies noted in previous trials with regard to aspirin resistance prevalence. We propose that the optimal assay cut-off value used to define aspirin resistance be based on results obtained in a control healthy population on aspirin therapy and not on cut-off values derived from assay responses in normal individuals not exposed to anti-platelet drugs. The proposed cut-off values should also not be based on ROC

characteristics but rather on a sensitivity threshold close to 100% (at least > 95%) which would avoid false attribution of a resistant state, provided that resistance is determined to be rare in the control population. The assay should also demonstrate good discrimination between exposed and non-exposed individuals in order to increase the proportion of resistant patients that can be detected by the assay (reflected by assay specificity). Based on our results, we suggest that either LTA-AA or the *VerifyNow*[®] Aspirin assay may be considered optimal to detect aspirin effects because both assays demonstrate very high sensitivity to aspirin effects at an easily identifiable cut-off value and also because values in most normal individuals not taking aspirin are clearly above these cut-off values. Although the other assays evaluated in our study detected aspirin effect with reasonable accuracy, the wide overlap in values obtained in exposed and non-exposed individuals underline their inability in many instances to distinguish “true” resistance from a false negative result.

AA-induced platelet aggregation measured by LTA is the most widely studied assay to detect aspirin effect (3, 15). Data generated from our results shows 100% sensitivity and a clear distinction from the pre-aspirin values if cut-offs in the 10-20% range are selected, which supports its use as an adequate surrogate marker of aspirin effects and confirms previous suggestions that 20% constitutes a proper cut-off level to be used in studies evaluating aspirin effect, at an AA concentration of 1.6 mM (3).

The *VerifyNow*[®] Aspirin assay is a point of care system that has been modified and now uses AA as the principal agonist. Findings from a study of previous

cartridges using propyl gallate as the principal agonist and a recently published study evaluating 3 days of 325 mg of aspirin intake as well as our data suggest that values between 500-550 ARU are optimal to detect the presence of aspirin and support the use of the Food and Drug Administration (FDA) approved cut-off of 550 ARU (15, 30).

ADP-induced platelet aggregation assays using impedance in whole blood or light transmission in platelet-rich plasma have been extensively studied and show that they can detect aspirin effect. Most of these studies show that some patients on aspirin do not display inhibition of agonist effects in proportions varying from 10 to 50% (3, 29, 30). We propose that our finding of a 15.6% prevalence of so called “resistance” with ADP 10 μ M reflect poor assay ability to detect aspirin effect rather than identifying true resistance since this is not supported by either AA-induced LTA or *VerifyNow*[®] assay results. Although this cohort of 15.6% “resistant” subjects might be physiologically different from the “responsive” cohort, this different response profile may not be the result of aspirin failure to inhibit platelet COX-1 but might be explained by bypassing mechanisms of platelet activation independent of COX-1 inhibition. Poor correlation between ADP 10 μ M-induced LTA and the platelet count drop, TEG[®], or 11-dTxB₂ results in this study would rather suggest that assay performance limitations are important and many of the “resistant” patients defined by these assays could well be false-negatives based on the arbitrarily defined cut-off values. This supports our suggestion that the cut-off values be based on near perfect sensitivity in a normal population on therapy.

Although the TEG® and platelet count drop assay both use AA as the platelet agonist, many factors may limit results obtained with these assays. The platelet count drop procedure and TEG® are done in whole blood which can lead to interactions mediated by leucocytes and erythrocytes (31). These interactions may decrease the sensitivity of these assays by causing aggregation that is not mediated by AA. Nonetheless, a platelet count drop technique similar to ours has been commercialized as PlateletWorks® (Helena Laboratories, TX, USA) and has shown some interesting results although the performance characteristics are still to be defined. Suboptimal TEG® results in our laboratory could not be explained, although they are paralleled by others (32, 33). While technical factors such as sampling errors or contamination of the cuvettes were considered, they do not represent the principal source of this variability as results were consistently variable throughout the study and as repeat testing in many samples led to results that were reproducible. Furthermore, proper training was made available prior to study start by the manufacturer who provided individual study reagents and cuvettes almost completely eliminating the possibility of cross cuvette contamination. Refinements in this interesting technique may be useful to decrease study variability. Our observation that angle measure ($\% \alpha_{AA}$) might reflect more accurately aspirin effects in this assay is worthy of further study.

The observed relative change in the urinary 11-dTxB₂ dosage of 53.3% (95% CI : 27.3-79.3) on aspirin therapy would suggest that a change of less than 25 % on aspirin therapy might be indicative of a decreased therapeutic efficacy although this would have to be validated in other studies. Adjusting for urinary creatinine might

have reduced inter-subject variability although this could not be assessed by our data. Looking at data from a previous study from our group (29), we found that crude 11-dTxB₂ levels and urinary creatinine were poorly correlated ($r=0.40$) in a homogeneous population of patients with stable coronary heart disease on two different doses of aspirin therapy, even after the exclusion of patients not demonstrating suppression of aggregation on LTA-AA ($r=0.46$ for 80 mg and $r=0.41$ for 325 mg). This suggests that correction of 11-dTxB₂ results with urinary creatinine may have impacted only slightly our overall conclusions, although this needs to be assessed further.

Large clinical trials using aspirin in the prevention of atherothrombotic events have generated paradoxical results that are still to be explained in physiological terms. One of these paradoxes is the apparent difference in clinical benefit from aspirin with regard to gender (34). This issue was carefully analyzed in our cohort that was well balanced for gender distribution. Even though the number of patients is too small to rule out small differences in aspirin effects, the striking similarity in the results for males and females point toward the possibility that potential gender differences in aspirin effects may not be mediated by COX-1 inhibition differences, a finding in agreement with a recent report by Becker et al (7).

Meta-analyses of studies evaluating clinical endpoints related to platelet function study endpoints show a prognostic impact of many assays, particularly aggregometry, urinary 11-dTxB₂ levels and PFA-100® (1, 35, 36). Although these studies are reported to support the concept of aspirin resistance, they may also

suggest that COX-1 independent platelet activity on aspirin therapy is a contributor to patient outcome, whether or not this is related to aspirin effects.

Conclusion

Although aspirin resistance may be a true phenomenon in pathological and pharmacological situations, no such resistant patient was found in our study of healthy young individuals. Ours and other studies demonstrate that lack of pharmacological response to aspirin, based on COX-1 dependant assays, is rarely of hereditary origin. Findings from our study suggest that assay sensitivity variability is more important than physiological differences in aspirin effects on platelets to explain a large proportion of the pseudo-resistance to aspirin found in previous trials. Although assay limitations may explain variations in the reported incidence in aspirin resistance, we do not exclude that platelet function can vary in pathological states. As such, so-called aspirin resistance may well reflect global platelet hyperactivity more than failure of aspirin to suppress COX-1 activity. Whether this global platelet hyperactivity reflects non COX-1 mediated aspirin effects or physiological mechanisms unrelated to aspirin remains to be shown. Our findings therefore suggest that the thromboxane A₂ dependent assays using LTA with AA at the concentration of 1.6 mM and the *VerifyNow*® Aspirin assay are highly sensitive and may be considered best-suited in the evaluation of COX-1 mediated aspirin effects.

Acknowledgements

This study was made possible through a grant from the Fondation de l'Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Canada. Normand Blais and Marie Lordkipanidzé are recipients of Training Awards from the Fonds de recherche en santé du Québec. HaemoscopeTM provided two TEG® instruments and study reagents free of charge.

