

Université de Montréal

**Étude de l'effet des médicaments antiplaquettaires
sur la fonction plaquettaire:
De la variabilité de réponse à l'effet rebond**

par

Marie Lordkipanidzé

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de pharmacie
en vue de l'obtention du grade de PhD
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Décembre, 2009

© Marie Lordkipanidzé, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Étude de l'effet des médicaments antiplaquettaires sur la fonction plaquettaire:
De la variabilité de réponse à l'effet rebond

Présentée par :
Marie Lordkipanidzé

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Huy Ong, président-rapporteur
Chantal Pharand, directeur de recherche
Jean G. Diodati, co-directeur
Pierre Thérroux, membre du jury
David H. Fitchett, examinateur externe
William D. Lubell, représentant du doyen de la FES

Résumé

En inhibant la formation de caillots dans le sang, les médicaments antiplaquettaires diminuent de façon importante le risque d'événements ischémiques aigus. Cependant, une sous-population de patients souffrant de maladie coronarienne présente une inhibition inadéquate de la fonction plaquettaire malgré la prise quotidienne d'acide acétylsalicylique (AAS). Le premier volet de cette thèse démontre qu'une régénération plaquettaire accélérée pourrait expliquer en partie la variabilité dans la persistance de l'effet antiplaquettaire de l'AAS chez certains sujets souffrant de maladie coronarienne. Ces données suggèrent qu'une augmentation de la fréquence d'administration d'AAS d'une à deux fois par jour pourrait être bénéfique chez ces sujets.

Des méta-analyses ont suggéré qu'une réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS pourrait augmenter le risque d'événements ischémiques récurrents. La nature rétrospective de ces analyses ne permet pas d'établir la causalité. Dans le deuxième volet de cette thèse, les résultats d'une étude prospective visant à comparer la pertinence clinique de 6 tests de fonction plaquettaire fréquemment utilisés pour évaluer la réponse plaquettaire à l'AAS est présentée. Les résultats démontrent qu'aucun des tests de fonction plaquettaire couramment employés ne prédit la survenue d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de maladie coronarienne stable. Toutefois, la cessation de la prise d'AAS est un prédicteur important d'événements thrombotiques.

La cessation de médicaments antiplaquettaires a souvent été associée à la survenue d'événements thrombotiques dans les jours suivant l'interruption. À savoir si la survenue de ces événements est attribuable uniquement au retrait d'un médicament protecteur ou plutôt à une sensibilisation plaquettaire, constitue un débat d'actualité. Dans le troisième volet de cette thèse, des données sont présentées démontrant que la cessation de clopidogrel après la période recommandée par les lignes directrices actuelles provoque une sensibilisation des plaquettes nouvellement formées aux stimuli plaquettaires

physiologiques. Ces résultats encouragent la recherche sur différentes modalités pour atténuer le risque thrombotique accru chez ces patients souffrant de maladie coronarienne.

En conclusion, cet ouvrage présente des études visant à identifier les sous-populations de patients qui sont plus à risque de complications cardiovasculaires récurrentes. Dans ce contexte, la personnalisation de traitement est une avenue thérapeutique prometteuse, où chaque patient pourra recevoir un traitement ciblé en fonction de ses besoins et de ses contre-indications. Ce changement de paradigme d'une thérapie empirique issue d'études de grande envergure sur des données populationnelles à une thérapie ajustée aux besoins individuels représente un vaste champ de recherche, où la majorité des découvertes sont à faire.

Mots-clés : médicaments antiplaquettaires, pharmacologie clinique, plaquettes, tests de fonction plaquettaire, traitement personnalisé, variabilité de réponse

Abstract

By inhibiting the formation of blood clots, antiplatelet drugs significantly reduce the risk of acute ischemic events. However, a subpopulation of patients suffering from coronary artery disease presents with an inadequate inhibition of platelet function despite taking acetylsalicylic acid (ASA) daily. The first part of this thesis demonstrates that accelerated platelet turnover could partly explain the variability in the persistence of the antiplatelet effect of ASA in some coronary artery disease patients. These results suggest that increasing the frequency of administration of ASA from once to twice daily may be beneficial in selected patients.

Meta-analyses have suggested that an inadequate platelet response to ASA may increase the risk of recurrent ischemic events. The retrospective nature of these analyses forbids the inference of causality. In the second part of this thesis, the results of a prospective study comparing the clinical relevance of 6 platelet function tests commonly used to assess platelet response to ASA are presented. The results show that none of the commonly used platelet function tests predict the occurrence of acute ischemic events in stable coronary artery disease patients. However, discontinuation of ASA is an important predictor of thrombotic events.

Discontinuation of antiplatelet drugs has often been associated with thrombotic events in the days following cessation. If the occurrence of these events is due solely to the withdrawal of a protective drug or rather platelet sensitization is a topic of some debate. In the third part of this thesis, data are presented demonstrating that clopidogrel discontinuation, after the period recommended by current guidelines, leads to sensitization of newly formed platelets to physiological platelet stimuli. These results encourage research on different ways to mitigate the increased risk of thrombosis in coronary artery disease patients scheduled to discontinue clopidogrel therapy.

In conclusion, this dissertation presents studies aiming to identify subpopulations of patients who are at increased risk of recurrent cardiovascular events. In this context, the personalization of treatment is a promising therapeutic avenue, where each patient can receive a targeted therapy according to his needs and contraindications. This shift in paradigm from empirical therapy based on population data retrieved from large clinical studies to therapy tailored to individual needs opens a vast field of research, where the majority of discoveries remain to be made.

Keywords : antiplatelet drugs, clinical pharmacology, individualized treatment, platelets, platelet function tests, variability of response

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre 1 : La maladie coronarienne.....	3
Chapitre 2 : L'hémostase.....	7
A) La découverte de la plaquette.....	7
B) Le cycle de vie de la plaquette.....	10
C) Le rôle de la plaquette dans l'agrégation.....	13
i) Adhésion.....	13
ii) Activation et agrégation.....	15
D) Les autres fonctions de la plaquette.....	23
Chapitre 3 : Les médicaments antiplaquettaires dans le traitement de la maladie coronarienne.....	27
A) L'AAS et les autres inhibiteurs de la COX-1.....	27
i) Pharmacologie.....	28
ii) Pharmacocinétique.....	30
iii) Pharmacodynamie.....	31
iv) Efficacité clinique.....	32
v) Variabilité de réponse.....	33
vi) AAS nitrosylée.....	34
vii) Inhibiteurs du récepteur de TxA_2	36
B) Le clopidogrel et les autres inhibiteurs des récepteurs purinergiques.....	37
i) Pharmacologie.....	38
ii) Pharmacocinétique.....	39
iii) Pharmacodynamie.....	41
iv) Efficacité clinique.....	42
v) Variabilité de réponse.....	43
vi) Inhibiteurs du récepteur $P2Y_{12}$ en développement.....	45
vii) Inhibiteurs du récepteur $P2Y_1$	49

C) Les inhibiteurs de la phosphodiesterase.....	49
D) Les inhibiteurs des récepteurs de la thrombine.....	50
Chapitre 4 : L'exploration de la fonction plaquettaire.....	52
A) Les tests globaux de l'hémostase.....	52
i) Temps de saignement standardisé.....	53
ii) Thromboélastographe (TEG [®]).....	53
B) Les tests ciblant l'adhésion plaquettaire.....	54
i) Cone and Plate(let) Analyzer (IMPACT [®]).....	55
C) Les tests ciblant l'activation plaquettaire.....	56
i) Agrégation par transmission lumineuse.....	56
ii) Agrégation par impédance électrique.....	58
iii) Chute du décompte plaquettaire (Plateletworks [®]).....	59
iv) Libération du contenu des granules plaquettares.....	60
v) Concentrations sanguines ou urinaires de métabolites de la TxA ₂	61
vi) Marqueurs de l'activation plaquettaire par cytométrie en flux.....	61
vii) VerifyNow [®]	63
D) Les tests ciblant l'agrégation plaquettaire.....	64
i) Platelet Function Analyzer (PFA-100 [®]).....	65
E) La comparabilité entre les tests de fonction plaquettaire.....	66
i) Évaluation de l'inhibition de la COX-1.....	67
ii) Évaluation de l'inhibition du récepteur P2Y ₁₂	70
F) L'utilité clinique des tests de fonction plaquettaire.....	72
i) Valeur prédictive hémorragique.....	73
ii) Valeur prédictive thrombotique.....	74
Chapitre 5 : Les prédicteurs connus des événements ischémiques récurrents.....	80
A) Les scores de prédiction clinique.....	80
B) Les études observationnelles.....	84

Chapitre 6 : Méthodologie	91
A) Évaluation de la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS lors d'une administration quotidienne standard	91
i) Objectifs.....	91
ii) Sélection des sujets.....	92
iii) Devis expérimental.....	93
iv) Calcul de la taille échantillonnale et analyse statistique.....	94
B) Étude de la pertinence clinique des tests de fonction plaquettaire pour la prédiction d'événements ischémiques majeurs chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable prenant de l'AAS	95
i) Objectifs.....	96
ii) Déroulement de l'étude	96
iii) Calcul de la puissance de l'étude et analyse statistique	97
C) Évaluation de l'impact sur la fonction plaquettaire de la cessation de la prise quotidienne de clopidogrel.....	98
i) Objectifs.....	98
ii) Sélection des sujets.....	99
iii) Devis expérimental.....	100
iv) Calcul de la taille échantillonnale et analyse statistique.....	102
Chapitre 7 : Heterogeneity in platelet cyclooxygenase inhibition by aspirin in coronary artery disease.....	103
Chapitre 8 : Clinical predictiveness of six major platelet function tests used to assess aspirin response in patients with stable coronary artery disease.....	122
Chapitre 9 : Evidence of a pharmacological rebound following discontinuation of clopidogrel therapy in patients with stable coronary artery disease	140

Chapitre 10 : Discussion	167
A) Évaluation de la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS lors d'une administration quotidienne standard	167
i) Résultats majeurs	167
ii) Discussion.....	169
B) Étude de la pertinence clinique des tests de fonction plaquettaire pour la prédiction d'événements ischémiques majeurs chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable prenant de l'AAS	181
i) Résultats majeurs	181
ii) Discussion.....	182
C) Évaluation de l'impact sur la fonction plaquettaire de la cessation de la prise quotidienne de clopidogrel.....	185
i) Résultats majeurs	185
ii) Discussion.....	187
Conclusion	199
Annexe 1 : Formulaire de collecte de données pour l'étude sur la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS sur 24 heures	I
Annexe 2 : Étude-mère sur la comparaison de six tests de fonction plaquettaire évaluant la réponse plaquettaire à l'AAS chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable	V
Annexe 3 : Entrevue téléphonique pour l'étude de suivi	XXIX
Annexe 4 : Formulaire de collecte de données pour l'étude de suivi	XXXI
Annexe 5 : Formulaire de collecte de données pour l'étude sur la cessation de clopidogrel	XXXIII
Annexe 6 : Résumé des accomplissements académiques	XXXVIII

Liste des tableaux

Table 1 : Participant characteristics	117
Table 2 : Participant characteristics at enrolment	136
Table 3 : Clinical events.....	138
Table 4 : Participant characteristics	160

Liste des figures

Figure 1 : Vascularisation du cœur	4
Figure 2 : Schéma illustrant la progression d'athérosclérose avec formation de thrombus .	5
Figure 3 : Portrait de Giulio Bizzozero à l'âge de 20 ans (vers 1866).....	8
Figure 4 : Étapes charnières franchies dans l'étude de la fonction plaquettaire	10
Figure 5 : Structure de la plaquette	12
Figure 6 : Implication des molécules d'adhésion selon la vitesse de cisaillement	14
Figure 7 : Modèles d'agrégation plaquettaire	15
Figure 8 : Voies menant à l'activation plaquettaire	17
Figure 9 : Surface plaquettaire comme plateforme d'ancrage de facteurs de coagulation .	21
Figure 10 : Récepteurs plaquettaires connus et inconnus pour les facteurs de coagulation	22
Figure 11 : Recrutement des leucocytes par les plaquettes activées.....	24
Figure 12 : Origine de l'ARN messager plaquettaire	25
Figure 13 : Processus de traduction d'ARN en protéines dans la plaquette activée.....	26
Figure 14 : Mode de synthèse d'acide acétylsalicylique.....	28
Figure 15 : Cible d'action de l'AAS et des anti-inflammatoires non-stéroïdiens.....	29
Figure 16 : Structure chimique de NCX-4016	35
Figure 17 : Structure chimique de terutroban	36
Figure 18 : Structures chimiques des inhibiteurs du récepteur P2Y ₁₂	37
Figure 19 : Mécanisme d'action des thiényridines	38
Figure 20 : Voies d'activation des thiényridines	40
Figure 21 : Variabilité de réponse plaquettaire au clopidogrel	44
Figure 22 : Schéma du devis de l'appareil TEG [®]	54
Figure 23 : Schéma du devis du Cone and Plate(let) Analyzer	55
Figure 24 : Schéma du devis de l'agrégométrie optique.....	57
Figure 25 : Schéma du devis de l'agrégométrie par impédance électrique	58
Figure 26 : Illustration de l'appareil Multiplate [®]	59

Figure 27 : Pertinence du VASP comme cible pour évaluer l'activité plaquettaire en réponse à l'ADP	63
Figure 28 : Schéma du devis de VerifyNow [®]	64
Figure 29 : Schéma du devis de PFA-100 [®]	65
Figure 30 : Risque de subir un événement ischémique en présence d'une inhibition insuffisante de la fonction plaquettaire par l'AAS.....	76
Figure 31 : Risque de subir un événement ischémique en présence d'une inhibition insuffisante de la fonction plaquettaire par le clopidogrel	78
Figure 32 : Valeur prédictive du score TIMI	81
Figure 33 : Grille de calcul du risque de mortalité par le score GRACE	83
Figure 34 : Platelet cyclooxygenase inhibition by aspirin as assessed by	119
Figure 35 : Platelet cyclooxygenase-independent aggregation as assessed by	120
Figure 36 : Platelet TxB ₂ formation following cyclooxygenase-independent aggregation induced by	121
Figure 37 : Major adverse cardiovascular and cerebrovascular event ± revascularization risk as a function of aspirin response	139
Figure 38 : Platelet aggregation as assessed by light transmission aggregometry in response to increasing concentrations of ADP, as a function of time from clopidogrel discontinuation	163
Figure 39 : Platelet aggregation as assessed by the VerifyNow [®] assay as a function of time from clopidogrel discontinuation	164
Figure 40 : Concentration-response curves for platelet aggregation, as assessed by light transmission aggregometry	165
Figure 41 : Assessment of hsCRP as a function of time from clopidogrel discontinuation	166
Figure 42 : Mécanisme compensatoire potentiel lors de l'administration chronique de clopidogrel	195

Liste des abréviations

- 11-dTxB₂ : 11-dehydrothromboxane B₂
- AA : acide arachidonique
- AAS : acide acétylsalicylique
- ACC : *American College of Cardiology*
- ADP : adénosine diphosphate
- AHA : *American Heart Association*
- ATP : adénosine triphosphate
- COX : cyclo-oxygénase
- DAG : 1,2-diacylglycerol
- GP : glycoprotéine
- hsCRP : protéine C-réactive à haute sensibilité
- IP₃ : 1,4,5-IP₃
- LDL : lipoprotéines de faible densité
- NF-κB : facteur nucléaire κB
- NO : oxyde nitrique
- PFA-100[®] : *Platelet function analyzer*
- PAR : *protease-activated receptor*
- PG : prostaglandine
- PI-3K : PI₃-kinase
- PIP₂ : PI-4,5-P₂
- PGI₂ : prostacycline
- PKC : protéine kinase C
- PLA₂ : phospholipase A₂
- PLC : phospholipase C
- SCAI : *Society for Cardiovascular Angiography and Interventions*
- Tx : thromboxane
- TXAS : thromboxane synthase

TP : récepteur aux thromboxanes

TRAP : peptide activateur du récepteur de la thrombine

VASP : *vasodilator-stimulated phosphoprotein*

vWF: facteur de von Willebrand

*À Alexandre,
pour son soutien et sa confiance inébranlable
en l'accomplissement de ce projet*

Remerciements

Je tiens à remercier pour leur appui et leurs conseils, mes directeurs de recherche et mentors, Dre Chantal Pharand et Dr Jean G. Diodati.

Pour leurs nombreux commentaires, suggestions et recommandations, je remercie Dr Erick Schampaert et Dr Donald A. Palisaitis.

Pour son attention méticuleuse et son travail quotidien dans le laboratoire, je remercie Edmond Sia.

Pour leur coopération et leur constante bonne humeur, j'aimerais remercier l'équipe de l'unité de recherche, et plus particulièrement Céline Groulx.

Pour leur précieuse collaboration, j'aimerais citer les cardiologues de la clinique externe de cardiologie de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

Pour les discussions candides et animées sur toutes les facettes de la recherche et de la vie académique, j'aimerais remercier mes collègues étudiants du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. J'ai une pensée particulière pour Marilyn de Chantal, Louis-Philippe Richer, Sévan Kaloustian et Shérif Shousha.

Pour leur confiance inébranlable et leur soutien inconditionnel, je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement ma mère, Nicole Huneault et mon époux, Alexandre Carvalho Dias; leurs encouragements et opinions ont façonné ma personne et mon parcours.

Introduction

La thérapie antiplaquettaire est une pierre angulaire dans la prévention secondaire d'événements ischémiques aigus.¹ À cet effet, les lignes directrices actuelles recommandent la prise quotidienne à vie d'acide acétylsalicylique (AAS, AspirinTM) chez tout sujet souffrant de maladie coronarienne, et l'ajout de clopidogrel chez certains sujets à haut risque d'événements ischémiques pour une période de 1 mois à 1 an.²⁻⁶

En inhibant la formation de caillots dans le sang, les médicaments antiplaquettaires diminuent de façon importante le risque d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral et de mortalité de cause vasculaire.¹ Cependant, la réponse plaquettaire à l'AAS et au clopidogrel n'est pas identique chez tous les individus. En effet, une sous-population de patients coronariens présente une inhibition incomplète ou inadéquate de la fonction plaquettaire malgré la prise quotidienne de ces médicaments.^{7, 8} Des méta-analyses ont suggéré une association entre une réponse plaquettaire inadéquate aux médicaments antiplaquettaires et un risque accru d'événements ischémiques récurrents, mais la nature rétrospective de ces analyses ne permettait pas d'en établir la causalité.^{9, 10} Ainsi, la pertinence clinique de la variabilité dans la réponse plaquettaire et les mécanismes sous-jacents demeurent peu connus et feront l'objet du présent ouvrage.

Par ailleurs, bien qu'il demeure incertain que la variabilité dans la réponse aux médicaments antiplaquettaires constitue un facteur de risque d'événements ischémiques récurrents, la cessation de ces médicaments a été maintes fois associée à une recrudescence de la survenue de tels événements dans les jours suivants l'interruption.¹¹ À savoir si la survenue de ces événements est attribuable uniquement au retrait d'un médicament protecteur, ou plutôt à une sensibilisation plaquettaire qui se manifeste comme une disposition accrue à la formation de caillots suite au retrait du médicament, constitue un débat d'actualité dans la littérature scientifique auquel cette thèse tentera d'apporter des éléments nouveaux.

Cette thèse s'articule autour de 3 articles fondateurs issus des recherches menées durant mes études doctorales. Les prochaines sections recensent la littérature scientifique en ce qui a trait à la maladie coronarienne, au fonctionnement des plaquettes, aux méthodes évaluatives de l'inhibition plaquettaire, à l'effet pharmacologique et clinique de l'administration et du retrait des médicaments antiplaquettaires, ainsi qu'aux prédicteurs connus des événements ischémiques récurrents. Trois volets distincts seront ensuite abordés par articles, soient :

1. L'exploration des mécanismes sous-jacents à la variabilité plaquettaire en réponse à l'administration quotidienne d'AAS chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable
2. La pertinence clinique d'étudier la réponse plaquettaire à l'AAS chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable
3. L'effet sur les plaquettes de la cessation du clopidogrel chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable

Chacun de ces volets sera examiné en détails dans la section discussion, et la pertinence des résultats dans l'état actuel des connaissances sera présentée dans une discussion globale. Les répercussions thérapeutiques des résultats présentés feront l'objet des perspectives d'avenir et de la conclusion.

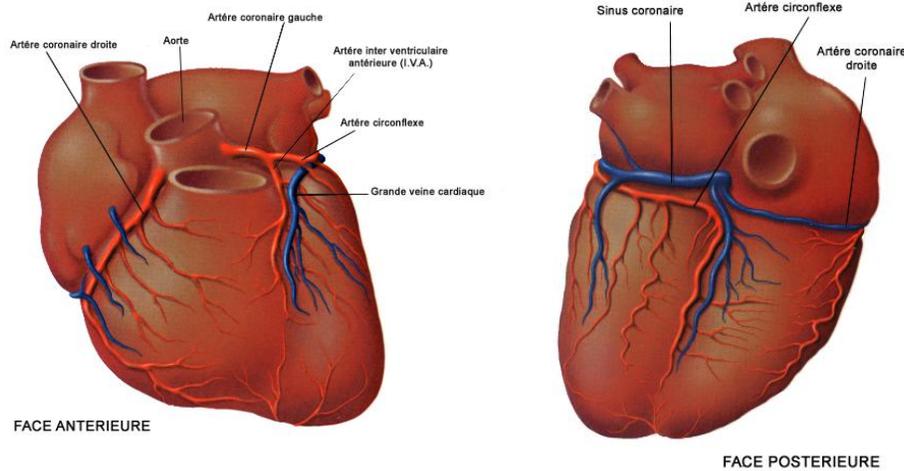
Chapitre 1 : La maladie coronarienne

La maladie coronarienne est une cause de mortalité importante dans le monde occidental. Aux États-Unis, elle explique la moitié des décès de cause cardiaque et représente la 5^{ème} cause de mortalité de toute cause.¹² En 2006, le nombre d'interventions médicales requises pour cause de maladie coronarienne s'établissait à près de 3,4 millions aux États-Unis seulement, se détaillant en 1 414 000 angiographies coronariennes, 1 214 000 angioplasties, 467 000 opérations de pontage aorto-coronarien, 64 000 installations de défibrillateurs implantables et 197 000 installations de stimulateurs cardiaques.¹²

À l'âge de 40 ans, le risque à vie de développer une maladie coronarienne est d'environ 50% chez les hommes et d'environ 30% chez les femmes.¹³ Plusieurs facteurs de risque augmentent la probabilité de souffrir de cette maladie. D'ailleurs, les facteurs de risque dits classiques sont présents chez 80 à 90% des patients atteints de maladie coronarienne et incluent un âge supérieur à 45 ans chez l'homme et à 55 ans chez la femme, l'hypertension, l'hypercholestérolémie et le tabagisme.^{14, 15} D'autres facteurs sont aussi associés à un risque de maladie coronarienne plus élevé, notamment la présence de diabète et d'obésité, ainsi que l'augmentation de marqueurs inflammatoires.^{16, 17} Selon un registre international, ces facteurs sont communs chez les patients Québécois et Canadiens.¹⁸

Trois artères coronaires principales assurent la vascularisation du cœur chez l'humain, soient l'artère interventriculaire antérieure, l'artère coronaire droite et l'artère circonflexe (**Figure 1**). L'apport en sang oxygéné est fonction de la demande; lorsque les artères coronaires sont saines, elles répondent rapidement à un besoin accru, lors d'exercice ou de stress émotionnel par exemple, en augmentant le flot coronarien et en assurant ainsi un apport adéquat en sang oxygéné. La maladie coronarienne se définit comme une atteinte d'une ou de plusieurs artères coronaires, le plus souvent due à l'athérosclérose.¹⁹

Figure 1 : Vascularisation du cœur

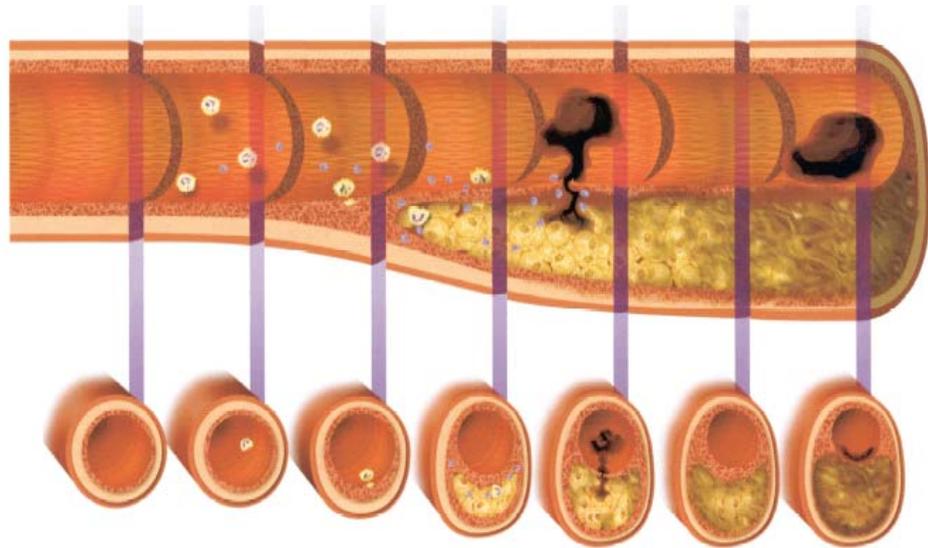


Tiré de : Anatomie de la vascularisation cardiaque. Médecine et santé.
<http://www.medecine-et-sante.com/anatomie/coeurvasc.html> [Accédé le 20 octobre 2009]. Copyright © 1999-2008 SevenMice SARL

L'athérosclérose se caractérise par l'accumulation de dépôts lipidiques au niveau de la paroi vasculaire, diminuant la lumière du vaisseau et ainsi sa capacité à irriguer le muscle cardiaque (**Figure 2**).¹⁹ Un cap fibreux recouvre le cœur lipidique d'une plaque athéromateuse stable, ce qui isole le matériel hautement thrombogène du noyau lipidique du sang circulant.¹⁹ Ceci explique que la présence d'une plaque stable au niveau d'une artère coronaire est généralement asymptomatique au repos. Toutefois, puisque la lumière du vaisseau est rétrécie, l'apport en sang risque d'être insuffisant si la demande en oxygène est accrue, donnant lieu à des douleurs angineuses à l'effort.

Advenant une brèche dans le cap fibreux menant à une rupture de la plaque athéromateuse, l'exposition du noyau lipidique thrombogène aux éléments circulant dans le sang favorise la formation d'un caillot pouvant obstruer l'artère coronaire (**Figure 2**). Cette obstruction peut se manifester en tant qu'événement ischémique aigu, tel l'angine instable ou l'infarctus du myocarde, qui peut s'avérer fatal.^{19, 20}

Figure 2 : Schéma illustrant la progression d'athérosclérose avec formation de thrombus



Reproduction autorisée : Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 104: 365-372. Copyright © 2001 American Heart Association, Inc.

La prévention d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de maladie coronarienne demeure un défi de taille. Environ 40% des personnes qui subissent un événement coronarien aigu en décèdent.¹² Cela se traduit aux États-Unis en des chiffres accablants : à toutes les 26 secondes, un Américain subit un événement coronarien aigu, et à chaque minute, un Américain en décède.¹² De plus, les patients qui survivent à leur événement coronarien aigu présentent un risque de morbidité et de mortalité supérieur de 1,5 à 15 fois à la population générale.¹² Dans les 6 années qui suivent un infarctus du myocarde, il est estimé que 18% des hommes et 35% des femmes éprouveront un second infarctus du myocarde, que 7% des hommes et 6% des femmes mourront subitement, que 22% des hommes et 46% des femmes seront affligés d'insuffisance cardiaque, et que 8% des hommes et 11% des femmes subiront un accident vasculaire cérébral.¹²

La composante thrombotique étant d'une importance capitale dans la pathogénèse des événements coronariens aigus, il n'est pas étonnant de retrouver dans l'arsenal thérapeutique préventif des traitements visant à inhiber la formation de caillots.³⁻⁵ Le prochain chapitre est dédié à la description détaillée de l'hémostase et aux voies menant à la formation d'un thrombus, et permettra de mieux cibler les approches pharmacologiques antithrombotiques employées chez les patients souffrant de maladie coronarienne pour prévenir la survenue d'événements coronariens aigus.

Chapitre 2 : L'hémostase

L'hémostase, soit l'équilibre entre la formation de caillots et leur lyse, est essentielle à la survie car elle évite l'hémorragie et permet la réparation des vaisseaux lésés. Dans ce processus, les plaquettes jouent un rôle prépondérant.

A) La découverte de la plaquette

Le premier à identifier des éléments sanguins circulants n'appartenant ni à la famille des globules rouges, ni à celle des globules blancs est Max Schultze, qui a attribué le terme « sphérules » à ces entités irrégulières formant des agrégats.^{21, 22} Ses études exhaustives sur les cellules sanguines ont permis à Max Schultze de décrire les érythrocytes et les lymphocytes rigoureusement, mais les plaquettes sont demeurées des cellules peu caractérisées.²¹ Néanmoins, Max Schultze a souligné l'importance potentielle des plaquettes en 1865 en ces termes, traduits en anglais par Douglas B. Brewer : ²¹

« It is certain that no constituent of the blood is unimportant and so I will, in conclusion, draw attention, with some emphasis, to a normal constituent of the blood which until now has almost been unnoticed. I find in my blood and in the blood of many other persons, of young and middle age I have investigated, more or less numerous, irregularly formed clumps of colourless little spherules of different sizes consisting of many little spherules together. The individual spherules, at the most, measure 0.001–0.002 mm. They occur singly in the blood, but more frequently, they are bound together loosely in groups. »

(...)

« To those who are concerned with the in-depth study of the blood of humans, the study of these granules in human blood is enthusiastically recommended. »

Ce n'est qu'en 1882 que Giulio Bizzozero (**Figure 3**) détaillera dans un article saillant ses découvertes sur ces granules, qu'il appellera *piatrine* en italien, *petites plaques* puis *plaquettes* en français et *blutplättchen* en allemand.²¹⁻²³



Figure 3 : Portrait de Giulio Bizzozero à l'âge de 20 ans (vers 1866)

Reproduction autorisée : Mazzarello P, Calligaro AL, Calligaro A. Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 776-781. Copyright © 2001 Nature Publishing Group.

Les descriptions des plaquettes et de leurs fonctions faites par Giulio Bizzozero demeurent d'actualité aujourd'hui. Je me permets de reprendre certaines de ses paroles intégralement ci-dessous, traduites en anglais par E.A. Beck :²⁴

« If one investigates the contents of such vessels with an immersion objective (regardless of whether they are veins or capillaries) so one achieves the surprising result that actually, in addition to the red and white blood corpuscles, a third sort of morphological element circulates in the blood vessels. In form, they are very thin platelets, disc-shaped, with parallel surfaces or rarely lens-shaped structures, round or oval and with a diameter 2–3 times smaller than the diameter of the red cells. »

(...)

« Whereas under normal conditions they float isolated in the plasma, when subject to an influence that leads to thrombosis, they adhere to one another to form an accumulation. The blood platelets, free in the blood stream and being hurried along are held up by other platelets that they come into contact with as they become stickier than they are under normal conditions. »

(...)

« Blood platelets, swept along by the blood stream, are held up at the damaged spot as soon as they arrive at it. At first one sees only 2–4–6 (platelets); very soon the number climbs to hundreds. Usually some white blood cells are held up amongst them. Little by little the volume increases and soon the thrombus fills the lumen of the blood vessels, and impedes the blood stream more and more. »

Les nombreuses et méticuleuses études menées par Giulio Bizzozero sur les plaquettes lui ont permis de comprendre leur fonctionnement, et de prédire leur importance dans certaines conditions pathologiques. Ainsi, Bizzozero concluait son article-clé par les phrases suivantes : ²⁴

« Thus one recognizes that the barely initiated study of the blood platelets already provides a significant contribution for explaining the phenomena of thrombosis and blood coagulation. However, we have not as yet obtained information concerning the physiological role of the blood platelets, since both thrombosis and coagulation take place exclusively under abnormal conditions. It is hardly permitted to assume that elements, represented in the blood in such a constant fashion and great number, as it is the case for blood platelets, are active only under abnormal or pathological conditions. Their physiologic significance, therefore, remains to be investigated, as well as their origin and their possible relationship with other elements of the blood. It is not necessary to emphasize the difficulty of these tasks.

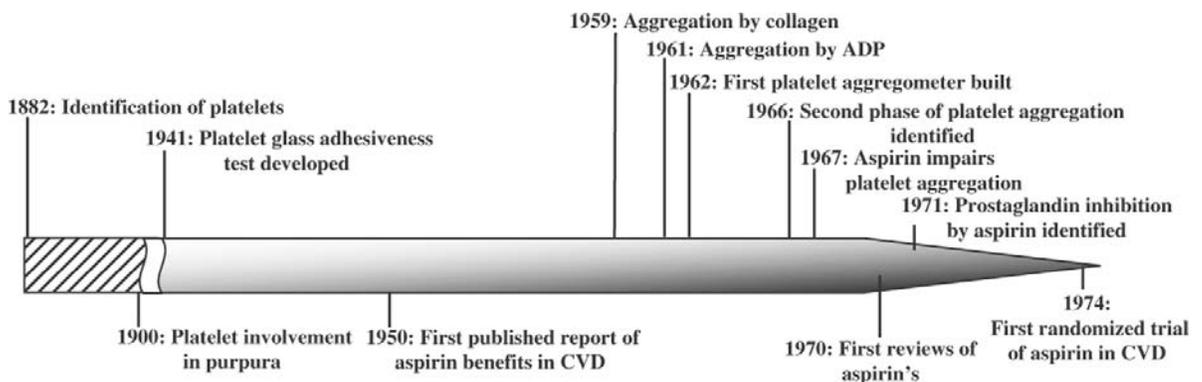
In the future, one will have to consider this new blood constituent in studies of pathological events as well. Thus, it is probable that the blood platelets are involved not only in thrombosis and coagulation but also in other vital reactions of the blood and the blood vessels associated with disease states.

One may assume that their increased number alters the conditions of blood circulation. Alternatively, it is equally likely that in such conditions the

slightest alteration of vessel may lead to widespread thrombosis. Thus, a broad field for new research has been opened. »

Depuis la publication par Bizzozero de ses recherches en 1882, de nombreuses percées technologiques ont permis de mieux caractériser les plaquettes ainsi que leur fonctionnement tant dans un contexte physiologique que pathologique (**Figure 4**). Les prochaines sections révèlent plus précisément son cycle de vie et décrivent la physiologie et l'activité de la plaquette.

Figure 4 : Étapes charnières franchies dans l'étude de la fonction plaquettaire



Reproduction autorisée : de Gaetano G, Crescente M, Cerletti C. Current concepts about inhibition of platelet aggregation. *Platelets*. 2008; 19: 565-570. Copyright © 2008 Informa Healthcare.

B) Le cycle de vie de la plaquette

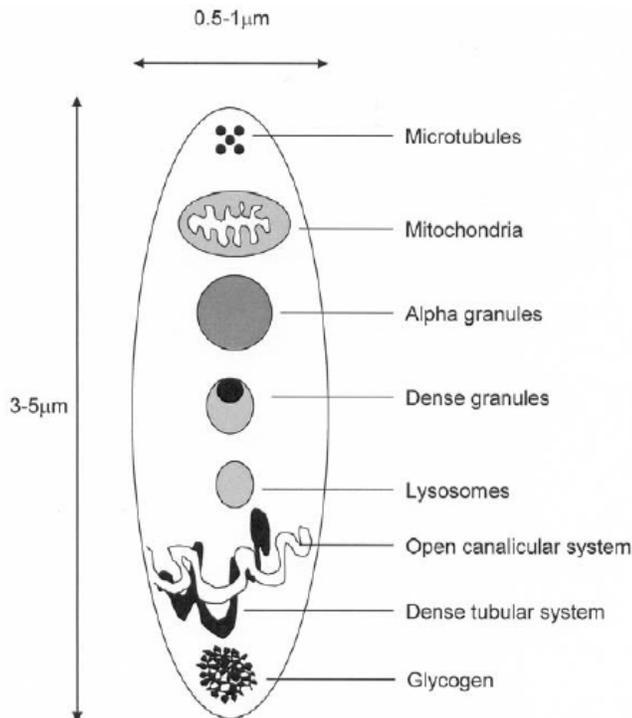
Les plaquettes sont des cellules anucléées dérivées des mégacaryocytes se trouvant majoritairement dans la moelle osseuse, mais également en petite quantité dans le sang et les poumons.^{25,26} Les plaquettes circulent en nombre variant de 150 à 400 x 10⁹ par litre de sang, mais leur nombre est maintenu constant dans un intervalle étroit chez le même individu d'un jour à l'autre.²⁷ Pour maintenir un niveau normal de décompte plaquettaire, un individu adulte sain doit produire environ 10¹¹ plaquettes quotidiennement.²⁷ La thrombopoïétine est le principal régulateur de la formation de plaquettes à partir de

mégacaryocytes. La thrombopoïétine est une glycoprotéine (GP) principalement synthétisée par le foie et le rein.²⁷ Elle agit sur le mégacaryocyte par le récepteur c-Mpl pour stimuler la formation de proplaquettes et accroître ainsi le nombre de plaquettes circulantes.²⁷ Les plaquettes exercent un rôle de régulateurs négatifs de la thrombopoïétine; en effet, dès que leur nombre est suffisant pour assurer l'hémostase, les plaquettes absorbent la thrombopoïétine circulante par des récepteurs à haute affinité, ce qui diminue la concentration circulante de thrombopoïétine et réduit la formation de nouvelles plaquettes par les mégacaryocytes.²⁷

Les procédés de synthèse de plaquettes à partir de mégacaryocytes demeurent méconnus.^{26, 28} Sous l'effet de la thrombopoïétine, les mégacaryocytes forment des extensions cytoplasmiques qui traversent la paroi endothéliale et se projettent dans le sang circulant.²⁶ Ces extensions contiennent des organelles cytoplasmiques, des mitochondries, des composantes du cytosquelette et des granules, qui se retrouveront ultérieurement dans des plaquettes individuelles (**Figure 5**).²⁶ Ce qui provoque le morcellement des ces extensions cytoplasmiques des mégacaryocytes n'a pas été identifié. Toutefois, des particules de taille et de forme variable, généralement ovoïde ou tubulaire, se dispersent dans le sang et se divisent en proplaquettes, puis en plaquettes dans la circulation générale. Ainsi, la croyance que les grosses plaquettes réactives sont de jeunes plaquettes, tandis que les plaquettes plus petites et denses sont plus âgées est remise en question, puisque dès la genèse plaquettaire, il y a production de cellules de taille et de morphologie différentes.^{26, 28} Cependant, les jeunes plaquettes contiennent généralement plus d'ARN que les plaquettes plus âgées, ce qui permet leur identification par coloration à l'aide de thiazole orange.²⁹ Ces jeunes plaquettes réticulées constituent environ 7% des plaquettes en circulation, ce qui permet d'estimer le taux de régénération plaquettaire quotidien.²⁹ Nonobstant, la formation de nouvelles plaquettes à partir de mégacaryocytes semble suivre un rythme circadien.²⁶ En effet, les extensions cytoplasmiques mégacaryocytaires sont relâchées dans le sang surtout pendant le sommeil, tandis que la fragmentation et la formation de nouvelles plaquettes se déroulent tôt dans la période active.²⁶ Ainsi, au cours des premières heures du

matin, les jeunes plaquettes peuvent constituer jusqu'à 20% des plaquettes circulantes, tandis qu'elles ne forment que 5% des plaquettes dans l'après-midi.²⁶

Figure 5 : Structure de la plaquette



Reproduction autorisée : Hartley PS. Platelet senescence and death. *Clin Lab.* 2007; 53: 157-166. Copyright © 2007 Professional Association of Scientists in Laboratory Diagnostics.

Les facteurs contrôlant la durée de vie et la sénescence plaquettaire demeurent incompris.²⁹ Le vieillissement plaquettaire se traduit en une réactivité diminuée aux stimuli et en une altération de certains récepteurs membranaires qui se produit en 7 à 10 jours.²⁹ L'activation plaquettaire, qui induit entre autres un réarrangement des lipides membranaires, semble être une étape terminale provoquant la mort cellulaire.²⁹ L'épuration des plaquettes du sang procède par 2 voies majeures : la consommation des plaquettes dans des procédés hémostatiques et l'élimination des plaquettes âgées ou mortes par des macrophages situés dans la rate.²⁹ La proportion de plaquettes éliminée par la rate

par rapport à celle utilisée dans le maintien de l'hémostase est inconnue.²⁹ Toutefois, des études suggèrent que le nombre de plaquettes produites par les mégacaryocytes excède largement le nombre nécessaire au maintien de l'hémostase, ce qui laisse croire que la majorité des plaquettes sont éliminées par la rate suite à un processus de vieillissement physiologique.²⁹

C) Le rôle de la plaquette dans l'agrégation

Le rôle principal des plaquettes est le maintien de l'hémostase, ce pourquoi elles sont enrichies de récepteurs membranaires et de protéines de signalisation en quantité suffisante permettant de répondre rapidement à une lésion de la paroi vasculaire.^{25, 30, 31} Leur forme et leur petite taille permet aux plaquettes de circuler en périphérie du sang, proche de la paroi vasculaire, ce qui les place à un endroit stratégique pour assurer l'intégrité de la paroi vasculaire. À l'état quiescent, l'endothélium produit de puissantes molécules inhibitrices plaquettaires, dont l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline (PGI₂) et des ecto-ADPases.^{30, 31} Advenant une brèche dans l'endothélium vasculaire, l'exposition de la matrice sous-endothéliale aux plaquettes circulant dans le sang provoque des réactions rapides menant à la formation d'un thrombus stable en 3 étapes : l'adhésion plaquettaire, l'activation plaquettaire et l'agrégation plaquettaire.

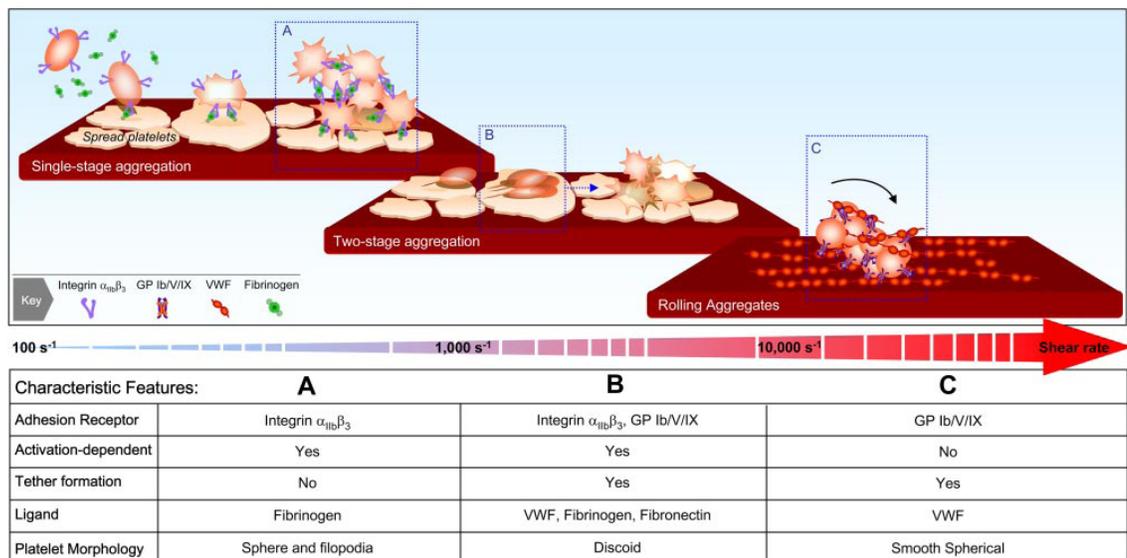
i) Adhésion

Les plaquettes font face à des conditions rhéologiques diverses dans la circulation, allant de vitesses de cisaillement (*shear stress*) de $< 500 \text{ s}^{-1}$ dans les grosses veines, à $5\,000 \text{ s}^{-1}$ dans les petites artérioles, et pouvant atteindre $40\,000 \text{ s}^{-1}$ dans les artères avec un rétrécissement dû à une plaque athérosclérotique.³²

Ces diverses conditions rhéologiques influencent le processus d'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale (**Figure 6**). À des vitesses de cisaillement basses ($< 1\,000 \text{ s}^{-1}$), l'adhésion plaquettaire dépend principalement de l'activation des intégrines

$\alpha_{IIb}\beta_3$ qui lie le fibrinogène.³³ Toutefois, à des vitesses de cisaillement plus élevées, de l'ordre de 1 000 à 10 000 s^{-1} , l'adhésion plaquettaire dépend principalement de la liaison du facteur de von Willebrand (vWF) par le complexe de GP Ib/V/IX.³³ L'interaction entre le complexe GP Ib/V/IX et le vWF ne requiert pas d'activation plaquettaire et semble dépendre majoritairement des interactions biomécaniques du sang avec la paroi vasculaire lésée.³⁴ Bien que la liaison du vWF au complexe GP Ib/V/IX soit nécessaire à l'adhésion plaquettaire au site de la lésion, le taux de dissociation de cette réaction est élevé, ce qui se traduit en un roulement de la plaquette sur la paroi endothéliale lésée. Le roulement plaquettaire donne lieu à des modifications de la structure physique de la plaquette; en effet, des protrusions cylindriques composées d'une bicouche de phospholipides forment des pseudopodes sous l'influence du flux sanguin qui pousse la plaquette dans la direction de la circulation.³² Ces pseudopodes ralentissent le roulement plaquettaire et favorisent l'interaction d'autres récepteurs membranaires (dont les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$, ainsi que le récepteur au collagène GPVI) menant à une adhésion stable de la plaquette au site de lésion.³⁴

Figure 6 : Implication des molécules d'adhésion selon la vitesse de cisaillement



Reproduction autorisée : Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 2007; 109: 5087-5095. Copyright © 2007 American Society of Hematology.