We wish to thank our clinical study nurse, Céline Groulx, who was responsible for blood and urine sampling throughout the study.

References

1. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007 Aug 13-27;167(15):1593-9.
2. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-Resistant Thromboxane Biosynthesis and the Risk of Myocardial Infarction, Stroke, or Cardiovascular Death in Patients at High Risk for Cardiovascular Events. *Circulation.* 2002 April 9, 2002;105(14):1650-5.
3. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2001;88(3):230-5.
4. Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestini A, Riondino S, Gazzaniga PP, Violi F. Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(6):979-84.
5. Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D, Monbouquette R, Reisman M, Gray W, et al. Incidence of aspirin nonresponsiveness using the ULtegra Rapid Platelet Function Assay-ASA. *Am J Cardiol.* 2003;92(12):1492-4.
6. Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Mar 17;43(6):1122-6.
7. Becker DM, Segal J, Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Bray PF, et al. Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. *Jama.* 2006 Mar 22;295(12):1420-7.
8. Davis JW, Hartman CR, Lewis HD, Jr., Shelton L, Eigenberg DA, Hassanein KM, et al. Cigarette smoking--induced enhancement of platelet function: lack of prevention by aspirin in men with coronary artery disease. *J Lab Clin Med.* 1985 Apr;105(4):479-83.
9. Hung J, Lam JYT, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette Smoking Acutely Increases Platelet Thrombus Formation in Patients With Coronary Artery Disease Taking Aspirin. *Circulation.* 1995 November 1, 1995;92(9):2432-6.

10. Gulmez O, Yildirim A, Bal U, Konas ND, Aydinalp A, Demir O, et al. Assessment of biochemical aspirin resistance at rest and immediately after exercise testing. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007 Jan;18(1):9-13.
11. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)--its relation to metabolic control. *Thromb Res*. 2004;113(2):101-13.
12. Friend M, Vucenik I, Miller M. Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ*. 2003 January 11, 2003;326(7380):82-3.
13. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Swadzba J, Gora PF, Piwowarska W, et al. Inhibition of Thrombin Generation by Aspirin Is Blunted in Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 August 1, 1996;16(8):948-54.
14. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, et al. Functional and Biochemical Evaluation of Platelet Aspirin Resistance After Coronary Artery Bypass Surgery. *Circulation*. 2003 August 5, 2003;108(5):542-7.
15. Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P. Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. *J Thromb Haemost*. 2006 Apr;4(4):813-9.
16. Faraday N, Becker DM, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Segal JB, Moy TF, et al. Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *The American Journal of Cardiology*. 2006 Sep 15;98(6):774-9.
17. Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, Ginsburg G, Parker A, Kottke-Marchant K, et al. Aspirin resistance and a single gene. *The American Journal of Cardiology*. 2005 Mar 15;95(6):805-8.
18. Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost*. 2005 Oct;3(10):2340-5.

19. Burke J, Kraft WK, Greenberg HE, Gleave M, Pitari GM, VanBuren S, et al. Relationship of arachidonic acid concentration to cyclooxygenase-dependent human platelet aggregation. *J Clin Pharmacol*. 2003 Sep;43(9):983-9.
20. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(6):961-5.
21. Harrison P. Advances in platelet counting. *Br J Haematol*. 2000 December 01, 2000;111(3):733-44.
22. Nicholson N, Panzer-Knodle S, Haas N, Taite B, Szalony J, Page J, et al. Assessment of platelet function assays. *Am Heart J*. 1998;135(5 Pt 2 Su):S170-S8.
23. Bochsén L, Wiinberg B, Kjelgaard-Hansen M, Steinbruchel DA, Johansson PI. Evaluation of the TEG platelet mapping assay in blood donors. *Thromb J*. 2007;5:3.
24. Rivard G, Cohen E, Hofer A, Fan L. The Use of Thrombelastograph To Monitor the Aspirin Induced Inhibition of Platelet Response to Arachidonic Acid. *Blood*. 2003:3963a.
25. Catella F, Healy D, Lawson JA, FitzGerald GA. 11-Dehydrothromboxane B₂: a quantitative index of thromboxane A₂ formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Aug;83(16):5861-5.
26. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation*. 2000 March 14, 2000;101(10):1206-18.
27. Solberg H. The theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1987 1987 25(9):645-56.
28. NCCLS. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline---Second Edition. NCCLS document C28-A2.: NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA; 2000 [cited].

29. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2007 Jul;28(14):1702-8.
30. Dyszkiewicz-Korpanty AM, Kim A, Burner JD, Frenkel EP, Sarode R. Comparison of a rapid platelet function assay - Verify Nowtrade mark Aspirin - with whole blood impedance aggregometry for the detection of aspirin resistance. *Thrombosis Research*. 2007;120(4):485-8.
31. Santos MT, Valles J, Lago A, Tembl J, Sanchez E, Moscardo A, et al. Residual platelet thromboxane A2 and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease. *J Thromb Haemost*. 2008 Apr;6(4):615-21.
32. Mayne E, Jacobson B, Louw S, Bernstein P, Mayne A. The utility of thrombo-elastography in the monitoring of aspirin therapy. *S Afr Med J*. 2007 Dec;97(12):1289-91.
33. Hobson AR, Petley GW, Dawkins KD, Curzen N. A novel fifteen minute test for assessment of individual time-dependent clotting responses to aspirin and clopidogrel using modified thrombelastography. *Platelets*. 2007 Nov;18(7):497-505.
34. Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G, Brown DL. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama*. 2006 Jan 18;295(3):306-13.
35. Reny JL, Quere I, de Moerloose P, Fontana P. Aspirin response variability assessed with the PFA-100 device. *Thromb Haemost*. 2008 May 1, 2008;99(5):968-9.
36. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2008 Jan 26;336(7637):195-8.

Table 1. Study population

	n (%)
Gender	
Male	16 (35.6)
Female	29 (64.4)
Age	
19-39	21 (46.7)
40-59	24 (53.3)
Race	
Caucasian	43 (95.6)
Asian	2 (4.4)
BMI	
18-25	32 (71.1)
26-30	8 (17.8)
> 30	5 (11.1)
Family history of cardiovascular disease	13 (28.9)
Exercise level	
None	15 (33.3)
Less than 120 min/wk	13 (28.9)
120 min/wk or more	17 (37.8)
Oral contraceptive/HRT use	8 (27.6)*
Drug compliance	

Full compliance	41 (91.1)
Full compliance in last 3 days	45 (100)

Females only*

Table 2. Paired sample analysis of pre-aspirin and post-aspirin results using different assays

	Prior to aspirin Median (5 th ; 95 th percentile)	After aspirin Median (5 th ; 95 th percentile)	p value*	Mean variation[†] (95% CI)
LTA-AA (%)	64 (22.6; 76.4)	2 (0; 7.5)	<0.0001	-94.7% (-74.3; -115.1)
LTA-ADP 10 μM (%)	81 (25; 96.1)	45 (5.9; 77.5)	<0.0001	-44.3% (12.0; -100.7)
VerifyNow (ARU)	642 (538.2 ; 666.7)	405 (367.3; 476.9)	<0.0001	-35.5% (-23.5 ; -47.5)
Platelet count drop (%)	83 (31.6;95.4)	46 (9.3; 67.4)	<0.0001	-38.0% (48.8 ; -124.8)
TEG-MA_{AA} (%)	108 (19.5 ; 157.9)	40.6 (0; 160.2)	<0.0001	-50.0% (49.3 ; -149.3)
11-dTxB₂ (pg/ml)	109.8 (35.3 ;1024)	51.6 (15.1; 460.1)	<0.0001	-53.3% (-27.3 ; -79.3)

Wilcoxon signed rank test*, Variations in paired samples were calculated as (Post aspirin-Pre aspirin)/Pre aspirin[†]

Table 3. Test performance characteristics

	Sensitivity	Specificity	Cut-off value
LTA-AA 1.6 mM	100 %	95.6 %	< 20% ^{**‡}
LTA-ADP 10 μM	84.4 %	77.8 %	< 70% ^{**‡}
VerifyNow	100 %	95.6 %	<550 ARU ^{†‡}
Platelet count drop	82.2 %	86.7 %	<55% [‡]
TEG-MA_{AA}	82.9 %	75.8 %	< 90% [‡]
11-dTxB₂	62.2%	82.2%	< 60 pg/ml [‡]

as suggested by Gum et al^{*}, as suggested by manufacturer[†], best fit on ROC curve[‡]

Table 4. Correlation coefficients between platelet function tests.^a

	LTA-ADP 10 µM	VerifyNow	Platelet count drop	TEG-MA_{AA}	11-dTxB₂
LTA-AA 1.6 mM	0.627	0.793	0.708	0.434	0.387
LTA-ADP 10 µM	-	0.675	0.467	0.456	0.230
VerifyNow®	-		0.596	0.456	0.332
Platelet count drop	-	-	-	0.374	0.387
TEG - MA_{AA}	-	-	-	-	0.099

^aIt is generally accepted that a correlation coefficient between 0 and 0.2 shows no correlation, between 0.2 and 0.4 shows low correlation, between 0.4 and 0.6 shows moderate correlation, between 0.6 and 0.8 shows good correlation and superior to 0.8 shows strong correlation.

Figure 1. Comparison of pre-aspirin and post-aspirin values using six different platelet function tests. Values were obtained from 45 volunteers before and after 80 mg of aspirin intake for 8-10 days. Boxes : 25th percentile; median; 75th percentile. Whiskers : 5th and 95th percentiles. The dashed line represents the cutoff value as shown in table 3.

Figure 2. Comparison of results obtained by arachidonic acid-induced light transmission aggregometry and VerifyNow Aspirin in matched samples. The dashed line represents the proposed cutoff value as suggested by Gum et al (LTA-AA) or by manufacturer (VerifyNow®). Four pre-aspirin and no post-aspirin data points are outliers according to the set cut-off values of both assays.

Figure 3. Evaluation of different doses of ADP (1 μ M, 5 μ M and 10 μ M) to detect aspirin effects by light transmission aggregometry. Boxes : 25th percentile; median; 75th percentile. Whiskers : 5th and 95th percentiles.

Figure 4. Comparison of the angle (“ α ”) and maximal amplitude (MA) TEG® parameters in the detection of aspirin exposure. Boxes : 25th percentile; median; 75th percentile. Whiskers : 5th and 95th percentiles.

Supplementary Figure. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the six different platelet function tests.

Figure 1. Comparison of pre-aspirin and post-aspirin values using six different platelet function tests. Values were obtained from 45 volunteers before and after 80 mg of aspirin intake for 8-10 days. Boxes : 25th percentile; median; 75th percentile. Whiskers : 5th and 95th percentiles. The dashed line represents the cutoff value as shown in table 3.

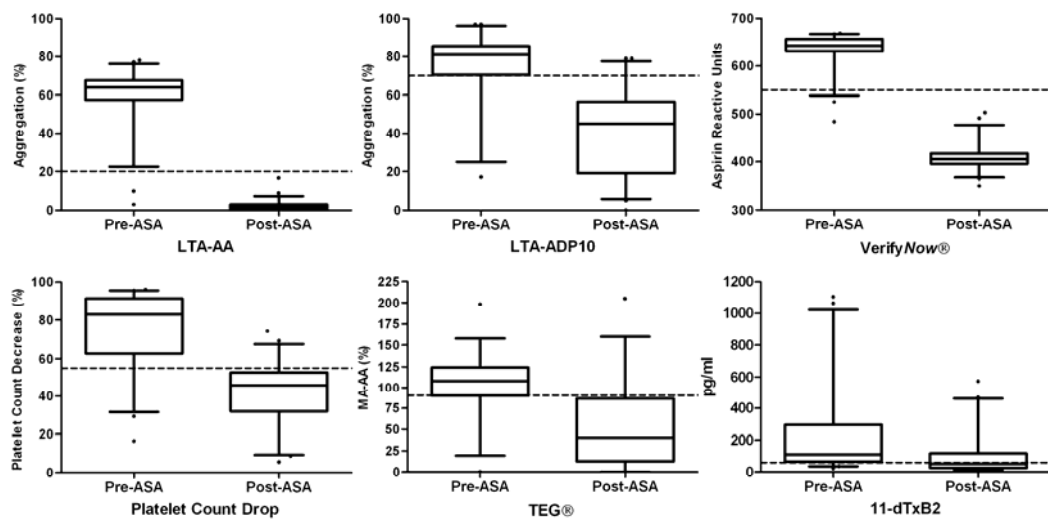


Figure 2. Comparison of results obtained by arachidonic acid induced light transmission aggregometry and VerifyNow aspirin in matched samples. The dashed line represents the proposed cutoff value as suggested by Gum et al (LTA-AA) or by manufacturer (VerifyNow®). Four pre-aspirin and no post-aspirin data points are outliers according to the set cut-off values of both assays.

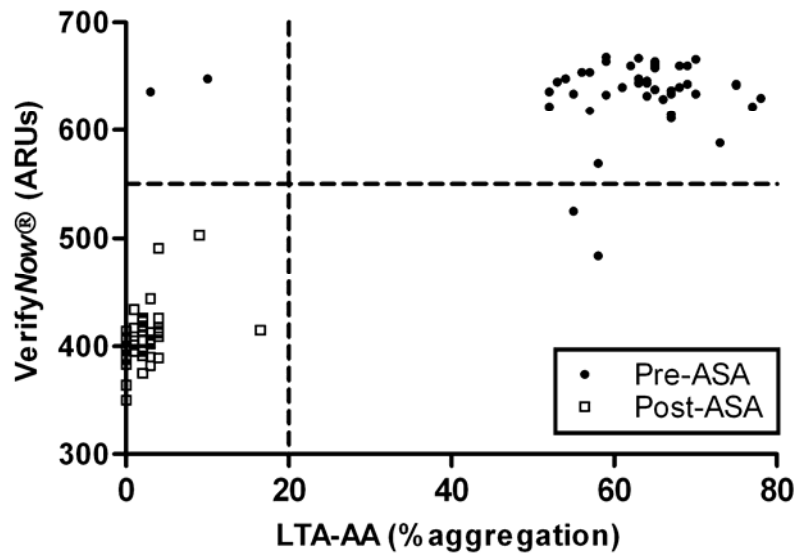


Figure 3. Evaluation of different doses of ADP (1 μ M, 5 μ M and 10 μ M) to detect aspirin effects by light transmission aggregometry. Boxes : 25th percentile; median; 75th percentile. Whiskers : 5th and 95th percentiles.