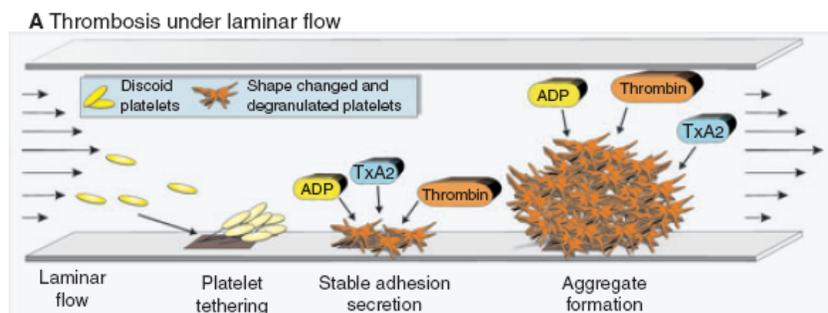
À des niveaux pathologiques de cisaillement (vitesse pouvant atteindre $40\,000\text{ s}^{-1}$), l'activation plaquettaire ne contribue pas à l'adhésion; cette dernière est exclusivement dépendante des interactions biomécaniques du vWF avec le complexe GP Ib/V/IX.³³

ii) Activation et agrégation

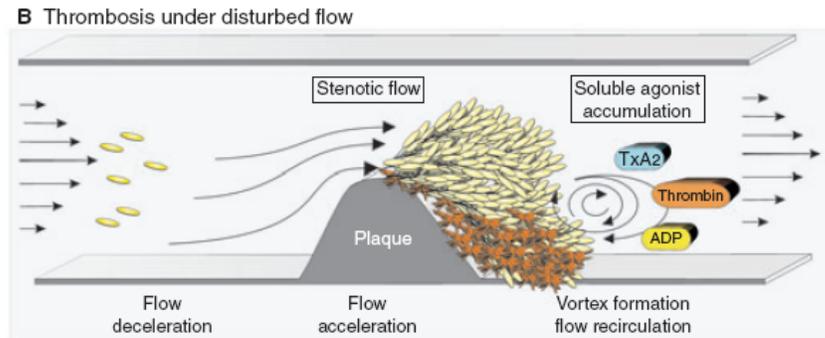
Tel qu'introduit ci-dessus, l'adhésion est caractérisée par le dépôt d'une monocouche de plaquettes au niveau de la brèche via la liaison aux molécules sous-endothéliales, particulièrement le vWF et le fibrinogène. Ce contact avec la matrice sous-endothéliale se caractérise par un changement conformationnel (apparition de pseudopodes), et mène à l'activation plaquettaire.³¹ La majorité des études réalisées sur l'activation plaquettaire l'ont été dans des modèles *ex vivo* qui peinent à reproduire le stress induit par une sténose artérielle importante.³³ En effet, en présence d'un rétrécissement important de la lumière du vaisseau, la circulation sanguine se trouve perturbée, avec un ralentissement du flux sanguin avant la sténose suivie d'une accélération importante au sommet de la lésion, et un flux turbulent à la sortie de la sténose (**Figure 7**). La formation des circuits de recirculation (vortex) à la sortie des lésions favorise une accumulation des agonistes plaquettaires localement et amplifie de façon importante la formation du thrombus.³³

Figure 7 : Modèles d'agrégation plaquettaire

A) dans les conditions de flux laminaire (vitesse de cisaillement $> 1000\text{ s}^{-1}$);



B) dans les conditions de flux altéré par la présence de plaque athéromateuse (vitesse de cisaillement pouvant atteindre $40\,000\text{ s}^{-1}$)

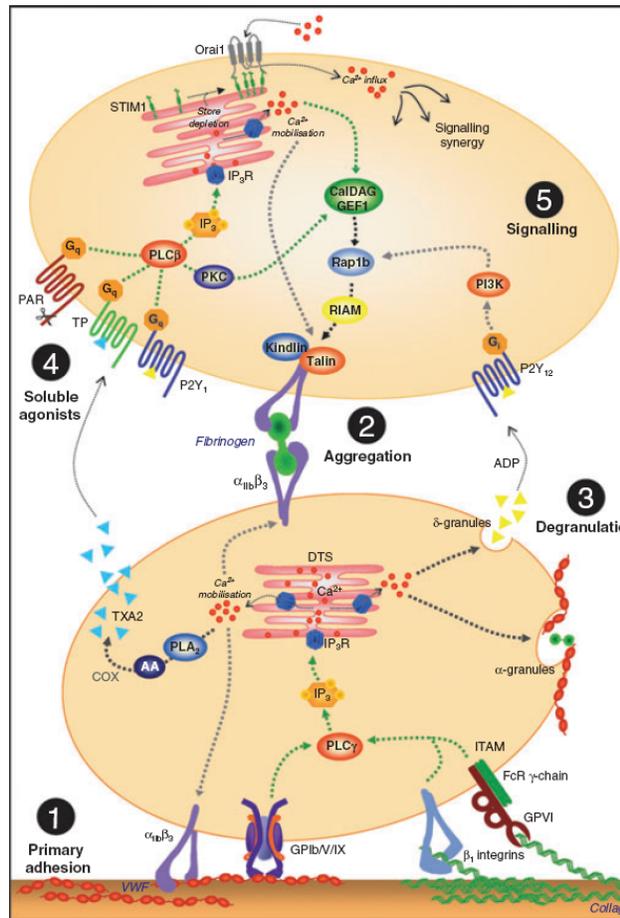


Reproduction autorisée : Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 17-20. Copyright © 2009 International Society on Thrombosis and Haemostasis.

L'activité de la plaquette est assujettie à une variété de récepteurs membranaires qui contrôlent différentes fonctions plaquettaires.³¹ De nombreuses substances stimulent les plaquettes (agonistes). Leurs effets peuvent être classés en deux aboutissements majeurs (**Figure 8**):

- a) l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaires qui renforcent la stimulation plaquettaire et favorisent la sécrétion des granules denses et α , ce qui résulte en un recrutement des plaquettes avoisinantes;
- b) l'induction de changements conformationnels de l'intégrine $\alpha_{2b}\beta_3$, ce qui augmente l'affinité du récepteur envers le fibrinogène et facilite l'agrégation des plaquettes aux plaquettes avoisinantes pour former un thrombus du volume requis pour contrer l'hémorragie.

Figure 8 : Voies menant à l'activation plaquettaire



Reproduction autorisée : Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK, Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol.* 2009; 147: 415-430. Copyright © 2009 Blackwell Publishing Ltd.

Les prochaines sous-sections décrivent plus en détails les voies plaquettaires les plus importantes dans le recrutement et l'activation plaquettaires.

a) Les voies d'activation plaquettaire

Parmi les composantes sous-endothéliales les plus thrombogènes exposées au sang lors d'une lésion de la paroi vasculaire, le collagène, généralement de type I, III et VI, lie un nombre important de récepteurs plaquettaires dont l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, la GPVI, et possiblement la GPIV, le p65 et le p85/90.^{30, 35} Le récepteur le plus important dans l'activation plaquettaire par le collagène semble être le GPVI, un récepteur de la famille des immunoglobulines.³⁵ La liaison du collagène au récepteur GPVI induit une dimérisation du

récepteur, puis une phosphorylation de son extrémité intracellulaire, ce qui active la phospholipase C (PLC) plaquettaire.³⁵ L'activation de la PLC est une voie commune à plusieurs récepteurs plaquettaires (**Figure 8**); elle induit la conversion par la PI₃-kinase (PI-3K) de PI-4,5-P₂ (PIP₂) en 1,4,5-IP₃ (IP₃) et 1,2-diacylglycerol (DAG), qui à leur tour provoquent une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC), respectivement.³⁵ Ceci a pour résultat l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) qui mobilise l'acide arachidonique de la paroi membranaire et l'induction de la dégranulation, assurant ainsi une propagation de l'activation plaquettaire (**Figure 8**).³⁵ Aucun médicament antiplaquettaire présentement disponible ne cible le récepteur GPVI.

La dégranulation plaquettaire permet la sécrétion hors de la plaquette du contenu des granules α et denses. Les granules α sont riches en molécules pro-coagulantes, régulateurs fibrinolytiques, facteurs de croissance, chimiokines, modulateurs immunologiques, molécules d'adhésion et autres protéines, tandis que les granules denses contiennent des ions (tels le calcium et le magnésium), des dérivés nucléotidiques, des protéines membranaires (telles la P-sélectine), ainsi que des transmetteurs (tels la sérotonine).³⁶ Bien que toutes ces molécules puissent être décrites en détails, les molécules dont le rôle est le mieux établi dans la propagation de l'activation plaquettaire sont les dérivés adénosidiques, soient l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP).

Les nucléotides adénosidiques, ADP et ATP, lient les récepteurs purinergiques sur la surface membranaire.³⁷ Il existe 3 récepteurs purinergiques identifiés sur la plaquette, soient le P2X₁, le P2Y₁ et le P2Y₁₂.³⁷ Le récepteur P2X₁ est un canal ionique sensible à l'ATP, dont le rôle consiste à induire une entrée rapide et de courte durée de calcium suite à son activation.³⁷ Ce récepteur n'active pas la plaquette, mais contribue à la restructuration du cytosquelette plaquettaire lors de son activation.³⁸ On dénombre entre 500 et 1 000 copies de récepteurs P2Y sur la membrane plaquettaire. De ce nombre, environ 150 sont de type P2Y₁, tandis que l'excédent est de type P2Y₁₂.³⁹ Le récepteur P2Y₁ est un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine G_{αq}.³⁷ La liaison d'ADP au récepteur

P2Y₁ induit l'activation de la PLC (**Figure 8**), ce qui se traduit en l'activation de la PLA₂ et en une augmentation de la concentration intraplaquettaire de calcium, tel que décrit plus haut.³⁷ Le récepteur P2Y₁₂ est également un récepteur à 7 passages transmembranaires, mais il est couplé à une protéine G_{oi}.³⁷ L'activation du récepteur P2Y₁₂ inhibe l'adénylcyclase, ce qui se traduit en une diminution d'AMP cyclique. Cette dernière est nécessaire à la phosphorylation de la *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP), qui est un modulateur négatif de l'intégrine $\alpha_{2b}\beta_3$. Donc, le niveau de phosphorylation de VASP est un marqueur spécifique de la liaison de l'ADP au récepteur P2Y₁₂, mais ce mécanisme n'explique que partiellement son effet pro-agrégant.³⁷ En effet, l'activation plaquettaire induite par la stimulation du récepteur P2Y₁₂ est due majoritairement à l'activation de petites GTPases, dont le Rap1b, qui contribue significativement à l'activation de l'intégrine $\alpha_{2b}\beta_3$ (**Figure 8**).³⁷ Les médicaments de la famille des thiényridines inhibent le récepteur P2Y₁₂ plaquettaire, et par conséquent inhibent partiellement l'agrégation induite par l'ADP. Les médicaments présentement disponibles sont la ticlopidine et le clopidogrel (voir **Chapitre 4**). D'autres médicaments ciblant le P2Y₁₂ sont présentement en développement, ainsi que des médicaments ciblant les récepteurs P2X₁ et P2Y₁.³⁸

L'activation de la PLA₂ plaquettaire par la PKC mobilise l'acide arachidonique à partir de la membrane plaquettaire et le rend disponible pour métabolisme.³¹ L'acide arachidonique est converti dans la plaquette en thromboxane (Tx)A₂ en deux étapes, par l'enzyme cyclo-oxygénase (COX)-1 et par la thromboxane synthase (TXAS). La TxA₂ agit sur le récepteur aux thromboxanes (TP) pour amplifier le signal des autres agonistes plaquettaires.⁴⁰ Environ 1 000 copies de ce récepteur tapissent la membrane plaquettaire.³⁹ Le récepteur TP est également un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine G_{oq} (**Figure 8**); sa signalisation intracellulaire mène à l'activation de la PLC et augmente la concentration de calcium plaquettaire.⁴¹ L'AAS est un médicament qui cible la voie de l'acide arachidonique, en inhibant la COX-1 plaquettaire et en abolissant ainsi la formation de TxA₂ (voir **Chapitre 4**).⁴² D'autres médicaments ciblant la voie de l'acide

arachidonique, dont des inhibiteurs de la TXAS et du récepteur TP, sont présentement en développement.⁴³

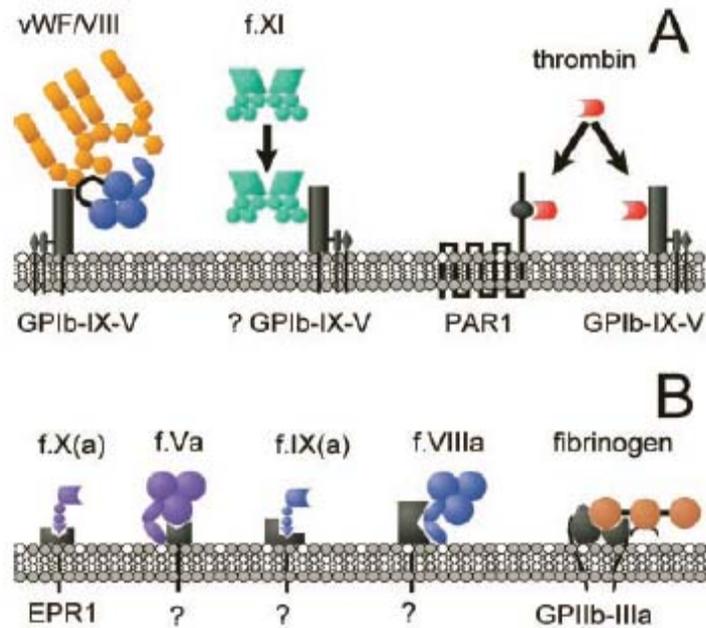
Le récepteur le plus abondant sur la membrane plaquettaire est le récepteur à la thrombine PAR-1, pour *protease-activated receptor*, dont on retrouve environ 2 000 copies par plaquette.^{31, 39} La thrombine est mieux connue pour son rôle dans le système de coagulation, où elle convertit le fibrinogène en fibrine, mais elle est également un puissant agoniste plaquettaire. Le récepteur PAR-1 présente la particularité de ne pas être activé directement par la thrombine, mais d'être activé par sa propre extrémité N-terminale, suite à un clivage par la thrombine au site Arg₁₅.^{30, 31} Le récepteur PAR-1 est également un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine G_{αq}, dont la signalisation est similaire au récepteur P2Y₁ et TP (**Figure 8**).³⁰ Aucun médicament inhibant le récepteur PAR-1 n'est actuellement disponible, mais plusieurs sont en développement.⁴⁴

D'autres agonistes plaquettaires contribuent à l'activation, incluant l'épinéphrine par les récepteurs α₂ et la sérotonine par les récepteur 5-HT_{2A}, mais leur rôle est moins bien établi et ils semblent apporter une contribution mineure.³¹ Néanmoins, ces récepteurs pourraient être des cibles potentielles de nouveaux médicaments antiplaquettaires.

L'étape finale de l'activation plaquettaire est le changement conformationnel de l'intégrine α_{2b}β₃, qui se traduit en une affinité accrue du récepteur pour le fibrinogène et permet l'agrégation plaquettaire (**Figure 8**).³¹ Toutefois, la liaison du fibrinogène à l'intégrine α_{2b}β₃ initie également une signalisation intraplaquettaire dont le but est de stabiliser le caillot en formation, en mobilisant le calcium intracellulaire, en activant la phosphorylation de multiples protéines et en réorganisant le cytosquelette.³¹ Il existe des médicaments inhibiteurs de l'intégrine α_{2b}β₃, mais ils sont uniquement indiqués en aigu et ne font donc pas partie de l'arsenal thérapeutique utilisé dans la prévention secondaire chez les patients souffrant de maladie coronarienne stable.³¹

par les intégrines $\alpha_{2b}\beta_3$.⁴⁵ Ainsi, bien que l'hémostase secondaire dépende principalement des facteurs de coagulation, les plaquettes activées contribuent à cette étape cruciale de la formation d'un thrombus stable.

Figure 10 : Récepteurs plaquettaire connus et inconnus pour les facteurs de coagulation



Reproduction autorisée : Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1381-1389. Copyright © 2002 American Heart Association, Inc.

c) Les voies d'inhibition plaquettaire

La redondance des voies d'activation plaquettaire permet une réponse rapide des plaquettes face à une lésion dans la paroi vasculaire et un recrutement d'un grand nombre de plaquettes avoisinantes pour la formation du caillot de taille suffisante pour restaurer la barrière naturelle. Toutefois, un processus inhibiteur doit compenser cette propension vers l'agrégation pour éviter l'occlusion complète du vaisseau par le thrombus.

L'endothélium sécrète plusieurs molécules inhibitrices de la fonction plaquettaire, dont le NO. Cette petite molécule traverse la membrane plaquettaire et active la

guanylyclase soluble, ce qui résulte en une formation accrue de GMP cyclique qui induit la phosphorylation des transporteurs de calcium et réduit la concentration de calcium intraplaquettaire.^{31, 46}

Une autre molécule produite par l'endothélium est la prostacycline qui lie le récepteur IP plaquettaire.^{41, 46} Ce récepteur à 7 passages transmembranaires est couplé à la protéine G_{as} , qui stimule l'adénylyclase et augmente les concentrations intracellulaires d'AMP cyclique.⁴¹ Ceci résulte en une augmentation de la recapture de calcium dans les réseau tubulaire dense et en une réduction de la concentration calcique intraplaquettaire.⁴¹

Finalement, l'expression par l'endothélium de CD39, une ecto-ADPase, permet la dégradation d'ADP en AMP, ce qui réduit la disponibilité de cet agoniste plaquettaire.⁴¹

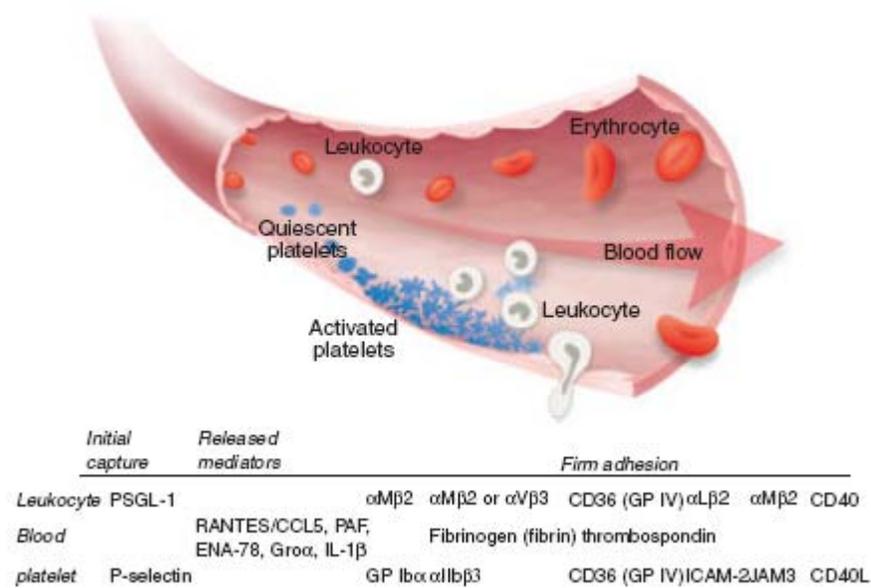
D) Les autres fonctions de la plaquette

L'important rôle de la plaquette dans l'hémostase a longtemps occulté les autres fonctions que cette dernière effectue, incluant la collaboration dans des réponses immunes et inflammatoires, le maintien de l'intégrité vasculaire et la participation dans la guérison des lésions.³⁶ En effet, en raison de l'absence d'un noyau, la plaquette a longtemps été considérée incapable de synthèse protéique et par conséquent, il a longtemps été cru que son rôle devait se limiter à l'agrégation.⁴⁷ Toutefois, de nombreuses études remettent en question ce paradigme qui circonscrit le rôle plaquettaire à une réponse hémostatique aigüe, en partie en raison du déséquilibre entre le nombre de plaquettes produites et celui nécessaire pour assurer une hémostase normale, tel que suggéré en 1882 par Bizzozero.²⁹

Bien que l'absence d'un noyau rend effectivement impossible la transcription d'ADN en ARN, les plaquettes sont pourvues de mécanismes multiples leur permettant d'accumuler et de libérer des médiateurs bioactifs, ce qui les met à l'avant-plan dans la modulation des fonctions des cellules avec lesquelles elles entrent en contact.³⁶ À titre d'exemple, l'activation plaquettaire mène à l'extériorisation de P-sélectines, ce qui permet la liaison des plaquettes aux leucocytes circulants via le récepteur leucocytaire PSGL-1 (*P*-

selectin glycoprotein ligand). En parallèle, la dégranulation plaquettaire libère dans la circulation des substances, tels le facteur plaquettaire 4 (PF4) et RANTES, qui contribuent à l'activation des leucocytes et à leur recrutement au site de la lésion (**Figure 11**).³⁶ Ces leucocytes peuvent à leur tour initier ou médier des processus inflammatoires ou immuns.

Figure 11 : Recrutement des leucocytes par les plaquettes activées

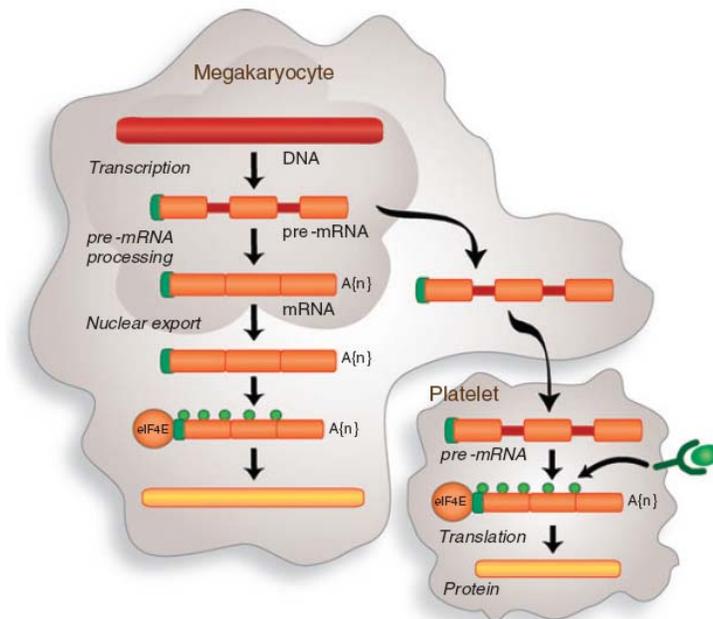


Reproduction autorisée : Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC. Platelet functions beyond haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 1759-1766. Copyright © 2009 International Society on Thrombosis and Haemostasis.

Un autre exemple est la promotion de la guérison des lésions.³⁶ Dans ce cas, c'est la formation de thrombine à la surface des plaquettes activées qui agit comme agent chimiotactique pour les macrophages, ainsi que pour les cellules stromales et endothéliales. Par ailleurs, les plaquettes secrètent bon nombre de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines qui influencent directement le processus de guérison et assurent aussi l'étanchéité vasculaire.³⁶ Il semblerait que près de 18% des plaquettes soient dédiées à cette tâche.³⁶

En plus d'accumuler certaines molécules bioactives dans des granules, les plaquettes peuvent synthétiser des protéines à partir d'ARN originaire des mégacaryocytes (**Figure 12**).⁴⁷ De nombreuses études ont démontré que les plaquettes sont capables de synthétiser *de novo* une panoplie de protéines incluant (mais ne se limitant pas à) la GPIb, l'intégrine $\alpha_{2b}\beta_3$, le fibrinogène, la thrombospondine, l'albumine, le vWF, l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène (PAI-1), des protéines contractiles, des protéines d'histocompatibilité, des facteurs de coagulation et la COX-1.^{47, 48}

Figure 12 : Origine de l'ARN messager plaquettaire

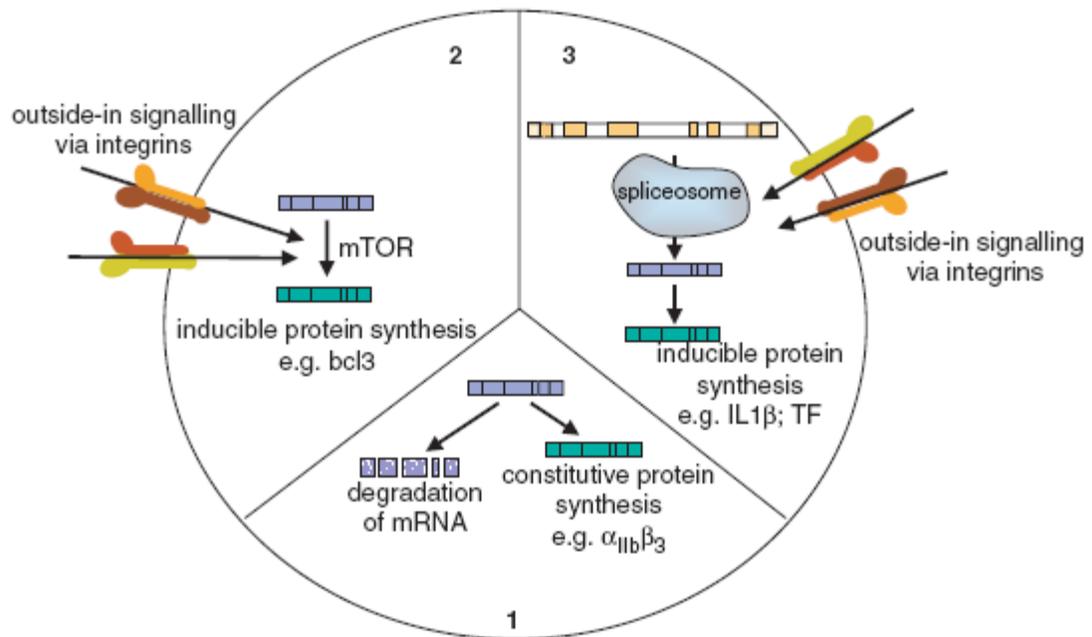


Reproduction autorisée : Weyrich AS, Schwartz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 241-246. Copyright © 2009 International Society on Thrombosis and Haemostasis.

Les mécanismes menant à la traduction dans la plaquette demeurent méconnus. Toutefois, l'activation plaquettaire semble être un pré-requis pour induire la formation de nouvelles protéines.^{49, 50} Il semblerait que 2 voies principales mènent à la synthèse de

nouvelles protéines, soient l'épissage et l'activation de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) induits par l'activation des intégrines plaquettaires (**Figure 13**).^{49, 50}

Figure 13 : Processus de traduction d'ARN en protéines dans la plaquette activée



Reproduction autorisée : Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets*. 2008; 19: 395-404. Copyright © 2008 Informa UK, Ltd.

Ainsi, malgré la suggestion par Bizzozero en 1882 d'un rôle plaquettaire physiologique autre que la réponse hémostatique, ces fonctions plaquettaires demeurent à ce jour peu comprises et font l'objet de nombreuses études contemporaines.

Chapitre 3 : Les médicaments antiplaquettaires dans le traitement de la maladie coronarienne

La thérapie antiplaquettaire est une pierre angulaire de la prévention d'événements ischémiques aigus.¹ En effet, l'administration quotidienne de médicaments antiplaquettaires chez des sujets souffrant de maladie coronarienne diminue le risque d'événements ischémiques aigus d'environ 25%.¹ Plus précisément, le risque d'infarctus du myocarde non mortel se trouve diminué du tiers, celui d'accident vasculaire cérébral non mortel du quart et celui de mortalité de cause vasculaire du sixième.¹

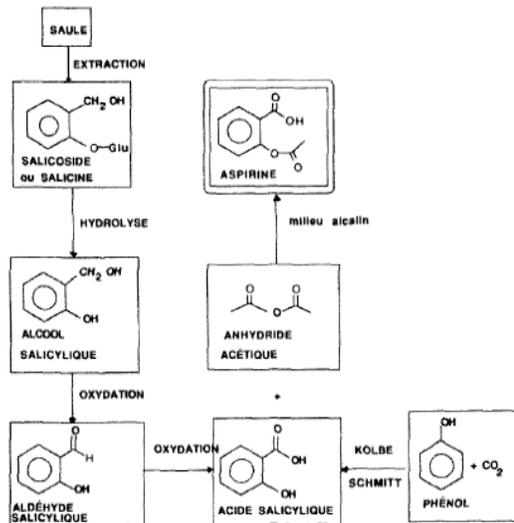
Les lignes directrices actuelles recommandent la prise quotidienne d'AAS indéfiniment chez tout sujet souffrant de maladie coronarienne stable.² En cas de contre-indication à l'AAS, le clopidogrel devrait être donné en remplacement d'AAS.² Chez des patients à haut risque thrombotique, tels les sujets ayant subi un syndrome coronarien aigu ou ayant été revascularisés par intervention coronarienne percutanée, les lignes directrices recommandent l'ajout de clopidogrel à la thérapie quotidienne d'AAS idéalement pendant 1 an.^{3, 5, 6}

Ce chapitre décrit la pharmacologie clinique des médicaments antiplaquettaires employés couramment, soient l'AAS et le clopidogrel, mais présente également les médicaments antiplaquettaires en développement clinique.

A) L'AAS et les autres inhibiteurs de la COX-1

Le médicament antiplaquettaire le plus répandu est l'AAS, qui cible la voie de la formation de TxA₂ plaquettaire. L'AAS a été découvert dans sa forme impure pour la première fois en 1853 par Charles-Frédéric Gerhardt, mais ce n'est qu'en 1897 que Felix Hoffmann, pharmacien œuvrant pour les laboratoires Bayer, a synthétisé cette molécule qui a pu être commercialisée sous le nom d'AspirinTM dès 1899 (**Figure 14**).⁵¹⁻⁵³

Figure 14 : Mode de synthèse d'acide acétylsalicylique



Reproduction autorisée : Lévesque H, Lafont O. L'aspirine à travers les siècles: rappel historique. *Rev Med Interne*. 2000; 21: 8s-17s. Copyright © 2000 Elsevier SAS.

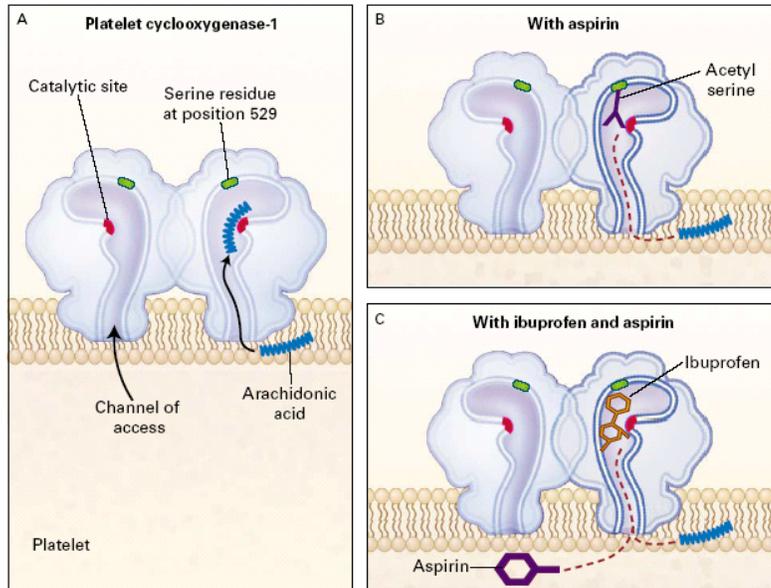
i) Pharmacologie

Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer l'effet antiplaquettaire de l'AAS. Notamment, l'AAS augmenterait la production de NO, protégerait les lipoprotéines de faible densité (LDL) de modifications oxydatives, inhiberait le facteur nucléaire κB (NF- κB), diminuerait la génération de thrombine, augmenterait le potentiel fibrinolytique du fibrinogène, inhiberait la transcription de la COX-2 et aurait un rôle dans l'élimination de radicaux hydroxyls, diminuant ainsi le niveau de stress oxydatif.^{42, 54-56} Bien que ces voies accessoires aient sans doute une certaine importance, la plupart des auteurs s'entendent pour dire que l'effet antithrombotique de l'AAS est majoritairement attribuable à l'acétylation irréversible de la COX, tel que décrit par John Vane en 1971 (**Figure 15**).^{57, 58}

L'acétylation par l'AAS d'un résidu sérine (Ser⁵²⁹ de la COX-1 et Ser⁵¹⁶ de la COX-2) empêche la liaison d'acide arachidonique à son site catabolique et bloque ainsi la formation de TxA₂ plaquettaire.^{42, 54, 58, 59} L'AAS inhibe la COX-1 préférentiellement; son affinité pour cette dernière est environ 150 à 200 fois supérieure à celle pour COX-2.^{42, 59} Ainsi, l'administration de faibles doses d'AAS inhibe plutôt la formation de TxA₂

(inhibition de la COX-1 plaquettaire) et minimise l'inhibition de la synthèse de PGI₂ (inhibition de la COX-2 vasculaire). Ceci résulte en une action antithrombotique soutenue, diminuant les facteurs favorisant l'agrégation et protégeant les facteurs inhibiteurs.

Figure 15 : Cible d'action de l'AAS et des anti-inflammatoires non-stéroïdiens



A – COX-1 plaquettaire
 B – Liaison de l'AAS sur la COX-1
 C – Interaction ibuprofène – AAS.
 Site catalytique en rouge, sérine⁵²⁹ en vert, acide arachidonique en bleu, AAS en mauve, ibuprofène en orange

Reproduction autorisée : Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1809-1817. Copyright © 2001 Massachusetts Medical Society.

L'AAS n'est pas la seule molécule à cibler la COX. En effet, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), tels l'ibuprofène ou la naproxène, sont des inhibiteurs réversibles de la COX. En raison de la réversibilité de cette liaison, l'effet antiplaquettaire des AINS est transitoire et insuffisant pour assurer une protection thrombotique chronique chez les patients souffrant de maladie coronarienne stable.⁶⁰ De plus, la liaison d'AINS à la COX-1 empêche par encombrement stérique l'AAS de se rendre à sa sérine-cible et d'inhiber l'activité de la COX de façon permanente (**Figure 15**).^{61, 62} Cette interaction entre les AINS et l'AAS entraîne un risque accru de subir un événement ischémique aigu et devrait donc être évitée.⁶³

ii) Pharmacocinétique

L'AAS est un composé chimique issu de l'estérification de l'acide salicylique.^{59, 64} Elle est instable dans le sang où elle est hydrolysée en acétate et salicylate en environ 30 minutes.^{42, 64, 65} Contrairement à l'AAS, le salicylate est inactif sur la fonction plaquettaire. Sa prise ne modifie ni l'agrégation plaquettaire, ni la formation de TxA_2 .⁶⁶

a) Absorption

L'AAS sous forme régulière pris oralement est absorbé à près de 80 à 100% au niveau gastrique et duodéal, en 20 minutes à 2 heures.^{64, 65, 67} Son absorption est passive et elle est optimale à des pH variant de 2,15 à 4,10. Il n'est donc pas surprenant que les formes gastro-résistantes à absorption entérique soient absorbées à un moindre degré, soit à près de 40 à 50%, en 3 à 8 heures.^{59, 65}

b) Distribution et métabolisme

Le volume de distribution de l'AAS est de 0,15 à 0,2 L/kg.⁵⁹ L'AAS se lie peu aux protéines plasmatiques.⁵⁹ Sa demi-vie est particulièrement courte, de l'ordre de 15 à 30 minutes, ce qui est expliqué par une hydrolyse rapide au niveau de la muqueuse intestinale, du foie et du sang.^{42, 59, 65} L'acide salicylique résultant de l'hydrolyse de l'AAS subit un métabolisme hépatique avec une cinétique de premier ordre.

c) Élimination

La grande majorité de l'AAS étant rapidement hydrolysée, seulement 1% de la dose ingérée est excrétée inchangée dans l'urine. Le reste est éliminé principalement sous forme de métabolites inactifs de l'acide salicylique.⁵⁹

iii) Pharmacodynamie

L'effet antiplaquettaire de l'AAS est apparent dans l'heure qui suit l'administration orale d'un comprimé régulier et se maintient pendant la durée de vie de la plaquette et ce, malgré une demi-vie d'élimination plasmatique de l'ordre de 30 minutes.^{65, 68} Cette asymétrie entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de l'AAS s'explique par la nature irréversible de l'acétylation de la COX-1 plaquettaire par l'AAS et l'incapacité de la plaquette à synthétiser des quantités importantes de COX-1 active. L'inhibition plaquettaire par l'AAS est cumulative,⁶⁹ l'administration d'AAS à des doses aussi faibles que 20 à 30 mg par jour est suffisante pour inhiber profondément la formation de TxA₂ et l'agrégation plaquettaire chez les patients souffrant de maladie coronarienne.⁶⁹⁻⁷² Or, les doses couramment utilisées d'AAS varient entre 80 et 325 mg par jour, ce qui dépasse la dose minimalement effective d'AAS et résulte en une inhibition quasi-absolue de la capacité plaquettaire à former la TxA₂.⁶⁸

Malgré l'utilisation de doses d'AAS supérieures à la dose minimale requise, la capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger peut varier dans le temps. En effet, dans une étude sur des volontaires sains, Di Minno et collaborateurs ont démontré que les plaquettes retrouvent une capacité fonctionnelle à produire de la TxA₂ et à agréger en réponse à la stimulation concomitante par 2 agonistes dans les 4 heures qui suivent l'administration de 650 mg d'AAS.⁷³ Ces investigateurs ont aussi démontré que aussi peu que 2,5% de plaquettes avec une COX-1 non-acétylée est suffisant pour induire une agrégation plaquettaire importante en réponse à l'acide arachidonique et au collagène.⁷³ Ils suggèrent que de très faibles quantités de TxA₂ sont nécessaires pour amplifier la réponse plaquettaire aux autres stimuli. Par ailleurs, Perneby *et al.* ont démontré une capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger en sang complet en réponse à l'acide arachidonique seul dans les 24 heures suivant l'administration d'AAS chez des volontaires sains et ce, malgré une inhibition significative de la formation de TxA₂.⁷⁴ Ainsi, la relation entre l'inhibition pharmacologique et l'inhibition fonctionnelle de l'activité plaquettaire par

l'AAS ne semble pas directe. La pertinence de ces résultats chez des sujets souffrant de maladie coronarienne devra être étudiée.

En raison de l'incapacité de la plaquette de synthétiser des quantités importantes de protéines, le rétablissement de l'hémostase normale requiert la genèse de nouvelles plaquettes à partir de mégacaryocytes.⁶⁸ Toutefois, le rétablissement de la fonction plaquettaire suite à la cessation d'AAS est plus rapide que ce que laisse présager le taux de régénération plaquettaire normal d'environ 10 à 12% par jour.⁷⁰ En effet, le rétablissement de la fonction plaquettaire suite à la cessation d'AAS n'est pas linéaire; en présence d'aussi peu que 20% de plaquettes non-inhibées, soit en 48 à 72 heures après la cessation d'AAS, l'hémostase peut se dérouler normalement.^{42, 73, 75, 76} Ceci pourrait en partie être expliqué par le rôle amplificateur de la TxA₂ dans la réponse plaquettaire.

iv) Efficacité clinique

L'efficacité et l'innocuité de l'AAS ont été évaluées dans près de 70 études cliniques randomisées sur plus de 115 000 sujets couvrant tout le spectre de la maladie athérosclérotique, allant de sujets apparemment sains à risque de maladie coronarienne à des sujets ayant subi un syndrome coronarien aigu.⁶⁸ L'administration chronique d'AAS a un effet bénéfique net démontré sur la prévention d'événements ischémiques aigus en prévention secondaire. En effet, une méta-analyse portant sur 16 études sur l'AAS en prévention secondaire (17 000 sujets à haut risque thrombotique représentant 43 000 personnes-années ayant subi 3 306 événements cardiovasculaires majeurs) a démontré une réduction significative de 18% du risque de subir un événement cardiovasculaire majeur (6,7% chez des sujets prenant de l'AAS vs. 8,2% chez des sujets contrôles) et a réduit la mortalité de toute cause de 10%.⁷⁷

La dose d'AAS a également fait l'objet de nombreuses études cliniques. Une méta-analyse sur 287 études, incluant plus de 200 000 sujets, concluait que l'administration de faibles doses d'AAS (allant de 75 à 325 mg par jour) était aussi efficace que l'utilisation de

doses plus élevées pour inhiber la fonction plaquettaire.¹ Puisque l'incidence d'effets indésirables était directement liée à la dose d'AAS, les auteurs recommandaient l'administration de doses ne dépassant pas 325 mg dans la prévention d'événements ischémiques aigus.^{1,65}

v) Variabilité de réponse

Le bénéfice clinique de faibles doses d'AAS a été rigoureusement établi, mais il est néanmoins en contradiction avec plusieurs études ayant démontré une réponse plaquettaire variable et corrélée linéairement à la dose d'AAS, en terme d'inhibition plus marquée de la production de TxA₂ et d'agrégation plaquettaire.^{69, 70, 78-80} De nombreuses études suggèrent qu'un certain nombre de patients prenant quotidiennement de l'AAS se présentent avec une agrégation plaquettaire résiduelle prononcée, signalant une réponse plaquettaire inhibitrice faible à l'AAS.⁷ Ce phénomène de « résistance à l'AAS » qui signale une réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS serait présent chez 0,4 à 60% des sujets souffrant de maladie coronarienne stable.⁸¹⁻⁹⁸ Cette disparité dans la prévalence peut en partie être expliquée par l'absence d'un consensus sur la définition de résistance à l'AAS, l'abondance de tests de fonction plaquettaire utilisés (voir **Chapitre 4**), les différentes populations de patients étudiées, ainsi que par la variabilité dans le régime médicamenteux d'AAS administré.⁷ Nonobstant, une inhibition incomplète de l'agrégation plaquettaire par l'AAS semble prédisposer à un risque accru de subir un événement cardiovasculaire majeur.⁹

Le déterminant le plus puissant de la réponse plaquettaire à l'AAS demeure l'adhésion au traitement par le patient.^{99, 100} En effet, il a été démontré que la majorité des cas de patients où une activité plaquettaire résiduelle prononcée était détectée était en fait due au fait que le patient ne prenait pas l'AAS tel que prescrit.^{99, 100} Lorsque l'inadhésion au traitement ne peut expliquer le défaut d'inhibition plaquettaire par l'AAS, un certain nombre d'hypothèses ont été postulées pour élucider les mécanismes menant à un effet amoindri de l'AAS. Ce phénomène probablement plurifactoriel pourrait être causé par des polymorphismes génétiques,^{87, 101-107} une hypersensibilité plaquettaire aux autres agonistes

requérant potentiellement des quantités minimales de TxA_2 pour amplifier l'agrégation plaquettaire,^{82, 93, 108-110} des interactions avec les autres éléments figurés du sang,¹¹¹⁻¹¹⁴ une dysfonction endothéliale menant à une formation moindre de substances inhibitrices plaquettaires,¹¹⁵⁻¹¹⁷ un stress oxydatif menant à la formation de molécules prothrombotiques telles les isoprostanes,¹¹⁸⁻¹²¹ une compétition pour la COX-1 plaquettaire entre l'acétylation par AAS et la glycation par une glycémie élevée,¹²² et une inactivation accrue de l'AAS par des estérases plasmatiques.^{123, 124} Bien que tous ces mécanismes puissent contribuer à une agrégation plaquettaire résiduelle prononcée chez certains patients, aucun n'explique une partie importante de la variabilité de la réponse plaquettaire recensée chez les sujets souffrant de maladie coronarienne prenant de l'AAS.

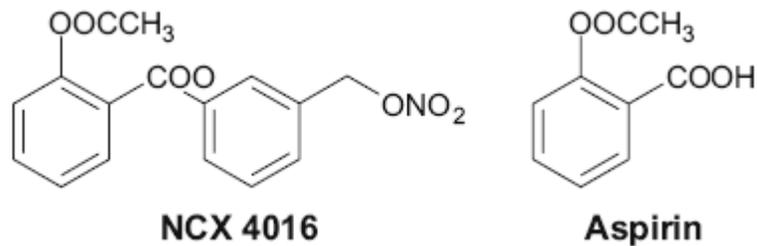
Dans une étude auprès de 200 sujets souffrant de maladie coronarienne stable, nous avons investigué les caractéristiques des patients qui pourraient expliquer une réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS.¹²⁵ Dans cette étude, nous avons démontré qu'un décompte plaquettaire élevé augmentait significativement le risque d'avoir une réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS.¹²⁵ En effet, pour chaque incrément de 50×10^9 plaquettes/L, le risque augmentait de 3,5 fois, tandis que pour chaque incrément de 100×10^9 plaquettes/L, le risque augmentait de 12 fois.¹²⁵ Nous avons suggéré qu'un taux de régénération plaquettaire accru pourrait expliquer l'inefficacité de l'AAS à inhiber adéquatement l'agrégation plaquettaire. D'autres études soutiennent cette hypothèse où un taux de régénération plaquettaire accru, mesuré par réticulation plaquettaire, serait associé à une inhibition plaquettaire moindre par l'AAS.¹²⁶⁻¹²⁸ L'importance de ce mécanisme devra être approfondie dans une étude clinique prospective.

vi) AAS nitrosylée

Le NCX-4016 est une molécule en développement clinique qui combine l'AAS à un donneur de NO (**Figure 16**).¹²⁹ Cette molécule aurait des effets antithrombotiques, antiathérogéniques et vasodilatateurs qui pourraient être bénéfiques chez des sujets souffrant de maladie coronarienne. En plus de l'effet inhibiteur de la formation de TxA_2 de

l'AAS, l'AAS nitrosylée exploite l'effet antiplaquettaire du NO. Tel que discuté dans le **Chapitre 2**, le NO traverse la membrane plaquettaire et active la guanylcyclase soluble, ce qui résulte en une formation accrue de GMP cyclique qui induit la phosphorylation des transporteurs de calcium et réduit la concentration de calcium intraplaquettaire.^{31, 46, 116} De plus, le NO induit une vasodilatation, ce qui réduit les forces de cisaillement dans le sang et contribue à diminuer l'activation plaquettaire.

Figure 16 : Structure chimique de NCX-4016



Reproduction autorisée : Gresele P, Momi S. Pharmacologic profile and therapeutic potential of NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin, for cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006; 24: 148-168. Copyright © 2006 Blackwell Publishing Ltd.