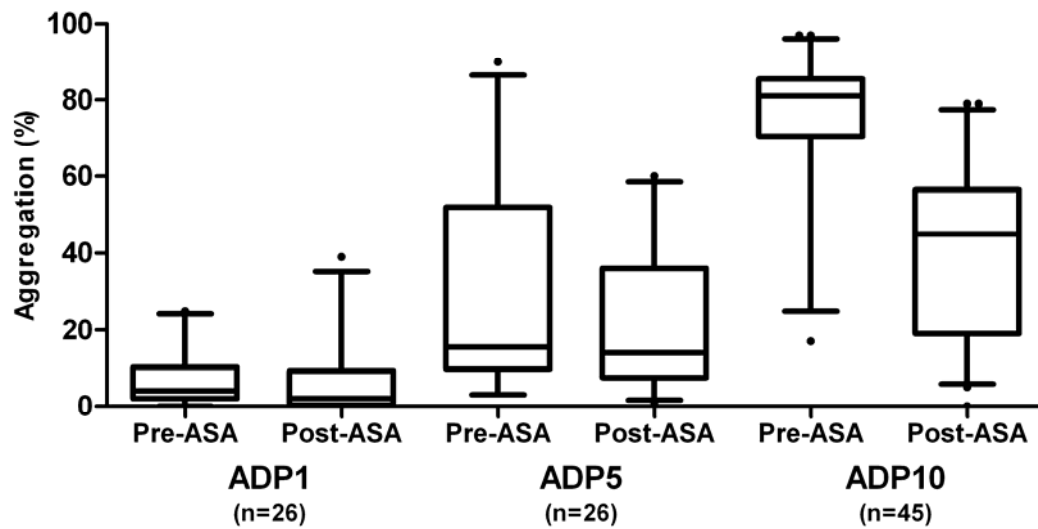
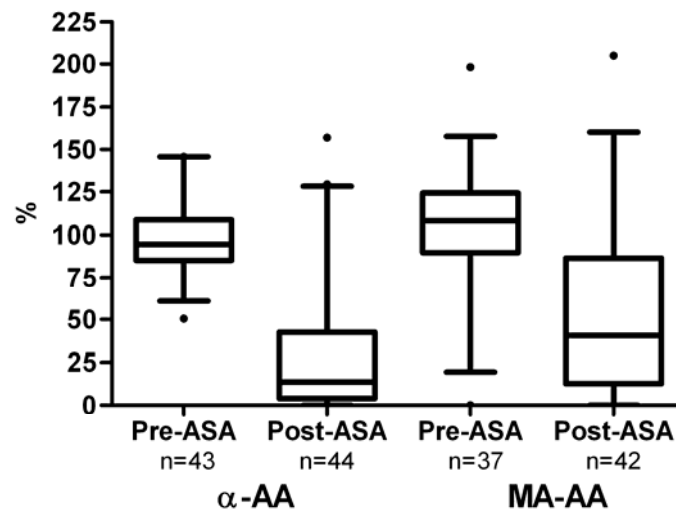
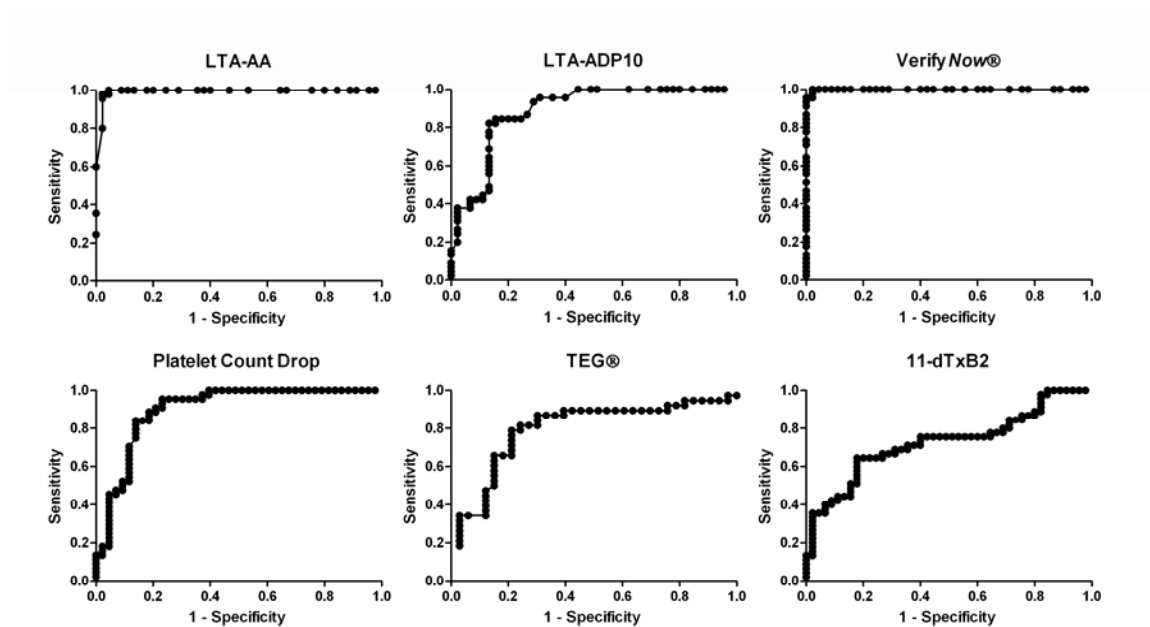


Figure 4. Comparison of the angle (“ α ”) and maximal amplitude (MA) TEG® parameters in the detection of aspirin exposure. Boxes : 25th percentile; median; 75th percentile. Whiskers : 5th and 95th percentiles.



Supplementary Figure. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the six different platelet function tests.



Discussion

La revue de la littérature ainsi que notre contribution originale démontre que l'effet biologique de l'aspirine est détectable chez la très grande majorité des sujets sains lorsque l'observance de la prise du médicament est contrôlée de façon très stricte et lorsque la technologie utilisée est suffisamment sensible au principal mécanisme d'action connu de l'aspirine, soit l'inhibition plaquettaire de la COX-1 [6, 137, 163].

Les résultats obtenus dans diverses études, incluant ceux présentés ici, permettent de proposer l'utilisation de l'agrégation optique induite par l'AA et la trousse *VerifyNow*® Aspirin comme modalités techniques préférables dans l'évaluation de l'effet de l'aspirine dans diverses populations où une résistance potentielle à l'aspirine serait recherchée. Cette suggestion provient de la démonstration d'une très grande sensibilité analytique de ces deux techniques à l'effet de l'aspirine chez des sujets sains.

L'agrégation optique induite par l'AA a été largement étudiée pour démontrer l'effet de l'aspirine [2, 122, 124, 147]. En utilisant un seuil de 10% ou de 20%, une sensibilité de 100% a été observée dans notre étude. Le niveau du 95^e percentile des valeurs d'agrégation après la prise d'aspirine (7,5%) témoigne de l'excellente sensibilité technique de cette analyse. Par ailleurs, la valeur du 5^e percentile d'agrégation avant la prise d'aspirine dans cette même population de 22,6% suggère qu'une valeur seuil de 10-20% pourrait être utilisée afin de bien distinguer une réponse normale à l'aspirine (sous le seuil) d'un état potentiellement résistant (au-dessus du seuil). Cette valeur est en accord avec d'autres études récentes [137, 147].

De façon similaire, la performance analytique de la trousse *VerifyNow® Aspirin* observée dans notre étude suggère une excellente sensibilité à l'aspirine dans une population saine. En utilisant la valeur seuil de 550 ARU proposée par la Food and Drug Administration (FDA) Américaine [164], nous avons observé une sensibilité de 100% avec cette trousse. Le niveau du 95^e percentile des valeurs d'ARU après la prise d'aspirine (476,9 ARU) témoigne de l'excellente sensibilité de cette analyse. La valeur du 5^e percentile d'agrégation sans aspirine dans cette même population (538 ARU) suggère que la valeur seuil de 550 ARU proposée par la FDA soit légèrement sous optimale en ce qui concerne la spécificité de l'analyse chez des sujets sains non traités. Puisque la sensibilité analytique sous aspirine est le critère le plus important dans la recherche d'un état de résistance à l'aspirine, cette valeur seuil de 550 ARU s'avère donc conservatrice et limite les risques de résultats faussement positifs.

L'agrégation plaquettaire induite par l'ADP en technique optique ou en impédance a été étudiée par plusieurs auteurs qui ont démontré que cette technique permet d'identifier un effet antiplaquettaire de l'aspirine [2, 122]. Ces études ont rapportées que certains sujets ne démontrent pas d'inhibition de la fonction plaquettaire induite par l'ADP dans une proportion variable de 10 à 50% et ceci est compatible avec notre observation d'une absence d'inhibition à l'ADP dans 15,6% de la population étudiée. Nous proposons que les résultats obtenus avec cette analyse reflètent une sensibilité analytique sous optimale à l'effet de l'aspirine plutôt que de représenter une variabilité de réponse interindividuelle à l'aspirine.

Malgré que la TEG® et l'étude en tube de la chute du décompte plaquettaire utilisent l'AA comme agoniste, plusieurs facteurs techniques potentiels peuvent limiter les résultats obtenus par ces analyses. Ces deux techniques sont effectuées avec un spécimen de sang total plutôt qu'un PRP. La présence de leucocytes et d'érythrocytes dans le tube d'analyse peut augmenter les risques d'interférence technique par la survenue d'interactions intercellulaires favorisant l'aggrégation plaquettaire, de façon indépendante de l'effet de l'AA. Dans notre étude ainsi que dans d'autres publications [165, 166], les résultats générés par la thromboélastographie se sont avérés non interprétables dans plusieurs cas. Quoique plusieurs facteurs techniques tels que des erreurs de prélèvement ou la contamination des cuvettes aient été considérés, ceux-ci ne semblent pas représenter la source principale de variabilité des résultats obtenus puisque la présence de résultats non interprétables est survenue tout au long de l'étude et ne pouvait être corrigée par la reprise de l'analyse. Malgré la standardisation technique du TEG® par une trousse contenant des réactifs et des cuvettes individuelles à chaque analyse (platelet mappingTM assay) ainsi que l'enseignement technique reçu préalablement à notre étude, d'autres améliorations de cette technologie intéressante semblent nécessaires afin d'en améliorer sa sensibilité à l'effet de l'aspirine.

Les résultats du dosage du 11-TxB₂ urinaire ont démontré qu'il existe une variabilité interindividuelle importante limitant l'interprétation d'une valeur donnée chez un seul individu. Par contre, nous avons observé une chute des résultats de 11-TxB₂ chez tous les individus lorsque les résultats pré aspirine ont été comparés aux résultats après la prise d'aspirine. Calculée de cette façon, la diminution relative de

53,3% (IC 95% : 27,3-79,3) du niveau de 11-TxB₂ urinaire sous aspirine indique que deux valeurs sont nécessaires chez un individu donné afin que cette analyse soit interprétable. Cette façon de collecter des résultats s'avère par contre souvent non praticable dans des études de cohorte où seuls des prélèvements sous aspirine sont disponibles.

Plusieurs méta-analyses d'études évaluant la survenue d'évènements athérombotiques récidivants en fonction de résultats d'analyses reliées à la fonction plaquettaire suggèrent un effet pronostique de plusieurs analyses, en particulier l'agrégométrie, le dosage de 11-TxB₂ urinaire et le PFA-100® [3, 97, 167]. Quoique ces analyses aient été utilisées pour supporter le concept de résistance à l'aspirine, une hypothèse alternative de ces résultats significatifs est qu'il pourrait exister une variabilité intrinsèque de l'activité plaquettaire indépendante de l'effet de l'aspirine et contribuant au pronostic vasculaire d'un patient. Puisque la corrélation entre nos résultats d'agrégation induite par l'ADP, de la TEG®, du dosage de 11-dTxB₂ urinaire et de la chute du décompte plaquettaire en tube était pauvre, il est vraisemblable que la valeur pronostique d'un test de fonction plaquettaire soit limité à certaines de ces techniques et que les mécanismes physiopathologiques associés à ce risque thrombotique soient variables.

Conclusion

Quoique la résistance biologique à l'aspirine puisse être un phénomène réel, notre étude ainsi que d'autres publications ont conclu qu'il est possible d'identifier un effet biologique de l'aspirine chez la très grande majorité des individus sains lorsque la technologie utilisée est suffisamment sensible et basée sur l'effet inhibiteur de l'aspirine sur la COX-1. La présence que de très rares individus sains résistants à l'aspirine décrits dans la littérature suggère que la prévalence de la résistance constitutive à l'aspirine soit inférieure à 1%.

Il est vraisemblable qu'un effet sous optimal de l'aspirine puisse se développer dans des situations pathologiques et donner lieu à une résistance acquise à l'aspirine. Les causes les plus importantes de ce phénomène semblent être la non observance au traitement et une interaction pharmacologique de l'aspirine avec les AINS tels que l'ibuprofène. Quoique d'autres étiologies potentielles soient présumées, celles-ci demeurent controversées justifiant la poursuite d'études plus spécifiques à cet égard.

La sensibilité analytique variable à l'aspirine des technologies d'évaluation plaquettaire témoigne de la complexité des mécanismes d'activation plaquettaire et du rôle important mais non essentiel de la COX-1 dans la génération d'une activation plaquettaire. Il s'avère donc vraisemblable que la très grande variabilité de la prévalence de la résistance à l'aspirine rapportée dans la littérature soit liée à une sensibilité analytique variable des technologies utilisées à l'aspirine et donc surestimée de façon inversement proportionnelle à la sensibilité du test utilisé. Nos travaux suggèrent que l'agrégation optique induite par l'AA et que la trousse

VerifyNow® Aspirin sont très sensibles à l'effet biologique de l'aspirine et devraient servir d'analyses de référence dans des études ultérieures sur le sujet.

La démonstration par plusieurs auteurs d'un risque plus élevé de manifestations athérombotiques en présence d'une inhibition sous optimale de la fonction plaquettaire [93] ou d'un taux plus élevé des métabolites urinaires de la thromboxane [98] suggère néanmoins que l'activité plaquettaire est un facteur de risque important d'évènements thrombotiques dans une population à risque. Dans ce sens, la variabilité observée de la prévalence de « résistance » à l'aspirine, pourrait correspondre à une variabilité d'un état d'hyperactivité globale de la plaquette, indépendante de l'effet de l'aspirine sur la COX-1. La possibilité que cette hyperactivité plaquettaire soit associée à des mécanismes physiopathologiques indépendants de la COX-1 modulés par l'aspirine ou par des mécanismes physiologiques complètement indépendants de l'aspirine soulève de nombreuses hypothèses qui devront faire l'objet d'études ultérieures.