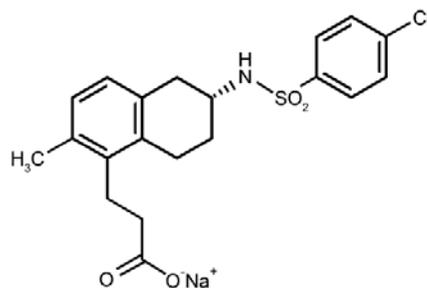
Les études de pharmacocinétique chez l'humain ont démontré que le NCX-4016 subit un effet de premier passage hépatique important suite à son absorption, et que les niveaux de salicylates et de métabolites nitrosylés augmentent significativement, ce qui laisse entendre que l'AAS et le NO sont libérés dans la circulation sanguine.¹²⁹ Les études cliniques de phase I et II chez des patients souffrant de maladie coronarienne laissent présager une efficacité de cette molécule au moins équivalente à l'AAS en termes d'inhibition plaquettaire, mais laisse aussi prévoir une toxicité gastro-intestinale moindre et une meilleure efficacité chez des sujets souffrant de dysfonction endothéliale, de diabète et d'obésité.¹²⁹ Des études de phase III sont donc attendues pour confirmer l'utilité clinique de cette molécule dans l'arsenal thérapeutique en prévention secondaire d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de la maladie coronarienne.

vii) Inhibiteurs du récepteur de TxA₂

L'activation des récepteurs TP par la TxA₂, ou par d'autres ligands, provoque l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction et la bronchoconstriction. Les récepteurs TP interviennent également dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse.¹³⁰ Plusieurs antagonistes des récepteurs TP sont en développement clinique, incluant le dalstroban, le ramatroban et le seratrodist.¹³⁰ La majorité de ces molécules ciblent les maladies bronchoconstrictives comme l'asthme. Toutefois, le terutroban est développé spécifiquement dans l'indication de maladies cardiovasculaires.¹³¹

Le terutroban est un antagoniste des récepteurs TP, puissant, sélectif, direct, réversible et actif par voie orale (**Figure 17**). Il se lie de façon spécifique et durable aux récepteurs TP plaquettaires.¹³¹ Une étude clinique a démontré qu'une dose quotidienne de 10 mg de terutroban est suffisante pour produire un effet antiplaquettaire soutenu pendant 24 heures.¹³² Le terutroban, administré à cette dose à des patients coronariens déjà traités par l'AAS améliorerait sensiblement leur fonction endothéliale.¹³³ Cette molécule est présentement en études de phase III dans la prévention des événements thrombotiques chez des patients ayant souffert d'un accident vasculaire cérébral.¹³⁴

Figure 17 : Structure chimique de terutroban



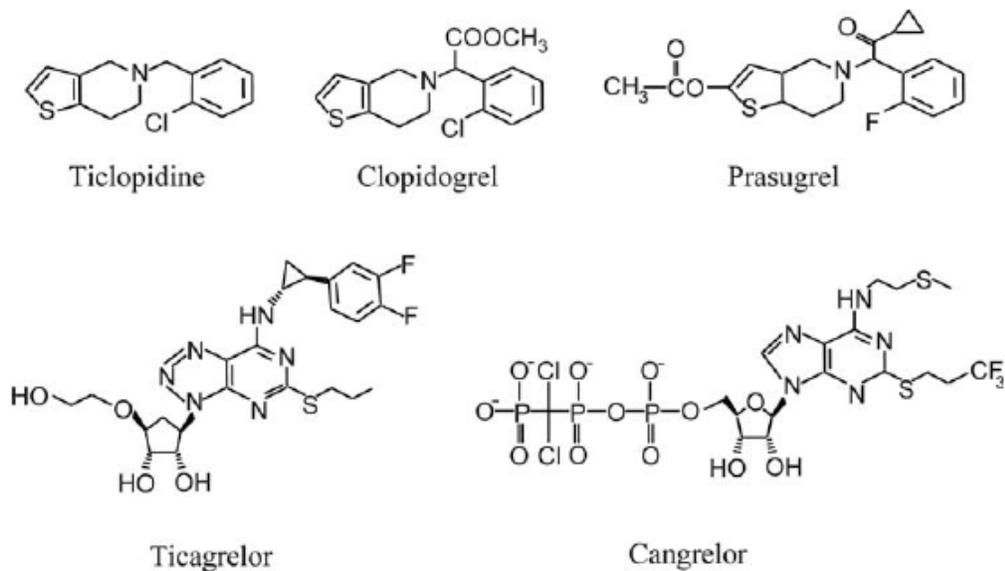
Reproduction autorisée : Maalej N, Osman HE, Shanmuganayagam D, Shebuski RJ, Folts JD. Antithrombotic properties of the thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor antagonist S18886 on prevention of platelet-dependent cyclic flow reductions in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005 ;45: 389-395. Copyright © 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

B) Le clopidogrel et les autres inhibiteurs des récepteurs purinergiques

L'ADP est un agoniste plaquettaire qui intervient dans l'activation et le recrutement des plaquettes au site de lésion. L'inhibition de cette voie d'activation par des médicaments ciblant le récepteur P2Y₁₂ représente une option thérapeutique antiplaquettaire de choix chez des sujets à haut risque thrombotique, tels les sujets ayant subi un syndrome coronarien aigu ou une intervention coronarienne percutanée.

Dans cette classe de médicaments, nous retrouvons le clopidogrel et la ticlopidine disponibles actuellement, ainsi que le prasugrel, le ticagrelor, l'elinogrel et le cangrelor en développement clinique (**Figure 18**).

Figure 18 : Structures chimiques des inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂

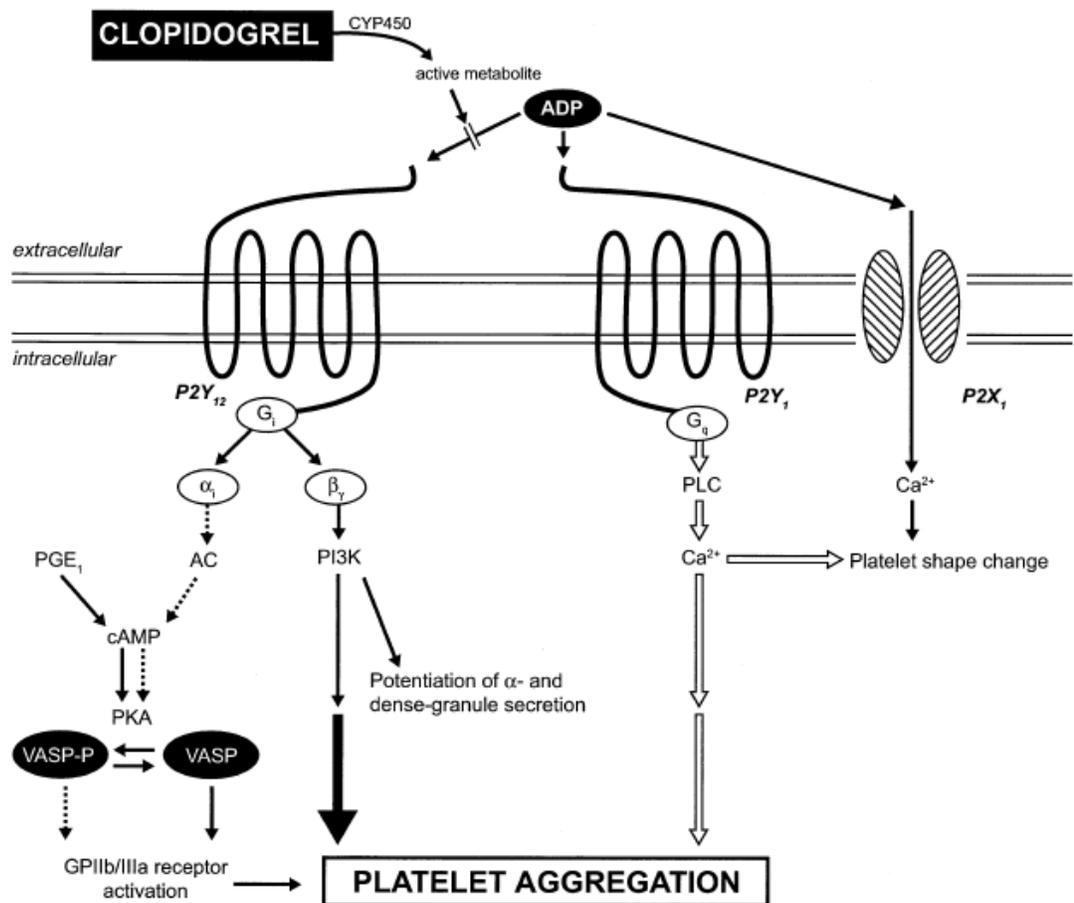


Reproduction autorisée : Wallentin L. P2Y₁₂ inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J.* 2009; 30: 1964-1977. Copyright © 2009 European Society of Cardiology.

i) Pharmacologie

Les thiénopyridines (ticlopidine et clopidogrel) sont des antagonistes irréversibles du récepteur P2Y₁₂ plaquettaire. La liaison des métabolites actifs de ces composés au récepteur P2Y₁₂ empêche l'activation de ce récepteur par l'ADP, ce qui se traduit en une augmentation d'AMP cyclique intracellulaire et une inhibition de l'agrégation plaquettaire (Figure 19).

Figure 19 : Mécanisme d'action des thiénopyridines



Reproduction autorisée : Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 1157-1164. Copyright © 2005 American College of Cardiology Foundation.

ii) Pharmacocinétique

Les thiénoxyridines sont des pro-médicaments qui nécessitent un métabolisme hépatique pour donner lieu à des métabolites actifs et inactifs.⁶⁸ Le métabolisme de la ticlopidine a mené à l'identification de 13 métabolites chez l'humain, dont un possède une activité inhibitrice sur le récepteur P2Y₁₂.¹³⁵ Le métabolisme du clopidogrel donne également lieu à de nombreux métabolites inactifs par dé-estérification, tandis qu'un métabolite actif est produit par métabolisme oxydatif.¹³⁵

a) Absorption

La ticlopidine est absorbée à près de 90% après une administration orale d'une dose de 250 mg.^{68, 136} Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 1 à 3 heures après une dose unique et l'état d'équilibre est atteint en 3 à 5 jours après une administration continue de doses de 250 mg deux fois par jour.^{135, 136}

Le clopidogrel est rapidement absorbé à environ 50% après une administration orale et les concentrations plasmatiques maximales du métabolite actif de clopidogrel sont atteintes en environ 1 heure après une dose unique de 300 mg.^{68, 137} Les concentrations plasmatiques des métabolites de clopidogrel augmentent en relation avec la dose administrée, mais cette relation n'est pas directe; ainsi, doubler la dose se traduit en une augmentation des concentrations plasmatiques de l'ordre de 30 à 40%.⁶⁸ L'état d'équilibre est atteint en 4 à 7 jours lors d'administration quotidienne de clopidogrel à une dose de 75 mg.⁶⁸ Cette dose a été sélectionnée pour équivaloir à l'inhibition plaquettaire obtenue avec une dose quotidienne de 500 mg de ticlopidine.⁶⁸

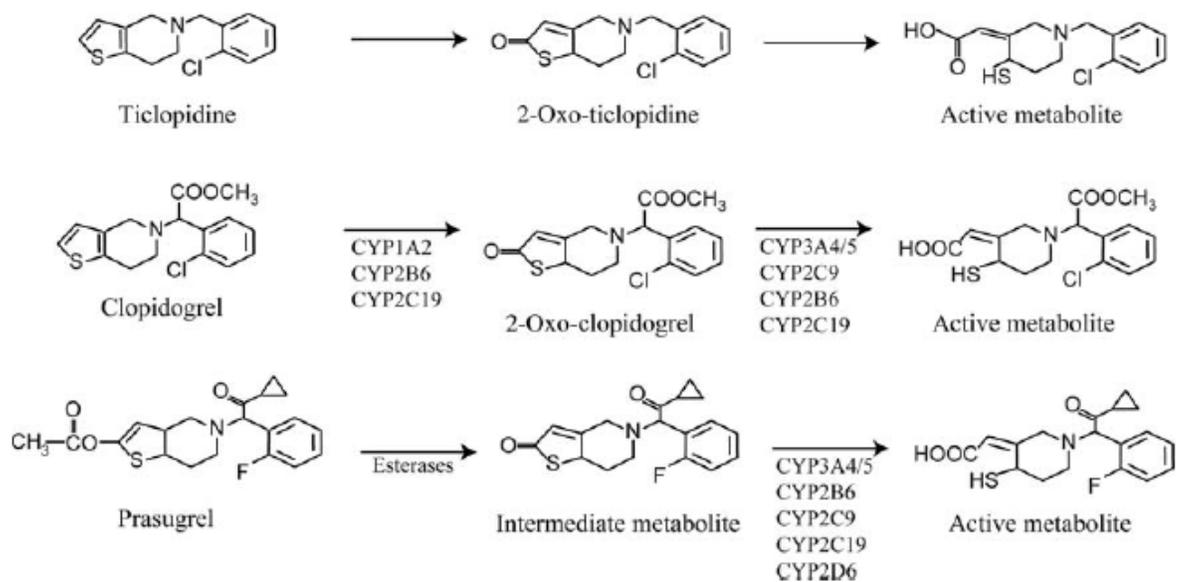
b) Distribution et métabolisme

La ticlopidine est fortement liée (à plus de 98%) aux protéines plasmatiques, particulièrement à l'albumine.^{68, 136} Le métabolisme de la ticlopidine est considérable, avec moins de 1% du médicament retrouvé inchangé dans l'urine.¹³⁸ Au moins cinq voies

métaboliques ont été recensées pour la ticlopidine, donnant lieu à 13 métabolites, dont un seul est actif (**Figure 20**).¹³⁵

Le clopidogrel est fortement lié (à plus de 98%) aux protéines plasmatiques.¹³⁶ Il est métabolisé par deux voies principales : les estérases inactivent la majorité du clopidogrel absorbé (environ 85%) tandis que les cytochromes (CYP) hépatiques métabolisent une minorité du clopidogrel en son métabolite actif (**Figure 20**).¹³⁵ De nombreux CYP impliqués dans le métabolisme du clopidogrel ont été identifiés; les CYP les plus importants sont CYP3A4/5, CYP2B6, CYP2C19 et CYP2C9.^{135, 136}

Figure 20 : Voies d'activation des thiényopyridines



Reproduction autorisée : Wallentin L. P2Y₁₂ inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J.* 2009; 30: 1964-1977. Copyright © 2009 European Society of Cardiology.

c) Élimination

La ticlopidine ne suit pas une pharmacocinétique de premier ordre.¹³⁷ La demi-vie d'élimination de la ticlopidine est de 24 à 36 heures après une dose unique et de 96 heures

après 14 jours d'administration.⁶⁸ La ticlopidine est éliminée à 60% dans l'urine et à 25-40% dans les selles.^{136, 138}

Le clopidogrel suit une pharmacocinétique de premier ordre, avec une demi-vie d'élimination du métabolite actif de clopidogrel d'environ 8 heures.^{68, 137} Le clopidogrel est éliminé à 40% dans l'urine et à 35-60% dans les selles.¹³⁵

iii) Pharmacodynamie

L'effet antiplaquettaire de la ticlopidine est apparent dans les 24 à 48 heures qui suivent le début du traitement biquotidien, atteint le sommet de son effet en 3 à 7 jours et persiste dans le temps pour la durée de vie de la plaquette.^{135, 138} La ticlopidine inhibe l'activation de l'intégrine $\alpha_2\beta_3$ induite par l'ADP, ainsi que l'expression plaquettaire de P-sélectines, mais n'affecte pas l'entrée de calcium dans la plaquette, ni le changement conformationnel en réponse à l'ADP, ce qui est cohérent avec une inhibition spécifique du récepteur P2Y₁₂ sans effet sur les récepteurs P2Y₁ et P2X₁.^{38, 137} L'administration continue de ticlopidine se traduit en une augmentation du temps de saignement standardisé de l'ordre de 2 fois.¹³⁷ Le rétablissement de la fonction plaquettaire suite à la cessation de ticlopidine se fait en 3 à 4 jours après une administration d'une dose unique de 250 mg, mais requiert 11 à 13 jours lorsque la ticlopidine est administrée de façon continue.¹³⁵

L'effet antiplaquettaire du clopidogrel est apparent dans les 4 à 5 heures qui suivent l'administration d'une dose de charge de 300 mg et se traduit en une inhibition de l'ordre de 30 à 40% de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP.¹³⁵ L'administration quotidienne de 75 mg de clopidogrel maintient ce niveau d'inhibition qui persiste dans le temps pour la durée de vie de la plaquette.^{68, 135} L'augmentation de la dose de charge à 600 mg permet de réduire le délai d'inhibition à environ 2 heures et augmente le niveau d'inhibition plaquettaire d'environ 10 à 15%.^{68, 135} Comme dans le cas de la ticlopidine, l'administration de clopidogrel inhibe l'activation de l'intégrine $\alpha_2\beta_3$ induite par l'ADP, ainsi que l'expression plaquettaire de P-sélectines, mais n'affecte pas l'entrée de calcium

dans la plaquette, ni le changement conformationnel en réponse à l'ADP, ce qui est cohérent avec une inhibition spécifique du récepteur P2Y₁₂ sans effet sur les récepteurs P2Y₁ et P2X₁.³⁸ Le rétablissement de la fonction plaquettaire suite à la cessation de clopidogrel se fait en 3 à 7 jours, ce qui suggère que le rétablissement dépend de la formation de nouvelles plaquettes à partir de mégacaryocytes.¹³⁵

iv) Efficacité clinique

Bien que la première sur le marché, la ticlopidine a été reléguée en thérapie de seconde ligne en raison de son profil d'effets indésirables; en effet, ce médicament était associée à la neutropénie chez 0,8 à 2,3% des patients.¹³⁹ Néanmoins, les études initiales qui ont confirmé le bénéfice clinique de l'ajout d'une thiényridine à l'AAS chez des patients à haut risque thrombotique ont été menées avec la ticlopidine et ont établi la supériorité de la combinaison AAS-thiényridine par rapport à l'AAS seule, particulièrement dans le contexte d'intervention coronarienne percutanée.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴

En raison de son profil d'effets indésirables plus favorable et une efficacité similaire à la ticlopidine, le clopidogrel s'est imposé comme thiényridine de choix.¹⁴⁵ Le clopidogrel est au moins aussi efficace que l'AAS dans la prévention secondaire d'événements ischémiques aigus.¹⁴⁶ Selon l'étude CAPRIE (*Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events*), le clopidogrel a réduit le risque relatif d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de décès cardiovasculaire de 8,7% par rapport à l'AAS, mais cette réduction n'était pas suffisante pour une approbation réglementaire de supériorité.¹⁴⁶ Néanmoins, les résultats de cette étude permettent la substitution par le clopidogrel chez des sujets chez qui l'AAS ne peut être administrée.⁶⁸

La complémentarité des mécanismes d'inhibition plaquettaire de l'AAS et du clopidogrel ont suscité un intérêt pour la combinaison de ces médicaments antiplaquettaires dans la prévention d'événements ischémiques chez des patients à haut risque thrombotique.⁶⁸ L'étude CURE (*Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent*

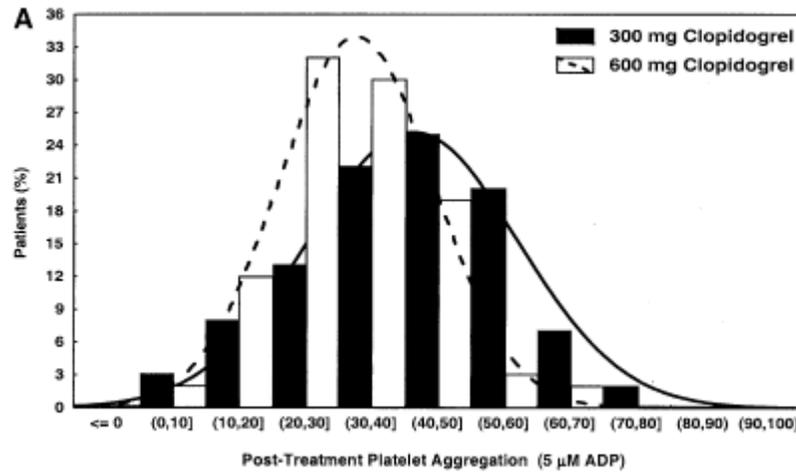
Events) a démontré que la combinaison d'AAS et de clopidogrel réduisait le risque d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de décès cardiovasculaire de 20% par rapport à l'AAS seule chez des sujets ayant subi un syndrome coronarien aigu.¹⁴⁷ Ce bénéfice était maintenu chez des sujets ayant subi une intervention coronarienne percutanée, tel que démontré dans la sous-étude PCI-CURE et l'étude CREDO (*Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation*).^{148, 149} Chez des sujets ayant subi un infarctus du myocarde, l'étude COMMIT (*Clopidogrel and Metoprolol Myocardial Infraction Trial*) et l'étude CLARITY (*CLopidogrel as Adjunctive ReperfuSIon TherapY*) ont démontré que l'ajout de clopidogrel à l'AAS réduisait la mortalité et les événements cardiovasculaires majeurs.^{150, 151}

La dose de clopidogrel a également fait l'objet de nombreuses études cliniques. L'étude ARMYDA-2 (*Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty*) a démontré une réduction significative du risque de complications thrombotiques périprocédurales de 50% d'une dose de charge de 600 mg par rapport à la dose standard de 300 mg chez des sujets devant subir une intervention coronarienne percutanée.¹⁵² Des études pharmacodynamiques ont appuyé l'utilisation d'une dose de charge de 600 mg en démontrant une inhibition plus importante et plus rapide avec cette dose par rapport à la dose standard de 300 mg.^{153, 154}

v) Variabilité de réponse

Malgré un bénéfice clinique clair du clopidogrel dans la prévention d'événements ischémiques, particulièrement en combinaison avec l'AAS chez des patients à haut risque thrombotique, de nombreuses études rapportent une variabilité marquée dans l'effet antiplaquettaire du clopidogrel chez les patients souffrant de maladie coronarienne.⁸ Cette variabilité est présente à toutes les doses de clopidogrel, mais semble moins étendue lorsque la dose de charge de clopidogrel est accrue (**Figure 21**).

Figure 21 : Variabilité de réponse plaquettaire au clopidogrel



Reproduction autorisée : Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45: 1392-1396. Copyright © 2005 American College of Cardiology Foundation.

Un certain nombre d'hypothèses ont été postulées pour élucider les causes d'une variabilité de réponse plaquettaire au clopidogrel. Une hyperactivité plaquettaire basale semble prédisposer à une agrégation plaquettaire prononcée malgré la prise de clopidogrel chez les patients souffrant de maladie coronarienne.^{155, 156} Cette manifestation pourrait avoir une importance dans le cas de patients en syndrome coronarien aigu où l'activité plaquettaire est particulièrement accentuée. La variabilité de réponse au clopidogrel est probablement plurifactorielle. Toutefois, puisque le clopidogrel est un pro-médicament, la biodisponibilité pourrait être un enjeu majeur dans son efficacité.¹⁵⁷ En effet, une faible inhibition plaquettaire par le clopidogrel pourrait être causée par des défauts dans l'absorption et le métabolisme du médicament, incluant un sous-dosage (particulièrement chez les personnes obèses),^{158, 159} des polymorphismes génétiques des CYP hépatiques impliqués dans le métabolisme du clopidogrel, ainsi que des interactions médicamenteuses.¹⁶⁰⁻¹⁶⁷ Également, une hypersensibilité plaquettaire à l'ADP potentiellement due à une modification des récepteurs purinergiques,^{104, 168} ou une

hyperagrégabilité en raison d'une modification des intégrines $\alpha_2\beta_3$ pourraient expliquer une inhibition plaquettaire insuffisante par le clopidogrel chez certains patients.^{169, 170} Bien que tous ces mécanismes puissent contribuer à une agrégation plaquettaire résiduelle prononcée chez certains patients, aucun n'explique une partie importante de la variabilité de la réponse plaquettaire recensée chez les sujets souffrant de maladie coronarienne prenant du clopidogrel.

Parmi les stratégies pour diminuer la variabilité de réponse plaquettaire au clopidogrel, l'augmentation de la dose de charge ou de maintien semble avoir une certaine efficacité.¹⁷¹⁻¹⁷⁹ Une autre possibilité réside dans le changement de molécule. Une étude par Campo *et al.* suggère que la majorité des patients avec une faible inhibition plaquettaire par le clopidogrel répondent favorablement à une substitution avec la ticlopidine.¹⁸⁰ Toutefois, la voie est ouverte pour le développement de nouvelles molécules plus puissantes et avec un profil d'effets indésirables plus favorable pour pallier les déficiences des thiénoxyridines disponibles actuellement.

vi) Inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ en développement

Les médicaments ciblant le récepteur P2Y₁₂ présentement en développement clinique se divisent en deux catégories : les thiénoxyridines, qui incluent le prasugrel, et les agents inhibiteurs directs, qui incluent le ticagrelor, l'elinogrel et le cangrelor.¹³⁵

a) Prasugrel

Le prasugrel est une thiénoxyridine dont le métabolite actif lie irréversiblement le récepteur P2Y₁₂, et en ce sens ressemble grandement aux thiénoxyridines présentement sur le marché (**Figure 18**).^{135, 181} Comme la ticlopidine et le clopidogrel, le prasugrel requiert une biotransformation hépatique pour former le métabolite actif, mais cette transformation dépend de plusieurs CYP ce qui facilite le métabolisme du prasugrel dans sa forme active (**Figure 20**). La biodisponibilité du prasugrel est améliorée par rapport au clopidogrel. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 30 minutes et augmentent de façon

proportionnelle à la dose de prasugrel.^{135, 136} Environ 70% de la dose de prasugrel est éliminée dans l'urine et environ 25% se retrouve dans les selles.¹³⁵

Cette pharmacocinétique améliorée se manifeste également en un délai d'inhibition plaquettaire diminué. L'effet antiplaquettaire du prasugrel est apparent dans les 15 à 30 minutes qui suivent l'administration d'une dose de charge de 60 mg et une inhibition maximale de 60 à 70% de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP est atteinte en 2 à 4 heures.¹³⁵ Une inhibition d'environ 50% de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP est maintenue avec une administration quotidienne de 10 mg et l'hémostase normale est rétablie en 7 à 10 jours après la cessation de prasugrel, ce qui laisse supposer que le rétablissement requiert la formation de nouvelles plaquettes à partir de mégacaryocytes.¹³⁵

L'efficacité clinique du prasugrel se compare favorablement au clopidogrel selon l'étude TRITON (*TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet iNhibition with prasugrel*) qui a rapporté une diminution du risque d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de décès cardiovasculaire avec le prasugrel par rapport au clopidogrel chez des patients ayant subi un syndrome coronarien aigu.¹⁸² Toutefois, cet avantage était contrecarré par une augmentation significative du risque hémorragique.¹⁸² Le devis expérimental de l'étude TRITON a été sévèrement critiqué, particulièrement en ce qui a trait à la dose de charge de clopidogrel employée (300 mg) et au moment d'administration. Néanmoins, le prasugrel a reçu l'approbation des instances réglementaires européennes et américaines pour sa mise en marché en 2009, et Santé-Canada étudie le dossier actuellement.

b) Ticagrelor

Le ticagrelor est un antagoniste direct et réversible du récepteur P2Y₁₂ (**Figure 18**).¹³⁵ Cet analogue à haute affinité de l'ADP ne nécessite pas de biotransformation pour lier le récepteur plaquettaire P2Y₁₂ et induire un changement conformationnel réversible rendant le récepteur insensible à l'ADP.¹³⁵ Le ticagrelor est rapidement absorbé et est

métabolisé en au moins un métabolite dont l'activité antiplaquettaire est similaire à la molécule-mère.¹³⁵ Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 1 à 3 heures et augmentent de façon proportionnelle à la dose.¹³⁵ La demi-vie plasmatique de ce composé est de 6 à 13 heures, ce qui explique sa posologie biquotidienne.¹³⁵

L'effet antiplaquettaire du ticagrelor se manifeste en 2 à 4 heures et atteint 50 à 60% d'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP suite à une dose de charge de 180 mg.¹³⁵ Ce niveau d'inhibition plaquettaire est maintenu lors de l'administration continue de 90 mg de ticagrelor deux fois par jour.¹³⁵ Le retour à une hémostase normale se fait en 3 jours suite à la cessation de ticagrelor.¹⁸³

L'efficacité clinique du ticagrelor se compare favorablement au clopidogrel selon l'étude PLATO (*PLATelet inhibition and patient Outcomes*) qui a rapporté une diminution du risque d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de décès cardiovasculaire avec le ticagrelor par rapport au clopidogrel chez des patients ayant subi un syndrome coronarien aigu.¹⁸⁴ Le risque hémorragique global n'a pas été augmenté chez les sujets randomisés au ticagrelor, mais les saignements non reliés au pontage aorto-coronarien étaient plus fréquents chez les sujets prenant du ticagrelor. Par ailleurs, la discontinuation de traitement due aux effets indésirables était significativement plus fréquente chez les sujets randomisés au ticagrelor par rapport au clopidogrel.¹⁸⁴ Parmi les effets indésirables inquiétants, les investigateurs ont recensé la dyspnée et des altérations du rythme cardiaque.¹⁸⁴ Le ticagrelor n'a pas encore reçu d'approbation de mise en marché d'aucune instance réglementaire mondialement.

c) Elinogrel

L'elinogrel est un antagoniste direct et réversible du récepteur P2Y₁₂ en phase II de développement clinique.¹⁸⁵ Les concentrations plasmatiques maximales d'elinogrel semblent être atteintes en 4 à 6 heures, ce qui se manifeste en une inhibition maximale de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP en 4 à 6 heures également.¹⁸⁵ La liaison

d'elinogrel au récepteur P2Y₁₂ étant réversible, l'effet antiplaquettaire disparaît en 24 heures.¹⁸⁵ L'administration d'une dose de 60 mg d'elinogrel chez des patients souffrant de maladie coronarienne répondant peu au clopidogrel réduit l'agrégation plaquettaire résiduelle dans les 4 heures qui suivent la prise du médicament.¹⁸⁵ Des études de phase II et de phase III sont requises pour mieux caractériser l'effet de ce nouveau médicament.

d) Cangrelor

Le cangrelor est un inhibiteur direct et réversible du récepteur P2Y₁₂ en phase III de développement clinique (**Figure 18**).¹³⁵ Sa particularité est sa voie d'administration intraveineuse. Le cangrelor est un analogue de l'ATP résistant au catabolisme par les ectonucléotidases avec une forte affinité pour le récepteur P2Y₁₂. Le cangrelor ne nécessite pas de bioactivation et est actif dès son administration intraveineuse. L'état d'équilibre est atteint en 30 minutes à partir du début de l'infusion de cangrelor (bolus de 30 µg/kg et infusion à 4 µg/kg/min).¹³⁵ Sa demi-vie étant de 3 à 6 minutes, le rétablissement de la fonction plaquettaire requiert 20 minutes suivant la cessation de l'infusion intraveineuse.

Bien que les études de phase II ayant démontré une inhibition profonde de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP laissaient présager une efficacité clinique intéressante pour le cangrelor, les études de phase III ont été cessées prématurément en raison de futilité.^{186, 187} Néanmoins, en raison des courts délais d'action et d'élimination de l'effet, le cangrelor pourrait être utile chez des sujets chez qui l'administration d'un inhibiteur du récepteur P2Y₁₂ est nécessaire, mais doit être cessé en vue d'une chirurgie. Dans ce cas, le cangrelor pourrait remplacer l'inhibiteur irréversible pour protéger le sujet sur le plan thrombotique jusqu'à ce qu'il soit sécuritaire de recommencer le traitement inhibiteur chronique. L'étude BRIDGE (*Maintenance of Platelet inhibition With cangRelor After discontinuation of Thienopyridines in Patients Undergoing surgery*; ClinicalTrials.gov NCT00767507) est en cours pour évaluer si l'administration péri-chirurgicale de cangrelor offre un profil d'innocuité acceptable en diminuant les risques thrombotiques sans augmenter de façon excessive le risque de saignement.

vii) Inhibiteurs du récepteur P2Y₁

Étant responsable de l'initiation de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP, le récepteur P2Y₁ pourrait être une cible pharmacologique intéressante. Les études portant sur des souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur P2Y₁ (P2Y₁^{-/-}) ont démontré une résistance des plaquettes à la stimulation par l'ADP, ainsi qu'une protection contre la formation de thrombus *in vivo*.^{188, 189}

Des molécules ciblant le récepteur P2Y₁ sont présentement en développement pré-clinique.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Certaines de ces molécules antagonistes du récepteur P2Y₁ ont démontré un effet antiplaquettaire intéressant et laissent présager le développement futur de cette classe de médicaments.¹⁹³ Par ailleurs, une composante naturelle des granules denses plaquettaires, le diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate (Ap₄A), et ses dérivés semblent posséder des attributs mixtes d'antagonisme des récepteurs P2Y₁ et d'agonisme partiel des récepteurs P2Y₁₂, ce qui pourrait se traduire en une inhibition profonde de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP tout en conservant une certaine activité résiduelle qui pourrait diminuer les risques hémorragiques associés.¹⁹² Ces résultats prometteurs devront être validés dans des modèles animaux avant leur application en essai clinique.

C) Les inhibiteurs de la phosphodiesterase

Cette classe de médicaments comprend le dipyridamole et le cilostazol, mais aucun de ces médicaments n'est approuvé au Canada en prévention secondaire de la maladie coronarienne stable. Ces médicaments agissent en inhibant la phosphodiesterase plaquettaire, dont le rôle est de dégrader l'AMP et le GMP cycliques, ce qui se traduit en une augmentation de la concentration intraplaquettaire de ces composés signalétiques inhibiteurs de l'activation plaquettaire.⁶⁸ L'association d'AAS et de dipyridamole est disponible au Canada et peut être utilisée en prévention d'événements vasculaires cérébraux, toutefois son efficacité dans la maladie coronarienne n'a jamais été démontrée.¹⁹⁴

Le cilostazol n'est pas approuvé au Canada, mais peut être obtenu par le programme d'accès spécial de Santé-Canada. Commercialisé aux États-Unis pour le traitement de la claudication intermittente, ce médicament est présentement sous investigation pour son utilité en traitement adjuvant à la combinaison AAS-thiénopyridine dans la prévention thrombotique post-syndrome coronarien aigu et pose de tuteur coronarien.^{195, 196} L'étude ACCEL-AMI (*Adjunctive Cilostazol versus high maintenance dose ClopidogrEL in patients with AMI*) a comparé l'effet antiplaquettaire d'une combinaison standard (AAS + clopidogrel 75 mg), d'une combinaison intensive (AAS + clopidogrel 150 mg) ou d'une triple thérapie (AAS + clopidogrel 75 mg + cilostazol 200 mg) chez 90 sujets ayant subi un infarctus du myocarde.¹⁹⁷ L'ajout de cilostazol à la thérapie combinée d'AAS et de clopidogrel s'est traduit en une inhibition plus profonde de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP, tant comparativement à la dose standard de clopidogrel qu'à une forte dose.¹⁹⁷ Par ailleurs, dans le groupe ayant reçu la triple thérapie, la proportion de sujets présentant une hyperactivité plaquettaire résiduelle était significativement moindre comparativement aux deux autres groupes.¹⁹⁷ En parallèle, dans une étude observationnelle portant sur 3099 sujets ayant reçu soit une thérapie combinée standard (AAS + clopidogrel 75 mg) ou une triple thérapie (AAS + clopidogrel 75 mg + cilostazol 200 mg) à la discrétion du médecin traitant, la survenue d'infarctus du myocarde ou de thrombose de tuteur à 12 mois était significativement moins fréquente dans le groupe ayant reçu le cilostazol.¹⁹⁸ Les effets indésirables, notamment des céphalées, un inconfort gastro-intestinal et des réactions cutanées, surviennent chez près de 15% des sujets et requièrent la cessation du cilostazol, ce qui peut limiter l'utilisation clinique de ce produit.¹⁹⁵ Néanmoins, le cilostazol pourrait être un traitement adjuvant intéressant chez des sujets avec une réponse antiplaquettaire insuffisante au traitement combiné standard.

D) Les inhibiteurs des récepteurs de la thrombine

Les inhibiteurs spécifiques du récepteur PAR-1 de la thrombine offrent une nouvelle avenue de traitement. Ils ont la particularité d'être complémentaires à la voie d'inhibition

plaquettaire de l'AAS et du clopidogrel et pourraient se donner en plus de ces médicaments antiplaquettaires usuels.¹⁸¹

Le SCH 530348 est un antagoniste hautement sélectif, compétitif et réversible du récepteur PAR-1 et agit en inhibant l'activation plaquettaire induite par la thrombine mais n'interfère pas avec les autres rôles de la thrombine, tel le clivage du fibrinogène.^{181, 194} Le SCH 530348 est absorbé rapidement, mais son élimination plasmatique est lente avec une demi-vie de 159 à 311 heures.¹⁹⁹ Le SCH 530348 est métabolisé par le CYP3A4 avant son élimination, majoritairement dans les selles, avec moins de 5% de la dose éliminée dans les urines.¹⁹⁹

Le SCH 530348 inhibe de façon dose-dépendante l'agrégation plaquettaire induite par le peptide activateur du récepteur de la thrombine (TRAP).¹⁹⁹ Une dose de 20 mg inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP à plus de 80% en environ 2 heures chez 50% des patients.¹⁹⁹ Une dose de 40 mg inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le TRAP à plus de 80% en environ 1 heure chez 70% des patients et en environ 2 heures chez 96% des patients. Une dose de maintien de 1 ou de 2,5 mg par jour est suffisante pour maintenir ce niveau d'inhibition plaquettaire en administration continue. Le rétablissement de la fonction plaquettaire normale prend 1 semaine après une dose de 10 mg, 2 semaines après une dose de 20 mg et 3 semaines après une dose de 40 mg.¹⁹⁹ Suite à la cessation d'un traitement continu de 2,5 mg par jour, le retour à des valeurs normales d'agrégation plaquettaire nécessite 2 à 3 semaines.¹⁹⁹

Les études de phase II suggèrent que le SCH 530348 en concomitance avec l'AAS et le clopidogrel réduit significativement les complications thrombotiques périprocédurales chez des patients requérant une intervention coronarienne percutanée sans augmenter significativement le risque de saignement.¹⁹⁹ Les études de phase III sont présentement en cours pour établir l'efficacité clinique de cette molécule.^{194, 200}

Chapitre 4 : L'exploration de la fonction plaquettaire

L'exploration plaquettaire comprend des méthodes simples, telles le décompte plaquettaire et l'examen morphologique sur frottis sanguin, mais également des tests évaluant la fonction plaquettaire. Les tests de fonction plaquettaire ont été développés pour détecter la présence de défauts innés ou acquis de la fonction plaquettaire.²⁰¹ Depuis l'invention de l'agrégomètre de Born, dont la méthodologie demeure le test étalon à ce jour, de nombreux essais techniques ont permis le développement d'instruments rapides et plus standardisés pour l'évaluation des anomalies hémostatiques communes. Ainsi, ces tests ont façonné le diagnostic de nombreuses maladies innées, telles la maladie de Glanzmann, la maladie de von Willebrand, la maladie du pool vide, la déficience en COX, et des désordres myéloprolifératifs.²⁰¹ Les tests de fonction plaquettaire ont aussi permis de caractériser des défauts plaquettaires acquis, en présence d'urémie par exemple, ou de maladie immune. Au cours des dernières décennies, l'intérêt s'est dirigé vers l'évaluation de l'effet pharmacodynamique des médicaments antiplaquettaires.²⁰²

Bien que certains tests étudient l'hémostase dans son ensemble, la majorité des tests de fonction plaquettaire ciblent différentes phases de la fonction plaquettaire. Dans les sections qui suivent, les tests de fonction plaquettaire disponibles seront présentés par phase de l'activité plaquettaire ciblée, soient l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire. La liste des tests n'est pas exhaustive, mais les prochaines sous-sections présentent les tests de fonction plaquettaire les plus couramment employés dans la littérature.

A) Les tests globaux de l'hémostase

Certains tests étudient l'hémostase dans son ensemble. Ces tests incluent le temps de saignement standardisé, ainsi que le thromboélastographe (TEG[®]).

i) Temps de saignement standardisé

Le test de fonction plaquettaire le plus ancien encore utilisé consiste en une mesure du temps nécessaire à l'arrêt de saignement suite à une incision dans la peau.²⁰³⁻²⁰⁵ Ce test a été standardisé pour permettre une meilleure comparabilité. Un brassard à pression est gonflé pour atteindre une pression de 40 mm Hg au niveau du bras. Un appareil automatisé inflige une incision standardisée de 10 mm de longueur et de 1 mm de profondeur sur la face palmaire de l'avant-bras. La lésion est ensuite délicatement éponagée à toutes les 30 secondes jusqu'à l'arrêt du saignement. En temps normal, le temps de saignement est inférieur à 10 minutes.²⁰³ Toutefois, suite à l'ingestion de médicaments antiplaquettaires, le temps de saignement se trouve prolongé.

Ce test offre l'avantage d'étudier l'hémostase naturelle de chaque sujet, à coût modique.²⁰⁵ Par ailleurs, ce test est facile, rapide et ne nécessite aucune manipulation sanguine avant le test.²⁰³ Cependant, ce test présente plusieurs inconvénients majeurs. Notamment, il est invasif et peut laisser des cicatrices.²⁰⁵ Malgré sa standardisation, le test demeure difficilement reproductible.^{204, 205} Le résultat est subjectif et dépend de plusieurs facteurs, dont l'expérience de l'investigateur, la température de la peau, son épaisseur, etc.²⁰³ Pour ces raisons, ce test est de plus en plus délaissé par les chercheurs pour mesurer la fonction plaquettaire.

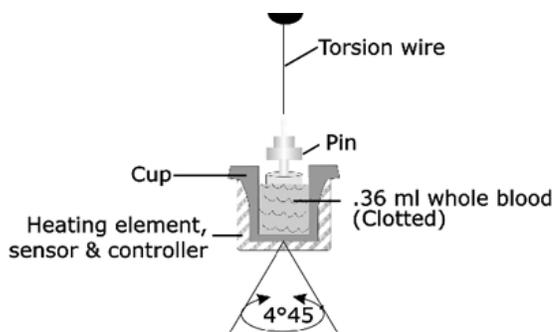
ii) Thromboélastographe (TEG[®])

Le thromboélastographe (TEG[®], avec la technologie PlateletMapping[™] par la compagnie *Haemoscope^{MD}*) examine les propriétés d'un caillot plaquettaire de sa formation à sa lyse.²⁰⁵ Le système, composé d'un filament suspendu à l'intérieur d'un gobelet oscillant, analyse les forces de torsion induites sur le filament par la rotation du gobelet (**Figure 22**). Ces forces dépendent des propriétés physiques du caillot formé entre la surface du gobelet et le filament suspendu suite à l'ajout d'un agoniste. Durant la phase de formation du thrombus, les forces augmentent jusqu'à un maximum, puis diminuent durant

la phase de lyse. Le profil hémostatique est alors analysé et l'effet des médicaments antiplaquettaire peut en être déduit.

L'avantage principal de cette technique est l'obtention d'un profil hémostatique complet, de la formation à la destruction du caillot dans un échantillon de sang entier.²⁰⁵ Par ailleurs, certains investigateurs ont rapporté que les résultats obtenus par cette méthode corrélaient avec ceux obtenus par agrégométrie optique.^{206, 207} Toutefois, dans notre expérience, le test ne reproduit pas fidèlement l'agrégation plaquettaire mesurée par agrégométrie optique.²⁰⁸ De surcroît, cette méthode demeure peu répandue et sa capacité à prédire les événements cliniques reste à déterminer.^{209, 210}

Figure 22 : Schéma du devis de l'appareil TEG[®]



Reproduction autorisée :

TEG[®] Torsion Wire, Cup & Pin diagram.

Copyright © Haemoscope Corporation

TEG[®] and Thrombelastograph[®] are registered trademarks of Haemoscope Corporation in Canada

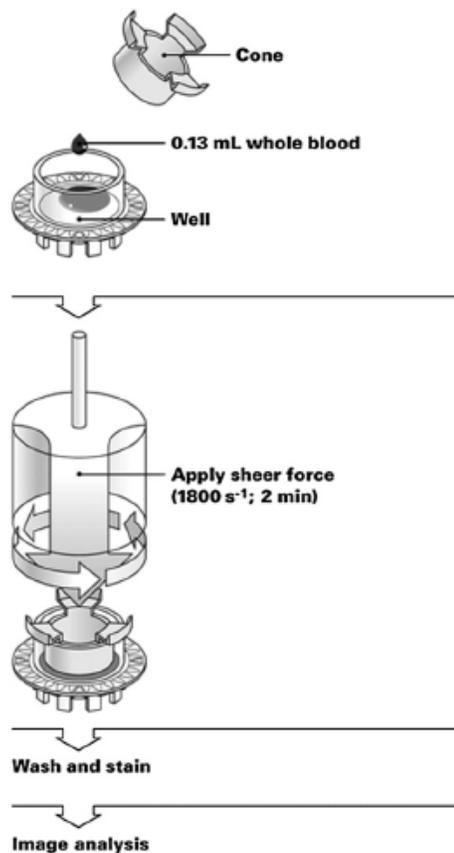
B) Les tests ciblant l'adhésion plaquettaire

Les tests qui évaluent l'adhésion plaquettaire tentent de reproduire la rhéologie sanguine ainsi que l'interaction entre les plaquettes et la matrice sous-endothéliale d'un vaisseau lésé. Ces tests ne peuvent donc pas être effectués dans un contexte statique et requièrent une induction de stress de cisaillement pour induire la liaison des récepteurs membranaires des plaquettes mobiles dans le sang à des molécules fixées sur la surface du test. Seul l'IMPACT[®] Cone and Plate(let) Analyzer est couramment employé pour étudier l'adhésion plaquettaire.

i) Cone and Plate(let) Analyzer (IMPACT[®])

Le *Cone and Plate(let) Analyzer* (IMPACT[®] par la compagnie *DiaMed^{MD}*) est un appareil automatisé qui étudie l'adhésion plaquettaire à une matrice extracellulaire sous des forces de cisaillement variables.²⁰³⁻²⁰⁵ Le système est composé d'un cône mobile et d'un plat stationnaire, dans lequel le sang additionné d'un agoniste subit des forces de cisaillements d'environ 1800 s^{-1} induites par la rotation du cône (**Figure 23**). L'adhésion et l'agrégation plaquettaires sur la surface sont captées par un analyseur d'images qui les quantifie. Son utilisation pour évaluer l'effet des médicaments antiplaquettaires requiert une activation plaquettaire préalable à l'aide d'agonistes plaquettaires présélectionnés.^{211, 212}

Figure 23 : Schéma du devis du Cone and Plate(let) Analyzer



Reproduction autorisée : Shenkman B, Matetzky S, Fefer P, Hod H, Einav Y, Lubetsky A, Varon D, Savion N. Variable responsiveness to clopidogrel and aspirin among patients with acute coronary syndrome as assessed by platelet function tests. *Thromb Res.* 2008; 122: 336-345. Copyright © 2008 Elsevier Ltd.

Ce système offre plusieurs avantages, dont celui de requérir une quantité minime de sang, d'être rapide et de reproduire des conditions physiologiques.^{203, 205} Par ailleurs, certains investigateurs rapportent une corrélation entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par agrégométrie optique.^{211, 212} Toutefois, peu d'études démontrent son utilité dans l'évaluation de l'inhibition de la fonction plaquettaire par les médicaments antiplaquettaires.²¹³

C) Les tests ciblant l'activation plaquettaire

Les tests qui évaluent l'activation plaquettaire étudient la stimulation des récepteurs membranaires, la dégranulation, la formation de dérivés phospholipidiques tels la TxA_2 , l'expression de molécules à la surface indiquant un état d'activation plaquettaire, ainsi que le changement conformationnel des intégrines $\alpha_{2b}\beta_3$. Ces tests peuvent être faits en sang complet ou sur des isolats de plaquettes. Les tests suivants sont utilisés pour étudier l'activation plaquettaire : l'agrégométrie optique ou par impédance électrique, la chute du décompte plaquettaire (Plateletworks[®]), la relâche du contenu des granules plaquettaires, les concentrations sanguines ou urinaires de métabolites de la TxA_2 , la mesure de marqueurs d'activation (tels l'expression de P-sélectines, l'état de phosphorylation de VASP, le changement conformationnel des intégrines $\alpha_{2b}\beta_3$) par la cytométrie en flux, et le VerifyNow[®].

i) Agrégation par transmission lumineuse

L'agrégométrie optique est le test-étalon (*gold standard*) en terme de mesure de fonction plaquettaire.^{202, 205} Elle est de loin la méthode la plus utilisée.^{203, 204} Cette technique permet la mesure de l'agrégation plaquettaire par analyse de la transmission de lumière à travers un échantillon de plasma riche en plaquettes obtenu par centrifugation d'un échantillon de sang entier. Le plasma riche en plaquettes est un milieu turbide où la lumière passe peu. L'ajout d'un agoniste induit l'agrégation plaquettaire dans l'échantillon, ce qui provoque la formation d'amas plaquettaires et diminue la turbidité de l'échantillon,

laissant passer davantage de luminosité. Ainsi, le niveau d'agrégation plaquettaire de l'échantillon est déduit de l'intensité de lumière captée suite à l'ajout d'un agoniste au plasma riche en plaquettes (**Figure 24**). L'agrégation plaquettaire est exprimée sous forme de pourcentage, le maximum étant fixé par la luminosité captée en plasma pauvre en plaquettes.^{202-205, 214}

Figure 24 : Schéma du devis de l'agrégométrie optique



Reproduction autorisée : Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 2007; 109: 5087-5095. Copyright © 2007 American Society of Hematology.

Une multitude d'agonistes peuvent être utilisés pour stimuler l'agrégation plaquettaire. Les plus courants sont l'ADP, l'épinéphrine, le collagène et l'acide arachidonique.²⁰³ Tous ces agents agissent de façon synergique dans l'induction de l'agrégation plaquettaire. L'agoniste classique pour l'étude de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par l'AAS est l'acide arachidonique, tandis que l'ADP est employée pour l'étude de l'effet du clopidogrel, puisque ces agonistes ciblent la voie d'activation plaquettaire inhibée par chacun de ces médicaments.^{202, 203, 215}

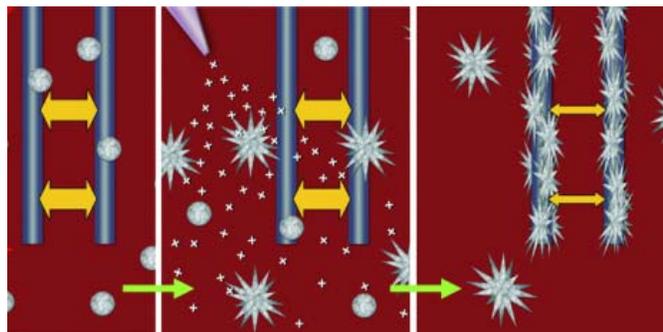
L'agrégométrie optique offre plusieurs avantages, dont celui d'être bien établie dans la littérature scientifique et d'être reproductible.^{204, 205, 214} Son utilisation depuis près de 50 ans a démontré une bonne corrélation entre les résultats obtenus et l'efficacité clinique des agents antiplaquettaires.²¹⁴ Toutefois, certains inconvénients rendent l'utilisation de l'agrégométrie optique limitée aux laboratoires spécialisés. La méthode requiert l'expertise

d'un technicien expérimenté pour assurer une reproductibilité.^{202, 205} Le test prend du temps et oblige à la préparation d'échantillons sanguins par centrifugation.²⁰² La préparation de plasma riche en plaquettes exclut certaines populations de plaquettes (particulièrement celles qui sont grosses, jeunes ou réactives)^{46, 204}, ainsi que les autres éléments sanguins pouvant interagir avec les plaquettes *in vivo*.²⁰⁵ Par ailleurs, les résultats sont influencés par le décompte plaquettaire et la concentration de lipides sanguins de l'échantillon.²⁰³

ii) Agrégation par impédance électrique

L'agrégation plaquettaire peut également être mesurée en sang complet. La méthode d'impédance étudie le passage électrique entre deux électrodes immergées dans un échantillon de sang. Suite à l'ajout d'un agoniste, des agrégats plaquettaires se déposent sur les électrodes et interfèrent avec le passage du courant électrique (**Figure 25**).^{203, 205, 214} Cette impédance permet de quantifier l'agrégation plaquettaire dans l'échantillon, sous plusieurs formes : l'amplitude maximale (exprimée en ohms [Ω]) et le taux maximal d'impédance (exprimé en ohms par secondes [Ω/s]), 5 minutes suite à l'introduction de l'agoniste.

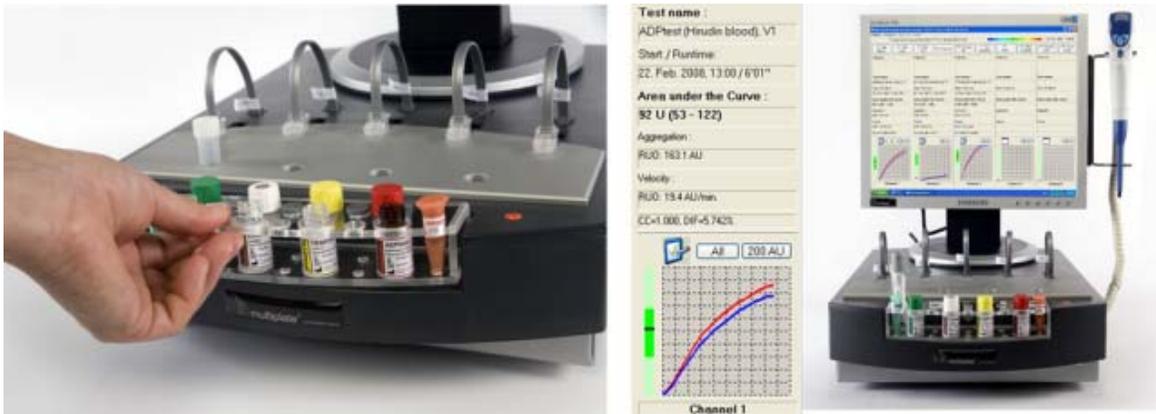
Figure 25 : Schéma du devis de l'agrégométrie par impédance électrique



Reproduction autorisée : Detection principe. Dynabyte Informationssysteme GmbH.
<http://www.multiplate.net/en/detection.php> [Accédé le 11 novembre 2009]. Copyright © 2008 Multiplate®.

Une version standardisée de cette méthodologie a été commercialisée sous le nom Multiple Platelet Function Analyzer (Multiplate[®] par la compagnie *Dynabyte Informationssysteme GmbH*), qui offre des cuvettes jetables et un appareil préprogrammé où l'ajout des agonistes est fait sous conditions normalisées (**Figure 26**).

Figure 26 : Illustration de l'appareil Multiplate[®]



Reproduction autorisée : Instrument. Dynabyte Informationssysteme GmbH.
<http://www.multiplate.net/en/leftinstrument.php> [Accédé le 11 novembre 2009].
 Copyright © 2008 Multiplate[®].

L'avantage majeur de cette technique est l'utilisation de sang entier, ce qui élimine l'étape de centrifugation et permet l'étude de plaquettes dans leur milieu physiologique.^{203, 205, 214} Toutefois, l'agrégométrie par impédance corrèle faiblement avec l'agrégométrie optique et avec l'efficacité clinique des agents antiplaquettaires.^{98, 205, 216} Plusieurs facteurs peuvent faire varier les résultats, dont le délai entre le prélèvement de l'échantillon et le test, le décompte plaquettaire, l'hématocrite et la température.²¹⁵

iii) Chute du décompte plaquettaire (Plateletworks[®])

La chute du décompte plaquettaire est une méthode s'inspirant du décompte plaquettaire traditionnel par impédance électrique. Les plaquettes, présentes dans un échantillon de sang frais auquel on ajoute un agoniste sont comptées avant et après l'ajout

de l'agoniste. Au fur et à mesure que les plaquettes s'agrègent pour former des amas, leur grosseur dépasse la limite supérieure de ce qui est compté comme plaquette individuelle par l'appareil.^{205, 214, 215} Le niveau d'agrégation plaquettaire est ensuite déduit, sous forme de ratio entre le nombre de plaquettes dans l'échantillon avant et après l'ajout de l'agoniste selon la formule suivante :^{205, 214, 215, 217}

$$\text{Agrégation maximale (\%)} = \frac{(\text{Décompte plaquettaire basal} - \text{Décompte plaquettaire sous agoniste}) \times 100}{\text{Décompte plaquettaire basal}}$$

Une version standardisée de ce test de fonction plaquettaire est offert sous le nom Plateletworks[®] par *Helena Laboratories*^{MD}.²¹⁸ Le manufacturier fournit des tubes standardisés contenant de l'acide arachidonique, de l'ADP ou du collagène comme agonistes pour l'évaluation de la fonction plaquettaire.²¹⁸ Les tubes contenant l'acide arachidonique sont promus pour l'évaluation de l'effet antiplaquettaire de l'AAS, tandis que ceux contenant de l'ADP visent l'évaluation de l'effet antiplaquettaire du clopidogrel.

L'avantage principal de cette méthode est sa facilité, sa disponibilité, et l'absence de manipulation de l'échantillon sanguin puisque le test est fait sur sang entier.^{204, 205, 214} Cependant, la concordance entre ce test et l'agrégométrie optique laisse à désirer.²¹⁹ De plus, la méthode demeure peu répandue dans la littérature et sa capacité à prédire les événements cliniques reste à déterminer.^{202, 204, 215}

iv) Libération du contenu des granules plaquettaires

La dégranulation plaquettaire fait partie et contribue au processus d'activation plaquettaire. Puisque les granules servent d'endroit de stockage pour diverses molécules pro-thrombotiques, la mesure dans le sang des niveaux de certaines de ces molécules suite à l'agrégation permet d'estimer le niveau d'activation plaquettaire. Les tests les plus fréquemment utilisés sont la mesure des dérivés des nucléotides de l'adénine par bioluminescence et la mesure de sérotonine par marquage radioactif.²²⁰ Ces tests sont

surtout utilisés pour le diagnostic de défauts de sécrétion plaquettaire et leur utilisation pour évaluer l'effet antiplaquettaire des médicaments n'a pas été rapportée.

v) Concentrations sanguines ou urinaires de métabolites de la TxA₂

La mesure au niveau sanguin ou urinaire des concentrations de métabolites stables de la TxA₂ peut se faire par marquage radioactif ou par immuno-essai enzymatique; cette dernière technique est la plus répandue.^{202, 203, 221-223} Il a été suggéré que la mesure sanguine (sérum ou plasma) de TxB₂, le métabolite stable au niveau sanguin de la TxA₂, soit le test le plus spécifique vis-à-vis de l'action de l'AAS sur les plaquettes.^{74, 221} Par contre, la mesure de 11-déhydro-TxB₂ (11-dTxB₂) dans l'urine, ajustée pour la concentration de créatinine urinaire comme indice de fonction rénale, est un test non-invasif ayant fait l'objet d'études dans des populations diverses de patients souffrant de maladie coronarienne.^{222, 223} Bien que ces études ne suggèrent pas de niveaux limites au-dessus desquels l'AAS peut être considérée inefficace, les auteurs rapportent que des niveaux croissants de 11-dTxB₂ dans l'urine sont associés à un risque accru d'événements ischémiques.^{222, 223}

La mesure des concentrations sanguines ou urinaires de métabolites de la TxA₂ ont l'avantage d'être sensibles et spécifiques à la voie d'activation plaquettaire inhibée par l'AAS.²⁰² Cependant, un consensus sur les valeurs-cibles et valeurs-seuils pour les personnes prenant de l'AAS n'est toujours pas atteint.

vi) Marqueurs de l'activation plaquettaire par cytométrie en flux

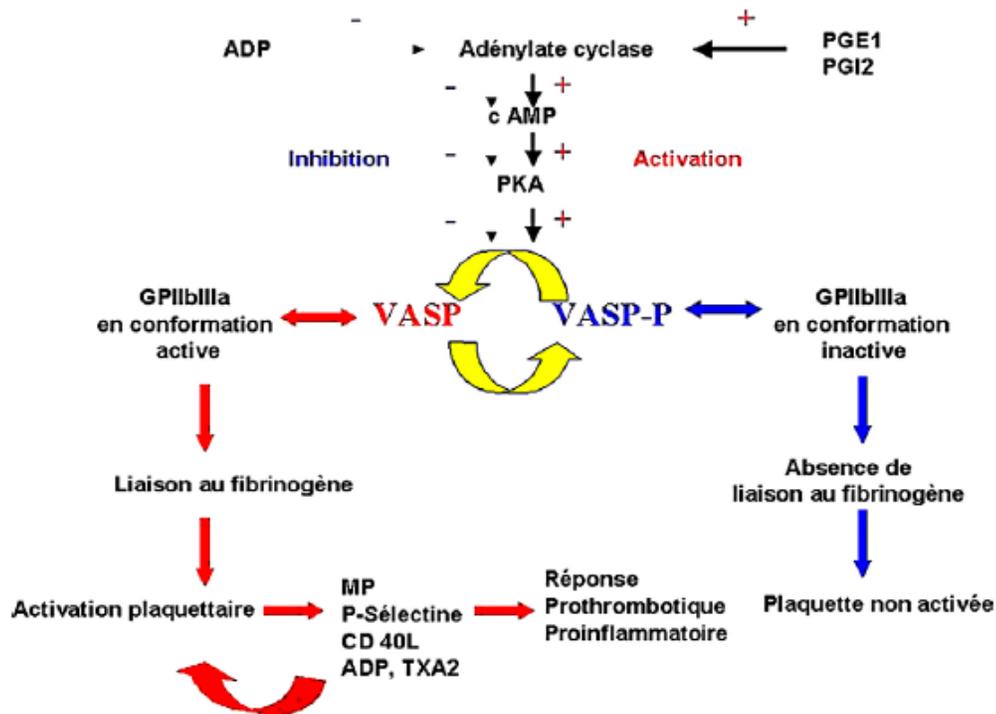
La cytométrie en flux est une technique puissante pour étudier l'état des plaquettes.^{224, 225} Elle consiste en un marquage fluoroscopique des plaquettes à l'aide d'anticorps monoclonaux.^{224, 225} Le marquage à l'aide d'anticorps fluorescents permet de quantifier l'activation plaquettaire suite à l'ajout d'un agoniste à l'aide d'un cytomètre en flux dans lequel l'échantillon sanguin marqué passe à un taux de 1000 à 100 000 cellules

par minute.²⁰³ Ces anticorps sont dirigés contre des épitopes spécifiques de l'activation plaquettaire, particulièrement les P-sélectines et PAC-1.^{224, 225} Les P-sélectines sont des glycoprotéines tapissant la surface des granules α . Au repos, les plaquettes n'expriment pas de P-sélectines à leurs surfaces. Toutefois, suite à la dégranulation des plaquettes durant la phase d'activation, les granules α fusionnent avec la membrane cellulaire des plaquettes, exposant ainsi leurs P-sélectines.^{204, 205} D'autre part, l'anticorps dirigé contre PAC-1 signale le changement conformationnel des intégrines $\alpha_{2b}\beta_3$, indiquant une activation plaquettaire menant à la liaison du fibrinogène par les intégrines $\alpha_{2b}\beta_3$ activées et la formation d'un thrombus organisé.²⁰⁵

L'analyse de l'état de phosphorylation de VASP mesure la signalisation activation-dépendante du récepteur P2Y₁₂ plaquettaire (**Figure 27**).²²⁶ Le test, tel que décrit pour la première fois par Schwarz *et al.*, repose sur la différence entre le taux de phosphorylation maximale de VASP obtenue en présence de la molécule vasodilatatrice PGE₁ et le taux de phosphorylation de cette protéine en présence d'ADP.²²⁷ L'activation du récepteur P2Y₁₂ par l'ADP se traduit en une diminution de la phosphorylation de VASP. Ainsi, le niveau de phosphorylation de VASP permet d'estimer de façon spécifique le niveau d'activation du récepteur P2Y₁₂ sur la surface plaquettaire par l'ADP. Ce test est commercialement disponible sous le nom BioCytex[®]. Le résultat du test est exprimé sous forme d'index de réactivité plaquettaire et corrèle bien avec les résultats obtenus par agrégométrie optique.²²⁸

La cytométrie en flux est une méthode sophistiquée permettant une analyse approfondie des marqueurs d'activation plaquettaire.^{203, 205, 215} Elle a l'avantage de requérir un petit échantillon sanguin et d'être effectuée en sang entier.^{203, 205} Toutefois, elle est très coûteuse, et pose plusieurs contraintes de temps et de manipulation des échantillons par un technicien expérimenté.^{204, 215} De plus, l'interprétation des résultats demeure subjective et difficilement comparable d'une étude à l'autre, ce qui limite son utilisation dans l'étude de l'inhibition plaquettaire par les médicaments antiplaquettaires, avec l'exception de la phosphorylation de VASP pour le clopidogrel.^{204, 229-231}

Figure 27 : Pertinence du VASP comme cible pour évaluer l'activité plaquettaire en réponse à l'ADP

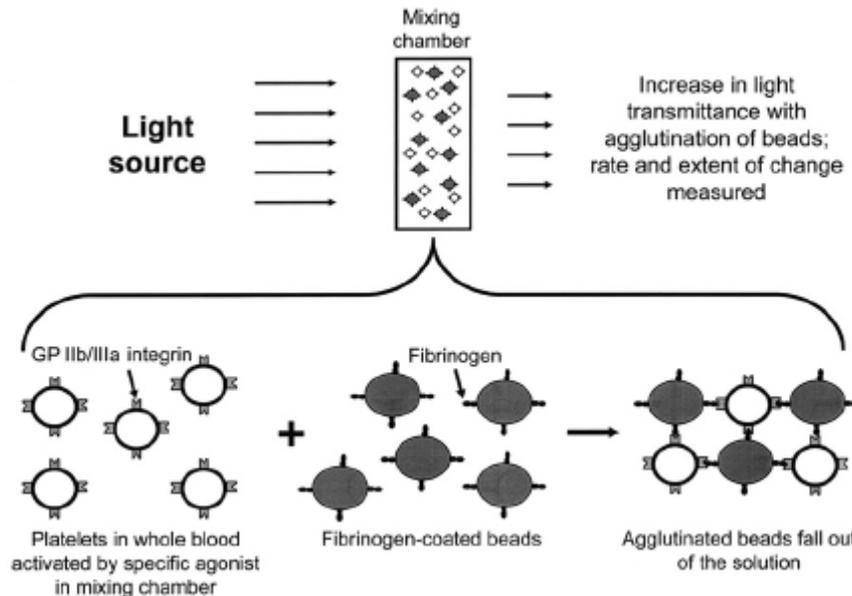


Reproduction autorisée : Morel O, Ohlmann P, Jesel L, Morel N, Ridard C, Faure A, Grunebaum L, Toti F, Bareiss P. Variable extent of platelet responsiveness to clopidogrel inhibition: "clopidogrel resistance"? *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2005; 54: 194-200. Copyright © 2005 Elsevier-Masson Inc.

vii) VerifyNow[®]

Le VerifyNow[®] par la compagnie *Accumetrics^{MD}* est un test de fonction plaquettaire se voulant au chevet du patient ; il est offert en cartouches tout-inclus. Le test mesure l'agrégation plaquettaire par capture d'intensité lumineuse, comme l'agrégométrie optique, mais sur un échantillon de sang entier (**Figure 28**). Les cartouches contiennent une préparation lyophilisée de perles enrobées de fibrinogène humain, un agoniste plaquettaire (l'acide arachidonique pour l'AAS, et le PGE₁ et l'ADP pour le clopidogrel), un tampon et des agents de conservation.

Figure 28 : Schéma du devis de VerifyNow[®]



Reproduction autorisée : Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol.* 2006; 98: S4-S10. Copyright © 2006 Elsevier Inc.

Les résultats sont convertis par l'appareil en ARU (*aspirin response units*) pour la cartouche contenant de l'acide arachidonique, et en PRU (*P2Y₁₂ response units*) pour la cartouche contenant le PGE₁ et l'ADP, via un algorithme breveté.²³²

Parmi les avantages attribués à cette méthode, notons sa facilité, sa rapidité d'utilisation grâce à des cartouches pré-conditionnées, sa reproductibilité et le petit volume sanguin requis. Selon le fabricant, ce test est influencé par le décompte plaquettaire, l'hématocrite, les concentrations de triglycérides sanguins et de fibrinogène.²³³

D) Les tests ciblant l'agrégation plaquettaire

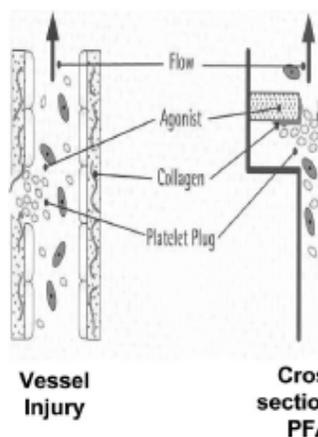
Les tests qui évaluent l'agrégation plaquettaire requièrent la formation de réseaux de fibrine entre les plaquettes pour former des agrégats stables. Le PFA-100[®] est utilisé pour étudier la formation d'un caillot stable.

i) Platelet Function Analyzer (PFA-100[®])

Le *Platelet Function Analyzer* (PFA-100[®] de la compagnie *Dade-Behring^{MD}*) est un test de fonction plaquettaire se voulant au chevet du patient. Ce test mime la formation d'un caillot plaquettaire sous des forces de cisaillement élevées (environ 5000 s⁻¹), suite à un dommage subi par un petit vaisseau (**Figure 29**).²³⁴ Le système mesure le temps nécessaire à l'occlusion d'une ouverture microscopique dans une membrane tapissée de collagène et d'épinéphrine ou d'ADP.²³² Le temps nécessaire à l'occlusion de la cartouche collagène-épinéphrine se trouve prolongé lors d'un défaut d'agrégation plaquettaire mineur, induit par exemple par la prise d'AAS.²³⁵ La cartouche collagène-ADP ne semble pas utile dans l'évaluation de l'effet antiplaquettaire du clopidogrel.²³⁵

Ce test de fonction plaquettaire se démarque par sa facilité, sa rapidité d'utilisation grâce à des cartouches pré-conditionnées, sa reproductibilité et par le petit volume sanguin requis.²⁰³ Toutefois, il est influencé par le décompte plaquettaire et l'hématocrite et ne peut être utilisé si ces derniers sont sous le seuil de 150 x 10⁹/mL et 25%, respectivement.^{202, 203, 205} De plus, plusieurs facteurs font varier les résultats, dont la concentration de vWF et de citrate sodé dans l'échantillon,^{202, 204, 215, 236, 237} le groupe sanguin²³⁸ et le rythme circadien.²³⁹

Figure 29 : Schéma du devis de PFA-100[®]



Reproduction autorisée : Agarwal S, Coakley M, Reddy K, Riddell A, Mallett S. Quantifying the effect of antiplatelet therapy: a comparison of the platelet function analyzer (PFA-100) and modified thromboelastography (mTEG) with light transmission platelet aggregometry. *Anesthesiology*. 2006; 105: 676-683. Copyright © 2006 American Society of Anesthesiologists, Inc.

E) La comparabilité entre les tests de fonction plaquettaire

La disponibilité et l'accessibilité des tests de fonction plaquettaire, particulièrement pour les tests rapides et standardisés, ont permis une utilisation répandue et à grande échelle de ces outils particuliers. Certains tests demeurent du ressort de laboratoires spécialisés, mais la facilité et la rapidité d'usage des tests dits au chevet du patient ont facilité leur introduction dans la pratique clinique, malgré une compréhension limitée de leur technologie, ce qui a mené parfois à une interprétation inadéquate de leurs résultats. La question sur la comparabilité ou l'interchangeabilité des tests de fonction plaquettaire s'est donc imposée et plusieurs investigateurs ont tenté d'y apporter réponse.

Dans un article publié en 1998, Nicholson et collaborateurs ont mené la comparaison de plusieurs tests de fonction plaquettaire avec le test étalon, l'agrégométrie optique.²¹⁴ Les auteurs ont stipulé que, en raison de nombreux défauts de l'agrégométrie optique dont le manque de standardisation et de reproductibilité, d'autres tests de fonction plaquettaires devraient être envisagés lors de l'évaluation de la fonction plaquettaire chez l'humain. Ils ont ainsi comparé à l'agrégométrie optique, les résultats obtenus à l'aide d'autres tests de fonction plaquettaire, dont certains s'attardaient plutôt à l'hémostase secondaire que primaire. Les tests de coagulation, tels le temps de coagulation et la rétraction du caillot, ne reproduisaient pas l'agrégation telle que mesurée par transmission lumineuse, ce qui pouvait s'expliquer facilement par le fait que ces tests ciblent l'hémostase secondaire qui n'est que partiellement affectée par l'activité plaquettaire.²¹⁴ Par contre, les tests de fonction plaquettaire tels l'agrégométrie par impédance électrique, le PFA-100[®], la chute du décompte plaquettaire et le VerifyNow[®] semblaient de bons candidats pour remplacer l'agrégométrie optique, malgré une grande variabilité inter- et intra-individuelle de la fonction plaquettaire observée.²¹⁴

De nombreuses études se sont penchées sur la capacité des tests de fonction plaquettaire à détecter les défauts dans une voie d'activation plaquettaire spécifique. Dans

le présent ouvrage, la comparabilité entre les tests pour mesurer l'inhibition de la COX-1 et du récepteur P2Y₁₂ plaquettaire sera présentée en détails dans les sous-sections suivantes.

i) Évaluation de l'inhibition de la COX-1

La comparaison entre le temps de saignement standardisé, le PFA-100[®] et la concentration urinaire de 11-dTxB₂ a été évaluée chez 191 sujets souffrant de maladie coronarienne.²⁴⁰ Dans cette étude, la corrélation entre les résultats des différents tests de fonction plaquettaire était au mieux faible, mais généralement inexistante. Par ailleurs, le manque de concordance entre les résultats des tests à identifier les sujets avec une activité plaquettaire résiduelle prononcée ont mené les auteurs à conclure que l'utilité de ces tests dans l'évaluation de l'inhibition de la COX-1 était douteuse.

Lors d'une étude auprès de 484 sujets souffrant de maladie coronarienne, Paniccia *et al.* ont comparé le PFA-100[®] et le VerifyNow[®] à l'agrégométrie optique.²⁴¹ Les auteurs rapportent des niveaux de concordance modérés entre les différents tests à identifier les sujets avec une activité plaquettaire résiduelle prononcée. Toutefois, ils recommandent de revoir les valeurs-seuils des tests de fonction plaquettaire, car avec les valeurs recommandées par les fabricants de PFA-100[®] et de VerifyNow[®], leur sensibilité était de 62% et de 39%, tandis que leur spécificité était de 80% et de 96%, respectivement.²⁴¹

Chez des sujets souffrant de maladie vasculaire cérébrale, Harrison et collaborateurs ont comparé le PFA-100[®] et le VerifyNow[®] à l'agrégométrie optique.²⁴² La disparité entre les tests était telle que les auteurs ont conclu que le niveau de concordance n'était pas supérieur à ce que l'on pourrait s'attendre par hasard.²⁴² Cette même équipe a entrepris de revoir tous les patients un an après leur participation initiale dans l'étude afin de refaire les tests de fonction plaquettaire pour mesurer leur reproductibilité dans le temps.²⁴³ La concordance intra-test était décevante, avec une concordance dans près de 60% des cas, et la concordance inter-tests était de nouveau inexistante.²⁴³ Les auteurs ont donc conclu sur une note pessimiste vis-à-vis de l'applicabilité clinique des tests de fonction plaquettaire.

McGlasson *et al.* ont étudié la relation entre les résultats des tests en sang entier, soient l'agrégométrie par impédance électrique, le PFA-100[®] et le VerifyNow[®], avec la mesure urinaire de 11-dTxB₂.²⁴⁴ La valeur prédictive positive pour identifier les sujets avec une activité plaquettaire résiduelle prononcée par rapport à l'agrégométrie par impédance électrique était de 81% pour le PFA-100[®], de 73% pour le VerifyNow[®] et de 74% pour la concentration de 11-dTxB₂. Par contre, la valeur prédictive négative était de 54% pour le PFA-100[®], de 100% pour le VerifyNow[®] et de 40% pour la concentration de 11-dTxB₂.²⁴⁴ Ces investigateurs concluaient que les tests de fonction plaquettaires manquaient de concordance, ce qui requerrait la sélection et l'utilisation assidue d'un même test de fonction plaquettaire pour obtenir des résultats cohérents.²⁴⁴

Dans une étude auprès de 21 volontaires sains et 40 patients souffrant de maladie coronarienne, le manque de concordance entre le VerifyNow[®] et l'agrégométrie optique a été confirmé.²⁴⁵ Ce qui était particulièrement étonnant dans cette étude, c'est que les auteurs ont sélectionné seulement les sujets chez qui la formation de TxB₂ dans le sérum était complètement abolie comme indicateur d'adhésion au traitement à l'AAS, mais l'agrégométrie optique a tout de même identifié un nombre important de sujets avec une activité plaquettaire résiduelle prononcée. Ainsi, le lien entre l'inhibition pharmacologique estimée par la formation de TxB₂ et la capacité fonctionnelle des plaquettes à former des caillots ne semble pas direct. Le même groupe de recherche a comparé dans un devis similaire le Multiplate[®] à l'agrégométrie optique et a obtenu des résultats similaires.²⁴⁶

La chute du décompte plaquettaire est une méthode particulièrement attirante en raison de son extrême simplicité. Nous avons donc comparé cette méthode à l'agrégométrie optique auprès de 161 sujets souffrant de maladie coronarienne.²¹⁹ La corrélation entre les deux méthodes était inexistante; les méthodes n'identifiaient donc pas les mêmes sujets en tant que présentant une activité plaquettaire résiduelle prononcée. Par ailleurs, la chute du décompte plaquettaire surestimait l'agrégation plaquettaire par environ 15% lorsque comparée à la mesure par agrégométrie optique.²¹⁹ Ce manque de concordance ne permettait donc pas l'utilisation de la chute du décompte plaquettaire en

remplacement de l'agrégométrie optique pour l'évaluation de l'inhibition de la COX-1 plaquettaire.

Gurbel *et al.* ont publié une étude portant sur 125 sujets souffrant de maladie coronarienne.²⁴⁷ Ils ont rapporté une faible concordance entre l'agrégométrie optique, le VerifyNow[®], le TEG[®], le PFA-100[®] et la mesure urinaire de 11-dTxB₂.²⁴⁷

En parallèle, notre groupe a mené l'étude comparative la plus étoffée jusqu'à présent sur la comparabilité des tests de fonction plaquettaire à évaluer l'inhibition de la COX-1 plaquettaire.⁹⁸ Après de 201 sujets souffrant de maladie coronarienne, nous avons comparé les résultats des six tests de fonction plaquettaire les plus fréquemment utilisés, soient l'agrégométrie optique à l'aide d'acide arachidonique et d'ADP, l'agrégométrie par impédance électrique, le PFA-100[®], le VerifyNow[®] et la mesure urinaire de 11-dTxB₂.⁹⁸ Nous avons rapporté une corrélation modeste entre les différents tests de fonction plaquettaire et une absence de concordance entre les tests pour identifier les sujets ayant une activité plaquettaire résiduelle prononcée.⁹⁸ Vis-à-vis de l'agrégométrie optique stimulée à l'acide arachidonique, l'utilisation de l'ADP comme agoniste avec la même méthodologie donnait des valeurs prédictives positives variant entre 5 et 21% et des valeurs prédictives négatives variant entre 97 et 99%, dépendant de la concentration d'agoniste utilisée. L'agrégométrie par impédance électrique présentait une valeur prédictive positive de 14% et une valeur prédictive négative de 98%. Le PFA-100[®] était également peu prédictif (valeur prédictive positive de 5%, valeur prédictive négative de 98%). Le VerifyNow[®] se classait légèrement mieux, avec une valeur prédictive positive à 23% et une valeur prédictive négative à 97%, tandis que la mesure urinaire de 11-dTxB₂ avait une valeur prédictive positive de 2% et une valeur prédictive négative de 95%. Nous avons donc conclu que les tests de fonction plaquettaire ne sont pas interchangeables et que leur utilité clinique devra être démontrée dans des essais prospectifs.

ii) Évaluation de l'inhibition du récepteur P2Y₁₂

La nécessité d'études comparatives entre les différents tests de fonction plaquettaire évaluant l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ s'est concrétisée suite à une recommandation de l'American College of Cardiology (ACC), de l'American Heart Association (AHA) et de la Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI) qui justifiait l'évaluation de la fonction plaquettaire chez certains sujets particulièrement à risque de mourir d'un événement ischémique aigu.⁵ La recommandation de tester l'inhibition plaquettaire chez ces sujets s'accompagnait aussi d'une recommandation d'augmenter la dose de clopidogrel chez ceux qui présentaient une inhibition insuffisante, arbitrairement fixée à 50%.⁵ Toutefois, aucun consensus sur le test de fonction plaquettaire à privilégier dans ce contexte n'a été établi et la question sur l'interchangeabilité des tests était donc posée.

Une étude auprès de 50 patients souffrant de maladie coronarienne a permis de comparer l'agrégométrie optique, le TEG[®] et le Plateletworks[®].²⁰⁷ Les auteurs affirmaient qu'une corrélation significative a été décelée entre l'inhibition mesurée par ces tests versus l'agrégométrie optique, mais la force de cette association n'était pas rapportée. Ils ont également rapporté un taux élevé de concordance entre les différents tests.²⁰⁷

Nous avons également testé l'utilité de la chute du décompte plaquettaire en comparaison avec l'agrégométrie optique auprès de 91 sujets souffrant de maladie coronarienne prenant du clopidogrel.²¹⁹ La corrélation entre les deux méthodes était faible; les méthodes n'identifiaient pas les mêmes sujets en tant que présentant une activité plaquettaire résiduelle prononcée. Par ailleurs, la chute du décompte plaquettaire surestimait l'agrégation plaquettaire par environ 18% lorsque comparée à la mesure par agrégométrie optique.²¹⁹ Ce manque de concordance ne permettait donc pas l'utilisation de la chute du décompte plaquettaire en remplacement de l'agrégométrie optique pour l'évaluation de l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ plaquettaire.

Dans une étude comparant l'agrégométrie optique, le PFA-100[®] et la détermination en cytométrie en flux de l'état de phosphorylation de VASP ainsi que de l'expression de P-

sélectines chez 24 sujets sains, Geiger *et al.* ont conclu à une bonne corrélation entre la phosphorylation du VASP et l'agrégométrie optique, mais à une absence de corrélation avec le PFA-100[®] et l'expression de P-sélectines.²²⁸ Ils suggéraient d'utiliser l'évaluation par cytométrie en flux de la phosphorylation du VASP comme la méthode la plus sensible et spécifique à l'inhibition du récepteur P2Y₁₂.²²⁸ Toutefois, ce niveau élevé de corrélation entre la phosphorylation du VASP et l'agrégométrie optique n'a pas été atteint dans d'autres études comparatives.^{229, 248}

Agarwal *et al.* ont rapporté une étude portant sur 10 sujets comparant l'agrégométrie optique, le TEG[®] et le PFA-100[®].²⁴⁹ Tandis que le TEG[®] se comparait avantageusement à l'agrégométrie optique, les auteurs ont confirmé l'incapacité du PFA-100[®] à détecter l'inhibition du récepteur P2Y₁₂.²⁴⁹ Par ailleurs, cette conclusion a été étayée dans nombreuses autres études.²⁵⁰⁻²⁵²

En comparant le VerifyNow[®] à l'agrégométrie optique, van Werkum et collaborateurs ont rapporté une excellente corrélation entre les résultats des deux méthodologies, et une absence de biais systématique.²⁵³ Ces données étaient en accord avec les études de von Beckerath *et al.* et de Jakubowski *et al.* qui démontraient aussi une forte corrélation entre les deux méthodologies.^{254, 255} van Werkum et collaborateurs concluaient donc que le VerifyNow[®] et l'agrégométrie optique étaient à toutes fins pratiques interchangeables dans l'évaluation de l'inhibition du récepteur P2Y₁₂.

Dans une des études les plus imposantes sur la comparaison des tests de fonction plaquettaire, Paniccia *et al.* ont examiné chez 1267 sujets souffrant de maladie coronarienne la comparabilité entre l'agrégométrie optique, le PFA-100[®] et le VerifyNow[®]; la phosphorylation du VASP a aussi été étudiée auprès d'une sous-population de 115 sujets.²⁵¹ Ils concluaient que le VerifyNow[®] et la phosphorylation du VASP corrélaient bien avec les résultats obtenus par agrégométrie optique, mais confirmaient l'inefficacité du PFA-100[®].²⁵¹

La comparaison entre l'agrégométrie optique et le Multitplate[®] chez des sujets souffrant de maladie coronarienne a été rapportée par Sibbing *et al.*²⁵⁶ Dans cette étude, les résultats obtenus par ces méthodologies corrélaient modérément. Toutefois, les auteurs concluaient qu'en raison de menues différences entre les deux technologies, les méthodes sont comparables mais pas interchangeables.

Nous avons rapporté une étude comparant l'agrégométrie optique, l'agrégométrie par impédance électrique, le PFA-100[®] et le VerifyNow[®] auprès de 116 sujets souffrant de maladie coronarienne.²¹⁶ Nous estimions que la corrélation entre les différents tests de fonction plaquettaire est faible au mieux, mais généralement inexistante. Nous avons spécifiquement regardé la capacité des tests à identifier les individus qui pourraient bénéficier d'une augmentation de dose de clopidogrel en vertu des dernières recommandations américaines.⁵ Une inhibition insuffisante de l'agrégation plaquettaire a été détectée chez la majorité des sujets (55 à 66% des sujets par agrégométrie optique, 47 à 71% des sujets par impédance électrique et 61% des sujets par VerifyNow[®]).²¹⁶ La concordance entre les différents tests à identifier les sujets pouvant bénéficier d'une augmentation de dose en vertu des dernières recommandations américaines était au mieux faible, mais généralement inexistante. Par conséquent, nous avons conclu que les tests de fonction plaquettaires ne sont pas interchangeables, et leur utilisation pour guider la conduite clinique semble prématurée. La question de la pertinence clinique devra donc être résolue dans des études cliniques prospectives.