Bibliographie

1. Lordkipanidze, M., et al., *Aspirin resistance: truth or dare*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(3): p. 733-43.
2. Gum, P.A., et al., *Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2001. **88**(3): p. 230-235.
3. Snoep, J.D., et al., *Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis*. Arch Intern Med, 2007. **167**(15): p. 1593-9.
4. Pulcinelli, F.M., et al., *Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(6): p. 979-984.
5. Wang, J.C., et al., *Incidence of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA*. Am J Cardiol, 2003. **92**(12): p. 1492-1494.
6. Fontana, P., et al., *Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(4): p. 813-9.
7. Schultze, M., *Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes*. Arch Mikroskop Anat 1865. **1**: p. 1-14.
8. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet*. British Journal of Haematology, 2006. **133**(3): p. 251-258.
9. Chang, Y., et al., *From hematopoietic stem cells to platelets*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 318-27.
10. Battinelli, E.M., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(5): p. 419-26.

11. Italiano, J.E., Jr., et al., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
12. Harker, L.A. and C.A. Finch, *Thrombokinetis in man*. J Clin Invest, 1969. **48**(6): p. 963-74.
13. Davis, R.E., et al., *Localization of megakaryocytes in normal mice and following administration of platelet antiserum, 5-fluorouracil, or radiostrontium: evidence for the site of platelet production*. Exp Hematol, 1997. **25**(7): p. 638-48.
14. Hartwig, J.H., *The platelet: form and function*. Semin Hematol, 2006. **43**(1 Suppl 1): p. S94-100.
15. Fox, J.E., *Cytoskeletal proteins and platelet signaling*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 198-213.
16. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. **12**(5): p. 261 - 273.
17. Reed, G.L., *Platelet secretory mechanisms*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): p. 441-50.
18. Moroi, M., et al., *Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion*. Blood, 1996. **88**(6): p. 2081-92.
19. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 403-12.
20. Ebbeling, L., et al., *Rapid ultrastructural changes in the dense tubular system following platelet activation*. Blood, 1992. **80**(3): p. 718-23.
21. Walker, T.R. and S.P. Watson, *Synergy between Ca²⁺ and protein kinase C is the major factor in determining the level of secretion from human platelets*. Biochem J, 1993. **289** (Pt 1): p. 277-82.

22. Seabra, M.C., E.H. Mules, and A.N. Hume, *Rab GTPases, intracellular traffic and disease*. Trends Mol Med, 2002. **8**(1): p. 23-30.
23. Sollner, T., et al., *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 318-24.
24. Ren, Q., et al., *Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(1): p. 24-33.
25. George, J.N., J.P. Caen, and A.T. Nurden, *Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease*. Blood, 1990. **75**(7): p. 1383-95.
26. Niiya, K., et al., *Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation*. Blood, 1987. **70**(2): p. 475-83.
27. O'Toole, T.E., et al., *Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction*. J Cell Biol, 1994. **124**(6): p. 1047-59.
28. Xiao, T., et al., *Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics*. Nature, 2004. **432**(7013): p. 59-67.
29. Michelson, A.D., *Platelets*. 2nd ed. 2007, Amsterdam: Academic Press/Elsevier. xlii, 1343.
30. Yacoub, D., et al., *Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 30024-35.
31. Engelmann, B., *Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 188-90.
32. Yang, J., et al., *Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46035-42.
33. Shattil, S.J. and P.J. Newman, *Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1606-15.

34. Prevost, N., et al., *Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9820-5.
35. Gould, W.R., et al., *Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(4): p. 733-41.
36. Prasad, K.S., et al., *Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12367-71.
37. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. Circulation, 1995. **92**(3): p. 657-71.
38. Dai, G., et al., *Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14871-6.
39. van der Wal, A.C., et al., *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 36-44.
40. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
41. Matetzky, S., et al., *Smoking increases tissue factor expression in atherosclerotic plaques: implications for plaque thrombogenicity*. Circulation, 2000. **102**(6): p. 602-4.
42. Dangas, G., et al., *Pravastatin therapy in hyperlipidemia: effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile*. J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(5): p. 1294-304.
43. Osende, J.I., et al., *Blood thrombogenicity in type 2 diabetes mellitus patients is associated with glycemic control*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(5): p. 1307-12.

44. Kaikita, K., et al., *Tissue factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(10): p. 2232-7.
45. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2000. **101**(8): p. 841-3.
46. Mutin, M., et al., *Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells*. *Blood*, 1999. **93**(9): p. 2951-8.
47. Arias-Salgado, E.G., et al., *Variations in platelet protein associated with arterial thrombosis*. *Thromb Res*, 2008.
48. Ridker, P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, *Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease*. *JAMA*, 2001. **285**(19): p. 2481-5.
49. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
50. Pratico, D., et al., *Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoïd formation in low density lipoprotein receptor knockout mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3358-63.
51. Fitzgerald, D.J., et al., *Platelet activation in unstable coronary disease*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(16): p. 983-9.
52. Patrono, C., et al., *Antiplatelet Drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. *Chest*, 2008. **133**(6_suppl): p. 199S-233.
53. Statistics Canada. *Deaths, by cause, Chapter IX: Diseases of the circulatory system (100 to 109), age group and sex, Canada, annual (number), CANSIM (database) 2004* [cited June 12, 2008]; Available from: http://cansim2.statcan.ca/cgi-win/cnsmcgi.exe?Lang=E&RootDir=CII/&CANSIMFile=CII/CII_1_E.htm.

54. Rosamond, W., et al., *Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. *Circulation*, 2008. **117**(4): p. e25-146.
55. Public Health Agency of Canada. *Economic Burden of Illness in Canada, 1998*. 2002 [cited June 24th, 2008]; Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ebic-femc98/pdf/ebic1998.pdf>.
56. McPherson, R., et al., *Canadian Cardiovascular Society position statement--recommendations for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease*. *Can J Cardiol*, 2006. **22**(11): p. 913-27.
57. Becker, R.C., et al., *The Primary and Secondary Prevention of Coronary Artery Disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. *Chest*, 2008. **133**(6_suppl): p. 776S-814.
58. Antman, E.M., et al., *2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008. **51**(2): p. 210-247.
59. Albers, G.W., et al., *Antithrombotic and Thrombolytic Therapy for Ischemic Stroke: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. *Chest*, 2008. **133**(6_suppl): p. 630S-669.
60. Adams, H.P., Jr., et al., *Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists*. *Circulation*, 2007. **115**(20): p. e478-534.
61. Hirsch, A.T., et al., *ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic): A Collaborative Report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, * Society for Cardiovascular Angiography and*

- Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): Endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. Circulation, 2006. 113(11): p. e463-465.*
62. Sobel, M. and R. Verhaeghe, *Antithrombotic Therapy for Peripheral Artery Occlusive Disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. Chest, 2008. **133**(6_suppl): p. 815S-843.
63. Bhatt, D.L., et al., *Clopidogrel and Aspirin versus Aspirin Alone for the Prevention of Atherothrombotic Events*. N Engl J Med, 2006. **354**(16): p. 1706-1717.
64. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*. Nat New Biol, 1971. **231**(25): p. 232-5.
65. Mueller, R.L. and S. Scheidt, *History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 432-49.
66. Loll, P.J., D. Picot, and R.M. Garavito, *The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(8): p. 637-43.
67. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, *Cyclooxygenases 1 and 2*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 97-120.
68. Rocca, B., et al., *Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7634-9.
69. Solomon, S.D., et al., *Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention*. N Engl J Med, 2005. **352**(11): p. 1071-80.