F) L'utilité clinique des tests de fonction plaquettaire

La discordance entre les résultats des différents tests de fonction plaquettaire suggère que chaque test quantifie une facette différente de la fonction plaquettaire. Tel que décrit ci-dessus, certains tests ciblent l'adhésion plaquettaire, tandis que d'autres mesurent plutôt l'activation ou l'agrégation plaquettaire, et d'autres encore évaluent la formation de caillot globalement. L'attrait de ces tests de fonction plaquettaire est la possibilité d'équilibrer le risque thrombotique et le risque de saignement chez les patients,

particulièrement chez ceux qui requièrent un traitement antiplaquettaire chronique. Pour ce faire, les résultats des tests de fonction plaquettaire doivent être en mesure de prédire les événements, tant thrombotiques qu'hémorragiques des individus.

i) Valeur prédictive hémorragique

L'évaluation du risque hémorragique est généralement menée en période péri-opératoire, où le risque de saignement augmente le risque chirurgical.²⁵⁷ Habituellement, ce sont des tests globaux de l'hémostase, tel le temps de saignement standardisé ou le TEG[®], qui sont employés, ainsi que des tests de coagulation tels le temps de coagulation activé (offert comme test rapide sous le nom de HemoSTATUS[®] par la compagnie *Medtronic Blood Management*^{MD}) ou la rétraction du caillot (offert comme test rapide sous le nom de Hemostasis Analysis System[®] par la compagnie *Hemodyne*^{MD}).²⁵⁸ Ces tests peuvent être utiles chez certains patients sélectionnés.²⁵⁸ Toutefois, leur valeur prédictive de saignements dans la population globale est faible, et ajoute peu au risque établi à l'aide de l'histoire médicale et des scores cliniques de prédiction de saignement.²⁵⁹

Un intérêt particulier envers le risque de saignement se pose en présence de médicaments inhibiteurs de la fonction plaquettaire. Cuisset *et al.* ont récemment démontré, chez 597 sujets ayant subi un syndrome coronarien aigu et requérant un traitement antiplaquettaire, que l'agrégométrie optique ainsi que l'évaluation de l'état de phosphorylation de VASP dans le quartile inférieur augmentait significativement le risque des patients de saigner à 30 jours après l'incident thrombotique aigu.²⁶⁰ Sibbing et collaborateurs ont conduit une étude similaire auprès de 2533 patients ayant subi une intervention coronarienne percutanée.²⁶¹ Bien qu'une inhibition profonde de l'agrégation plaquettaire en sang complet en réponse à l'ADP mesurée à l'aide de Multiplate[®] était associée à une augmentation du risque de saignement péri-procédural de 2,2 fois, la valeur prédictive positive de ce test était de 2,2%, avec une valeur prédictive négative de 99,2%.²⁶¹ Par ailleurs, il est important de noter que les saignements péri-procéduraux sont influencés par de nombreux facteurs, dont l'administration d'autres médicaments antithrombotiques

tels les inhibiteurs des récepteurs GPIIb/IIIa et les médicaments anticoagulants. Par conséquent, des études cliniques prospectives sont requises pour conclure à l'utilité clinique réelle de ces tests de fonction plaquettaire en plus de l'évaluation clinique usuelle à prédire les événements hémorragiques à long terme.

ii) Valeur prédictive thrombotique

De nombreuses études ont tenté d'évaluer l'association entre les résultats des tests de fonction plaquettaire et le risque de subir un événement thrombotique. Dans la majorité des cas, ces études portaient sur des sujets prenant des médicaments antiplaquettaires.²⁰²

a) L'évaluation de l'inhibition de la COX-1

La mesure urinaire de 11-dTxB₂ est le test de fonction plaquettaire ciblant la COX-1 plaquettaire pour lequel le risque d'événements ischémiques est le mieux documenté. Une sous-étude cas-témoin de l'étude *Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE)* a été menée auprès de 488 sujets ayant subi un événement ischémique et 488 témoins appariés pour l'âge et le sexe.²²³ Le risque de subir un infarctus du myocarde ou de décéder augmentait dans chaque quartile de 11-dTxB₂ urinaire.²²³ Une seconde sous-étude, cette fois de l'étude *Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance (CHARISMA)* portant sur 3261 sujets, a confirmé l'association entre les taux croissants de 11-dTxB₂ urinaire et le risque de subir des événements cardiovasculaires.²²²

L'agrégométrie optique a également été étudiée dans la littérature. Une faible inhibition de l'agrégation plaquettaire par l'AAS a été associée à une augmentation du risque de subir un événement ischémique majeur.^{86, 262}

L'agrégométrie en sang complet par impédance électrique a également démontré une augmentation du risque de complications ischémiques chez des sujets souffrant de maladie vasculaire périphérique.²⁶³

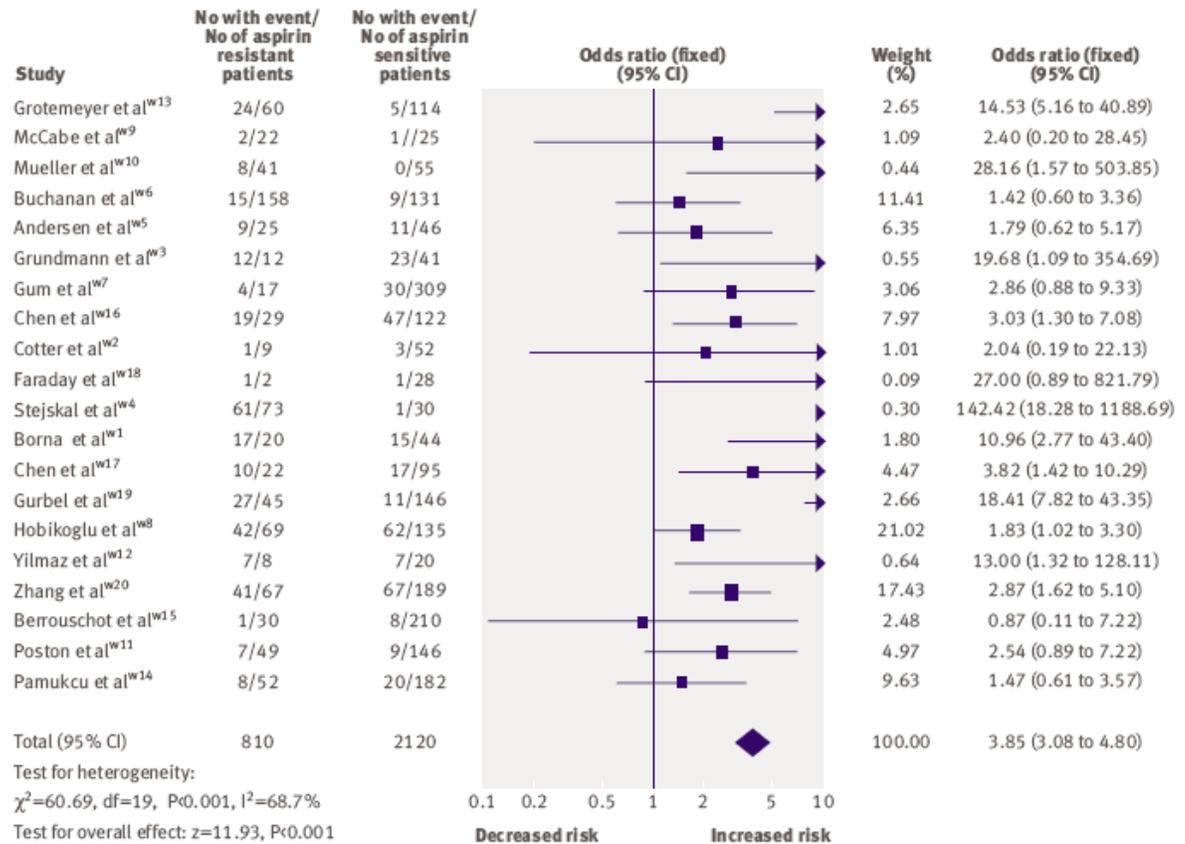
Le VerifyNow[®] a été employé par Chen *et al.* auprès de 151 sujets souffrant de maladie coronarienne requérant une angioplastie.²⁶⁴ Une inhibition plaquettaire insuffisante par l'AAS était associée à un risque augmenté de complications ischémiques péri-procédurales.²⁶⁴ Le même groupe a mesuré la fonction plaquettaire avec le VerifyNow[®] auprès de 468 patients souffrant de maladie coronaire stable, et a de nouveau démontré une association entre une inhibition plaquettaire insuffisante par l'AAS et la survenue d'événements ischémiques aigus.²⁶⁵

Un certain nombre d'études ont également évalué l'utilité du PFA-100[®]. Les résultats avec cette méthodologie sont discordants. En effet, certains investigateurs ont rapporté une association entre une faible inhibition de l'agrégation plaquettaire par le PFA-100[®] et la survenue d'événements ischémiques,²⁶⁶⁻²⁶⁸ tandis que d'autres n'ont pu démontrer une telle association.^{86, 269-271}

Deux méta-analyses se sont penchées sur l'association entre une inhibition insuffisante de la COX-1 par l'AAS et le risque d'événements ischémiques.^{9, 272} Dans les deux cas, le risque d'événements ischémiques majeurs était significativement augmenté chez des sujets démontrant une inhibition incomplète de l'agrégation plaquettaire par l'AAS (**Figure 30**).^{9, 272}

Ces méta-analyses souffraient d'une grande hétérogénéité des études incluses. Les études étaient généralement de petite taille échantionnelle (allant de 28 à 326 personnes), souvent de devis rétrospectif ou cas-témoin, incluaient des tests de fonction plaquettaire divers, se basaient sur des définitions différentes de ce qui constituait une réponse plaquettaire insuffisante à l'AAS, et le moment d'évaluation de la fonction plaquettaire par rapport à la dernière prise de médicament était variable.^{9, 272} Par ailleurs, Krasopoulos et collaborateurs concluaient leur article en stipulant qu'une étude clinique prospective d'envergure dont l'objectif sera de répertorier la survenue d'événements ischémiques suite à une évaluation de la fonction plaquettaire par une batterie de tests est nécessaire pour confirmer l'utilité clinique de l'évaluation de la fonction plaquettaire.²⁷²

Figure 30 : Risque de subir un événement ischémique en présence d'une inhibition insuffisante de la fonction plaquettaire par l'AAS



Reproduction autorisée : Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008; 336: 195-198. Copyright © 2008 BMJ Publishing Group Ltd.

b) L'évaluation de l'inhibition du récepteur P2Y₁₂

L'agrégométrie optique demeure le test le plus étudié dans la littérature. Une faible inhibition de l'agrégation plaquettaire par le clopidogrel a été associée à une augmentation du risque de subir un événement ischémique majeur.^{231, 273-276}

Le test le plus spécifique à l'évaluation de l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ est l'état de phosphorylation du VASP. Une faible inhibition par le clopidogrel a été associée à une augmentation du risque de subir un événement ischémique majeur, avec une valeur-seuil établie à 50%.^{229, 231, 277}

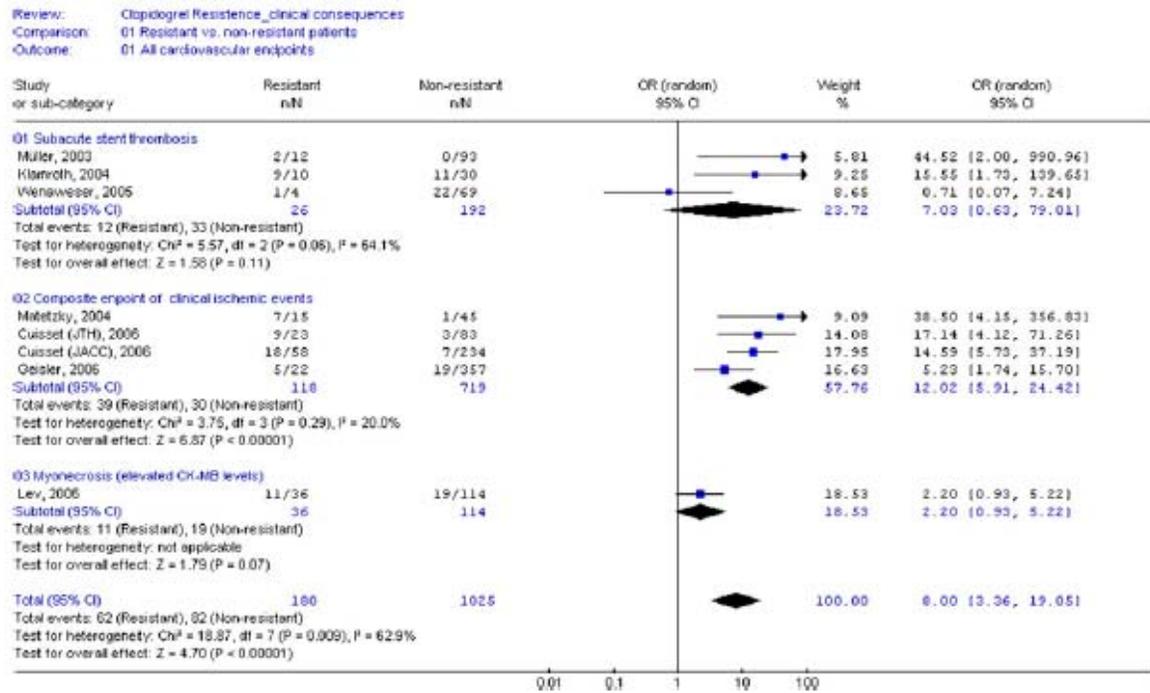
Le VerifyNow[®] a aussi été employé pour prédire les événements ischémiques.²⁷⁸ Après de 160 sujets souffrant de maladie coronarienne requérant une angioplastie, Patti *et al.* ont rapporté une augmentation du risque d'événements ischémiques de 6 fois chez les sujets se trouvant dans le quartile inférieur d'inhibition de l'agrégation plaquettaire.²⁷⁸ Avec une valeur-seuil de 240 PRU, la sensibilité du test serait de 81%, tandis que sa spécificité serait de 53%.²⁷⁸ Price *et al.* ont rapporté des résultats similaires avec 380 sujets requérant une angioplastie.²⁷⁹ La valeur-seuil dans cette étude était établie à 235 PRU.²⁷⁹

Une méta-analyse a été publiée où 3688 sujets ont été inclus dans 25 études rapportant l'association entre les résultats des tests de fonction plaquettaire et le risque d'événements ischémiques majeurs.¹⁰ Cette étude a démontré une augmentation du risque de subir un événement ischémique majeur de 8 fois en présence d'une inhibition inadéquate de la fonction plaquettaire par le clopidogrel (**Figure 31**).¹⁰

Cette méta-analyse souffrait d'une grande hétérogénéité des études incluses. Les études étaient généralement de petite taille échantionnelle (allant de 18 à 802 personnes), souvent de devis rétrospectif ou cas-témoin, incluaient des tests de fonction plaquettaire divers, se basaient sur des définitions différentes de ce qui constituait une réponse plaquettaire insuffisante au clopidogrel, et le moment d'évaluation de la fonction plaquettaire par rapport à la dernière prise de médicament était variable.¹⁰ Par conséquent, la valeur prédictive positive de subir un événement ischémique majeur en présence d'un test de fonction plaquettaire suggérant une inhibition insuffisante de l'agrégation plaquettaire par le clopidogrel était de 34%, tandis que la valeur prédictive négative se situait à 92%.¹⁰ Ainsi, les résultats de cette méta-analyse suggèrent que les tests de

fonction plaquettaire pourraient avoir une utilité clinique, mais ne permet pas de conclure quel test utiliser et comment en interpréter les résultats.

Figure 31 : Risque de subir un événement ischémique en présence d'une inhibition insuffisante de la fonction plaquettaire par le clopidogrel



Reproduction autorisée : Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2007; 154: 221-231. Copyright © 2007 Mosby, Inc.

L'étude POPular (*Do Platelet function assays predict clinical Outcomes in clopidogrel pretreated patients undergoing elective PCI*) avait comme objectif d'identifier le test de fonction plaquettaire qui prédisait le mieux les événements cliniques chez des sujets souffrant de maladie coronarienne requérant une angioplastie élective.²⁸⁰ Dans cette étude prospective, cinq tests de fonction plaquettaire étaient employés chez 1069 sujets traités à l'aide de clopidogrel : l'agrégométrie optique stimulée par 5 ou 20 μM d'ADP, le VerifyNow[®], le Plateletworks[®], le PFA-100[®] et l'IMPACT[®]. L'issue primaire d'efficacité

comprenait la survenue de décès, d'infarctus du myocarde, de thrombose de tuteur intracoronarien ou d'accident vasculaire cérébral à un an, tandis que l'issue primaire d'innocuité était un composé de saignements mineurs et majeurs à un an. L'agrégométrie optique, le VerifyNow[®] et le Plateletworks[®] semblaient prédictifs d'événements ischémiques (augmentation du risque d'environ 2 fois chez des sujets avec une activité plaquettaire résiduelle prononcée vs. ceux avec une inhibition plaquettaire importante par le clopidogrel), tandis que le PFA-100[®] et IMPACT[®] n'apportaient pas d'information clinique utile.²⁸⁰ Toutefois, l'inclusion dans le modèle de facteurs de risque traditionnels et procéduraux d'événements ischémiques aigus prédisait la grande majorité des événements thrombotiques (60-72%), et l'ajout des tests de fonction plaquettaire n'améliorait le score de prédiction que de 1 à 5%. Par ailleurs, aucun des tests de fonction plaquettaire étudiés ne prédisait les événements hémorragiques à un an.²⁸⁰ Ainsi, bien que certains tests de fonction plaquettaire soient aptes à identifier des patients à plus haut risque d'événements ischémiques majeurs, leur contribution à l'évaluation clinique des patients semble mineure, ce qui limite leur pertinence clinique. Par conséquent, leur utilisation routinière chez les patients souffrant de maladie coronarienne stable ne peut être recommandée en clinique, mais l'emploi judicieux de ces tests peut être un atout important en recherche.

Chapitre 5 : Les prédicteurs connus des événements ischémiques récurrents

Il demeure incertain si la variabilité dans la réponse aux médicaments antiplaquettaires constitue un facteur de risque d'événements ischémiques récurrents, contrairement à un certain nombre d'autres facteurs qui se sont montrés prédicteurs d'événements dans la littérature. Dans l'esprit de stratifier les patients selon leur niveau de risque et potentiellement ajuster l'intensité du traitement prescrit, des scores prédictifs ont été développés; en parallèle, des études observationnelles pour détecter les variables qui pourraient potentiellement être modifiées ont identifié des paramètres supplémentaires.

A) Les scores de prédiction clinique

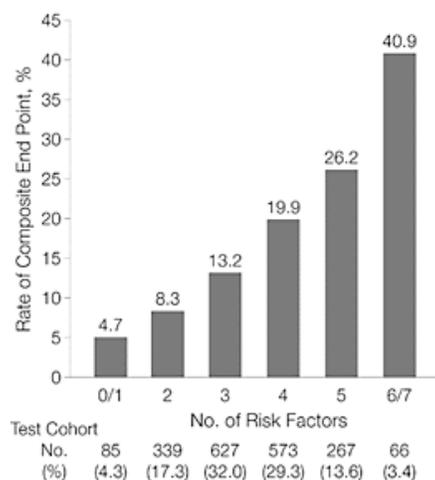
Parmi les premiers scores de stratification validés, le score TIMI (*Thrombolysis in Myocardial Infarction*) a été développé à partir d'études de grande envergure.²⁸¹ Ce score inclut 7 variables prédictrices d'événements cardiovasculaires subséquents, soient :

1. l'âge supérieur à 65 ans;
2. la présence d'au moins 3 facteurs de risque classiques de maladie coronarienne;
3. la présence d'une sténose coronarienne d'au moins 50%;
4. la présence d'un décalage du segment ST sur l'électrocardiogramme à l'admission;
5. la présence d'au moins 2 épisodes angineux dans les 24 heures précédentes;
6. l'utilisation d'AAS dans les 7 jours précédents;

7. L'augmentation de marqueurs enzymatiques cardiaques.²⁸¹

Chacun de ces facteurs est additif; l'impact sur le risque d'événements cardiovasculaires majeurs (mortalité de toute cause, infarctus du myocarde ou revascularisation urgente dans les 14 jours suivant l'incident initial) est proportionnel au nombre de facteurs de risque présents (**Figure 32**).²⁸¹ Ce score a été validé dans un registre national américain incluant 84 029 patients ayant subi un infarctus du myocarde.²⁸² Ce score semblait robuste et avoir une valeur prédictive positive d'environ 75%, tant chez des sujets ayant reçu un traitement fibrinolytique que ceux ayant subi une intervention coronarienne percutanée.²⁸²

Figure 32 : Valeur prédictive du score TIMI



Reproduction autorisée : Antman EM, Cohen M, Bernink PJ, McCabe CH, Horacek T, Papuchis G, Mautner B, Corbalan R, Radley D, Braunwald E. The TIMI risk score for unstable angina/non-ST elevation MI: A method for prognostication and therapeutic decision making. *JAMA*. 2000; 284: 835-842. Copyright © 2000 American Medical Association.

Le score GRACE (*Global Registry for Acute Coronary Events*) a été développé à partir d'un registre international incluant 94 hôpitaux situés dans 14 pays.²⁸³ Ce score prédit la mortalité à 6 mois suivant le congé de l'hôpital suite à un syndrome coronarien aigu.²⁸³ Ce score inclut 9 variables prédictives de mortalité à 6 mois, soient :

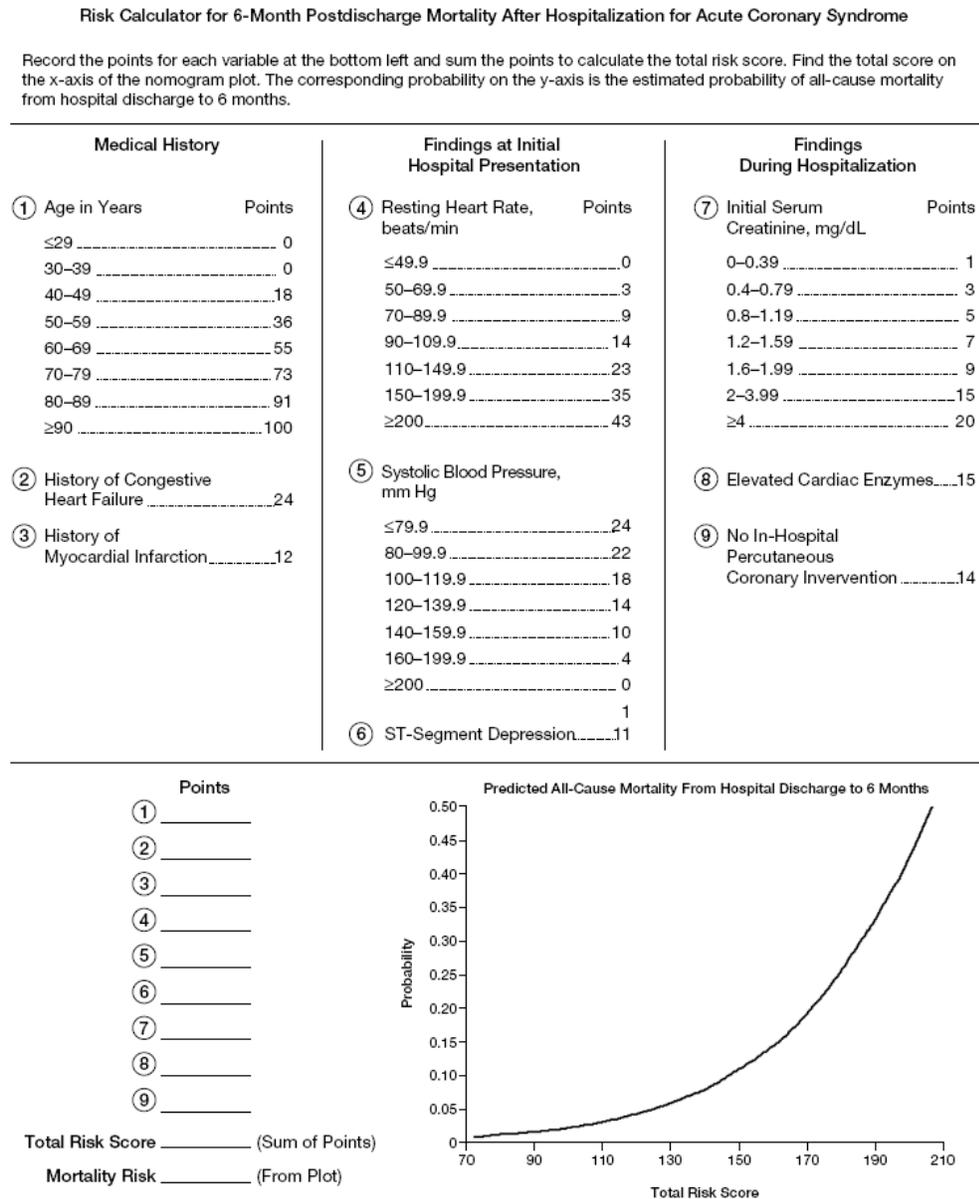
1. l'âge avancé;
2. un antécédent d'infarctus du myocarde;
3. un antécédent d'insuffisance cardiaque;

4. une tachycardie à l'admission;
5. une pression artérielle systolique basse à l'admission;
6. un niveau de créatinine sérique élevé à l'admission;
7. une augmentation de marqueurs enzymatiques cardiaques
8. la présence d'un décalage du segment ST sur l'électrocardiogramme à l'admission;
9. l'absence d'une intervention coronarienne percutanée effectuée à l'hôpital.

Ce score semble robuste et avoir une valeur prédictive positive d'environ 75-85% chez des sujets ayant subi un syndrome coronarien aigu avec ou sans décalage du segment ST.²⁸³ L'avantage de cette méthode est de traiter les variables prédictives comme variables continues et d'octroyer un score différent selon le niveau obtenu chez chaque patient individuel. Toutefois, l'inconvénient de cette méthode est la nécessité d'utiliser une grille de calcul pour mesurer le niveau de risque du patient (**Figure 33**).

Ce score peut également être adapté pour prédire les événements cardiovasculaires intra-hospitaliers suite à un syndrome coronarien aigu, avec une statistique C de 77%.²⁸⁴ Dans ce score modifié, les variables suivantes sont prises en considération : l'âge, la classe Killip, la survenue d'angine instable, la pression artérielle systolique, la présence d'un décalage du segment ST, l'absence d'un arrêt cardiaque à la présentation, les niveaux sériques de créatinine, l'absence de tachycardie, l'absence de transfert d'un autre hôpital, l'absence d'antécédent de maladie vasculaire périphérique, de diabète, d'insuffisance cardiaque et de fibrillation auriculaire, l'utilisation régulière de statines et l'absence d'utilisation de warfarine.²⁸⁴ Ce score GRACE modifié pour prédire la mortalité intra-hospitalière suite à un syndrome coronarien aigu a récemment été validé spécifiquement au Canada.²⁸⁵ Le score s'est montré apte à prédire les événements chez 84% des patients ayant subi un syndrome coronarien aigu.²⁸⁵

Figure 33 : Grille de calcul du risque de mortalité par le score GRACE



Reproduction autorisée : Eagle KA, Lim MJ, Dabbous OH, Pieper KS, Goldberg RJ, Van de Werf F, Goodman SG, Granger CB, Steg PG, Gore JM, Budaj A, Avezum A, Flather MD, Fox KA. A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month postdischarge death in an international registry. *JAMA*. 2004; 291: 2727-2733. Copyright © 2009 American Medical Association.

B) Les études observationnelles

Les études observationnelles ont permis d'identifier certaines variables associées à un risque accru de subir un événement thrombotique majeur qui n'avaient pas été identifiées auparavant.

Le score TIMI identifiait la prise d'AAS dans les 7 jours précédant l'événement ischémique comme un facteur de risque d'événements thrombotiques subséquents.²⁸¹ Ce résultat confirmait une étude antérieure sur 9461 patients ayant subi un syndrome coronarien aigu sans décalage du segment ST.²⁸⁶ En effet, la prise d'AAS augmentait le risque d'événements ischémiques aigus dans les 30 jours qui suivaient l'incident initial.²⁸⁶ Les auteurs ont suggéré que la prise d'AAS pouvait être un indicateur d'une maladie coronarienne plus sévère, ce qui pouvait expliquer le risque subséquent plus important.²⁸⁶ Toutefois, les investigateurs ne pouvaient exclure que ce soit dû à une inhibition insuffisante de l'agrégation plaquettaire par l'AAS ou à une réactivité plaquettaire paradoxalement élevée chez certains sujets.²⁸⁶ La question a été davantage explorée par Collet *et al.* qui ont étudié l'impact de la prise ou de l'arrêt de médicaments antiplaquettaires sur la survenue de syndrome coronariens aigus.²⁸⁷ Dans cette étude sur 1358 sujets admis pour syndrome coronarien aigu, les investigateurs ont identifié la cessation récente de médicaments antiplaquettaires comme facteur de risque d'événement ischémique aigu.²⁸⁷ En effet, la prise continue de médicaments antiplaquettaires était protectrice chez les sujets admis, tel que les études épidémiologiques pouvaient laisser entendre. Cependant, 5% des patients admis pour syndrome coronarien aigu avaient cessé la prise de leur médicament antiplaquettaire dans les 3 semaines précédant l'événement.²⁸⁷ La cessation de médicaments antiplaquettaires était le prédicteur le plus puissant d'événements ischémiques aigus, suivis de l'âge et de la fonction rénale.²⁸⁷

Une méta-analyse sur le risque associé au retrait de l'AAS chez des sujets souffrant de maladies cardiovasculaires a démontré que l'interruption de traitement antiplaquettaire précédait un événement thrombotique aigu dans 10.2% des cas.²⁸⁸ Selon cette analyse, le

temps écoulé entre la cessation d'AAS et la survenue d'événements thrombotiques aigus était de 8,5 jours pour un syndrome coronarien aigu, de 14,3 jours pour les accidents vasculaires cérébraux et de 25,8 jours pour un syndrome vasculaire périphérique aigu.²⁸⁸ Ce délai était confirmé dans une étude sur 1236 patients ayant subi un syndrome coronarien aigu, où la cessation d'AAS était en cause dans 4,1% des cas et 13,3% des récurrences de syndrome coronarien aigu, dans un délai moyen de 10 jours.²⁸⁹

Une seconde méta-analyse portant sur 50 279 sujets indiquait que la cessation d'AAS augmentait le risque de subir un événement thrombotique majeur de 3,14 fois.²⁹⁰ Ce risque se trouvait amplifié à 89,78 fois chez des sujets ayant reçu un tuteur coronarien suite à une intervention coronarienne percutanée; toutefois, la cessation concomitante de clopidogrel pourrait être en cause dans ce cas.²⁹⁰

Tel que discuté dans le **Chapitre 3**, la pose d'un tuteur coronarien nécessite l'administration d'une combinaison d'AAS et de clopidogrel de façon soutenue idéalement pour une durée d'un an.⁵ D'ailleurs, l'AHA, l'ACC, la SCAI, ainsi que l'American College of Surgeons, l'American Dental Association et l'American College of Physicians, ont émis un communiqué conjoint qui stipulait l'importance de prévenir la discontinuation précoce de médicaments antiplaquettaires suite à la pose d'un tuteur coronarien.²⁹¹ Simultanément, un communiqué similaire était diffusé par l'Association canadienne de cardiologie d'intervention et la Société canadienne de cardiologie.²⁹² Ces recommandations faisaient suite à de nombreuses études qui suggéraient une recrudescence marquée d'événements thrombotiques aigus suite à la discontinuation de médicaments antiplaquettaires, en particulier le clopidogrel.

En effet, un certain nombre d'études se sont penchées sur les prédictors de complications thrombotiques suite à la pose d'un tuteur coronarien, notamment la thrombose de tuteur. Cet événement rare affectant 1 à 3% des patients ayant subi une intervention coronarienne percutanée a des conséquences cliniques dramatiques; près des deux tiers des patients subissant une thrombose de tuteur se présentent en infarctus du

myocarde et entre 10 et 15% des patients décèdent dans les 30 jours suivant l'incident.²⁹³⁻
²⁹⁵ L'identification, et potentiellement la modification, de variables associées à un risque accru d'un tel événement a donc fait l'objet de nombreuses études.

Jeremias *et al.* ont suivi prospectivement 652 sujets ayant reçu un tuteur coronarien médicamenteux pendant 100 jours après leur congé de l'hôpital.²⁹⁶ Une thrombose de tuteur était rapportée chez 1,1% des sujets dans les 30 jours qui ont suivi l'implantation du tuteur coronarien. Les prédicteurs de cet événement thrombotique étaient un petit diamètre du tuteur et la cessation de médicaments antiplaquettaires qui augmentait le risque de thrombose de tuteur d'environ 30 fois.²⁹⁶

Dans une étude portant sur 2229 sujets ayant reçu un tuteur médicamenteux, Iakovou *et al.* ont identifié la cessation de médicaments antiplaquettaires comme la variable la plus prédictrice de thrombose de tuteur (augmentation du risque de 89,78 fois), suivie de l'insuffisance rénale (augmentation du risque de 6,49 fois), puis de la localisation de la lésion dans une bifurcation (augmentation du risque de 6,42 fois), du diabète (augmentation du risque de 3,71 fois) et une faible fraction d'éjection du ventricule gauche (augmentation du risque de 1,09 fois).²⁹⁷

Ong et collaborateurs ont examiné les prédicteurs d'une thrombose de tuteur tardive (survenant après 30 jours suivant l'implantation du tuteur coronarien) chez 2006 sujets ayant reçu un tuteur médicamenteux.²⁹⁸ Les investigateurs rapportent que la thrombose de tuteur peut survenir après la cessation de clopidogrel, malgré une continuation du traitement antiplaquettaire avec l'AAS.²⁹⁸

Dans une étude portant sur 1911 patients ayant reçu un tuteur médicamenteux, Park *et al.* ont identifié la cessation de médicaments antiplaquettaires comme la variable la plus prédictrice de thrombose de tuteur (augmentation du risque de 19,21 fois), suivie de l'infarctus du myocarde comme indication d'intervention coronarienne percutanée (augmentation du risque de 12,24 fois), puis de la longueur du tuteur (augmentation du risque de 1,02 fois par mm).²⁹⁹

Dans l'étude BASKET-LATE, toutes les analyses ont été effectuées après la cessation de clopidogrel; cette variable ne pouvait donc pas être évaluée dans l'étude.³⁰⁰ Néanmoins, les variables qui se sont montrées prédictives de thrombose de tuteur incluait un antécédent d'infarctus du myocarde, la nécessité d'employer des inhibiteurs des récepteurs GPIIb/IIIa, un nombre plus important d'occlusion de branches tributaires et l'angioplastie des greffons vasculaires.³⁰⁰

L'étude d'Airoldi *et al.* a prospectivement recensé les incidents de thrombose de tuteur chez 3021 sujets ayant reçu un tuteur médicamenteux.³⁰¹ La cessation de thiényopyridines était le prédicteur le plus important de thrombose de tuteur au cours des 6 premiers mois avec une augmentation du risque de l'ordre de 14 fois, dans quel cas la thrombose survenait en moyenne 13,5 jours après la cessation du médicament.³⁰¹ Par contre, ce paramètre n'était plus pertinent après un délai de 6 mois suivant l'implantation du tuteur. Les autres prédicteurs incluait une curiethérapie (*brachytherapy*) antérieure, une fraction d'éjection du ventricule gauche inférieure à 30% et une augmentation de la longueur du tuteur.³⁰¹

Dans l'étude d'Eisenstein *et al.* portant sur 4666 sujets ayant reçu un tuteur coronarien, dont 3165 avaient reçu un tuteur métallique et 1501 avaient reçu un tuteur médicamenteux, le risque associé avec la cessation de clopidogrel dépendait du type de tuteur employé.³⁰² En effet, la cessation de clopidogrel 6 mois après l'implantation du tuteur augmentait le risque de décès ou d'infarctus du myocarde davantage chez les sujets ayant reçu un tuteur médicamenteux que chez les sujets ayant reçu un tuteur métallique.³⁰² À un an, les sujets ayant reçu un tuteur médicamenteux continuant leur traitement de clopidogrel se trouvaient protégés des événements thrombotiques majeurs, contrairement à ceux qui avaient cessé le clopidogrel.³⁰² La prise continue d'AAS n'avait pas d'impact sur les résultats rapportés.³⁰²

Flores-Rios et collaborateurs ont examiné les prédicteurs d'une thrombose de tuteur chez 604 sujets ayant reçu un tuteur médicamenteux.³⁰³ Les paramètres prédisant un risque

accru de thrombose de tuteur étaient un diamètre de tuteur plus petit (réduction du risque équivalent à 0,08 par augmentation de 1 mm de diamètre), une faible fraction d'éjection du ventricule gauche (réduction du risque équivalent à 0,96 par pourcentage d'accroissement) et la cessation de médicaments antiplaquettaires (augmentation du risque de 4,87 fois).³⁰³

Dans une étude portant sur 3137 sujets, Ho *et al.* comparaient les répercussions cardiovasculaires chez 1568 sujets ayant reçu un traitement médical suite à leur syndrome coronarien aigu à 1569 sujets ayant reçu un tuteur coronarien.³⁰⁴ Indépendamment du traitement reçu, les sujets cessant le clopidogrel voyaient leur risque de subir un infarctus du myocarde ou de mourir augmenter significativement dans les 90 jours suivant la cessation du médicament.³⁰⁴ Cette recrudescence d'événements était plus marquée chez des sujets ayant reçu le traitement médical par rapport aux sujets ayant reçu un tuteur coronarien.³⁰⁴ Les auteurs ont suggéré qu'une hypersensibilité plaquettaire induite par la cessation de clopidogrel pourrait expliquer cet accroissement du risque de complications thrombotiques dans les semaines suivant la discontinuation de clopidogrel.³⁰⁴

Dans une étude sur 3405 sujets ayant reçu un tuteur coronarien, Aoki *et al.* ont rapporté que les indicateurs les plus importants de risque de thrombose de tuteur étaient la maladie athérosclérotique diffuse, des résultats angiographiques sous-optimaux et un traitement antiplaquettaire inadéquat, qui dans ce cas signifiait l'absence de pré-traitement à l'aide d'une thiényridine avant l'intervention coronarienne percutanée et l'utilisation non assidue de médicaments antiplaquettaires dans les 30 jours suivant l'implantation du tuteur coronarien.³⁰⁵

Dans une analyse portant sur 161 cas de thrombose de tuteur, Eisenberg *et al.* ont spécifiquement étudié l'impact de la cessation de médicaments antiplaquettaires.³⁰⁶ La cessation concomitante d'AAS et de la thiényridine précédait l'événement thrombotique en moyenne de 7 jours.³⁰⁶ Le même délai était observé si les patients cessaient l'AAS après une cessation sans complications de thiényridine.³⁰⁶ Toutefois, la continuation d'AAS malgré la cessation de thiényridine semblait préférer une certaine protection, puisque

seulement 6% des cas de thrombose étaient documentés dans les 10 jours de la cessation et 2% dans les 5 jours de la cessation de clopidogrel si l'AAS était maintenue.³⁰⁶ Les auteurs ont suggéré qu'une réponse inadéquate aux médicaments antiplaquettaires ou une activation plaquettaire rebond suite à la cessation de ces médicaments pourraient expliquer en partie ces événements thrombotiques.³⁰⁶

Dans une des études les plus importantes sur le sujet, Kimura *et al.* ont recensé l'effet de la cessation de médicaments antiplaquettaires sur le risque de thrombose de tuteur chez 10 778 patients ayant reçu un tuteur médicamenteux.³⁰⁷ La cessation concomitante d'AAS et de thiényridine augmentait significativement le risque de thrombose de tuteur tant précocement (30 à 180 jours après l'implantation du tuteur coronarien) que tardivement (181 à 365 et 366 à 548 jours après l'implantation du tuteur coronarien).³⁰⁷ Toutefois, en accord avec les résultats d'Eisenberg *et al.*, le maintien d'AAS éliminait l'accroissement de risque de thrombose de tuteur associé avec la discontinuation de thiényridine seule.³⁰⁷

L'étude de Schulz *et al.*, portant sur une cohorte de 6816 sujets ayant reçu un tuteur coronarien médicamenteux suivie pendant 4 ans, renforçait les résultats d'Eisenstein *et al.*^{302, 308} En effet, dans cette étude, la cessation de clopidogrel augmentait le risque de thrombose de tuteur seulement dans les 6 premiers mois suivant l'implantation du tuteur coronarien, dans quel cas l'événement thrombotique survenait en moyenne 9 jours après la cessation de clopidogrel.³⁰⁸ Après un délai de 6 mois suite à l'implantation du tuteur coronarien, l'incidence d'événements thrombotiques atteignait un plateau. Toutefois, van Werkum et collaborateurs ont rapporté que la cessation de clopidogrel tant précocement (dans les 30 jours de l'implantation du tuteur coronarien) que plus tardivement (30 jours à 6 mois et plus de 6 mois après l'implantation du tuteur coronarien) augmentait significativement le risque d'événements thrombotiques.³⁰⁹ Les autres prédicteurs d'événements thrombotiques dans cette étude incluaient un petit diamètre du tuteur coronarien, un flot TIMI inférieur à 3, la présence d'une tumeur, la localisation d'autres lésions coronariennes à proximité de la lésion coupable, la dissection coronarienne,

l'absence d'AAS, la localisation de la lésion dans une bifurcation, une faible fraction d'éjection du ventricule gauche et un âge plus jeune.³⁰⁹

Les raisons qui expliquent une recrudescence d'événements thrombotiques suivant la cessation de clopidogrel demeurent hypothétiques. Il a été suggéré que ces événements soient dus au retrait d'un médicament protecteur chez des patients à haut risque thrombotique.^{300, 309-313} Toutefois, d'autres investigateurs ont stipulé que la cessation de clopidogrel pourrait amener une hyperactivité plaquettaire rebond qui pourrait, en conjonction avec d'autres facteurs cliniques et angiographiques, provoquer une occlusion du tuteur coronarien.^{304, 306} En soutien à cette hypothèse, un certain nombre de petites études ont démontré une activité plaquettaire et inflammatoire accrue suite à la cessation de clopidogrel.³¹⁴⁻³¹⁶ Cependant, ces études n'incluaient pas de groupe contrôle ne prenant pas de clopidogrel, ce qui limite leur capacité à identifier une activité plaquettaire suite à la cessation de clopidogrel supérieure à ce qui serait attendu chez des sujets similaires ne prenant pas de clopidogrel. Ainsi, l'interrogation à savoir si la survenue des événements thrombotique est attribuable uniquement au retrait d'un médicament protecteur, ou plutôt à une sensibilisation plaquettaire qui se manifeste comme une propension accrue à la formation de caillots suite au retrait du médicament, constitue un débat d'actualité dans la littérature scientifique qui requiert une étude visant spécifiquement à répondre à cette question.

Chapitre 6 : Méthodologie

Ce chapitre sert à esquisser les prémisses, les objectifs et la méthodologie des études composant cet ouvrage. Chaque étude sera ensuite présentée sous forme d'article dans un chapitre subséquent.

A) Évaluation de la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS lors d'une administration quotidienne standard

Tel que présenté dans le **Chapitre 3**, l'administration d'AAS diminue le risque d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de maladie coronarienne.¹ Toutefois, certains patients ne bénéficient pas de la prise d'AAS au même titre que les autres.⁷ Cette sous-population de patients présente une réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS. Les mécanismes expliquant ce phénomène demeurent méconnus. Une étude récente a rapporté que les plaquettes, des éléments anucléés longtemps considérés incapables de synthèse protéique *de novo*, sont capables de synthétiser la COX-1 lorsque cette dernière a été inactivée par l'AAS.⁴⁸ Ce mécanisme pourrait expliquer en partie l'inefficacité de l'AAS à induire une inhibition plaquettaire soutenue chez certains patients.

i) Objectifs

La présente étude vise à évaluer chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable, la stabilité de l'inhibition plaquettaire par l'AAS au cours d'une posologie quotidienne standard.

Objectifs spécifiques :

1. Mesurer de façon séquentielle la formation de TxB₂ plasmatique dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.
2. Évaluer la capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger par agrégométrie optique en réponse à l'acide arachidonique dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.

3. Évaluer la capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger par agrégométrie optique en réponse à des agonistes alternatifs (ADP, épinéphrine et collagène) à faible dose, dont l'effet pourrait nécessiter la synergie avec la formation de TxA₂ plaquettaire, dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.
4. Évaluer la capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger par agrégométrie optique en réponse à des agonistes alternatifs (ADP, épinéphrine et collagène) à forte dose, dont l'effet pourrait surpasser l'inhibition de la COX-1 plaquettaire, dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.

ii) Sélection des sujets

Les sujets d'étude ont été choisis parmi la cohorte de patients suivis à la clinique externe de cardiologie de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, de juillet 2008 à janvier 2009.

Pour être éligibles pour cette étude, les sujets devaient souffrir de maladie coronarienne stable et prendre de l'AAS à enrobage entérique à une dose quotidienne de 80 mg depuis au moins 3 mois. Étaient exclus, les sujets qui prenaient d'autres médicaments pouvant influencer la fonction plaquettaire, des sujets dont l'état clinique pouvait influencer la fonction plaquettaire, ainsi que les sujets dont les paramètres hématologiques étaient anormaux, puisque les tests de fonction plaquettaire ne sont pas fiables dans ce contexte.

Critères d'inclusion

- Patients adultes, âgés de 18 ans ou plus
- Patients souffrant de maladie coronarienne stable, démontrée angiographiquement ou cliniquement (ayant subi un infarctus du myocarde, une revascularisation coronarienne ou présentant des symptômes d'angine de poitrine)
- Patients recevant une thérapie quotidienne d'AAS à enrobage entérique à 80 mg par jour en prévention d'événements ischémiques aigus, depuis au moins 3 mois
- Patients désirant participer à l'étude

Critères d'exclusion

- Syndrome coronarien aigu ou revascularisation coronarienne au cours des 3 mois précédant le recrutement pour l'étude
- Utilisation concomitante d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS, incluant des inhibiteurs spécifiques de la COX-2), de clopidogrel, de ticlopidine, de dipyridamole, de warfarine ou d'acénocoumarole.
- Utilisation d'AINS en vente libre, ou de médicaments contenant de l'AAS, dans les 10 jours précédant le recrutement
- Procédure chirurgicale majeure dans le mois précédant le recrutement
- Patient sous dialyse pour insuffisance rénale chronique
- Décompte plaquettaire anormal, soit inférieur à 100×10^9 plaquettes/L ou supérieur à 450×10^9 plaquettes/L
- Hématocrite inférieure à 25% ou hémoglobine inférieure à 100 g/L

iii) Devis expérimental

Le devis de cette étude a été enregistré dans un registre international (ClinicalTrials.gov sous l'identifiant NCT00671021). Ce protocole a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal et tous les sujets ont octroyé un consentement libre et éclairé pour participer à cette étude.

Tous les participants devaient se présenter à l'unité de recherche clinique entre 7h et 8h. Suite à l'obtention du consentement, un bref questionnaire sur l'histoire médicale et médicamenteuse du sujet était administré (**Annexe 1**) et une première prise de sang était effectuée avant la prise observée d'un comprimé d'AAS à enrobage entérique 80 mg (Asaphen EC, Pharmascience, Montréal, QC, Canada). Une prise de sang était ensuite effectuée 1 heure, 3 heures, 8 heures et 24 heures après la prise observée d'AAS. Chaque prise de sang servait à l'évaluation de la fonction plaquettaire par agrégométrie optique et à la mesure de TxB_2 dans le surnageant après l'agrégation plaquettaire pour estimer l'activité de la COX-1 induite par l'activation et l'agrégation plaquettaire.

Agrégométrie optique

L'agrégation plaquettaire était mesurée par agrégométrie optique qui mesure la transmission lumineuse à travers un échantillon de plasma riche en plaquettes suite à l'ajout d'un agoniste plaquettaire. Le prélèvement sanguin était effectué à l'aide d'une aiguille de 21 gauge et les 2 premiers mL ainsi prélevés étaient détruits. Ensuite, le sang était prélevé dans des tubes contenant 3,2% de sodium citraté et la mesure de la fonction plaquettaire était effectuée dans un délai d'au plus 2 heures suivant le prélèvement. L'échantillon sanguin était centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes pour obtenir le plasma riche en plaquettes. Aucun ajustement du décompte plaquettaire n'était effectué.³¹⁷ L'agrégation plaquettaire était mesurée à 37°C à l'aide de l'appareil ChronoLog Aggregometer (540 model, Havertown, PA, USA). L'agrégation plaquettaire est exprimée en fonction du changement maximal de transmission lumineuse dans l'échantillon en comparaison avec la transmission enregistrée dans un plasma pauvre en plaquettes (obtenu par centrifugation de l'échantillon sanguin à 3000 rpm pendant 10 minutes). Les agonistes plaquettaires employés étaient l'acide arachidonique (1.6 mM), l'ADP (2 et 20 µM), l'épinéphrine (2 et 20 µM) et le collagène (1 et 5 µg/mL).

Mesure de TxB₂ plaquettaire

À la fin du processus d'agrégation plaquettaire en plasma riche en plaquettes, l'échantillon était centrifugé à 6000 rpm pendant 1 minute et l'indométhacine à une concentration finale de 10 µg/mL était ajoutée au surnageant. L'ajout d'indométhacine bloque toute production post-agrégation de TxA₂ dans l'échantillon et assure que la TxB₂ mesurée correspond à celle qui est produite lors du processus d'agrégation. La concentration de TxB₂ était mesurée à l'aide d'un immuno-essai enzymatique (Thromboxane B₂ kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

iv) Calcul de la taille échantillonnale et analyse statistique

Le calcul de la taille d'échantillon est basé sur une étude antérieure démontrant qu'aussi peu que 2,2 ng/mL de TxB₂ dans le sang est suffisant pour induire une agrégation plaquettaire chez certains sujets et que l'AAS réduit la concentration de TxB₂ à près de 0.²²¹

Ainsi, pour détecter une différence d'au moins 2,2 ng/mL dans un devis de mesures répétées, avec une puissance de 99% et une erreur α permise de 5%, la taille échantillonnale requise est de 10 sujets (PASS 2002, NCSS 2004 Statistical software, Kaysville, UT, USA).

Les variables continues sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type lorsque distribuées normalement ou sous forme de médiane [écart interquartile] si la distribution ne suit pas la loi normale; les variables catégorielles sont présentées sous forme de fréquence et pourcentage. La normalité des données était vérifiée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. Une analyse de variance sur mesures répétées était effectuée pour les valeurs de TxB₂ plasmatiques et ainsi que pour les résultats d'agrégation plaquettaire. Le niveau de signification bidirectionnel était fixé à 0,05. Toutes les analyses statistiques étaient conduites à l'aide du logiciel SPSS 16.0 pour Windows (SPSS Institute, Illinois, USA).

B) Étude de la pertinence clinique des tests de fonction plaquettaire pour la prédiction d'événements ischémiques majeurs chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable prenant de l'AAS

Tel que présenté dans le **Chapitre 4**, la discordance entre les résultats des différents tests de fonction plaquettaire laisse entendre qu'ils ne sont pas interchangeables. L'étude-mère que nous avons menée sur la comparabilité des tests de fonction plaquettaire pour identifier les sujets ayant une inhibition inadéquate de la fonction plaquettaire par l'AAS est présentée en **Annexe 2**.⁹⁸ Le besoin d'identifier le test de fonction plaquettaire le plus prédictif d'événements ischémiques demeure inassouvi. L'utilité clinique des tests de fonction plaquettaire évaluant l'inhibition de la COX-1 plaquettaire par l'AAS doit être démontrée à l'aide d'une étude clinique prospective d'envergure dont l'objectif sera de répertorier la survenue d'événements ischémiques suite à une évaluation de la fonction plaquettaire par une batterie de tests ciblant l'inhibition de l'activité plaquettaire.

i) Objectifs

Dans le but de déterminer lequel des tests de fonction plaquettaire est le plus pertinent cliniquement, nous avons effectué un suivi 3 ans après l'évaluation de l'inhibition plaquettaire par l'AAS chez 201 sujets souffrant de maladie coronarienne stable (pour les critères de sélection et la méthodologie de l'étude-mère, cf. **Annexe 2**).

Objectif principal :

1. Comparer les tests de fonction plaquettaire dans leur capacité à identifier les patients les plus à risque de subir des événements cardiovasculaires néfastes en fonction de leur niveau d'inhibition plaquettaire par l'AAS

Objectifs secondaires :

2. Déterminer si la réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS, tel que mesurée par les différents tests de fonction plaquettaire, prédit la mortalité.
3. Déterminer si la réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS, tel que mesurée par les différents tests de fonction plaquettaire, prédit la survenue de syndrome coronarien aigu.
4. Déterminer si la réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS, tel que mesurée par les différents tests de fonction plaquettaire, prédit la survenue de accidents vasculaires cérébraux.
5. Déterminer si la réponse plaquettaire inadéquate à l'AAS, tel que mesurée par les différents tests de fonction plaquettaire, prédit le taux de revascularisation coronarienne.

ii) Déroulement de l'étude

Ce protocole a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal et tous les sujets ont octroyé un consentement libre et éclairé pour participer à cette étude. Tous les sujets recrutés dans l'étude-mère ont été approchés par téléphone pour

participer à cette étude de suivi des événements cardiovasculaires.⁹⁸ Suivant l'obtention du consentement de chaque sujet, un questionnaire sur la santé des 3 années précédentes était administré (**Annexe 3**) et, avec la permission des sujets, les dossiers médicaux étaient examinés par une infirmière de recherche expérimentée. Un formulaire standardisé était employé pour la collecte de données (**Annexe 4**).

iii) Calcul de la puissance de l'étude et analyse statistique

Puisque la présente étude fait suite à une étude réalisée entre 2004 et 2006, la taille échantillonnale ne pouvait être modifiée. Toutefois, en assumant un taux d'événements cardiovasculaires de 5%, une puissance d'au moins 80% et une erreur α permise de 5%, la présente étude est suffisamment puissante pour détecter une augmentation de risque de l'ordre d'au moins 2,5 fois (PASS 2002, NCSS 2004, Statistical software, UT, USA). En prévoyant un taux d'attrition de 10%, 180 sujets seraient suffisants pour détecter une augmentation de risque d'au moins 2,6 fois, avec une puissance d'au moins 80% et une erreur α permise de 5% (PASS 2002, NCSS 2004, Statistical software, UT, USA).

Les variables continues sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type et les variables catégorielles sont présentées sous forme de fréquence et pourcentage. Le risque de subir un événement cardiovasculaire néfaste était estimé par le test exact de Fisher, avec la réponse plaquettaire par chaque test de fonction plaquettaire comme variable indépendante. Une régression logistique multiple conditionnelle a été conduite, avec la survenue d'événements cardiovasculaires néfastes comme variable dépendante et les variables indépendantes suivantes comme potentiellement prédictives : l'âge, le sexe, le statut tabagique, le niveau d'exercice physique, le décompte plaquettaire, le volume plaquettaire moyen, l'hématocrite, l'hémoglobine, le décompte de globules blancs, l'index de masse corporelle, la glycémie à jeun, l'hémoglobine glyquée, le cholestérol total, le cholestérol LDL, le cholestérol HDL, les triglycérides, la protéine C-réactive, la créatinine sérique, l'histoire familiale de maladie coronarienne, un antécédent d'infarctus du myocarde, d'angine instable, d'accident vasculaire cérébral ou de revascularisation, la présence d'angine stable, l'étendue de la maladie coronarienne, la fraction d'éjection du ventricule gauche, la présence d'insuffisance cardiaque, d'hypertension, d'hypercholestérolémie, de diabète, de maladie vasculaire périphérique, le niveau

d'adhésion au traitement tel que rapporté par le patient et la réponse plaquettaire à l'AAS telle que mesurée par chaque test de fonction plaquettaire. Le niveau de signification bidirectionnel était fixé à 0,05. Toutes les analyses statistiques étaient conduites à l'aide du logiciel SPSS 16.0 pour Windows (SPSS Institute, Illinois, USA).

C) Évaluation de l'impact sur la fonction plaquettaire de la cessation de la prise quotidienne de clopidogrel

L'administration d'AAS et de clopidogrel diminue le risque d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de maladie coronarienne, particulièrement suite à une angioplastie coronarienne.¹ Les recommandations actuelles suggèrent l'utilisation de clopidogrel chez les patients à haut risque thrombotique, pour un maximum d'un an.⁵ Par conséquent, le clopidogrel est généralement cessé après cette période. Tel que décrit dans le **Chapitre 5**, nombre de registres et d'études observationnelles rapportent une recrudescence d'événements thromboemboliques précoces suite à l'interruption de traitement au clopidogrel. Certaines études ont suggéré que la cessation de clopidogrel était associée à une agrégation accrue ainsi qu'à une augmentation des marqueurs inflammatoires.³¹⁵ Toutefois, en l'absence d'un groupe comparateur, il est impossible de savoir si cette augmentation de l'agrégation plaquettaire est la conséquence du retrait d'un médicament antiplaquettaire bénéfique chez des patients à haut risque thrombotique ou si cela indique un effet de sensibilisation plaquettaire aux stimuli pro-agrégants lors de la prise chronique de ce médicament.

i) Objectifs

La présente étude vise à évaluer l'impact sur la fonction plaquettaire du retrait soudain de clopidogrel chez des patients souffrant de maladie coronarienne stable comparativement à des patients similaires qui ne prennent pas de clopidogrel.

Objectifs spécifiques :

1. Étudier l'effet de la cessation abrupte de clopidogrel sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP.

2. Étudier l'effet de la cessation abrupte de clopidogrel sur la sensibilité plaquettaire à l'ADP.
3. Étudier l'effet de la cessation abrupte de clopidogrel sur les marqueurs inflammatoires.

ii) Sélection des sujets

Les sujets d'étude ont été choisis parmi la cohorte de patients suivis à la clinique externe de cardiologie de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, de janvier 2008 à février 2009.

Pour être éligibles pour cette étude, les sujets devaient souffrir de maladie coronarienne stable, et devaient soit discontinuer la prise de clopidogrel sous recommandation médicale, ou ne pas prendre de clopidogrel. Étaient exclus, les sujets qui prenaient d'autres médicaments pouvant influencer la fonction plaquettaire, des sujets dont l'état clinique pouvait influencer la fonction plaquettaire, ainsi que les sujets dont les paramètres hématologiques étaient anormaux, puisque les tests de fonction plaquettaire de sont pas fiables dans ce contexte.

Critères d'inclusion

- Patients adultes, âgés de 18 ans ou plus
- Patients souffrant de maladie coronarienne stable, démontrée angiographiquement ou cliniquement (ayant subi un infarctus du myocarde, une revascularisation coronarienne ou présentant des symptômes d'angine de poitrine)
- Dans le groupe de cessation de clopidogrel :
 - Patients devant cesser leur thérapie de clopidogrel suite à la recommandation de leur cardiologue traitant et continuer leur thérapie d'AAS indéfiniment
- Dans le groupe contrôle :
 - Patients recevant une thérapie quotidienne d'AAS en prévention d'événements ischémiques aigus
- Patients désirant participer à l'étude

Critères d'exclusion

- Syndrome coronarien aigu ou revascularisation coronarienne au cours des 3 mois précédant le recrutement pour l'étude
- Utilisation concomitante d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS, incluant des inhibiteurs spécifiques de la COX-2), de ticlopidine, de dipyridamole, de warfarine ou d'acénocoumarole.
- Procédure chirurgicale majeure dans le mois précédant le recrutement
- Patient sous dialyse pour insuffisance rénale chronique
- Décompte plaquettaire anormal, soit inférieur à 100×10^9 plaquettes/L ou supérieur à 450×10^9 plaquettes/L
- Hématocrite inférieure à 25% ou hémoglobine inférieure à 100 g/L

iii) Devis expérimental

Le devis de cette étude a été enregistré dans un registre international (ClinicalTrials.gov sous l'identifiant NCT00670943). Ce protocole a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal et tous les sujets ont octroyé un consentement libre et éclairé pour participer à cette étude.

Le nombre de visites pour cette étude était différent pour les sujets devant discontinuer la prise de clopidogrel et les sujets n'en prenant pas.

Tous les sujets

La première visite servait à recueillir l'histoire médicale et médicamenteuse des sujets, ainsi qu'à mesurer des paramètres biochimiques et hématologiques décrits dans l'**Annexe 5**.

Sujets devant discontinuer la prise de clopidogrel

Un échantillon sanguin était prélevé à 7 reprises chez les sujets devant discontinuer la prise de clopidogrel, soit la veille de l'interruption de la prise de clopidogrel et 1, 3, 7, 14, 21 et 28 jours après l'arrêt de clopidogrel. Ces échantillons de sang servaient à l'étude

de l'agrégation plaquettaire et à la mesure de protéine C-réactive à haute sensibilité (hsCRP) comme marqueur inflammatoire.

Sujets ne prenant pas de clopidogrel

Un seul échantillon de sang était prélevé chez les sujets contrôles. Cet échantillon de sang servait à l'étude de l'agrégation plaquettaire et à la mesure de hsCRP comme marqueur inflammatoire.

Agrégométrie optique

L'agrégation plaquettaire était mesurée par agrégométrie optique qui mesure la transmission lumineuse à travers un échantillon de plasma riche en plaquettes suite à l'ajout d'un agoniste plaquettaire. Le prélèvement sanguin était effectué à l'aide d'une aiguille de 21 gauge et les 2 premiers mL ainsi prélevés étaient détruits. Ensuite, le sang était prélevé dans des tubes contenant 3,2% de sodium citraté et la mesure de la fonction plaquettaire était effectuée dans un délai d'au plus 2 heures suivant le prélèvement. L'échantillon sanguin était centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes pour obtenir le plasma riche en plaquettes. Aucun ajustement du décompte plaquettaire n'était effectué.³¹⁷ L'agrégation plaquettaire était mesurée à 37°C à l'aide de l'appareil ChronoLog Aggregometer (540 model, Havertown, PA, USA). L'agrégation plaquettaire est exprimée en fonction du changement de transmission lumineuse dans l'échantillon 5 minutes après l'ajout de l'agoniste en comparaison avec la transmission enregistrée dans un plasma pauvre en plaquettes (obtenu par centrifugation de l'échantillon sanguin à 3000 rpm pendant 10 minutes). L'agoniste plaquettaire employé était l'ADP à 0,5, 1, 1,5, 2,5, 5 et 10 µM.

VerifyNow[®] P2Y₁₂

Le VerifyNow[®] P2Y₁₂ est un test de fonction plaquettaire rapide commercialisé sous forme de cartouches standardisées. Elles contiennent 2 chambres distinctes pour mesurer l'agrégation plaquettaire. La première chambre utilise 22 nM de PGE₁ et 20 µM d'ADP pour induire l'agrégation plaquettaire et rapporte les résultats sous forme de *P2Y₁₂ Reaction Units* (PRU). La seconde chambre emploie le *thrombin receptor activating peptide* (TRAP) à 3,4 µM pour induire l'agrégation par une voie indépendante de l'ADP.

L'appareil estime ensuite l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par le clopidogrel en tant que rapport entre les résultats obtenus par PGE₁/ADP versus ceux obtenus par TRAP.

Mesure de hsCRP

L'échantillon sanguin était prélevé dans un tube contenant un activateur de caillot et un gel de séparation de sérum (BD Vacutainer, Mississauga, Canada). Le sérum était prélevé pour la mesure de hsCRP par immuno-essai enzymatique (CRP (Latex) HS assay par Roche Diagnostics Ltd, Mannheim, Allemagne).

iv) Calcul de la taille échantillonnale et analyse statistique

Le calcul de la taille d'échantillon requérait la détection d'une différence de 10% (écart-type 15%) dans l'agrégation plaquettaire entre les sujets discontinuant le clopidogrel et ceux qui n'en prenaient pas à n'importe quel moment pendant le suivi. Pour une puissance de 80% et une erreur α permise de 5%, la taille échantillonnale requise était de 37 sujets par groupe (PASS 2002, NCSS 2004 Statistical software, Kaysville, UT, USA).

Les variables continues sont présentées sous forme de moyenne (écart-type) lorsque distribuées normalement ou sous forme de médiane [écart interquartile] si la distribution ne suit pas la loi normale; les variables catégorielles sont présentées sous forme de fréquence et pourcentage. La normalité des données était vérifiée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. Les variables continues étaient comparées par le test de Student si normalement distribuées ou par le test non-paramétrique de Mann-Whitney s'il y avait déviance de la normalité. Les variables catégoriques étaient analysées par le test de χ^2 ou de Fisher lorsqu'applicable. Le test non-paramétrique de Mann-Whitney était utilisé pour comparer les niveaux d'agrégation plaquettaire à chaque moment de suivi avec les valeurs obtenues chez les sujets contrôles. Une analyse de variance sur mesures répétées était employée pour mesurer l'effet du temps sur les paramètres plaquettaires et inflammatoires. Le niveau de signification bidirectionnel était fixé à 0,05. Toutes les analyses statistiques étaient conduites à l'aide du logiciel SPSS 16.0 pour Windows (SPSS Institute, Illinois, USA).

Chapitre 7 : Heterogeneity in platelet cyclooxygenase inhibition by aspirin in coronary artery disease

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG

Sous presse à *International Journal of Cardiology*

2010; doi: 10.1016/j.ijcard.2010.02.025

Heterogeneity in platelet cyclooxygenase inhibition by aspirin in coronary artery disease

Marie Lordkipanidzé est le principal auteur de cet article.

Contribution : Marie Lordkipanidzé a participé à la conception et au design de l'étude, au recrutement des sujets, à l'analyse et l'interprétation des résultats, à la rédaction de l'ébauche du manuscrit ainsi qu'à sa révision en réponse aux commentaires des coauteurs et était responsable des corrections lors de la révision par les pairs du journal visé.

Summary

Background: Platelets, long believed to be incapable of *de novo* protein synthesis, may retain their ability to form the cyclooxygenase (COX) enzyme once it has been inactivated by aspirin. This may explain the inefficacy of the drug to induce sustained platelet inhibition in certain patients. We evaluated the stability of platelet inhibition following once-daily enteric-coated aspirin administration.

Methods: Platelet responsiveness to aspirin was evaluated in 11 stable coronary artery disease patients on chronic aspirin therapy before and 1, 3, 8, and 24h after observed ingestion of 80-mg enteric-coated aspirin. Inhibition of the COX pathway was measured pharmacologically through plasma thromboxane (Tx) B₂ levels, and functionally by light transmission aggregometry in response to arachidonic acid. COX-independent platelet activity was measured in response to adenosine diphosphate, epinephrine and collagen.

Results: Plasma TxB₂ levels showed profound inhibition of TxA₂ formation, which was stable throughout 24h, in all but 1 subject. This subject had optimal response to aspirin (inhibition of platelet TxA₂ production within 1h), but recovered the ability to synthesize TxA₂ within 24h of aspirin ingestion. Arachidonic acid-induced platelet aggregation closely mirrored TxB₂ formation in this patient, portraying a functional ability of the platelet to aggregate within 24h of aspirin ingestion. COX-independent platelet aggregation triggered TxA₂ production to a similar extent in all patients, likely through signal-dependent protein synthesis.

Conclusions: COX-dependent platelet activity is recovered in certain individuals within 24h of aspirin administration. Further research should consider increasing aspirin dosing frequency to twice daily, to allow sustained inhibition in such subjects.

Keywords: Aspirin, coronary artery disease, cyclooxygenase, platelet aggregation, thromboxane

Introduction

Daily aspirin administration has been shown to safely reduce the risk of ischemic events in patients suffering from stable coronary artery disease (CAD), owing to inhibition of pathological platelet aggregation.¹ Aspirin inhibits platelet function by irreversibly acetylating a key enzyme in thromboxane (Tx) A₂ synthesis from arachidonic acid (AA), namely the cyclooxygenase (COX)-1 enzyme.² Because platelets are anucleate, they have long been considered incapable of regenerating the COX-1 enzyme following acetylation by aspirin.² Thus, recovery of TxA₂ generation was believed to rely solely on generation of new platelets from megakaryocytes.³ This dogma has been challenged by recent reports of the presence of mRNA in platelets coding for a multitude of proteins, and of *de novo* protein synthesis in stimulated platelets.⁴⁻⁶

In a recent study on healthy volunteers, Evangelista and collaborators have suggested that anucleate platelets retain the ability to generate COX-1 through signal-dependent protein synthesis.⁷ They reported significant production of TxA₂ within 24 hours of pre-incubation of platelets with aspirin, as a result of active COX-1 generation by platelets in the presence of various agonists (AA, fibrinogen, thrombin, adenosine diphosphate [ADP] and collagen).⁷ Through an amplifying effect, the TxA₂ concentration produced was sufficient to enhance platelet responses to other platelet agonists.^{7, 8} Therefore, the ability of platelets to regenerate COX-1 activity, and ensuing TxA₂ synthesis, even in low concentrations, within the normal daily interval between aspirin doses may significantly impact on aspirin efficacy in certain patients.

The aim of the present study was to determine the ability of aspirin to inhibit platelet COX-1 activity over the standard 24-hour dosing interval in patients suffering from stable CAD. Inhibition of the COX pathway was measured pharmacologically through plasma TxB₂ levels (a stable metabolite of TxA₂), and functionally by light transmission aggregometry, both in response to AA. Additionally, we investigated the ability of platelets to aggregate in the presence of COX-1 inhibition by aspirin in response to low and high dose COX-independent agonists (ADP, epinephrine and collagen), which may require amplification through TxA₂ synthesis.

Materials and methods

Participants

Eleven consecutive patients with stable CAD (diagnosis based on a positive stress test or angiographically demonstrated coronary stenosis) treated with 80 mg enteric-coated aspirin daily for at least 3 months were enrolled in this study from the outpatient cardiology clinic of Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Canada, from July 2008 to January 2009 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00671021). Exclusion criteria were: acute coronary syndromes or revascularization within 3 months of enrolment; concurrent ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, including COX-2 selective anti-inflammatory drugs), clopidogrel, ticlopidine, dipyridamole, warfarin or acenocoumarol; self-reported use of non-prescription NSAIDs or drugs containing aspirin within 10 days of enrolment; major surgical procedure within 1 month of enrolment; platelet count outside the 100 to 450 x 10⁹/L range; hematocrit < 25% or hemoglobin < 100 g/L; chronic renal failure requiring dialysis. This study was approved by the institutional Research and Ethics Review Board and patients gave written informed consent.

All participants presented to the outpatient research unit between 7 and 8 AM. Blood was collected to assess platelet aggregation before aspirin intake, as well as 1, 3, 8, and 24 hours after observed ingestion of 80 mg enteric-coated aspirin (Asaphen EC, Pharmascience, Montréal, QC, Canada). The 24-hour sample was used as a control for the pre-aspirin sample, to ensure patient compliance with daily aspirin therapy. Demographic information, medical history and concurrent medications were assessed during a personal interview and through review of medical charts.

Assessment of platelet aggregation

Platelet aggregation was assessed using the historical gold standard, light transmission aggregometry, which studies luminosity as aggregation occurs following stimulation with a platelet agonist in platelet-rich plasma (PRP)⁹. The first 2 mL of blood, drawn by venipuncture through a 21-gauge needle, were discarded. Blood was then drawn into evacuated tubes containing 3.2% sodium citrate and processed within 2 hours of collection. PRP was obtained by centrifugation of citrated whole blood for 10 minutes at 1000 rpm. No adjustment of platelet count was made as measurement of aggregation in

native PRP may reflect more accurately the situation *in vivo*¹⁰. Platelet aggregation was measured at 37°C with a ChronoLog Aggregometer (540 model, Havertown, PA, USA) and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline after administration of a platelet agonist, using platelet-poor plasma as reference (obtained by centrifugation of the remaining blood for 10 minutes at 3000 rpm). The agonists used to evaluate response to aspirin were AA (1.6 mM [0.5 mg/ml]), ADP (2 and 20 µM), epinephrine (2 and 20 µM), and collagen (1 and 5 µg/ml).

Assessment of plasma TxB₂ concentration

Platelet cyclooxygenase activity was assessed through measurement of plasma TxB₂, as previously described.¹¹⁻¹³ Following aggregation induced by either of the agonists cited above, platelet samples were immediately centrifuged (6000 rpm, 1 minute) and indomethacin was added to the supernatant (final concentration 10 µg/ml). The addition of this non-selective COX inhibitor is necessary to stop TxA₂ synthesis in the sample, in order to eliminate post-aggregation production and thus ensure measurement of only aggregation-induced TxA₂ synthesis. Samples were stored at -80°C until the time of TxB₂ assaying by ELISA (Thromboxane B₂ kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

Sample size and statistical analysis

No data on plasma TxB₂ levels to be expected in CAD patients on aspirin therapy was available. However, a number of studies had looked at serum TxB₂ (obtained by letting the blood sample clot at room temperature and measuring TxB₂ in the serum). Knowing that a serum TxB₂ concentration of 2.2 ng/ml was sufficient to induce platelet aggregation and that aspirin administration reduces TxB₂ concentration to close to 0,¹⁴ our sample size calculation was based on the ability to detect a difference of 2.2 ng/ml in TxB₂ production. A sample size of 10 participants was deemed sufficient to detect such a difference, using a repeated measures design where TxB₂ production was measured 5 times in each participant, with a power of 99% and a 5% significance level with the use of a Geisser-Greenhouse Corrected F Test (PASS 2002, NCSS 2004 Statistical software, Kaysville, UT, USA).

Normally distributed continuous variables are presented as mean ± standard deviation, non-normally distributed continuous variables as median [interquartile range],

and categorical variables as frequencies (percentages). Variables were analyzed for a normal distribution with the Kolmogorov-Smirnov test. Repeated measures ANOVA was applied to TxB₂ results, as well as to platelet aggregation profile analysis. A two-sided $p \leq 0.05$ was considered significant. All analyses were performed with SPSS 16.0 for Windows (SPSS Institute, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Results

Participant characteristics

Participant characteristics are presented in **Table 1**. The majority of subjects were male (90.9%), aged 60 ± 11 years (range from 39 to 73 years). Complete blood counts were in the normal ranges. Study participants commonly presented classic CAD risk factors requiring pharmacological therapy such as beta-blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins.

Assessment of TxB₂ formation

In all but one subject, plasma TxB₂ concentration was uniformly inhibited by daily aspirin therapy to approximately 23 pg/ml (ranging from 8 to 50 pg/ml), with no statistically detectable difference between time points (**Figure 34 A**). One subject displayed a distinctly dissimilar profile ($p < 0.0001$ by repeated measures ANOVA). This subject had optimal response to aspirin (inhibition of platelet TxB₂ production within 1 hour of aspirin ingestion to 29 pg/ml), but recovered significant platelet activity within 24 hours of aspirin ingestion with mean pre-aspirin TxB₂ levels of 373 pg/ml (**Figure 34 A**).

Assessment of COX-dependent platelet aggregation

AA-induced platelet aggregation mirrored closely plasma TxB₂ concentration (**Figure 34 B**). In all but the one subject that displayed a distinct TxB₂ response, AA-induced platelet aggregation was uniformly inhibited by daily aspirin therapy to approximately 0.8% (ranging from 0 to 3%), with no statistically detectable difference between time points (**Figure 34 B**). The same subject displayed a distinctly dissimilar profile ($p < 0.0001$ by repeated measures ANOVA). This subject had optimal response to aspirin (inhibition of AA-induced platelet aggregation within 1 hour of aspirin ingestion to

0%), but recovered significant platelet activity within 24 hours of aspirin ingestion with mean pre-aspirin AA-induced platelet aggregation of 35% (**Figure 34 B**).

Assessment of COX-independent platelet aggregation

Platelet aggregation was assessed in response to low dose (**Figure 35 A-C**) and high dose (**Figure 35 D-F**) COX-independent agonists, namely ADP, epinephrine and collagen. Individual responses to these agonists were more variable than platelet aggregation assessed with AA.

Platelet aggregation in response to these agonists was uniform during the standard 24 hour aspirin dosing interval (**Figure 35**). Plasma TxB₂ concentration following aggregation induced by the various agonists paralleled the aggregation profiles (**Figure 36**). Neither the aggregation profiles in response to the COX-independent agonists, nor the ensuing TxB₂ production profiles were statistically different between participants with normal and dissimilar aspirin response profiles described above. These agonists elicited higher TxB₂ levels (induced by ADP 2 μM = 244 ± 83 pg/ml, by ADP 20 μM = 272 ± 86 pg/ml, by epinephrine 2 μM = 64 [39 ; 170] pg/ml, by epinephrine 20 μM = 159 ± 86 pg/ml, by collagen 1 μg/ml = 30 [21 ; 43] pg/ml, and by collagen 5 μg/ml = 34 [24 ; 187] pg/ml) than what was observed with AA in subjects presenting a normal response to the latter (TxB₂ levels induced by AA 1.6 mM = 23 ± 10 pg/ml), but lower than pre-aspirin levels of the patient with an abnormal COX-1 inhibition profile (TxB₂ levels induced by AA 1.6 mM = 373 ± 12 pg/ml; all p < 0.05).

Discussion

This study has two main findings. First, although a profound and stable response is observed during the standard once-daily administration regimen in the vast majority of subjects, significant TxA₂ production may recover in certain individuals within 24h despite platelet COX-1 inhibition by 80-mg enteric-coated aspirin as assessed by AA-induced platelet aggregation and TxA₂ formation. Second, COX-independent agonists elicit significantly greater TxA₂ synthesis than that produced in response to AA despite inhibition of AA-induced platelet aggregation by aspirin, suggesting a physiological pathway of

recuperation of some TxA₂ synthesis ability in stimulated platelets, either through signal-dependent protein synthesis or an accessory TxA₂-forming pathway.

Recovery of TxA₂ synthetic ability within 24 hours of aspirin ingestion

Platelet responsiveness to aspirin is known to be variable, although inadequate platelet inhibition by aspirin appears to be rare when assessment relies on COX-specific platelet function assays.^{15, 16} The term aspirin resistance has been used in such instances, but it may not relevantly depict the phenomenon, as resistance suggests the pharmacological inefficacy of aspirin to acetylate platelet COX-1 when other mechanisms could explain high residual platelet aggregability.^{17, 18} It is noteworthy that in our study, aspirin was effective in sustainably inhibiting platelet TxA₂ formation and ensuing aggregation in almost all individuals, with little variability with 24 hours of aspirin ingestion. It is also interesting that aspirin was highly effective in inhibiting platelet aggregation in the patient presenting with a dissimilar response pattern, eliminating aspirin resistance as the culprit, but daily aspirin administration appeared insufficient to consistently blunt COX-dependent platelet function in this patient.

Recovery of AA-dependent platelet aggregation may occur through different mechanisms, including COX-1 bypassing mechanisms such as the presence of COX-2 in platelets or oxidation of AA to isoprostanes, as well as recovery of functional COX-1 enzymes.¹⁹⁻²¹ Increased platelet turnover may explain regained COX-1 function. More new platelets, non-exposed to aspirin, may be released, exhibiting uninhibited COX-1 activity which could lead to platelet aggregation.^{22, 23} Because the relation of TxA₂ formation to platelet aggregation is not linear and near complete inhibition of TxA₂ synthesis by aspirin is required to achieve sustained inhibition of platelet function, even a small increase in platelet turnover could lead to recovery of platelet aggregation in certain individuals.^{24, 25} The clinical relevance of this mechanism was implied in a cross-over study of three different aspirin doses administered to healthy volunteers, which showed significant recovery of platelet aggregation in whole blood within 24 hours of aspirin administration.²⁶ Our study extends the time-dependence of platelet inhibition by aspirin to certain CAD patients, who might benefit from increasing the aspirin dosing frequency to twice daily to inhibit platelet aggregation consistently throughout the day.

Signal-dependent TxA₂ synthesis in aspirin-exposed platelets

Platelet stimulation by various agonists triggered in a parallel fashion enhanced TxA₂ production and aggregation to a similar extent in subjects with and without adequately inhibited AA-induced platelet aggregation. It would appear that platelet stimulation by ADP, epinephrine, and to a lesser extent collagen, induces recovery of TxA₂ synthesis in stable CAD patients on daily aspirin therapy. A plausible hypothesis that may explain this phenomenon would be signal-dependent protein synthesis by activated platelets, which leads to rapid formation of new aspirin-unexposed COX-1 enzymes.²⁷ The time course of COX-1 synthesis would have to be inferior to 5 minutes, as this is the time required for aggregation assessment with light transmission aggregometry, and would be consistent with the physiological role of platelets as rapid response cells assuring hemostasis. A recent report demonstrated COX-1 synthesis in platelets isolated from healthy volunteers and incubated with aspirin.⁷ Stimulation of platelets by thrombin, fibrinogen, ADP, collagen or thrombin receptor-activating peptide-induced COX-1 synthesis through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism.⁷ The COX-1 formed in these platelets was functional and produced TxA₂ in concentrations sufficient to boost platelet aggregation in the presence of other platelet agonists.⁷ Our results confirm that enhanced TxA₂ synthesis is triggered in response to platelet activation by ADP, epinephrine, and to a lesser extent collagen, in patients with stable CAD on daily aspirin therapy. The origin of the TxA₂ remains to be determined. It is still unclear whether it results from COX -1 synthesis or a bypassing TxA₂ producing pathway.

Limitations

Platelet function testing remains a topic of interest as it holds the promise of individualized antiplatelet therapy in patients. However, no platelet function assay has reached consensus.⁹ The historical gold standard used herein remains the most documented platelet function assay with results linked to clinical outcomes and with clear delineation between subjects presenting inadequate platelet response to aspirin and normal responders. Thus, the results presented herein are based on AA-induced light transmission aggregometry which, to our knowledge, is the best-suited method of platelet function evaluation for assessment of response to aspirin.¹⁶

We used the Thromboxane B₂ kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) for measurement of plasma TxB₂. This assay reports pg/ml levels of TxB₂, which is significantly lower than the ng/ml levels reported in other studies.^{7, 14} However, the levels reported by other investigators using the same assay are comparable to those reported in this study.^{13, 28} Thus, direct comparisons with other TxB₂ assay kits may not be appropriate.

Platelet reticulation or COX-1 expression in platelets was not assessed in the current study; we can therefore not assert whether increased platelet turnover or signal-dependent COX-1 synthesis explains the increased platelet TxA₂ production reported.

We have presented the participant characteristics of the subject presenting with a dissimilar aspirin response profile apart from the remaining subjects. However, as these pertain to a single subject, no clinical inference can be made at this point. Further characterization of such individuals, particularly with regard to platelet reticulation and protein synthesis capabilities, is warranted.

Clinical Relevance and future directions

Persistent platelet aggregation despite daily aspirin therapy is of clinical importance, as it has been linked with adverse ischemic events.²⁹ Improving the inhibitory efficacy of aspirin in selected individuals is a challenge, as the understanding of underlying mechanisms of suboptimal platelet inhibition remains limited. The current results provide evidence that recovery of TxA₂ production within a standard 24-hour dosing interval in certain stable CAD patients leads to suboptimal platelet inhibition, which may leave the patient unprotected against adverse ischemic events. Given the well established benefit provided by aspirin in secondary prevention of acute ischemic events, future research should assess whether increasing the aspirin dosing frequency may be clinically relevant in selected individuals with increased platelet turnover.

Moreover, physiological platelet agonist interplay appears to trigger signal-dependent TxA₂ synthesis in CAD patients on aspirin therapy. This may in part contribute to the clinical benefit of dual antiplatelet therapy targeting an alternative platelet activation

pathway. The importance and variability of this phenomenon will have to be studied in large clinical trials. Better understanding of physiological and pathological platelet activation mechanisms is an important step to ensure appropriate antiplatelet treatment in all CAD patients.

Acknowledgments

We wish to acknowledge the technical assistance of our laboratory technician, Edmond Sia, as well as the assistance of our research nurse, Céline Groulx.

The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology.³⁰

References

1. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86.
2. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation*. 2000;101:1206-1218.
3. Bracey AW, Grigore AM, Nussmeier NA. Impact of Platelet Testing on Presurgical Screening and Implications for Cardiac and Noncardiac Surgical Procedures. *Am J Cardiol*. 2006;98:25N-32N.
4. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:133-144.
5. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005;122:379-391.
6. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7:241-246.
7. Evangelista V, Manarini S, Di Santo A, Capone ML, Ricciotti E, Di Francesco L, Tacconelli S, Sacchetti A, D'Angelo S, Scilimati A, Sciulli MG, Patrignani P. De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res*. 2006;98:593-595.
8. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol*. 1991;68:11B-15B.
9. Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2004;110:e489-493.
10. Mani H, Luxembourg B, Klaffling C, Erbe M, Lindhoff-Last E. Use of native or platelet count adjusted platelet rich plasma for platelet aggregation measurements. *J Clin Pathol*. 2005;58:747-750.
11. Riondino S, Trifiro E, Principessa L, Mascioletti S, Di Renzo L, Gaudio C, Biasucci LM, Crea F, Pulcinelli FM. Lack of biological relevance of platelet

- cyclooxygenase-2 dependent thromboxane A₂ production. *Thromb Res.* 2008;122:359-365.
12. Cornelissen J, Kirtland S, Lim E, Goddard M, Bellm S, Sheridan K, Large S, Vuylsteke A. Biological efficacy of low against medium dose aspirin regimen after coronary surgery: analysis of platelet function. *Thromb Haemost.* 2006;95:476-482.
 13. Meen O, Brosstad F, Khiabani H, Gjertsen E, Lauritsen ME, Pedersen TM, Bjornsen S, Schjelderup NM, Ameln W, Ng EC, Wettergreen M, Siddique SP, Erikssen G. No case of COX-1-related aspirin resistance found in 289 patients with symptoms of stable CHD remitted for coronary angiography. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68:185-191.
 14. Marea AO, Curtin RJ, Dooley M, Conroy RM, Crean P, Cox D, Fitzgerald DJ. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1258-1263.
 15. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J.* 2007;153:175-181.
 16. Lordkipanidzé 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;28:1702-1708.
 17. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1980-1987.
 18. Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis DA, Diodati JG. Aspirin resistance : Truth or dare. *Pharmacol Ther.* 2006;112:733-743.
 19. Rocca B, Secchiero P, Ciabattini G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, Melloni E, Maggiano N, Zauli G, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *PNAS.* 2002;99:7634-7639.
 20. Kranzhofer R, Ruef J. Aspirin resistance in coronary artery disease is correlated to elevated markers for oxidative stress but not to the expression of cyclooxygenase (COX) 1/2, a novel COX-1 polymorphism or the PlA(1/2) polymorphism. *Platelets.* 2006;17:163-169.

21. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schror K, Hohlfeld T. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation*. 2003;108:542-547.
22. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, Delao T, Bergeron AL, Dong JF, Kleiman NS. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost*. 2007;5:490-496.
23. Lordkipanidzé M, Diodati JG, Turgeon J, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C. Platelet count, not oxidative stress, may contribute to inadequate platelet inhibition by aspirin. *Int J Cardiol*. 2009:doi:10.1016/j.ijcard.2009.1001.1037.
24. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikan M, Tellez A, DeLao T, Granada JF, Dong JF, Kleiman NS, Lev EI. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:743-749.
25. Vilahur G, Choi BG, Zafar MU, Viles-Gonzalez JF, Vorchheimer DA, Fuster V, Badimon JJ. Normalization of platelet reactivity in clopidogrel-treated subjects. *J Thromb Haemost*. 2007;5:82-90.
26. Perneby C, Wallen NH, Rooney C, Fitzgerald D, Hjemdahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thromb Haemost*. 2006;95:652-658.
27. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:s17-24.
28. Muir AR, Patterson C, McMullin MF, McKeown PP. Assessment of aspirin resistance varies on a temporal basis in patients with ischaemic heart disease. *Heart*. 2009;95:1225-1229.
29. 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;167:1593-1599.
30. Coats AJ. Ethical authorship and publishing. *Int J Cardiol*. 2009;131:149-150.

Table 1 : Participant characteristics

Characteristic	Normal response to aspirin	Unusual response to aspirin
	n = 10	n = 1
<i>Demographics and medical history</i>		
Age (years)	61 ± 11	51
Male gender	9 (90%)	1
Body-mass index (kg/m ²)	27.8 ± 4.3	32.8
Positive family history	7 (70%)	0
Prior myocardial infarction	8 (80%)	1
Prior unstable angina	4 (40%)	0
Prior revascularization	10 (100%)	0
Stable angina	3 (30%)	0
Hypertension	9 (90%)	1
Dyslipidemia	10 (100%)	1
Diabetes	2 (20%)	0
Prior stroke or transient ischemic event	1 (10%)	0
Peripheral artery disease	1 (10%)	0
<i>Hematological parameters</i>		
Platelet count (10 ⁹ /L)	245 ± 72	313
Mean platelet volume (fL)	8.9 ± 1.0	8.6
Hemoglobin (g/L)	141 ± 9	142
Hematocrit	0.415 ± 0.027	0.401

Concurrent medications

Angiotensin-converting enzyme inhibitors	5 (50%)	1
Angiotensin receptor blocker	3 (30%)	0
β -blockers	8 (80%)	1
Diuretics	4 (40%)	0
Cholesterol lowering therapy	10 (100%)	1
Calcium channel blockers	2 (20%)	0
Nitrates	1 (10%)	0

Figure 34 : Platelet cyclooxygenase inhibition by aspirin as assessed by

A) Plasma TxB_2 concentration

B) Arachidonic acid-induced light transmission aggregometry

Presented as mean and standard deviation in participants with normal aspirin response profile (●) and with dissimilar response profile (■).

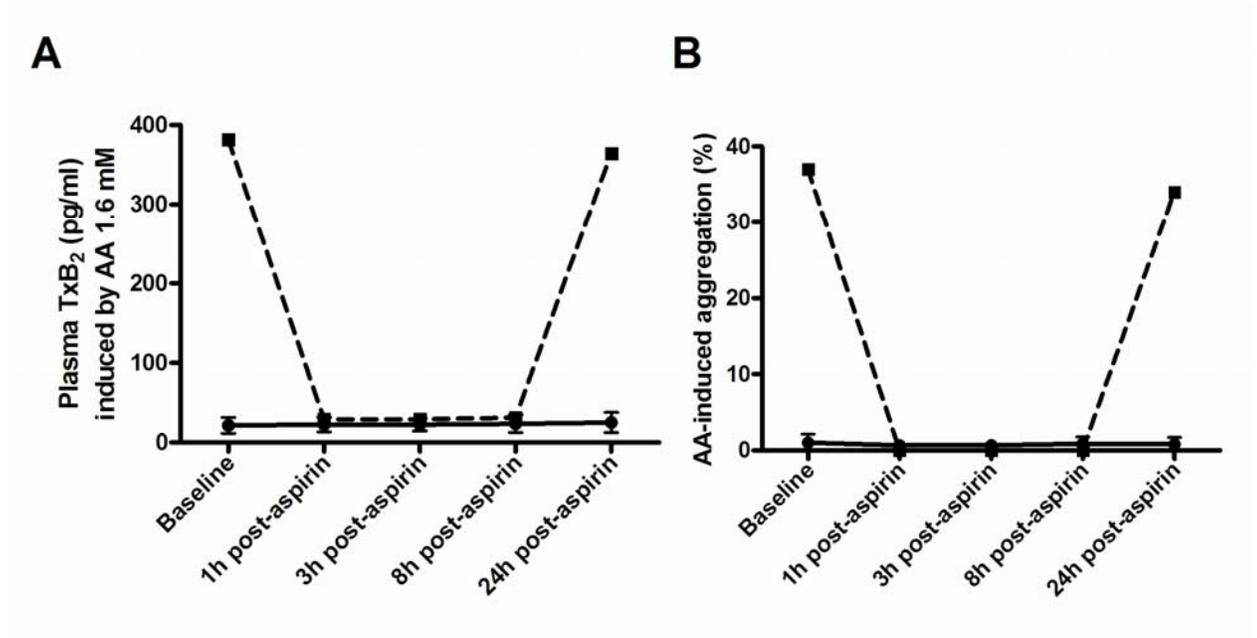


Figure 35 : Platelet cyclooxygenase-independent aggregation as assessed by

A) ADP 2 μM

B) Epinephrine 2 μM

C) Collagen 1 $\mu\text{g/ml}$

D) ADP 20 μM

E) Epinephrine 20 μM

F) Collagen 5 $\mu\text{g/ml}$

Presented as median and interquartile range in participants with normal aspirin response profile (●) and with dissimilar response profile (■).

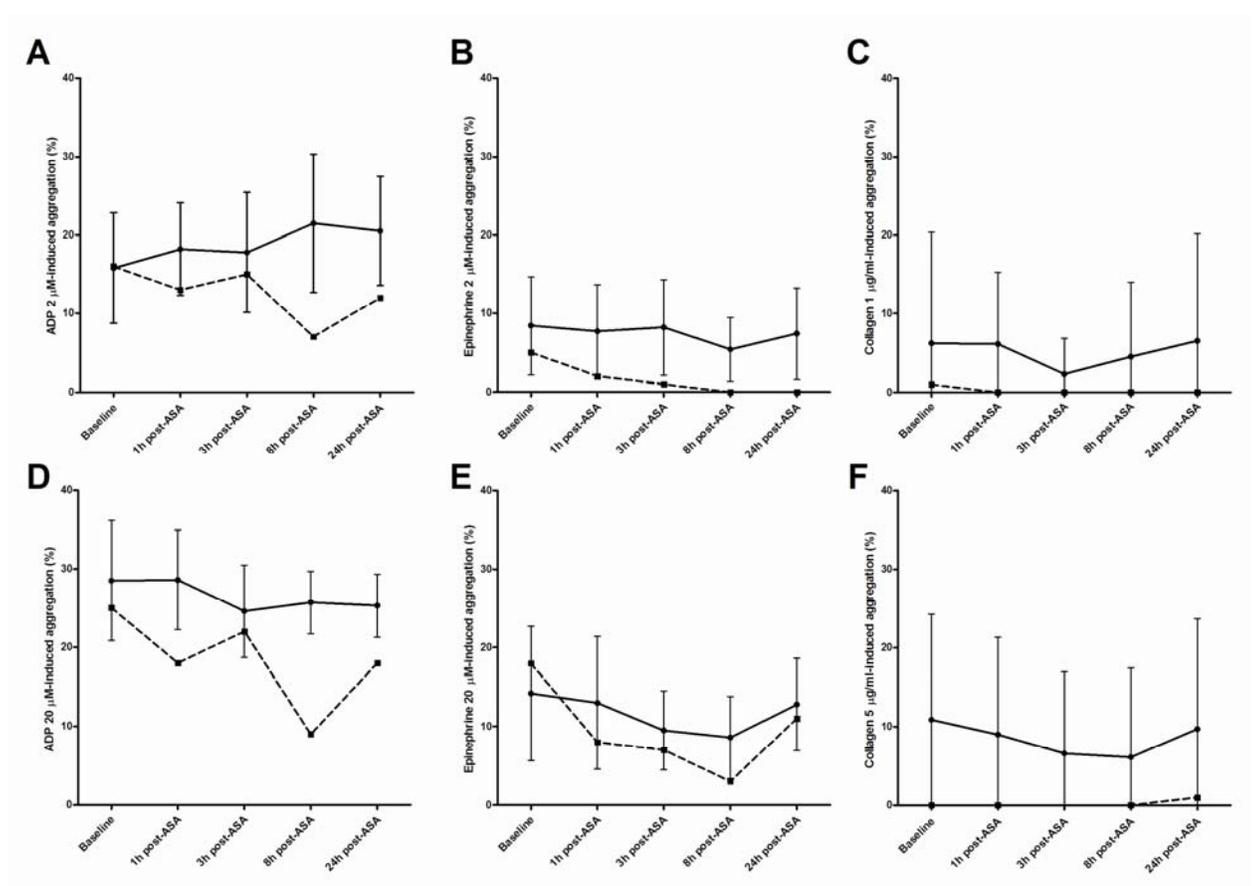
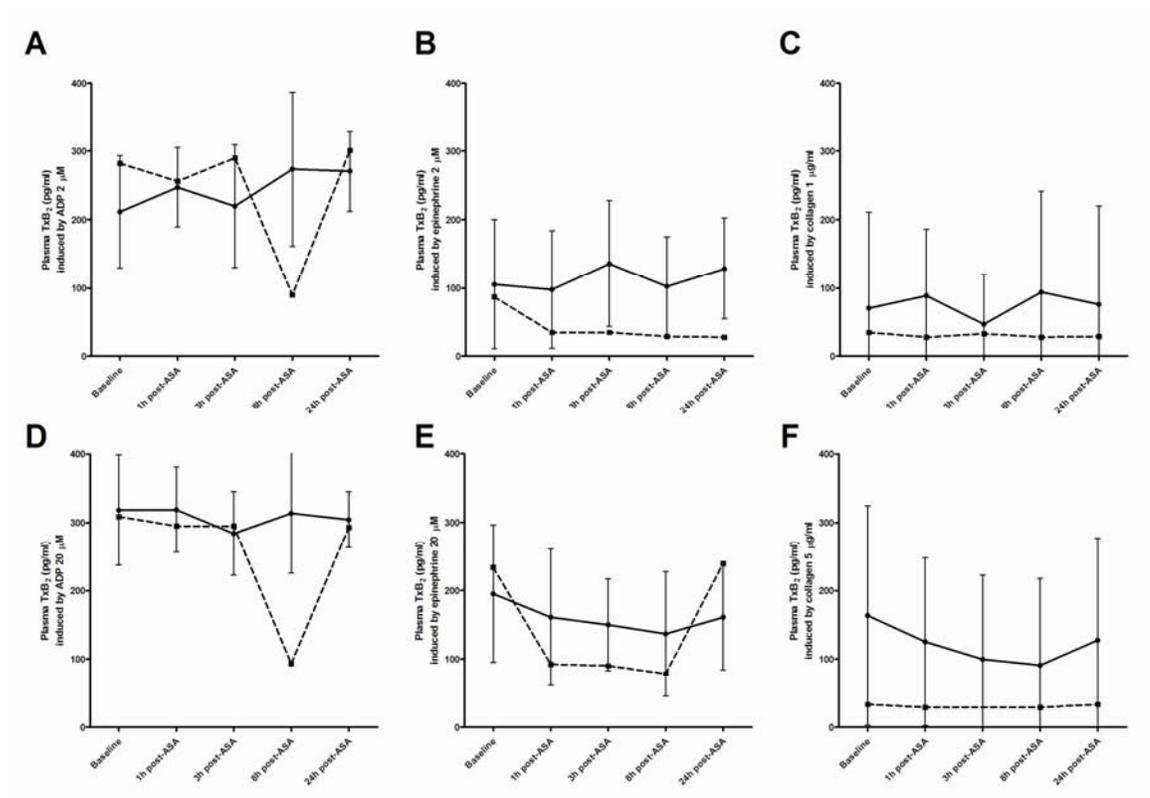


Figure 36 : Platelet TxB_2 formation following cyclooxygenase-independent aggregation induced by

- A) ADP 2 μM
- B) Epinephrine 2 μM
- C) Collagen 1 $\mu\text{g/ml}$
- D) ADP 20 μM
- E) Epinephrine 20 μM
- F) Collagen 5 $\mu\text{g/ml}$

Presented as median and interquartile range in participants with normal aspirin response profile (●) and with dissimilar response profile (■).