70. Johnsen, S.P., et al., *Risk of hospitalization for myocardial infarction among users of rofecoxib, celecoxib, and other NSAIDs: a population-based case-control study*. Arch Intern Med, 2005. **165**(9): p. 978-84.
71. Lindemann, S., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 485-90.
72. Steer, K.A., et al., *Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification*. Heart, 1997. **77**(4): p. 333-7.
73. Husain, S., et al., *Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 1998. **97**(8): p. 716-20.
74. Lopez-Farre, A., et al., *Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1*. Circulation, 1995. **91**(7): p. 2080-8.
75. Balsano, F., et al., *Antiplatelet treatment with ticlopidine in unstable angina. A controlled multicenter clinical trial. The Studio della Ticlopidina nell'Angina Instabile Group*. Circulation, 1990. **82**(1): p. 17-26.
76. Lau, W.C., et al., *Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction*. Circulation, 2003. **107**(1): p. 32-7.
77. Angiolillo, D.J., et al., *Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1895-900.
78. Montalescot, G., et al., *A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(5): p. 931-8.
79. Cuisset, T., et al., *Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(7): p. 1339-45.

80. Payne, C.D., et al., *Switching directly to prasugrel from clopidogrel results in greater inhibition of platelet aggregation in aspirin-treated subjects*. *Platelets*, 2008. **19**(4): p. 275-81.
81. Wiviott, S.D., et al., *Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 trial*. *Circulation*, 2007. **116**(25): p. 2923-32.
82. Michelson, A.D., *P2Y12 antagonism: promises and challenges*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(3): p. s33-8.
83. Chew, D.P., et al., *Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials*. *Circulation*, 2001. **103**(2): p. 201-6.
84. Harrington, R.A., et al., *Antithrombotic Therapy for Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. *Chest*, 2008. **133**(6_suppl): p. 670S-707.
85. Derendorf, H., et al., *Dipyridamole bioavailability in subjects with reduced gastric acidity*. *J Clin Pharmacol*, 2005. **45**(7): p. 845-50.
86. Gresele, P., et al., *Dipyridamole inhibits platelet aggregation in whole blood*. *Thromb Haemost*, 1983. **50**(4): p. 852-6.
87. Bult, H., et al., *Dipyridamole potentiates the anti-aggregating and vasodilator activity of nitric oxide*. *Eur J Pharmacol*, 1991. **199**(1): p. 1-8.
88. Neri Serneri, G.G., et al., *Enhanced prostacyclin production by dipyridamole in man*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1981. **21**(1): p. 9-15.
89. Diener, H.C., et al., *European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke*. *J Neurol Sci*, 1996. **143**(1-2): p. 1-13.

90. Halkes, P.H., et al., *Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial*. Lancet, 2006. **367**(9523): p. 1665-73.
91. De Schryver, E.L., A. Algra, and J. van Gijn, *Dipyridamole for preventing stroke and other vascular events in patients with vascular disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(2): p. CD001820.
92. *Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients*. BMJ, 2002. **324**(7329): p. 71-86.
93. Chen, W.H., et al., *Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(6): p. 1122-1126.
94. Ersoz, G., et al., *Differential effect of aspirin on platelet aggregation in patients with coronary artery disease in relation with associated risk factors*. Jpn Heart J, 2003. **44**(1): p. 21-29.
95. Watala, C., et al., *Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)--its relation to metabolic control*. Thromb Res, 2004. **113**(2): p. 101-113.
96. Friend, M., I. Vucenik, and M. Miller, *Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia*. BMJ, 2003. **326**(7380): p. 82-83.
97. Krasopoulos, G., et al., *Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis*. Bmj, 2008. **336**(7637): p. 195-8.
98. Eikelboom, J.W., et al., *Aspirin-Resistant Thromboxane Biosynthesis and the Risk of Myocardial Infarction, Stroke, or Cardiovascular Death in Patients at High Risk for Cardiovascular Events*. Circulation, 2002. **105**(14): p. 1650-1655.
99. Reny, J.L., et al., *Aspirin response variability assessed with the PFA-100 device*. Thromb Haemost, 2008. **99**(5): p. 968-9.

100. Bode-Boger, S.M., et al., *Effects of very low dose and enteric-coated acetylsalicylic acid on prostacyclin and thromboxane formation and on bleeding time in healthy subjects*. Eur J Clin Pharmacol, 1998. **54**(9-10): p. 707-14.
101. Catella-Lawson, F., et al., *Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin*. N Engl J Med, 2001. **345**(25): p. 1809-17.
102. Gilard, M., et al., *Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(3): p. 256-60.
103. Trenk, D., et al., *Impact of cytochrome P450 3A4-metabolized statins on the antiplatelet effect of a 600-mg loading dose clopidogrel and on clinical outcome in patients undergoing elective coronary stent placement*. Thromb Haemost, 2008. **99**(1): p. 174-81.
104. Natarajan, A., A.G. Zaman, and S.M. Marshall, *Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of antiplatelet agents*. Diab Vasc Dis Res, 2008. **5**(2): p. 138-44.
105. Jacopo, G., et al., *Identification of platelet hyper-reactivity measured with a portable device immediately after percutaneous coronary intervention predicts in stent thrombosis*. Thromb Res, 2007. **121**(3): p. 407-12.
106. Poston, R., et al., *Platelet function tests predict bleeding and thrombotic events after off-pump coronary bypass grafting*. Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **27**(4): p. 584-91.
107. Patrono, C., et al., *Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology*. Eur Heart J, 2004. **25**(2): p. 166-81.
108. Michelson, A.D., et al., *Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(6): p. 1309-11.
109. Milian, M.G., *Technique pour l'étude clinique de la coagulation du sang*. Soc Med Hosp Paris, 1901. **18**: p. 777-779.

110. Duke, W.W., *The relation of blood platelets to hemorrhagic disease.* JAMA, 1910. **60**: p. 1185-1192.
111. Ivy, A.C., Shapiro, P.F., Melnick, P., *The bleeding tendency in jaundice.* Surg Gynecol Obstet, 1935. **60**: p. 781-784.
112. Peterson, P., et al., *The preoperative bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and American Society of Clinical Pathologists' position article.* Arch Surg, 1998. **133**(2): p. 134-9.
113. Buchanan, M.R. and S.J. Brister, *Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically.* Can J Cardiol, 1995. **11**(3): p. 221-7.
114. Buchanan, M.R., et al., *Results of the BRAT study--a pilot study investigating the possible significance of ASA nonresponsiveness on the benefits and risks of ASA on thrombosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery.* Can J Cardiol, 2000. **16**(11): p. 1385-90.
115. Hayward, C.P., et al., *Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 312-9.
116. Crescente, M., et al., *Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review.* Thromb Haemost, 2008. **99**(1): p. 14-26.
117. Madan, M., et al., *Rapid assessment of glycoprotein IIb/IIIa blockade with the platelet function analyzer (PFA-100) during percutaneous coronary intervention.* Am Heart J, 2001. **141**(2): p. 226-33.
118. Geiger, J., et al., *Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods.* Clin Chem, 2005. **51**(6): p. 957-65.
119. Born, G.V., *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.* Nature, 1962. **194**: p. 927-9.
120. Gibbins, J.M. and M.P. Mahaut-Smith, *Platelets and megakaryocytes.* 2004, Totowa, N.J.: Humana Press. v.

121. *Erratum to: A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease.* J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(9): p. 1918-1918.
122. Gum, P.A., et al., *A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(6): p. 961-965.
123. Jefferson, B.K., et al., *Aspirin resistance and a single gene.* Am J Cardiol, 2005. **95**(6): p. 805-8.
124. Lordkipanidze, M., et al., *A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease.* Eur Heart J, 2007. **28**(14): p. 1702-8.
125. Zimmermann, N., et al., *Functional and Biochemical Evaluation of Platelet Aspirin Resistance After Coronary Artery Bypass Surgery.* Circulation, 2003. **108**(5): p. 542-547.
126. Becker, D.M., et al., *Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy.* Jama, 2006. **295**(12): p. 1420-7.
127. Snoep, J.D., et al., *Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis.* Am Heart J, 2007. **154**(2): p. 221-31.
128. Ingerman-Wojenski, C., J.B. Smith, and M.J. Silver, *Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets.* J Lab Clin Med, 1983. **101**(1): p. 44-52.
129. Ivandic, B.T., et al., *Determination of aspirin responsiveness by use of whole blood platelet aggregometry.* Clin Chem, 2007. **53**(4): p. 614-9.
130. Dyszkiewicz-Korpanty, A.M., et al., *Comparison of a rapid platelet function assay--Verify Now Aspirin--with whole blood impedance aggregometry for the detection of aspirin resistance.* Thromb Res, 2007. **120**(4): p. 485-8.

131. Hochholzer, W., et al., *Whole blood aggregometry for evaluation of the antiplatelet effects of clopidogrel*. *Thromb Res*, 2007. **119**(3): p. 285-91.
132. Dalby, M.C., et al., *Abciximab is rapidly effective in preventing and arresting established platelet aggregation*. *J Thromb Thrombolysis*, 2002. **13**(3): p. 141-5.
133. Anderson, D., et al., *Rapid method for quantification of pharmacologic inhibition of platelet aggregation using ADP-induced change in platelet count*. *Thromb Haemost*, 1995. **73**: p. 1446abst.
134. Dichiaro, J., et al., *Platelet function measured by VerifyNow identifies generalized high platelet reactivity in aspirin treated patients*. *Platelets*, 2007. **18**(6): p. 414-23.
135. Craft, R.M., et al., *Comparison of modified Thrombelastograph and Plateletworks whole blood assays to optical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrel inhibition in elective surgery patients*. *J Lab Clin Med*, 2005. **145**(6): p. 309-15.
136. White, M.M., et al., *The use of the point of care Helena ICHOR/Plateletworks and the Accumetrics Ultegra RPFAs for assessment of platelet function with GPIIb-IIIa antagonists*. *J Thromb Thrombolysis*, 2004. **18**(3): p. 163-9.
137. Karon, B.S., et al., *Aspirin responsiveness in healthy volunteers measured with multiple assay platforms*. *Clin Chem*, 2008. **54**(6): p. 1060-5.
138. Paniccia, R., et al., *Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(9): p. 1839-47.
139. Wheeler, G.L., et al., *The Ultegra rapid platelet-function assay: comparison to standard platelet function assays in patients undergoing percutaneous coronary intervention with abciximab therapy*. *Am Heart J*, 2002. **143**(4): p. 602-11.
140. Steinhubl, S.R., et al., *Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary*

intervention: results of the GOLD (AU-Assessing Ultegra) multicenter study. Circulation, 2001. **103**(21): p. 2572-8.

141. Patrono, C., et al., *Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans.* J Clin Invest, 1986. **77**(2): p. 590-4.
142. Catella, F. and G.A. FitzGerald, *Paired analysis of urinary thromboxane B2 metabolites in humans.* Thromb Res, 1987. **47**(6): p. 647-56.
143. Gonzalez-Conejero, R., et al., *Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure?* Stroke, 2005. **36**(2): p. 276-80.
144. Hartert, H., *Blutgerinnungstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren.* Klin Wochenschr, 1948. **26**(37-38): p. 577-83.
145. Craft, R.M., et al., *A novel modification of the Thrombelastograph assay, isolating platelet function, correlates with optical platelet aggregation.* J Lab Clin Med, 2004. **143**(5): p. 301-9.
146. Rivard, G., et al., *The Use of Thrombelastograph To Monitor the Aspirin Induced Inhibition of Platelet Response to Arachidonic Acid.* Blood, 2003: p. 3963a.
147. Tantry, U.S., K.P. Bliden, and P.A. Gurbel, *Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation.* J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(9): p. 1705-9.
148. Tucci, M.A., et al., *Platelet function monitoring with the Sonoclot analyzer after in vitro tirofiban and heparin administration.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(6): p. 1314-22.
149. Aleil, B., et al., *Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases.* J Thromb Haemost, 2005. **3**(1): p. 85-92.

150. Jakubowski, J.A., et al., *A comparison of the antiplatelet effects of prasugrel and high-dose clopidogrel as assessed by VASP-phosphorylation and light transmission aggregometry*. Thromb Haemost, 2008. **99**(1): p. 215-22.
151. Frelinger, A.L., 3rd, et al., *Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance*. Circulation, 2006. **113**(25): p. 2888-96.
152. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
153. Barrett, J.C. and L.R. Cardon, *Evaluating coverage of genome-wide association studies*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 659-62.
154. Topol, E.J., et al., *Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 2**: p. R117-23.
155. Goodman, T., A. Ferro, and P. Sharma, *Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review*. Br J Clin Pharmacol, 2008.
156. Gachet, C., *P2 receptors, platelet function and pharmacological implications*. Thromb Haemost, 2008. **99**(3): p. 466-72.
157. Macaulay, I.C., et al., *Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3260-9.
158. Hochstrasser, D.F., J.C. Sanchez, and R.D. Appel, *Proteomics and its trends facing nature's complexity*. Proteomics, 2002. **2**(7): p. 807-12.
159. Macaulay, I.C., et al., *Platelet genomics and proteomics in human health and disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3370-7.
160. Coppinger, J.A., et al., *Moderation of the platelet releasate response by aspirin*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4786-92.

161. Van den Bruel, A., et al., *The evaluation of diagnostic tests: evidence on technical and diagnostic accuracy, impact on patient outcome and cost-effectiveness is needed*. J Clin Epidemiol, 2007. **60**(11): p. 1116-22.
162. ClinicalTrials.gov. *GRAVITAS: Gauging Responsiveness With A VerifyNow Assay-Impact On Thrombosis And Safety*. 2008 [cited July 4th, 2008]; Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00645918>.
163. Schwartz, K.A., et al., *Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2005. **95**(8): p. 973-5.
164. Accumetrics, *Package insert*, in *Ultegra Rapid Platelet Function Analyzer (RPFA-ASA)*. 2003, Accumetrics: San Diego.
165. Hobson, A.R., et al., *A novel fifteen minute test for assessment of individual time-dependent clotting responses to aspirin and clopidogrel using modified thrombelastography*. Platelets, 2007. **18**(7): p. 497-505.
166. Mayne, E., et al., *The utility of thrombo-elastography in the monitoring of aspirin therapy*. S Afr Med J, 2007. **97**(12): p. 1289-91.
167. Reny, J.L., et al., *Use of the PFA-100trade mark closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis*. J Thromb Haemost, 2008.