Chapitre 8 : Clinical predictiveness of six major platelet function tests used to assess aspirin response in patients with stable coronary artery disease

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG

Soumis à *American Heart Journal*

2009

Clinical predictiveness of six major platelet function tests used to assess aspirin response in patients with stable coronary artery disease

Marie Lordkipanidzé est le principal auteur de cet article.

Contribution : Marie Lordkipanidzé a participé à la conception et au design de l'étude, au recrutement des sujets, à l'analyse et l'interprétation des résultats, à la rédaction de l'ébauche du manuscrit ainsi qu'à sa révision en réponse aux commentaires des coauteurs et sera responsable des corrections lors de la révision par les pairs du journal visé.

Abstract

Background: We sought to evaluate the clinical usefulness of six major platelet function tests to predict the occurrence of major adverse cardiovascular and cerebrovascular events (MACCE) in patients with stable aspirin-treated coronary artery disease.

Methods: Three-year clinical follow-up was completed in 198 subjects with stable coronary artery disease receiving daily aspirin therapy (≥ 80 mg). Platelet responsiveness to aspirin was assessed at baseline by: Light transmission aggregometry after stimulation with either 1) 1.6 mM of arachidonic acid, or 2) adenosine diphosphate (5, 10, and 20 μ M); 3) whole blood aggregometry in response to 1.6 mM of arachidonic acid; 4) PFA-100[®]; 5) VerifyNow Aspirin[®]; and 6) urinary 11-dehydro-thromboxane B₂ concentrations.

Results: MACCE occurred in 30 subjects over 3 years, translating into an event rate of 5.1% per year. The risk of developing MACCE was not associated with aspirin resistance, as assessed by either platelet function assay. Multiple forward stepwise logistic regression analysis identified 3 predictors of MACCE. The presence of persistent angina increased the risk of MACCE by 4.4 (1.6 – 12.3, $p=0.005$), the presence of heart failure increased the risk by 7.9 (2.5 – 25.1, $p<0.0001$) and discontinuation of aspirin therapy by 60.8 (10.2 – 363, $p<0.0001$).

Conclusion: The different platelet function assays, although able to segregate subjects into categories of responsiveness to aspirin, display little clinical usefulness in predicting the occurrence of MACCE in stable coronary artery disease patients on daily aspirin therapy, while discontinuation of aspirin therapy appears to be an important predictor of MACCE.

The benefit of regular aspirin administration in patients with cardiovascular diseases is well established, as it reduces the risk of stroke, myocardial infarction, or death by about a quarter.^{1, 2} Nevertheless, variability in platelet responsiveness to aspirin has led several investigators to question the efficacy of aspirin, particularly as individuals with uninhibited platelet aggregation despite daily aspirin administration have been shown to present an increased risk of major adverse cardiovascular and cerebrovascular events (MACCE).³ Whether this risk is modifiable remains a matter of debate, but platelet function testing was said to hold the promise of individualizing antiplatelet therapy as a function of each patient's specific needs.⁴ However, to identify patients with inadequate platelet response to aspirin, often referred to as "aspirin resistance", accurate and clinically meaningful assessment of platelet function is required.

We have previously reported platelet function assays to lack agreement in detecting platelet responsiveness to aspirin.⁵ In 201 patients suffering from stable coronary artery disease (CAD), we have found that the prevalence of inadequate platelet response to aspirin varied from 2.8% to 59.5%, and was assay-dependent with poor inter-assay correlation.⁵ Moreover, we found little to no agreement among assays to identify patients with inadequate platelet response to aspirin.⁵ Therefore, the clinical usefulness of platelet function testing was open for debate, as correctly highlighted by Cattaneo in the accompanying editorial to our paper.⁶

Hence, we present the 3-year clinical follow-up to determine the clinical usefulness of six major platelet function tests to predict the occurrence of MACCE in stable aspirin-treated CAD patients.

Methods

The methodology of the parent study has been published.⁵ Briefly, 201 consecutive patients with stable CAD (diagnosis based on a positive stress test or angiographically documented coronary artery stenosis) were enrolled in this study from the outpatient cardiology clinic of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Canada, from June 2005 to March 2006. All patients had received daily aspirin therapy (≥ 80 mg daily) for at least 1 month. Exclusion criteria were the presence of an acute coronary syndrome or

revascularization within the last 6 months; concurrent ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID, including COX-2 selective anti-inflammatory drugs), clopidogrel, ticlopidine, dipyridamole, warfarin, or acenocoumarol; self-reported use of non-prescription NSAID or drugs containing aspirin in the 10 days preceding enrolment; major surgical procedure within 1 month of enrolment; platelet count outside the 100 to $450 \times 10^9/L$ range; hematocrit $< 25\%$ or hemoglobin < 100 g/L; and chronic renal failure requiring dialysis. This study complies with the Declaration of Helsinki, was approved by the local Scientific and Ethics Review Board. All patients gave written informed consent for the parent study. Consent to participate to the follow-up study was sought verbally and was documented by the research nurse conducting the interview, in accordance with the recommendation of the Ethics Review Board.

Platelet aggregation assessment

Light transmission aggregometry

Platelet aggregation was assessed in platelet-rich plasma at 37°C by light transmission aggregometry (LTA). Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation of citrated whole blood for 10 minutes at 1000 rpm and adjusted to 250 to $450 \times 10^9/L$ with platelet-poor plasma (obtained by centrifugation of the remaining blood for 10 minutes at room temperature at 3000 rpm) if needed. Aggregation was measured with a ChronoLog Aggregometer (540 model, Pennsylvania, USA) and was expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline after the addition of 1.6 mM arachidonic acid (AA), using platelet-poor plasma as reference. Subjects having residual AA-induced platelet aggregation $\geq 20\%$ despite daily aspirin therapy were considered aspirin resistant.

Adenosine diphosphate (ADP; Sigma Aldrich, Ontario, Canada) was also used as an agonist (LTA_{ADP} ; 5 , 10 , and 20 μM). Subjects having residual ADP-induced platelet aggregation $\geq 70\%$ despite daily aspirin therapy were considered aspirin resistant.

Whole blood aggregometry

Whole blood aggregometry (WBA) was measured in response to 1.6 mM AA, using a ChronoLog Aggregometer (560 model, Pennsylvania, USA). Subjects presenting with

residual AA-induced impedance $\geq 3 \Omega$ despite daily aspirin therapy were considered aspirin resistant.

Platelet function analyzer (PFA-100[®])

The cartridge containing collagen and epinephrine (CEPI) was used to assess platelet function by PFA-100[®] (Dade Behring, Illinois, USA). Subjects were considered aspirin resistant if their closure time was in the normal range (< 193 seconds) despite aspirin treatment.

VerifyNow Aspirin[®]

The VerifyNow Aspirin[®] point-of-care system (Accumetrics, California, USA) was used to evaluate platelet response to aspirin in response to AA in whole blood. Subjects for whom the assay reported a result ≥ 550 Aspirin Reaction Units (ARU) despite aspirin treatment were considered aspirin resistant.

Urinary 11-dehydro-thromboxane B₂ (dTxB₂) measurement

Urinary dTxB₂ concentrations were measured using an enzyme immunoassay kit (11-dehydro-thromboxane B₂ EIA Kit, Cayman Chemical, Michigan, USA), and normalized for urinary creatinine concentrations. Subjects presenting dTxB₂ levels ≥ 67.9 ng/mmol of creatinine were considered aspirin resistant.

Endpoints and definitions

The primary outcome of this study was the occurrence of MACCE, defined as a composite of the first occurrence of death, myocardial infarction or unstable angina, stroke or transient ischemic event. The secondary endpoint was a composite of MACCE and revascularization. The diagnosis of events was made by the treating physician. Revascularization was defined as planned or emergent percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass grafting.

Clinical follow-up

All patients enrolled in the parent study were approached by telephone to take part in this follow-up study, 3 years after platelet function testing. All consenting subjects were

questioned about their health during the 3 previous years by an experienced research nurse unaware of platelet function results. All medical files were reviewed to confirm the occurrence of MACCE; if hospitalization took place in a different institution, all relevant files were requested, including the discharge summaries, documented medical interventions and outcomes. Change in antiplatelet medication was assessed. Patients were asked whether they omitted more than one dose of antiplatelet medications per week; self-reported omission of more than one dose of antiplatelet medications per week constituted poor compliance.

Power calculation and statistical analysis

Sample size was determined for the parent study, and included 201 subjects.⁵ Assuming that 5% of all patients would suffer from MACCE, we calculated that 200 subjects would allow for 80% power ($\beta=0.2$) and 5% error ($\alpha=0.05$) to detect an odds ratio of at least 2.5 to suffer from MACCE in aspirin resistant subjects (PASS 2002, NCSS 2004, Statistical software, UT, USA).

Continuous variables are presented as means \pm standard deviation and categorical variables are presented as frequencies and percentages. The risk of suffering of MACCE was calculated by the Fisher exact test, with aspirin resistance status by different assays as independent variables. Forward stepwise multiple logistic regression analysis was conducted to determine the clinical predictors of MACCE; independent variables included age, gender, current smoking, regular physical exercise, platelet count, mean platelet volume, hematocrit, haemoglobin, white blood cell count, body-mass index, fasting glucose, glycated haemoglobin, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, C-reactive protein, serum creatinine, family history of CAD, prior myocardial infarction, unstable angina, stroke or revascularization, stable angina, extent of CAD, left ventricular ejection fraction, heart failure, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, peripheral artery disease, self-reported compliance at follow-up and aspirin response status by the different platelet function assays. A two-sided p-value < 0.05 was considered significant. Analyses were performed with SPSS 16.0 for Windows (SPSS Institute, Illinois, USA).

Results

The results of the parent study have been previously published.^{5, 7} A complete follow-up was available for 198 participants of the parent study (98.5%). The baseline characteristics of participating subjects are presented in **Table 2**. Of the 198 subjects initially on aspirin, 19 subjects had discontinued aspirin therapy at follow-up. Of these, 8 were on alternative antiplatelet or anticoagulant therapy and 11 discontinued all antiplatelet or anticoagulant drugs. The remaining 179 participants continued aspirin therapy. Approximately half of subjects on 325 mg of aspirin at enrolment had been switched to 80 mg by their treating cardiologist during follow-up; that resulted in 147 subjects receiving 80 mg of aspirin daily and 32 subjects prescribed 325 mg daily at follow-up, vs. 108 subjects on 80 mg of aspirin daily and 71 subjects on 325 mg daily at enrolment ($p < 0.0001$). Self-reported compliance was $>80\%$ in 171 subjects, whereas 8 subjects (4%) admitted omitting more than one dose of aspirin per week.

Platelet function data was available in 197 subjects with AA-induced LTA and WBA. ADP-induced LTA results were available in 181 subjects with 5 μM , 170 with 10 μM , and 175 with 20 μM . Platelet aggregation results were obtained by PFA-100[®] in 198 subjects, and by VerifyNow Aspirin[®] in 192 subjects. Urinary dTxB₂ was available in 198 subjects.

Identification of inadequate platelet response to aspirin

Of the 198 participants available for follow-up, inadequate platelet response to aspirin (or aspirin resistance) had been identified in 8 subjects (4%) by LTA_{AA}, in 19 subjects (11%) by LTA_{ADP 5 μM} , in 31 subjects (18%) by LTA_{ADP 10 μM} , in 90 subjects (51%) by LTA_{ADP 20 μM} , 35 subjects (18%) by WBA, 117 subjects (59%) by PFA-100[®], in 13 subjects (7%) by VerifyNow Aspirin[®] and in 46 subjects (23%) by urinary dTxB₂.

Clinical outcomes

Clinical outcomes are reported in **Table 3**. If a subject suffered more than one event (e.g. myocardial infarction followed by death), all events were recorded, but only the first occurrence was included in the analysis. Over 3 years of follow-up, 30 subjects

incurred at least one MACCE, translating into an annual event rate of 5.1% (**Table 3**). If the need for revascularization was included, 33 subjects suffered at least one event (annual rate of 5.6%).

Major adverse cardiovascular and cerebrovascular event risk as a function of response to aspirin

The association between the occurrence of MACCE \pm revascularization and the status of aspirin responsiveness was assessed by the Fisher exact test, and is presented in **Figure 37**. The risk of suffering a MACCE was not significantly associated with aspirin resistance, regardless of the assay used (odds ratios between 0.46 and 1.89, all not statistically significant). The inclusion of revascularization did not modify the association (odds ratios between 0.54 and 1.99, all not statistically significant).

Predictors of major adverse cardiovascular and cerebrovascular events

Multiple forward stepwise logistic regression analysis identified 3 predictors of MACCE. The presence of persistent angina increased the risk of MACCE by 4.4 (1.6 – 12.3, $p=0.005$), the presence of heart failure increased the risk by 7.9 (2.5 – 25.1, $p<0.0001$) and discontinuation of aspirin therapy by 60.8 (10.2 – 362, $p<0.0001$). It is interesting to note that in patients who received an alternative antiplatelet or anticoagulant treatment upon aspirin discontinuation, the risk of MACCE was not significantly different from aspirin compliant subjects (OR=2.3 (0.4 – 13.0, $p=0.342$)) and self-reported non compliance with aspirin therapy was not associated with increased risk of MACCE (OR=1.02 (0.08 – 12.4, $p=0.989$)). The status of aspirin responsiveness, by any of the platelet function assays considered, did not reach sufficient significance for inclusion in the stepwise analysis. Forcing the resistance status by either platelet function assay into the logistic model on top of the 3 predictive parameters did not significantly modify their predictiveness; resistance status remained unproductive of MACCE.

Discussion

This prospective comparison of 6 major platelet function assays in stable CAD patients addresses an important question: does aspirin resistance, defined as lack of

pharmacological effect on platelet COX-1, or high on-treatment platelet reactivity, regardless of the platelet activation pathway studied, predict the occurrence of MACCE.⁶ Our results suggest that neither COX-specific nor COX-independent platelet function assays are of particular clinical benefit. Indeed, while 5.1% of patients per year experienced a MACCE, our study concludes with 80% power that none of the platelet function assays studied predicted a clinically significant increase in risk of such events. On the other hand, discontinuation of aspirin therapy was the strongest predictor of MACCE in our population, consistent with the essential role of aspirin in the secondary prevention of ischemic events.

Few studies have analyzed the clinical impact of platelet function testing in aspirin-treated stable CAD patients. Among the first studies published, the often cited article by Gum *et al.* reported that aspirin resistance, as defined by AA- and ADP-induced LTA was found in 5.2% of patients and independently predicted major adverse outcomes at 1.8 years in 326 stable CAD patients.⁸ However, a correction to this article stated that the actual prevalence of aspirin resistance was 2.8%, and in view of the low prevalence of aspirin resistance, the difference in major adverse events was not statistically significant.⁹ Nevertheless, multivariate analyses suggested that aspirin resistance was an independent predictor of adverse events.⁹ The most convincing evidence that poorly inhibited platelet function in aspirin-treated CAD patients could relate to recurrent ischemic events relied on urinary dTxB₂ measurements. Eikelboom and colleagues have reported that increasing concentrations of dTxB₂ (a stable metabolite of TxA₂ and a marker of platelet activation) were associated with an increased risk of MACCE.^{10, 11} A number of studies have concentrated on PFA-100[®] as a predictor for MACCE, with conflicting results,¹²⁻¹⁶ while others have evaluated and suggested that VerifyNow Aspirin[®] was a useful tool for predicting events.^{17, 18} When pooling these studies together in meta-analyses, aspirin resistance, regardless of the assay used to detect it, was shown to discernibly increase the risk of MACCE.^{3, 19-21} However, these analyses were limited by significant study heterogeneity, most likely introduced by the different platelet function assays included and definitions used.^{5, 22} Also, most studies entered a small number of patients, were retrospective in nature, and relied on a single assay of platelet function to assess platelet response to aspirin. Therefore, the need for a prospective head-to-head comparison of

platelet function assays in patients treated with aspirin to determine which is most suitable for prediction of recurrent cardiovascular events remained unfulfilled.

Our study questions the clinical relevance of **routine** platelet function testing for aspirin responsiveness in stable CAD patients. Indeed, while the different platelet function assays may segregate subjects into categories of aspirin responsiveness, the identification of patients with insufficiently inhibited platelet aggregation by aspirin according to these assays appears unrelated to the occurrence of MACCE. Thus, the clinical usefulness of the various platelet function assays in predicting the risk of MACCE appears of limited value in a population of all-comer stable CAD patients on daily aspirin therapy.

The greatest predictor of MACCE in our patient cohort was discontinuation of aspirin therapy. This is consistent with prior systematic reviews and meta-analyses which have highlighted the hazards of discontinuing or not adhering to aspirin therapy.^{23, 24} Indeed, it was found that up to 10.2% of acute coronary syndromes follow interruption of aspirin therapy.²⁴ Moreover, a meta-analysis of data from 50 297 patients treated with daily aspirin showed a three-fold increase in the risk of major adverse cardiac events in patients stopping aspirin therapy, a risk which was increased 89 times in patients having undergone percutaneous coronary intervention.²³ This finding is of crucial importance in the light of the statistics of long-term adherence with cardiovascular drugs; after 12 months of therapy, approximately one fifth of patients admit not taking aspirin as prescribed.²⁵ Thus, discontinuation of aspirin therapy appears to be a frequent problem, of much greater impact than aspirin resistance may be on the future risk of MACCE in stable CAD patients.

Limitations

As this is a follow-up study, the sample size was not determined for this analysis but for the parent study.⁵ As such, this study has a power of 80% to detect an odds ratio ≥ 2.5 . Thus, we can not preclude a smaller effect of aspirin resistance determination by platelet function assays on the occurrence of MACCE, although such increase in risk may be of limited clinical significance. Moreover, previous meta-analyses have suggested that aspirin resistance increases the risk of MACCE by a factor of 3.8,^{3, 20} which was well within the power of this study to detect. The inclusion of stable CAD patients with well controlled traditional risk factors as opposed to patients with an acute ischemic event may explain the

low (5.1%) risk of adverse cardiovascular events in our study; further studies are required to determine the usefulness of platelet function testing to determine the efficacy of aspirin in acute settings.

Conclusion

In conclusion, our results do not support routine platelet function testing to determine platelet responsiveness to aspirin in patients suffering from stable CAD. The information provided by COX-specific vs. COX-independent platelet function assays leads to a similar conclusion, that regardless of the platelet function assays used to determine aspirin responsiveness, the most important determinant of MACCE is whether the patient actually takes aspirin daily, as recommended. Perhaps the best individualization of care relies on comprehensive patient counselling by multiple healthcare professionals to ensure patient endorsement of the importance of compliance with medical therapy.

Acknowledgments

We wish to acknowledge the assistance of our research nurse, Céline Groulx, for expert patient follow-up.

References

1. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86.
2. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373:1849-1860.
3. 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;167:1593-1599.
4. Ang L, Mahmud E. Monitoring oral antiplatelet therapy: is it justified? *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008;2:485-496.
5. Lordkipanidzé 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;28:1702-1708.
6. Cattaneo M. Laboratory detection of 'aspirin resistance': what test should we use (if any)? *Eur Heart J*. 2007;28:1673-1675.
7. Lordkipanidzé M, Diodati JG, Turgeon J, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C. Platelet count, not oxidative stress, may contribute to inadequate platelet inhibition by aspirin. *Int J Cardiol*. 2009;doi:10.1016/j.ijcard.2009.1001.1037.
8. 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. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:961-965.
9. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. Erratum to: A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease (vol 41, pg 961, 2003) *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1918.

10. 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;105:1650-1655.
11. Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, Bhatt DL, Steg PG, Montalescot G, Johnston SC, Steinhubl SR, Mak KH, Easton JD, Hamm C, Hu T, Fox KA, Topol EJ. Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. *Circulation*. 2008;118:1705-1712.
12. Marcucci R, Panizza R, Antonucci E, Gori AM, Fedi S, Giglioli C, Valente S, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol*. 2006;98:1156-1159.
13. Gulmez O, Yildirim A, Kaynar G, Konas D, Aydinalp A, Ertan C, Ozin B, Muderrisoglu H. Effects of persistent platelet reactivity despite aspirin therapy on cardiac troponin I and creatine kinase-MB levels after elective percutaneous coronary interventions. *J Thromb Thrombolysis*. 2008;25:239-246.
14. Pamukcu B, Oflaz H, Onur I, Oncul A, Ozcan M, Umman B, Mercanoglu F, Meric M, Nisanci Y. Clinical relevance of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease: a prospective follow-up study (PROSPECTAR). *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18:187-192.
15. Christiaens L, Ragot S, Mergy J, Allal J, Macchi L. Major clinical vascular events and aspirin-resistance status as determined by the PFA-100 method among patients with stable coronary artery disease: a prospective study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19:235-239.
16. Addad F, Chakroun T, Abderazek F, Ben-Farhat M, Hamdi S, Dridi Z, Gamra H, Hassine M, Samama MM, Elalamy I. Response variability to aspirin and one-year prediction of vascular events in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2009;doi: 10.1007/s11239-11009-10335-11231.
17. 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;43:1122-1126.

18. Chen WH, Cheng X, Lee PY, Ng W, Kwok JY, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2007;120:631-635.
19. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, de Gaetano G, Cerletti C. PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a meta-analysis of 19 studies comprising 3,003 patients. *Thromb Haemost.* 2008;99:1129-1131.
20. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2008;336:195-198.
21. Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF. Residual platelet reactivity on aspirin therapy and recurrent cardiovascular events--a meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2008;128:166-171.
22. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, Gesheff T, Chaganti SK, Etherington A, Tantry US. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation.* 2007;115:3156-3164.
23. Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Agostoni P, Abbate A, Fusaro M, Burzotta F, Testa L, Sheiban I, Sangiorgi G. A systematic review and meta-analysis on the hazards of discontinuing or not adhering to aspirin among 50 279 patients at risk for coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2006;27:2667-2674.
24. Burger W, Chemnitz JM, Kneissl GD, Rucker G. Low-dose aspirin for secondary cardiovascular prevention - cardiovascular risks after its perioperative withdrawal versus bleeding risks with its continuation - review and meta-analysis. *J Intern Med.* 2005;257:399-414.
25. Kulkarni SP, Alexander KP, Lytle B, Heiss G, Peterson ED. Long-term adherence with cardiovascular drug regimens. *Am Heart J.* 2006;151:185-191.

Table 2 : Participant characteristics at enrolment

Characteristic	n=198
<i>Medical history and demographics</i>	
Age (years)	66.5 ± 10.5
Male gender	154 (78%)
BMI (kg/m ²)	27.2 ± 4.4
Extent of coronary artery disease	
Unknown	49 (25%)
1 vessel	44 (22%)
2 vessel	44 (22%)
3 vessel	46 (23%)
Left main	15 (8%)
Left ventricular ejection fraction (%)	52 ± 11
Cigarette smoking	29 (15%)
Positive family history	102 (52%)
Prior myocardial infarction	123 (62%)
Prior unstable angina	84 (42%)
Prior revascularization	136 (69%)
Stable angina	82 (41%)
Heart failure	24 (12%)
Hypertension	144 (73%)
Dyslipidemia	157 (79%)

Diabetes	33 (22%)
Prior stroke or TIA	7 (4%)
Peripheral artery disease	26 (13%)

Biochemical and hematological parameters

Hemoglobin (g/L)	144 ± 13
Hematocrit	0.422 ± 0.036
Platelet count (10 ⁹ /L)	228 ± 57
Fasting glucose (mmol/L)	6.0 ± 2.0
HbA _{1c} (%)	6.4 ± 0.9
Total cholesterol (mmol/L)	4.12 ± 0.79
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.35 ± 0.35
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.06 ± 0.64
Triglycerides (mmol/L)	1.6 ± 1.0
Serum creatinine (μmol/L)	88 ± 26
CRP (mg/L)	3.6 ± 2.8

Continuous variables are presented as mean ± standard deviation and categorical variables as N (%).

Table 3 : Clinical events

Parameter	n	Annual rate
MACCE	30	5.1%
Death	11	1.9%
Myocardial infarction	12	2.0%
Unstable angina	6	1.0%
Stroke or TIA	6	1.3%
with sequelae	2	0.3%
MACCE + revascularization	33	5.6%
Percutaneous coronary intervention	12	2.0%
Coronary artery bypass grafting	3	0.5%

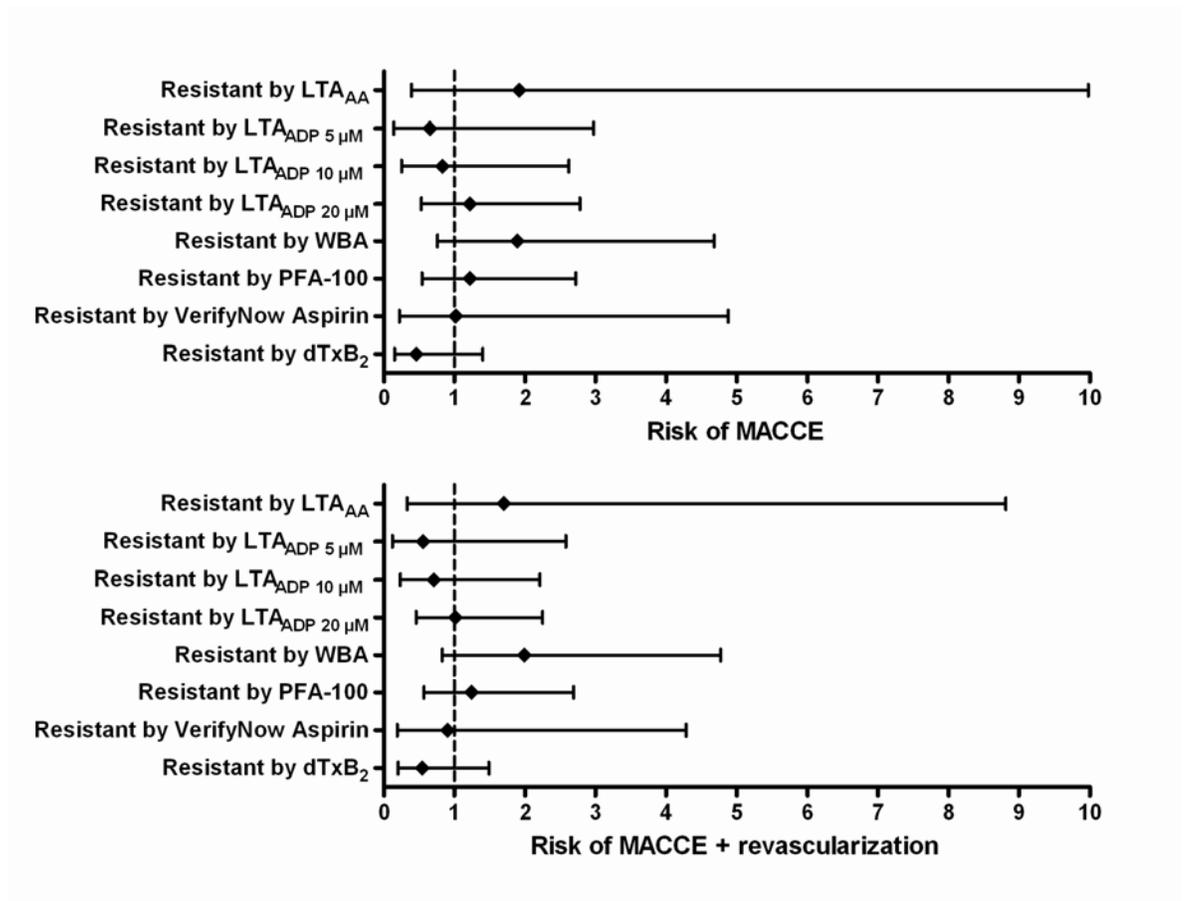
MACCE defined as the first occurrence of death, myocardial infarction, unstable angina, stroke or TIA.

MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular events; TIA: transient ischemic event

Figure 37 : Major adverse cardiovascular and cerebrovascular event ± revascularization risk as a function of aspirin response

The lozenges represent the odds ratio point estimates and whiskers represent 95% confidence intervals.

AA: arachidonic acid; ADP: adenosine diphosphate; dTxB₂: 11-dehydro-thromboxane B₂; LTA: light transmission aggregometry; MACCE: major adverse cardiovascular and cerebrovascular events; WBA: whole blood aggregometry



Chapitre 9 : Evidence of a pharmacological rebound following discontinuation of clopidogrel therapy in patients with stable coronary artery disease

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C

Soumis à *European Heart Journal*

2010

Evidence of a pharmacological rebound following discontinuation of clopidogrel therapy in patients with stable coronary artery disease

Marie Lordkipanidzé est le principal auteur de cet article.

Contribution : Marie Lordkipanidzé a participé à la conception et au design de l'étude, au recrutement des sujets, à la collecte de données, à l'analyse et l'interprétation des résultats, à la rédaction de l'ébauche du manuscrit ainsi qu'à sa révision en réponse aux commentaires des coauteurs et sera responsable des corrections lors de la révision par les pairs du journal visé.

Abstract

Aims: Clopidogrel discontinuation is associated with increased incidence of ischemic events, which may signal a pharmacological rebound. We evaluated the impact of clopidogrel discontinuation on platelet function.

Methods and Results: Platelet aggregation was measured by light transmission aggregometry (LTA) in response to ADP 0.5, 1, 1.5, 2.5, 5, and 10 μM and by VerifyNow[®] P2Y₁₂, in 37 clinically stable coronary artery disease patients scheduled to discontinue clopidogrel treatment, and 37 clinically stable coronary artery disease patients not taking clopidogrel. Platelet function was assessed the day before clopidogrel cessation and 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days after. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was also assessed the day before clopidogrel cessation and 1, 3, 7, and 28 days after.

VerifyNow[®] P2Y₁₂ did not detect any rebound platelet activity, but ADP-induced LTA showed sensitization of the platelet in response to ADP accompanied by a significant increase in platelet aggregation, particularly at low ADP levels, suggestive of platelet hypersensitivity. Rebound platelet activity was detectable 7 days after clopidogrel cessation, and remained higher than in controls 28 days after discontinuation. No evidence of a parallel increase in inflammatory markers was detected.

Conclusion: Heightened platelet sensitization to ADP (rebound) as a consequence of chronic clopidogrel administration may partially explain the recrudescence of ischemic events following clopidogrel discontinuation in otherwise stable coronary artery patients.

KEYWORDS: clopidogrel; coronary artery disease; pharmacology; platelets; rebound.

Introduction

A number of recent reports have shown interruption of clopidogrel treatment to precede acute coronary syndromes and stent thromboses, thus emphasizing the importance of antiplatelet therapy in the prevention of ischemic events in patients suffering from coronary artery disease (CAD).¹⁻⁹ This abundance of retrospective and observational data has prompted the American Heart Association, the American College of Cardiology, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, the American College of Surgeons and the American Dental Association to issue an advisory statement stressing the hazards of premature antiplatelet drug discontinuation and promoting sustained antiplatelet treatment, especially following stent implantation.¹⁰

The clustering of events in the weeks following clopidogrel cessation has led certain authors to suggest that clopidogrel withdrawal engenders a rebound hyperthrombotic state, possibly due to increased platelet activity.^{8, 11} In support of this hypothesis, several small studies reported heightened platelet aggregability in patients discontinuing clopidogrel; this could lead to increased thrombus formation and increased inflammatory biomarkers, the latter potentially promoting plaque erosion and activation of the coagulation cascade.¹²⁻¹⁴ However, the absence of a clopidogrel-free control group in most studies does not allow differentiation between return to basal levels vs. heightened platelet and inflammatory activity. Accordingly, a number of observational studies suggested that susceptibility towards ischemic events upon clopidogrel discontinuation was due to the loss of the protective antithrombotic effects of clopidogrel, and not to rebound platelet activity.^{9, 15-19}

Therefore, this study sought to investigate the impact of planned clopidogrel withdrawal in clinically stable CAD patients, with regards to: (1) platelet aggregation; (2) platelet sensitivity to the activation pathway inhibited by clopidogrel, namely the adenosine diphosphate (ADP)-sensitive pathway; and (3) the inflammatory state, assessed by high sensitivity C-reactive protein (hsCRP).

Methods

This study was approved by the Scientific and Ethics Review Board of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, and all participants gave written informed consent. The study design was registered at ClinicalTrials.gov under the identifier NCT00670943.

Participant selection

Thirty-seven consecutive patients suffering from stable CAD scheduled to discontinue clopidogrel therapy at least one month after bare metal stent and 6 months after drug-eluting stent implantation, and 37 consecutive clopidogrel-free stable CAD patients were enrolled from the outpatient cardiology clinic of Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Canada, from January 2008 to February 2009. Exclusion criteria included: acute coronary syndromes within 3 months of enrolment; concurrent ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (including COX-2 selective anti-inflammatory drugs), ticlopidine, dipyridamole, warfarin or acenocoumarol; major surgical procedure within 1 month of enrolment; platelet count outside the 100 to $450 \times 10^9/L$ range; hematocrit $< 25\%$ or hemoglobin < 100 g/L; and chronic renal failure requiring dialysis; and for control participants, clopidogrel therapy within one year of enrolment.

Study protocol

In patients discontinuing clopidogrel, platelet function was assessed at seven different time points: the day before clopidogrel cessation, 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days following clopidogrel withdrawal. In parallel, assessment of hsCRP, an inflammatory marker, was conducted the day before clopidogrel cessation, 1, 3, 7, and 28 days following clopidogrel withdrawal. In clopidogrel-free patients, a single measurement of platelet function and hsCRP was conducted serving as a control value.

Platelet function testing

Light transmission aggregometry

To avoid spontaneous activation and platelet aggregation as a result of sampling, the first 2 mL of blood were discarded; then, free-flowing blood was drawn into 3.5-mL evacuated tubes containing 3.2% sodium citrate. Platelet aggregation was assessed by light transmission aggregometry (LTA) in platelet-rich plasma (PRP) at 37°C. PRP was obtained by centrifugation of citrated whole blood for 10 minutes at 1000 rpm (89 g). Platelet-poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation of the remaining blood for 10 minutes at room temperature at 3000 rpm (805 g). Platelet count in the PRP varied from 250 to 450 x 10⁹/L. No adjustment of platelet count with PPP was performed.²⁰ Aggregation was measured with a ChronoLog Aggregometer (540 model, Havertown, PA, USA) after stimulation with 0.5, 1, 1.5, 2.5, 5, and 10 µM of ADP (ChronoLog, Havertown, PA, USA), using PPP as reference. All analyses were performed by a single highly trained and experienced technician. The results are reported as final platelet aggregation, corresponding to the aggregation level found 5 minutes after stimulation with ADP.^{21, 22}

VerifyNow[®] P2Y₁₂

The VerifyNow[®] P2Y₁₂ (Accumetrics, San Diego, CA, USA) point-of-care system is based on turbidimetric optical detection of platelet aggregation in whole blood. Blood was drawn into evacuated tubes containing 3.2% sodium citrate provided by the manufacturer. After withdrawal, whole blood was transferred into cartridges containing a combination of 20 µM of ADP and 22 nM of PGE₁ in the first channel, and thrombin receptor activating peptide (TRAP) 3.4 µM in the second channel. As aggregation occurs, the system converts luminosity transmittance results into P2Y₁₂ Reaction Units (PRU). Results are reported as either platelet aggregation, measured in PRU, or estimated platelet inhibition based on TRAP-induced platelet aggregation as a theoretical baseline.

Measurement of hsCRP

Blood was drawn into evacuated tubes containing a clot activator and gel for serum separation (BD Vacutainer, Mississauga, Canada). Serum samples were batched and kept frozen at -20°C until assaying with the CRP (Latex) HS assay (Roche Diagnostics Ltd, Mannheim, Germany). The detection limit of the assay is 0.1 mg/L and extends to 300 mg/L.

Sample size calculation and statistical analysis

Sample size was determined *a priori* to detect a 10% difference in platelet aggregation levels (assuming 15% standard deviation) between patients discontinuing clopidogrel and clopidogrel-free participants at any time point. To maintain a power of 80% ($\beta = 0.2$) and significance level of 5% ($\alpha = 0.05$), 37 subjects were required in each group (PASS 2002, NCSS 2004 Statistical software, Kaysville, UT, USA).

Variables were analyzed for a normal distribution with the Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables are presented as mean (standard deviation) if normally-distributed, median (interquartile range) otherwise; categorical variables are presented as counts (percentages). Continuous variables were compared using the Student T-test or the non-parametric Mann-Whitney U test, and categorical variables were compared using the χ^2 or Fisher exact test, when applicable. A Mann-Whitney U test was used to compare levels of platelet aggregation or inflammatory biomarkers at each time point with that of controls. A repeated-measures ANOVA was used to determine the influence of time on platelet and inflammatory parameters. A two-sided p-value < 0.05 was considered significant. All analyses were performed using SPSS 16.0 for Windows (SPSS Institute, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Results

Participant characteristics

Thirty-seven consecutive CAD patients scheduled to discontinue clopidogrel therapy were recruited, along with 37 consecutive CAD patients not taking clopidogrel. Participants scheduled to discontinue clopidogrel were more likely to have undergone revascularization in the past, were less likely to present with persistent stable angina and received more frequently β -blockers than their counterparts not on clopidogrel therapy (**Table 4**). All other characteristics were similar between groups.

While the aspirin dose administered did not statistically differ between groups, numerically more subjects on dual antiplatelet therapy received 80 mg of aspirin daily compared with CAD patients requiring aspirin alone (**Table 4**). Clopidogrel had been initiated a median of 555 days (ranging from 200 to 2280 days) before the treating cardiologist recommended its discontinuation. No event occurred to any patient during the 28 days following cessation.

Main findings

Platelet aggregation assessment by light transmission aggregometry

Recovery of platelet function assessed by LTA appeared to be linear for the first 7 days following clopidogrel discontinuation until it reached a plateau (**Figure 38**). Increasing ADP concentrations led to higher levels of platelet aggregation, but the profile of response was similar at the different ADP concentrations (**Figure 38**). At low ADP concentrations (0.5 – 2.5 μ M) consistent with physiological levels, platelet aggregation in patients discontinuing clopidogrel was significantly higher than that of clopidogrel-free controls at day 7, and remained higher than in controls 28 days after clopidogrel discontinuation. At supraphysiological ADP levels (5 and 10 μ M), platelet aggregation was not significantly different from that of controls from day 3 following clopidogrel cessation (**Figure 38**).

Platelet aggregation assessment by VerifyNow[®] P2Y₁₂

Platelet function assessed by the VerifyNow[®] P2Y₁₂ assay also showed a linear recovery of platelet function within 7 days of clopidogrel discontinuation, at which time a plateau was reached (**Figure 39 A**). Platelet aggregation in participants discontinuing clopidogrel was not significantly different from that observed in clopidogrel-free controls as of 7 days following clopidogrel cessation. The inhibition of platelet aggregation as reported by the assay was comparable between participants discontinuing clopidogrel therapy and clopidogrel-free controls by day 3 following clopidogrel discontinuation (**Figure 39 B**).

Exploratory findings

Platelet aggregability to ADP

Concentration-response curves were drawn (**Figure 40**). Qualitative analysis of concentration-response curves confirms that platelets of patients discontinuing clopidogrel achieved higher levels of platelet aggregation than those of controls beginning day 7 following clopidogrel discontinuation, and suggests the presence of an increased sensitivity to ADP after clopidogrel cessation. Indeed, curves from day 7 to day 28 lay consistently above the control curve, while at day 3, only lower levels of ADP (0.5 – 2.5 μ M) elicited platelet aggregation levels higher than in controls. ADP concentration required to induce 50% of maximal aggregation (EC_{50}) could not be reliably assessed because a plateau maximal effect was not reached.

Inflammatory markers

The progression of inflammatory markers was assessed through hsCRP (**Figure 41**). Although median levels of hsCRP were higher 28 days after (1.44 [0.70 ; 2.35] mg/L) than before discontinuation of clopidogrel (1.21 [0.80 ; 2.08] mg/L), the difference was not statistically significant by repeated-measures ANOVA between time points, nor when compared with clopidogrel-free participants (1.40 [0.73 ; 2.40] mg/L).

Discussion

The present results reveal increased platelet aggregability in the 28 days following clopidogrel discontinuation, a phenomenon more pronounced when low concentrations of ADP, consistent with physiological levels, are used to assess platelet function. The effect is blunted with higher ADP concentrations, suggesting that supraphysiological stimulation of ADP receptors is then achieved. Moreover, the rebound effect appears to be platelet-specific, as no increase beyond return to normal was detected in inflammatory marker measurements.

Despite extensive epidemiological data suggesting a link between clopidogrel discontinuation and the recrudescence of thrombotic events in otherwise stable CAD patients, the mechanisms underlying this phenomenon remain largely unknown.²³ Nonetheless, disruption of clopidogrel therapy has been consistently associated with an increased risk of thrombotic complications, including stent thromboses and recurrent acute coronary syndromes.¹⁻⁹ Whether this was solely due to the withdrawal of the protective antithrombotic effect of clopidogrel, or to a rebound in platelet activity leading to a temporary state of hyperaggregability, has elicited debate among investigators.^{8,18}

Platelet function recovery

Little pharmacological data is available on the recovery of platelet function following clopidogrel discontinuation, and most studies are limited to a week-long follow-up period. In 10 healthy volunteers, Weber *et al.* reported a gradual increase in platelet function assessed by LTA, and complete recovery of ADP-induced platelet aggregation within 7 days of clopidogrel cessation.¹² The investigators highlighted that a tendency towards increased expression of activation markers in platelets was observable 3 and 5 days after the last clopidogrel dose, suggesting a transient hyperactivity of newly formed platelets.¹² However, longer term (> 7 days) follow-up was not performed in this study, and no direct evidence of rebound platelet function was reported.¹² Angiolillo and

collaborators have extended the observation of platelet recovery after clopidogrel withdrawal to 54 patients with concomitant diabetes and CAD.¹³ Assessment of ADP-induced LTA and inflammatory markers before and 1 month after clopidogrel withdrawal led the investigators to conclude that clopidogrel discontinuation was associated with an increase in platelet and inflammatory biomarkers in diabetic patients, although the absence of a clopidogrel-free group precluded the ascertainment of a rebound in platelet and inflammatory activity.¹³ A similar study on 98 non-diabetic stented patients also reported an increase in platelet activation markers, but not in inflammatory markers.¹⁴ However, as its predecessor, this study lacked a clopidogrel-free comparator group. Price *et al.* studied platelet function assessed by the VerifyNow[®] P2Y₁₂ assay up to 5 days following clopidogrel discontinuation in 45 healthy volunteers.¹⁶ The majority of participants recovered baseline platelet activity by 3 days following discontinuation, with no evidence of rebound platelet activity.¹⁶ In a separate study, Price and Teirstein followed platelet recovery for 8 days following a single loading dose of clopidogrel in 14 healthy volunteers.¹⁷ No evidence of higher than baseline platelet activity was observed.

Our study is the first to report on platelet recovery following clopidogrel discontinuation as a function of time over 28 days, and to compare ADP-induced platelet aggregation to that obtained from clopidogrel-free stable CAD patients. Thus, we were able to confirm that recovery of platelet activity to levels seen in clopidogrel-free CAD patients requires 3 to 7 days. Our study also shows sensitization of the platelet ADP-dependent activation pathway, as evidenced by a decrease in the ADP concentration required to induce platelet aggregation as well as by an increase in the maximal level of platelet aggregation achieved in patients having discontinued clopidogrel > 7 days. This state of hyperaggregability appears to last through 28 days of clopidogrel discontinuation, and possibly longer, as our study did not assess platelet aggregation beyond that time. It is important to note that this rebound phenomenon was more apparent at lower than higher ADP concentrations. Previously, investigators have suggested that ADP in low, almost physiological, concentrations (1 – 3 μ M) may be more discriminating in the detection of

clopidogrel effect than higher ADP concentration^{20, 24}. It may also explain why a rebound effect was not detected by the VerifyNow[®] P2Y₁₂ assay, which incorporates ADP in a concentration of 20 μ M.

Assessment of inflammation

Although we noted an increase in inflammatory biomarkers following clopidogrel discontinuation, it did not reach statistical significance and was not different from levels obtained from clopidogrel-free CAD patients. Unlike Angiolillo *et al.* who reported a significant increase in hsCRP in patients with concomitant CAD and diabetes discontinuing clopidogrel, but similar to Wykrzykowska *et al.* who saw no such increase in non-diabetic CAD patients, our results suggest that clopidogrel withdrawal does not cause a rebound in inflammation in stable non-diabetic CAD patients.^{13, 14} The impact of clopidogrel discontinuation on inflammatory markers may be more substantial in diabetic patients, as their pathophysiological and inflammatory burdens differ; this hypothesis requires specific testing.

Potential mechanisms of platelet rebound

A pharmacological rebound effect often entails compensatory cellular mechanisms, such as up-regulation of receptor number or activity, or enhanced coupling with downstream molecular mediators in response to chronic pharmacological antagonism.²³ These mechanisms were long believed not to apply to platelets, which as a result from a lack of nucleus were believed to be unable to synthesize proteins in sufficient amounts to modulate their expression after initial platelet formation by megakaryocytes.²⁵ Recent reports have challenged this dogma, with the discovery of mRNA coding for a multitude of proteins and of signal-dependent protein synthesis in stimulated platelets.²⁶⁻²⁹ Whether this phenomenon occurs during clopidogrel therapy, and explains the increase in platelet sensitivity to physiological ADP concentrations following clopidogrel discontinuation, merits further research.

Another potential explanation may reside within the megakaryocyte. This polynucleated cell may be responsible for the formation of highly reactive platelets during clopidogrel therapy, to counterbalance chronic inhibition of the P2Y₁₂ ADP receptor by clopidogrel. As long as clopidogrel is administered, it may be sufficient to blunt such platelet hyperactivity, which only becomes apparent as clopidogrel is withdrawn. The time delay of 7 days before detection of higher than control platelet aggregation seen in our study would be consistent with a role of platelet turnover in this phenomenon, but requires further investigation.³⁰

Limitations

Our sample size was determined *a priori* to be able to detect a significant difference in platelet aggregation. Therefore, hsCRP assessment was exploratory in our study, which may not have been sufficiently powered to detect the increase in hsCRP as statistically significant. Therefore, hsCRP results need confirmation in larger trials.

We have selected ADP-induced LTA and the VerifyNow[®] P2Y₁₂ assay to monitor platelet function. We have previously reported on the lack of agreement between various platelet function assays in determining platelet responsiveness to clopidogrel.³¹ Therefore, the results of this study may not extend to other platelet function assays.

We have tested platelet aggregation in clopidogrel-free controls at a single time point. Repeated-testing, as for clopidogrel-discontinuing participants, could have explored the interday variability in platelet response to clopidogrel. However, although a worthy objective, this was not an aim of the current study.

We have limited our follow-up to 28 days. We can make no inferences beyond this 28-day period after clopidogrel discontinuation. Therefore, our results may explain the recrudescence of ischemic events shortly following clopidogrel cessation, but they cannot be used to suggest mechanisms of ischemic events occurring over 28 days after clopidogrel withdrawal.

Conclusion

No prospective study has yet established a causal link between rebound platelet activity following clopidogrel withdrawal and increased risk of adverse ischemic events. However, our study demonstrates that platelets display higher sensitivity to ADP and are more prone to aggregation in the weeks following clopidogrel discontinuation. The concordance between rebound in platelet activity, as shown in this study, and occurrence of deleterious ischemic events in time, as reported by a number of epidemiologic studies, suggests a potential causal link. A number of trials are underway to confirm whether clopidogrel discontinuation leads to enhanced platelet activity, including the Platelet Activity After Clopidogrel Termination (PACT; ClinicalTrials.gov identifier NCT00619073) trial, which will determine in a double blind, placebo-controlled and cross-over design, whether clopidogrel discontinuation is associated with increased platelet activity in healthy volunteers. Also, the Abrupt Versus Tapered Interruption of Chronic Clopidogrel Therapy After DES Implantation (ISAR-CAUTION; ClinicalTrials.gov identifier NCT00640679) study will test whether tapering of clopidogrel will be beneficial in avoiding platelet activation in comparison with abrupt withdrawal. As our understanding of platelet function recovery following clopidogrel discontinuation evolves, revision of current clinical practice may be required to prevent platelet activation rebound, and perhaps reduce the risk of acute ischemic complications in patients discontinuing clopidogrel therapy.

Funding

This work was supported by a grant from the Fonds de recherche en cardiologie de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Marie Lordkipanidzé is a recipient of the Fonds de recherche en santé du Québec PhD training award.

Acknowledgments

We wish to acknowledge the technical assistance of our laboratory technician, Edmond Sia, as well as the assistance of our research nurse, Céline Groulx, for blood sampling and platelet function testing. We are thankful to Dr H el ene Ammann for hsCRP measurements.

Conflict of Interest

M.L. and D.A.P. have nothing to declare. J.G.D. and C.P. have received research grants support and honoraria from Sanofi-Aventis; J.G.D. has served as consultant (advisory board) for Eli Lilly; E.S. has received research grants support from Cordis and Sanofi-Aventis, and acted as consultant and/or speaker for Cordis Canada, Boston Scientific, Sanofi-Aventis, Eli Lilly and GSK.

References

1. Collet JP, Montalescot G, Blanchet B, Tanguy ML, Golmard JL, Choussat R, Beygui F, Payot L, Vignolles N, Metzger JP, Thomas D. Impact of prior use or recent withdrawal of oral antiplatelet agents on acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004;110:2361-2367.
2. Jeremias A, Sylvia B, Bridges J, Kirtane AJ, Bigelow B, Pinto DS, Ho KK, Cohen DJ, Garcia LA, Cutlip DE, Carrozza JP, Jr. Stent thrombosis after successful sirolimus-eluting stent implantation. *Circulation*. 2004;109:1930-1932.
3. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, Airoidi F, Chieffo A, Montorfano M, Carlino M, Michev I, Corvaja N, Briguori C, Gerckens U, Grube E, Colombo A. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA*. 2005;293:2126-2130.
4. Park DW, Park SW, Park KH, Lee BK, Kim YH, Lee CW, Hong MK, Kim JJ, Park SJ. Frequency of and risk factors for stent thrombosis after drug-eluting stent implantation during long-term follow-up. *Am J Cardiol*. 2006;98:352-356.
5. Ong AT, McFadden EP, Regar E, de Jaegere PP, van Domburg RT, Serruys PW. Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:2088-2092.
6. Spertus JA, Kettelkamp R, Vance C, Decker C, Jones PG, Rumsfeld JS, Messenger JC, Khanal S, Peterson ED, Bach RG, Krumholz HM, Cohen DJ. Prevalence, predictors, and outcomes of premature discontinuation of thienopyridine therapy

- after drug-eluting stent placement: results from the PREMIER registry. *Circulation*. 2006;113:2803-2809.
7. Airolidi F, Colombo A, Morici N, Latib A, Cosgrave J, Buellesfeld L, Bonizzoni E, Carlino M, Gerckens U, Godino C, Melzi G, Michev I, Montorfano M, Sangiorgi GM, Qasim A, Chieffo A, Briguori C, Grube E. Incidence and predictors of drug-eluting stent thrombosis during and after discontinuation of thienopyridine treatment. *Circulation*. 2007;116:745-754.
 8. Ho PM, Peterson ED, Wang L, Magid DJ, Fihn SD, Larsen GC, Jesse RA, Rumsfeld JS. Incidence of death and acute myocardial infarction associated with stopping clopidogrel after acute coronary syndrome. *JAMA*. 2008;299:532-539.
 9. van Werkum JW, Heestermans AA, Zomer AC, Kelder JC, Suttorp MJ, Rensing BJ, Koolen JJ, Brueren BR, Dambrink JH, Hautvast RW, Verheugt FW, ten Berg JM. Predictors of coronary stent thrombosis: the Dutch Stent Thrombosis Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1399-1409.
 10. Grines CL, Bonow RO, Casey DE, Jr., Gardner TJ, Lockhart PB, Moliterno DJ, O'Gara P, Whitlow P. Prevention of premature discontinuation of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery stents: a science advisory from the American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, American College of Surgeons, and American Dental Association, with representation from the American College of Physicians. *Circulation*. 2007;115:813-818.
 11. Eisenberg MJ, Richard PR, Libersan D, Filion KB. Safety of short-term

discontinuation of antiplatelet therapy in patients with drug-eluting stents. *Circulation*. 2009;119:1634-1642.

12. Weber AA, Braun M, Hohlfeld T, Schwippert B, Tschöpe D, Schror K. Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52:333-336.
13. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Clopidogrel withdrawal is associated with proinflammatory and prothrombotic effects in patients with diabetes and coronary artery disease. *Diabetes*. 2006;55:780-784.
14. Wykrzykowska JJ, Warnholtz A, de Jaeger P, Curzen N, Oldroyd KG, Collet JP, Ten Berg JM, Rademaker T, Goedhart D, Lissens J, Kint PP, Serruys PW. Effect of clopidogrel discontinuation at 1 year after drug eluting stent placement on soluble CD40L, P-selectin and C-reactive protein levels: DECADES (Discontinuation Effect of Clopidogrel After Drug Eluting Stent): a multicenter, open-label study. *J Thromb Thrombolysis*. 2009:doi: 10.1007/s11239-11009-10354-y.
15. Komatsu T, Tamai Y, Takami H, Yamagata K, Fukuda S, Munakata A. Study for determination of the optimal cessation period of therapy with anti-platelet agents prior to invasive endoscopic procedures. *J Gastroenterol*. 2005;40:698-707.
16. Price MJ, Coleman JL, Steinhubl SR, Wong GB, Cannon CP, Teirstein PS. Onset and offset of platelet inhibition after high-dose clopidogrel loading and standard daily therapy measured by a point-of-care assay in healthy volunteers. *Am J*

Cardiol. 2006;98:681-684.

17. Price MJ, Teirstein PS. Dynamics of platelet functional recovery following a clopidogrel loading dose in healthy volunteers. *Am J Cardiol.* 2008;102:790-795.
18. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2584-2591.
19. Collet JP, Montalescot G, Steg PG, Steinhubl SR, Fox KA, Hu TF, Johnston SC, Hamm CW, Bhatt DL, Topol EJ. Clinical outcomes according to permanent discontinuation of clopidogrel or placebo in the CHARISMA trial. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009;102:485-496.
20. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost.* 2008;6:677-683.
21. Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis DA, Schampaert E, Diodati JG. Insights into the interpretation of light transmission aggregometry for evaluation of platelet aggregation inhibition by clopidogrel. *Thromb Res.* 2009;124:546-553.
22. Labarthe B, Theroux P, Angioi M, Ghitecu M. Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:638-645.
23. Lordkipanidzé M, Diodati JG, Pharand C. Possibility of a rebound phenomenon

following antiplatelet therapy withdrawal: a look at the clinical and pharmacological evidence. *Pharmacol Ther.* 2009;123:178-186.

24. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1980-1987.
25. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost.* 2009;7:241-246.
26. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:133-144.
27. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell.* 2005;122:379-391.
28. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:s17-24.
29. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16:961-966.
30. Vilahur G, Choi BG, Zafar MU, Viles-Gonzalez JF, Vorchheimer DA, Fuster V, Badimon JJ. Normalization of platelet reactivity in clopidogrel-treated subjects. *J Thromb Haemost.* 2007;5:82-90.
31. Lordkipanidzé M, Pharand C, Nguyen TA, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati

JG. Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *Eur Heart J.* 2008;29:2877-2885.

Table 4 : Participant characteristics

Characteristic	Clopidogrel discontinuation (n=37)	Clopidogrel-free controls (n=37)	P
<i>Demographics and medical history</i>			
Age (years)	65.3 (9.3)	65.5 (11.1)	0.95
Male gender	32 (86%)	30 (81%)	0.53
Alcohol use	34 (92%)	31 (84%)	0.57
Current smokers	9 (24%)	5 (14%)	0.24
Regular cardiovascular exercise *	15 (41%)	15 (41%)	1.00
BMI (kg/m ²)	27.3 (3.5)	27.3 (3.7)	0.96
Positive family history	24 (65%)	27 (73%)	0.45
Prior myocardial infarction	22 (59%)	21 (57%)	0.81
Prior unstable angina	15 (41%)	16 (43%)	0.81
Prior revascularization	35 (95%)	29 (78%)	0.04
Number of stents	2 (1 ; 3)	1 (0 ; 2)	0.004
Bare metal stents	1 (0 ; 2)	1 (0 ; 1)	0.435
Drug-eluting stents	0 (0 ; 2)	0 (0 ; 0)	0.001
Stable angina	8 (22%)	18 (49%)	0.02
Heart failure	1 (3%)	4 (11%)	0.17
Hypertension	27 (73%)	33 (89%)	0.08
Dyslipidemia	37 (100%)	37 (100%)	1.00

Diabetes	8 (22%)	5 (14%)	0.36
Prior stroke or TIA	1 (3%)	4 (11%)	0.17

Biochemical and hematological parameters

Hemoglobin (g/L)	141 (12)	140 (12)	0.65
Hematocrit	0.410 (0.037)	0.411 (0.034)	0.91
Platelet count ($10^9/L$)	224 (52)	227 (50)	0.80
Mean platelet volume (fL)	8.6 (1.0)	8.6 (0.9)	0.89
Fasting glucose (mmol/L)	5.1 (4.8 ; 6.0)	5.0 (4.7 ; 5.6)	0.60
HbA _{1c} (%)	5.9 (5.8 ; 6.4)	6.0 (5.8 ; 6.3)	0.92
Total cholesterol (mmol/L)	3.8 (0.8)	4.0 (0.7)	0.27
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.2 (0.3)	1.2 (0.4)	0.40
LDL-cholesterol (mmol/L)	1.9 (0.6)	2.1 (0.6)	0.10
Triglycerides (mmol/L)	1.3 (0.9 ; 1.8)	1.4 (0.8 ; 2.1)	0.66

Concurrent medications

Time from clopidogrel initiation (days)	555 (397 ; 754)	-	-
Aspirin dose			0.09
80 mg per day	36 (97%)	32 (86%)	
325 mg per day	1 (3 %)	5 (14%)	
ACE inhibitors	21 (57%)	20 (54%)	0.82
ARB	7 (19%)	9 (24%)	0.57
β -blockers	35 (95%)	26 (70%)	0.006

Diuretics	7 (19%)	11 (30%)	0.28
Cholesterol lowering therapy	37 (100%)	36 (97%)	0.31
CCB	3 (8%)	8 (22%)	0.10
Long-lasting nitrates	4 (11%)	3 (8%)	0.69
Proton pump inhibitors	9 (24%)	6 (16%)	0.56

Normally distributed continuous variables are presented as mean (standard deviation), non-normally distributed continuous variables as median (25th ; 75th percentiles), and categorical variables as N (%).

ACE: angiotensin-converting enzyme; ARB: angiotensin receptor blocker; BMI: body-mass index; CCB: calcium channel blockers; HbA_{1c}: glycosylated hemoglobin; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; TIA: transient ischemic attack.

* 30-60 minutes of aerobic exercise 3 to 7 times a week

Figure 38 : Platelet aggregation as assessed by light transmission aggregometry in response to increasing concentrations of ADP, as a function of time from clopidogrel discontinuation

In clopidogrel-free participants (■) and in participants scheduled to discontinue clopidogrel (●), data presented as mean with standard deviation. * represents significant difference ($p < 0.05$) as compared with clopidogrel-free participants. D-1 corresponds to the day before clopidogrel cessation, D1 to D28 correspond to 1 to 28 days from clopidogrel cessation.

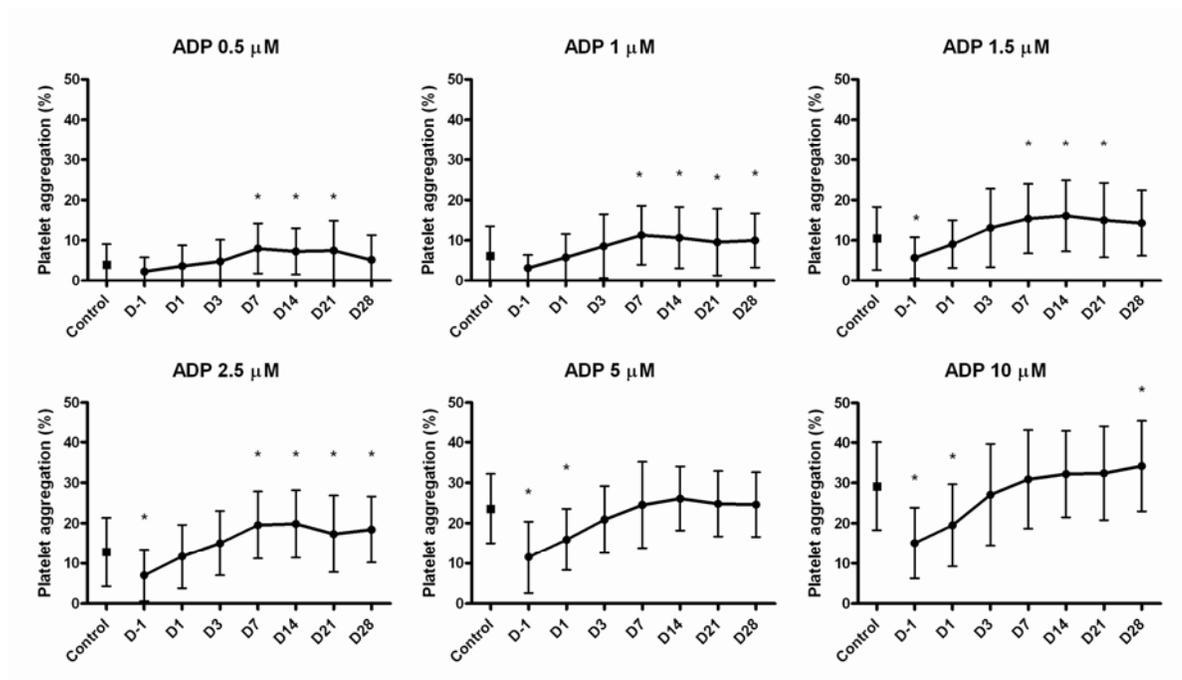


Figure 39 : Platelet aggregation as assessed by the VerifyNow[®] assay as a function of time from clopidogrel discontinuation

A) Assay-reported residual platelet aggregation

B) Assay-reported platelet inhibition

In clopidogrel-free participants (■) and in participants scheduled to discontinue clopidogrel (●), data presented as mean with standard deviation. * represents significant difference ($p < 0.05$) as compared with clopidogrel-free participants. D-1 corresponds to the day before clopidogrel cessation, D1 to D28 correspond to 1 to 28 days from clopidogrel cessation.

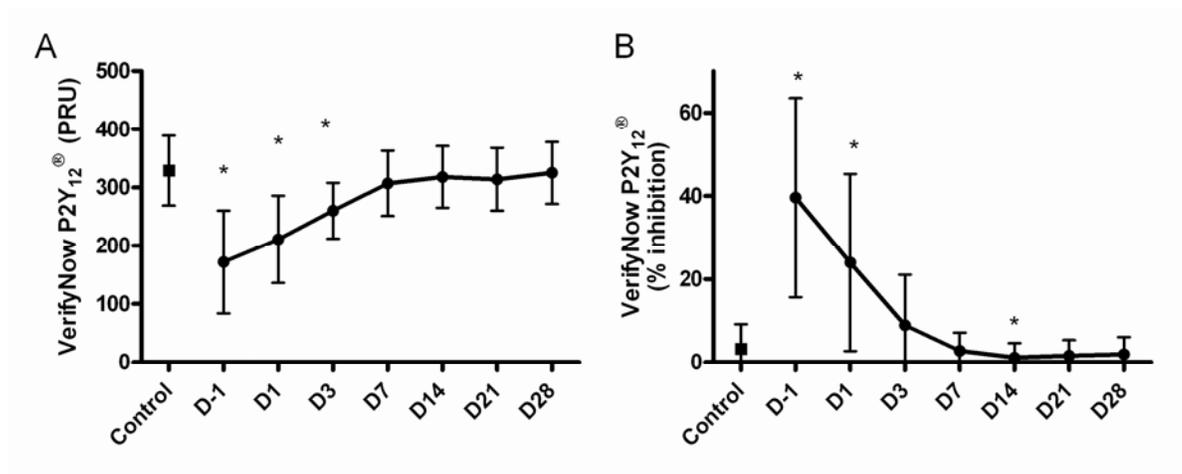


Figure 40 : Concentration-response curves for platelet aggregation, as assessed by light transmission aggregometry

The dotted line represents the concentration-response curve of clopidogrel-free participants. Full curves represent the concentration-response curves of participants discontinuing clopidogrel. D-1 corresponds to the day before clopidogrel cessation, D1 to D28 correspond to 1 to 28 days from clopidogrel cessation.

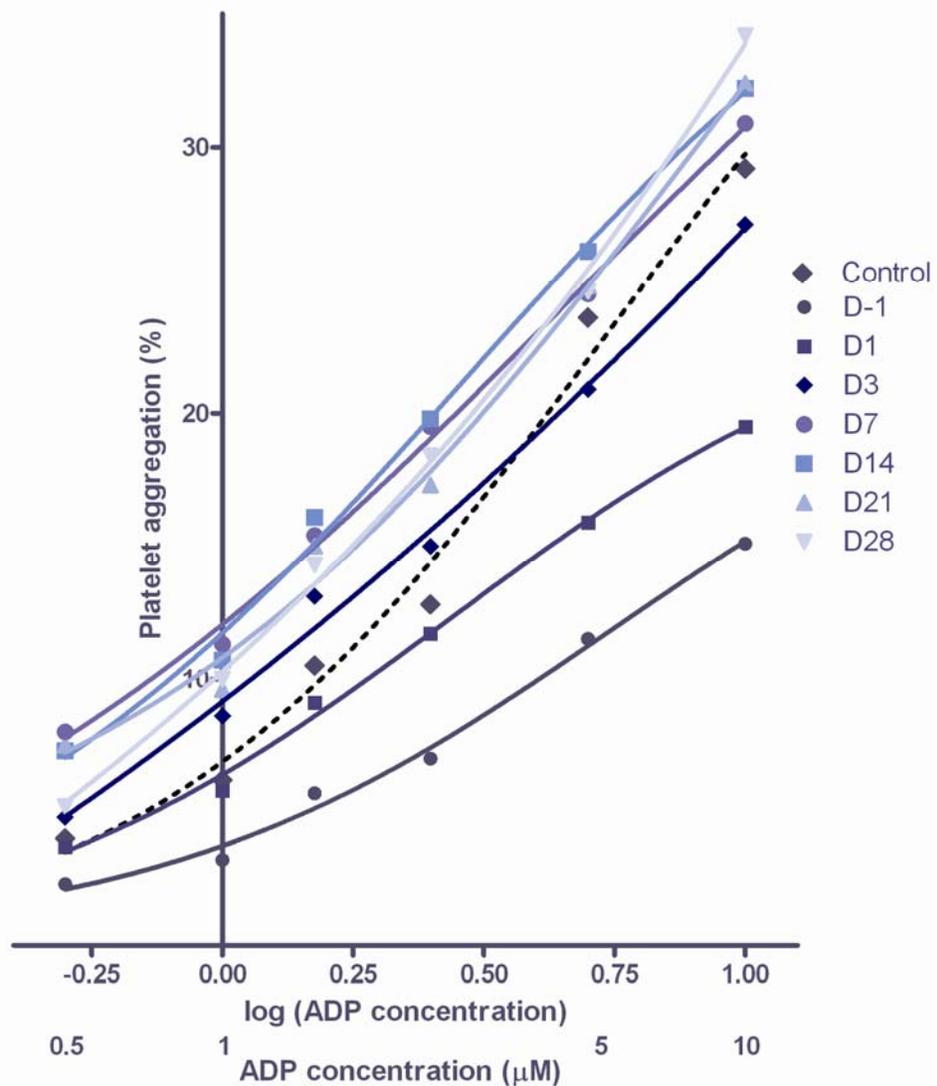
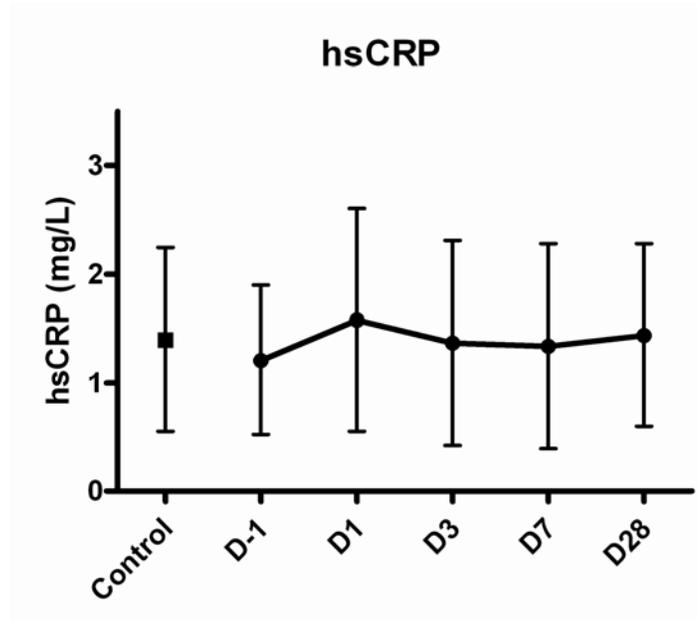


Figure 41 : Assessment of hsCRP as a function of time from clopidogrel discontinuation

In clopidogrel-free participants (■) and in participants scheduled to discontinue clopidogrel (●), data presented as median with interquartile range. D-1 corresponds to the day before clopidogrel cessation, D1 to D28 correspond to 1 to 28 days from clopidogrel cessation.



Chapitre 10 : Discussion

Cette section reprend les accomplissements majeurs de chaque étude présentée dans cette thèse et les place dans l'état actuel des connaissances.

A) Évaluation de la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS lors d'une administration quotidienne standard

Tel que décrit dans le **Chapitre 6**, cette étude visait à évaluer chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable, la stabilité de l'inhibition plaquettaire par l'AAS au cours d'une posologie quotidienne standard.

i) Résultats majeurs

En tout, 11 participants ont été recrutés dans cette étude. Les sujets étaient âgés en moyenne de 60 ± 11 ans (allant de 39 à 73 ans) et la majorité était de sexe masculin (91%). Les sujets présentaient des facteurs de risque classiques de la maladie coronarienne et recevaient des traitements recommandés par les lignes directrices actuelles.

Objectifs spécifiques :

1. Mesurer de façon séquentielle la formation de TxB₂ plasmatique dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.
 - a. Chez tous les sujets sauf un, la formation de TxB₂ plasmatique était inhibée de façon soutenue et uniforme pendant les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS. Aucune différence significative n'a été recensée dans la concentration plasmatique de TxB₂ au cours des 24 heures d'observation.
 - b. Un sujet présentait un profil de réponse significativement différent. Chez ce sujet, l'administration d'AAS se traduisait en une inhibition marquée de la

formation de TxB_2 par les plaquettes dans l'heure qui suivait l'administration d'AAS; ce niveau d'inhibition était maintenu pendant 8 heures, mais la concentration de TxB_2 plasmatique revenait à la normale à 24 heures, soit avant l'administration de la dose suivante d'AAS.

2. Évaluer la capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger par agrégométrie optique en réponse à l'acide arachidonique dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.
 - a. La capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger en réponse à l'acide arachidonique reproduisait le même profil de réponse que la formation de TxB_2 plasmatique. Ainsi, chez tous les sujets sauf un, l'agrégation plaquettaire était inhibée de façon soutenue et uniforme pendant les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS, sans différence significative au cours des 24 heures d'observation.
 - b. Un sujet présentait un profil de réponse significativement différent. Chez ce sujet, l'administration d'AAS se traduisait en une inhibition marquée de l'agrégation plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique dans l'heure qui suivait l'administration d'AAS; ce niveau d'inhibition était maintenu pendant 8 heures, mais l'agrégation plaquettaire revenait à la normale à 24 heures, soit avant l'administration de la dose suivante d'AAS
3. Évaluer la capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger par agrégométrie optique en réponse à des agonistes alternatifs (ADP, épinéphrine et collagène) à faible dose, dont l'effet pourrait nécessiter la synergie avec la formation de TxA_2 plaquettaire, dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.
 - a. Les niveaux d'agrégation plaquettaire aux agonistes alternatifs à faible dose étaient constants pendant les 24 heures suivant l'administration d'AAS.

- b. La concentration de TxB_2 plasmatique induite par l'agrégation en réponse à ces stimuli était significativement plus élevée que celle en réponse à l'acide arachidonique, sans différence significative au cours des 24 heures d'observation.
4. Évaluer la capacité fonctionnelle des plaquettes à agréger par agrégométrie optique en réponse à des agonistes alternatifs (ADP, épinéphrine et collagène) à forte dose, dont l'effet pourrait surpasser l'inhibition de la COX-1 plaquettaire, dans les 24 heures suivant l'administration observée d'AAS.
 - a. Les niveaux absolus d'agrégation plaquettaire aux agonistes alternatifs à forte dose étaient plus élevés qu'à faible dose d'agoniste, mais demeuraient constants pendant les 24 heures suivant l'administration d'AAS.
 - b. Les niveaux absolus de concentration de TxB_2 plasmatique induits par l'agrégation en réponse à ces stimuli étaient significativement plus élevés que ceux en réponse à l'acide arachidonique et aux concentrations plus faibles de ces agonistes, sans différence significative au cours des 24 heures d'observation.

ii) Discussion

Les résultats de cette étude peuvent être séparés en deux volets importants. Premièrement, l'effet antiplaquettaire de l'AAS est soutenu et stable au cours des 24 heures suivant l'administration quotidienne d'AAS chez la grande majorité des sujets. Toutefois, un rétablissement de la capacité de synthèse de TxA_2 et de la réponse fonctionnelle plaquettaire peut être observé dans des cas isolés. Deuxièmement, la stimulation plaquettaire par des agonistes alternatifs (ADP, épinéphrine, collagène), tant à faibles qu'à fortes doses, induit une formation plus importante de TxA_2 que la réponse à l'acide arachidonique. Ceci laisse entrevoir le recours à des voies plaquettaires alternatives ou

accessoires de formation de TxA_2 , ou à la possibilité de régénération de COX-1 active par synthèse protéique activation-dépendante.

a) La récupération de la capacité de synthèse de TxA_2 durant l'administration quotidienne standard d'AAS

Malgré le fait que l'AAS fête ses 110 ans cette année, les débats autour de son efficacité et de sa dose optimale demeurent d'actualité.³¹⁸ La majorité des études effectuées sur la pharmacodynamie de ce médicament remontent aux années 1970-1980. Dès le début des années 1970, alors que la cible pharmacologique de l'AAS était source de discussion, des études démontraient que l'acétylation par l'AAS de protéines intraplaquettaires, dont la COX-1, était permanente; en effet, le profil de réapparition de plaquettes avec des protéines non-acétylées suivait le cycle de régénération plaquettaire, ce qui soutenait l'hypothèse d'une acétylation irréversible des protéines plaquettaires.³¹⁹ La pharmacologie clinique de l'AAS supportait également un effet inhibiteur cumulatif de la fonction plaquettaire par l'administration chronique de faibles doses d'AAS, dont l'ampleur dépendait du taux de régénération plaquettaire.³²⁰ Par ailleurs, ces études démontraient aussi que des doses aussi faibles que 20 à 30 mg d'AAS par jour étaient suffisantes pour une inhibition quasi-totale de la capacité synthétique de TxA_2 par la plaquette.⁶⁹⁻⁷¹ Néanmoins, des études sur les métabolites de la TxA_2 dans l'urine suggéraient que le rétablissement de la capacité synthétique de TxA_2 chez des sujets sains exposés à des doses croissantes d'AAS se faisait à une vitesse variable.⁷⁰ En effet, certains sujets récupéraient complètement leur capacité de formation de TxA_2 dans la journée-même suivant la dernière dose d'AAS.⁷⁰ Nonobstant cette variabilité dans la durée de l'effet antiplaquettaire de l'AAS, des études cliniques d'envergure ont démontré un bénéfice global dans la prévention d'un quart à un tiers d'événements ischémiques aigus lorsque des doses de 50 à 100 mg d'AAS par jour étaient administrées à des sujets à haut risque thrombotique.^{1, 68, 77} Par conséquent, le questionnement sur la persistance de l'effet inhibiteur de l'AAS sur la fonction plaquettaire a longtemps été abandonné.

Un réexamen de la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS a suivi l'émergence dans la littérature scientifique du concept de « résistance à l'AAS », qui renvoie à la notion de variabilité de réponse plaquettaire à l'AAS présenté au **Chapitre 3**. Dès lors, l'élucidation des processus biologiques qui sous-tendent la variabilité de l'effet de l'AAS sur la fonction plaquettaire est devenue le centre d'intérêt d'une multitude de chercheurs. La stabilité de l'effet antiplaquettaire lors d'une administration chronique de faibles doses d'AAS en prévention d'événements ischémiques aigus chez des personnes à haut risque thrombotique a également été ré-analysée.

Tel qu'introduit dans le **Chapitre 3**, Di Minno et collaborateurs ont démontré, dans une étude sur des volontaires sains, que les plaquettes retrouvent une capacité fonctionnelle à produire de la TxA_2 et à agréger en réponse à la stimulation concomitante par 2 agonistes dans les 4 heures qui suivent l'administration de 650 mg d'AAS.⁷³ Ces investigateurs ont aussi démontré que aussi peu que 2,5% de plaquettes avec une COX-1 non-acétylée est suffisant pour induire une agrégation plaquettaire importante en réponse à l'acide arachidonique et au collagène.⁷³ L'explication d'un tel effet reposait sur la notion que de très faibles quantités de TxA_2 sont nécessaires pour amplifier la réponse plaquettaire aux autres stimuli.⁴⁰ Ce concept a été reproduit par Perneby *et al.* qui ont démontré que, en sang complet où les autres éléments peuvent fournir des agonistes supplémentaires, les plaquettes récupèrent une capacité fonctionnelle à agréger en réponse à l'acide arachidonique seul dans les 24 heures suivant l'administration d'AAS chez des volontaires sains et ce, malgré une inhibition significative de la formation de TxA_2 .⁷⁴ Ces résultats intéressants obtenus chez des volontaires sains suggéraient donc qu'un mécanisme similaire pouvait se produire chez des sujets souffrant de maladie coronarienne et pouvait expliquer une partie de la variabilité de la réponse plaquettaire observée auprès de tels patients.

Notre étude auprès de 11 sujets souffrant de maladie coronarienne sous thérapie quotidienne d'AAS répond donc à ce besoin de confirmation de la variabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS au cours des 24 heures d'intervalle normal de l'administration de ce médicament antiplaquettaire. Notre étude démontre que, tant au niveau

pharmacologique qu'au niveau fonctionnel, l'inhibition de la COX-1 plaquettaire est soutenue et stable chez la grande majorité des patients traités. Ce résultat confirme le bénéfice escompté chez la majorité des sujets, tel que démontré dans des études cliniques d'envergure sur l'AAS. Néanmoins, notre étude souligne également que, chez une minorité de patients, la capacité de synthèse de TxA₂ pourrait être rétablie dans les 24 heures qui suivent la prise quotidienne d'AAS et ce, malgré une inhibition initiale profonde de la COX-1 plaquettaire.

Les mécanismes qui pourraient expliquer un tel phénomène sont multiples. Des voies accessoires ou de contournement de la formation de TxA₂ dans la plaquette pourraient être mises à contribution. Elles incluent l'expression inductible de COX-2 dans la plaquette qui pourrait générer de la TxA₂ malgré une COX-1 adéquatement inhibée par les doses d'AAS couramment administrées.^{127, 128, 321} Toutefois, l'expression de COX-2 semble limitée aux jeunes plaquettes réactives formées notamment lors de stress inflammatoire aigu, ce qui ne représentait pas la population incluse dans cette étude. La formation de dérivés non-enzymatiques de l'acide arachidonique par stress oxydatif (isoprostanes) avec une activité biologique similaire à la TxA₂ ne peut également être exclue.^{120, 121, 322} Toutefois, une étude antérieure de notre groupe chez des sujets similaires à ceux enrôlés dans cette étude ne laissait pas supposer que la formation d'isoprostanes soit un mécanisme important dans la variabilité de l'effet antiplaquettaire d'AAS.¹²⁵ La formation de nouvelles plaquettes à partir de mégacaryocytes avec une COX-1 non-inhibée par l'AAS semble donc le mécanisme le plus probable de cette variabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS dans le temps.

Des résultats pertinents à cette discussion proviennent de la littérature sur les sujets souffrant de thrombocytémie essentielle traités à l'aide d'AAS. Cette affection du système sanguin, le plus souvent permanente, est caractérisée par une augmentation du taux de plaquettes au-dessus de 850×10^9 plaquettes par litre de sang, due à une hyperproduction médullaire. Cette maladie offre donc un modèle naturel de régénération plaquettaire accélérée. Les patients souffrant de thrombocytémie essentielle courent un risque plus

élevé de subir un événement ischémique aigu que la population générale.³²³ Pour cette raison, l'AAS est recommandée en prévention primaire et secondaire d'événements thrombotiques chez les patients souffrant de thrombocytémie essentielle.³²⁴ Cependant, aucune étude n'a pour le moment spécifiquement étudié l'efficacité clinique de l'AAS auprès de cette population. Une étude par Dragani et collaborateurs rapporte l'inhibition pharmacologique de la COX-1 par l'administration unique quotidienne d'AAS chez 41 sujets souffrant de thrombocytémie essentielle.³²⁵ Par rapport à des volontaires sains prenant de l'AAS, les sujets souffrant de thrombocytémie essentielle avaient des taux significativement plus élevés de TxB₂ sériques et urinaires 12 heures après la prise de leur comprimé d'AAS.³²⁵ Toutefois, l'ajout *in vitro* de 50 µM d'AAS abolissait la production de TxB₂ dans le sérum des patients souffrant de thrombocytémie essentielle, ce qui suggère que l'AAS est efficace chez ces patients, mais que la proportion de plaquettes circulantes avec une COX-1 non-inhibée est suffisante pour permettre une fonction plaquettaire accentuée, malgré une prise unique quotidienne d'AAS.³²⁵ Les auteurs concluaient qu'un profil de réponse similaire pourrait être observé dans d'autres conditions cliniques caractérisées par un taux de régénération plaquettaire accru, tels le diabète ou la période péri-procédurale lors d'un pontage aorto-coronarien chez les patients souffrant de maladie coronarienne.³²⁵

Des parallèles peuvent être notés avec les résultats de notre étude sur la stabilité de l'effet antiplaquettaire d'AAS. En effet, l'AAS était efficace dans l'inhibition de la formation de TxA₂ et l'agrégation plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique dans l'heure qui suivait la prise du comprimé. Ceci est cohérent avec la capacité pharmacologique de l'AAS d'atteindre sa cible, comme démontré dans l'étude de Dragani *et al.* par l'ajout *in vitro* d'AAS. Toutefois, après un délai supérieur à 8 heures, une capacité fonctionnelle de la COX-1 pouvait être observée, tant par la mesure de TxB₂ plasmatique que par l'agrégation plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique. Dans ce cas encore, l'effet est cohérent avec l'étude de Dragani *et al.* qui ont rapporté une formation accrue de TxB₂ dans le sérum des patients souffrant de thrombocytémie essentielle environ 12 heures après la prise quotidienne d'AAS. Une hypothèse plausible serait donc que le

rétablissement de l'activité plaquettaire dans les 24 heures qui suivent l'administration quotidienne d'AAS pourrait être dû à un taux de régénération plaquettaire accru chez certains sujets souffrant de maladie coronarienne. Cette hypothèse devra être testée spécifiquement en mesurant le taux de régénération plaquettaire par identification de plaquettes réticulées marquées à l'aide de thiazole orange par cytométrie en flux.

Par ailleurs, une hypothèse intrigante a été suggérée dans la littérature provenant d'études animales sur l'influence de la prise d'AAS sur la production plaquettaire. Dans une étude portant sur des souris ayant reçu une dose d'AAS, Sullivan et McDonald ont rapporté que l'administration d'AAS induisait une inhibition de la fonction plaquettaire qui, à son tour, engendrait une boucle de rétroaction au niveau des mégacaryocytes et induisait la formation accrue de nouvelles plaquettes.³²⁶ En effet, dans les 48 heures suivant l'administration d'AAS, la proportion de nouvelles plaquettes en circulation atteignait environ 30% de plus qu'avant l'administration d'AAS.³²⁶ Ces nouvelles plaquettes présentaient également une morphologie différente; un accroissement du volume plaquettaire moyen était apparent dans les 24 heures suivant l'administration d'AAS.³²⁶ De plus, les investigateurs ont observé une augmentation du nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse des souris, dont le pic était recensé à 24 heures après l'administration d'AAS, qu'ils ont attribué à une élévation potentielle de la concentration sanguine de thrombopoïétine.³²⁶ Dans une étude ultérieure, le même groupe a confirmé les résultats sur la production plaquettaire, la taille plaquettaire, ainsi que le nombre de mégacaryocytes.³²⁷ De plus, en transfusant le plasma obtenu de souris ayant une concentration de thrombopoïétine élevée à des souris normales, les investigateurs ont reproduit le même profil de réponse que chez les souris ayant reçu une dose d'AAS.³²⁷ Ces données renforçaient donc l'hypothèse que l'administration d'AAS chez la souris provoque une élévation de la concentration de thrombopoïétine, ce qui accélère la génération de nouvelles plaquettes à partir de mégacaryocytes. Il est à noter que ces expériences n'ont jamais été reproduites lors d'administration chronique d'AAS, ni dans d'autres espèces animales, et

que l'administration chronique d'AAS chez l'homme n'induit pas de thrombocytose marquée, ce qui limite l'applicabilité de ces données à l'humain.

Très peu d'études se sont attardées à la caractérisation de l'expression de la COX-1 dans les précurseurs des plaquettes, les mégacaryocytes. En raison de leur rareté (les mégacaryocytes humains composent 0,1% des cellules nucléées) et de la difficulté à les isoler (nécessité de prélever de la moelle osseuse), la recherche sur l'effet des médicaments antiplaquettaires sur les mégacaryocytes est extrêmement limitée.^{328, 329} Néanmoins, une lignée de cellules immortalisées isolées à partir de la moelle osseuse d'un patient souffrant de leucémie myéloïde chronique offre un modèle de cellules mégacaryoblastiques pouvant être utilisée en recherche (MEG-01).³³⁰ Ces cellules se différencient morphologiquement et biochimiquement en des mégacaryocytes matures qui, sous stimulation à l'aide de thrombopoïétine, forment des proplaquettes. Ainsi, il a été possible de déterminer que, sous l'influence de la thrombopoïétine, l'expression de mRNA de la COX-1 augmente dans le mégacaryocyte, ce qui se traduit également en une expression accrue de la COX-1.³³¹ Ces études ont permis d'établir que l'expression de COX-1 est constitutive dans le mégacaryocyte et est présente tout au long du processus de différenciation, jusqu'à la formation de plaquettes dont le contenu en COX-1 est le plus élevé par rapport au mégacaryocyte.³³¹ Ces résultats laissent donc aussi entendre que l'expression de COX-1 dans le mégacaryocyte pourrait être modulée en réponse à certains stimuli. Cette hypothèse ouvre donc la porte à la possibilité que, chez certains sujets, les plaquettes nouvellement formées après la prise d'AAS soient enrichies en COX-1, ce qui pourrait expliquer le rétablissement de la réponse plaquettaire à l'acide arachidonique chez ces sujets. Néanmoins, cette possibilité est hautement spéculative, compte tenu de l'absence de données chez l'homme sur l'influence de l'AAS sur le mégacaryocyte et sur la modulation de l'expression protéique dans cette cellule particulière.

La production de la thrombopoïétine semble ubiquitaire, mais avec près de 50% de la production de thrombopoïétine, le foie est la source la plus riche de thrombopoïétine chez l'humain adulte.^{332, 333} Le déterminant le plus important de la concentration sanguine

de thrombopoïétine est le décompte plaquettaire. En effet, les plaquettes possèdent des récepteurs à haute affinité pour la thrombopoïétine et l'épurent du sang en fonction de leur nombre; plus le nombre de plaquettes en circulation est élevé, moins il y a de thrombopoïétine dans le sang, et vice versa.^{332, 333} Ce système de régulation de la thrombopoïétine permet donc un ajustement rapide à tout changement hémostatique où les plaquettes sont particulièrement sollicitées ou détruites.^{332, 333} En présence d'un syndrome inflammatoire important, la production hépatique de thrombopoïétine peut augmenter de façon marquée, ce qui provoque une thrombocytose réactive chez certains sujets.^{332, 333}

Il n'y a pas de raison de soupçonner un état inflammatoire plus élevé chez le sujet présentant un rétablissement précoce de l'activité plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique par rapport aux autres sujets inclus dans notre étude, mais puisqu'aucun marqueur d'inflammation (tel que hsCRP) n'avait été mesuré, on ne peut exclure cette possibilité. Un processus inflammatoire sous-jacent pourrait théoriquement provoquer une expression accrue de thrombopoïétine, qui pourrait à son tour induire une accélération de la régénération plaquettaire et expliquer la présence de plaquettes aptes à répondre à l'acide arachidonique malgré une prise quotidienne d'AAS. Les études futures devraient mieux caractériser les sujets présentant un rétablissement précoce de la fonction plaquettaire, particulièrement à ce qui a trait au taux de régénération plaquettaire, à l'expression de COX-1, à la concentration de thrombopoïétine sanguine et aux marqueurs inflammatoires.

b) La formation de TxA₂ en réponse aux stimuli alternatifs de l'activation plaquettaire

Malgré une inhibition marquée de la COX-1 telle que mesurée par la formation de TxB₂ plasmatique en réponse à la stimulation à l'aide d'acide arachidonique chez la grande majorité des patients inclus dans notre étude, l'agrégation plaquettaire en réponse aux stimuli alternatifs (dont l'ADP, l'épinéphrine et le collagène) ne semblait pas affectée par l'administration quotidienne d'AAS. De surcroît, une concentration perceptiblement plus élevée de TxB₂ plasmatique était mesurée en réponse à ces stimuli plaquettaires vis-à-vis de

l'acide arachidonique. Cette formation aigue de TxA₂ par la plaquette en réponse à une activation par une voie alternative suggère des voies de récupération rapide de l'activité de la COX-1 inhibée par l'AAS.

Tel que discuté dans la section précédente, la possibilité de voies accessoires ou de contournement de l'inhibition de la COX-1 par l'AAS ne peuvent être exclues. Néanmoins, tant l'expression de COX-2 que la formation d'isoprostanes requerrait un état inflammatoire ou oxydatif aigu improbable auprès de la population de patients souffrant de maladie coronarienne stable recrutés pour cette étude. À défaut d'une voie accessoire ou de contournement, la synthèse de nouvelles enzymes COX-1 actives par la plaquette pourrait présenter un mécanisme hypothétique expliquant cette synthèse accrue de TxA₂.

Tel qu'introduit dans le **Chapitre 2**, les plaquettes peuvent synthétiser des protéines à partir d'ARN originaire des mégacaryocytes.⁴⁷ Les mécanismes menant à la traduction dans la plaquette demeurent méconnus. Toutefois, l'activation plaquettaire semble être un pré-requis pour induire la formation de nouvelles protéines.^{49, 50} Dans notre étude sur la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS, une activation plaquettaire par l'ADP, l'épinéphrine et à moindre degré le collagène induisait une concentration accrue de TxB₂ plasmatique, malgré une inhibition profonde de la COX-1 par l'AAS telle que démontrée par la réponse plaquettaire à l'acide arachidonique. Une hypothèse intéressante repose donc sur une synthèse activation-dépendante de COX-1 en réponse à ces stimuli plaquettaires.

Bien que spéculative à ce point, la possibilité de la synthèse de COX-1 par la plaquette activée a été signalée dans une petite étude par Evangelista *et al.*⁴⁸ Dans cette étude, les plaquettes étaient isolées à partir d'échantillons sanguins obtenus de volontaires sains s'étant abstenus de tout inhibiteur de la COX dans les 10 jours précédant la prise de sang. Ces plaquettes étaient incubées avec de l'AAS *in vitro* pendant 30 minutes, pour mimer l'exposition à l'AAS dans le sang de patients prenant de l'AAS quotidiennement. Cette incubation abolissait quasi-totalement la formation de TxA₂ plaquettaire.

L'activation de ces plaquettes par le fibrinogène, la thrombine, l'ADP, le collagène ou le TRAP provoquait une production accrue de TxA_2 24 heures après l'incubation initiale avec l'AAS par rapport aux plaquettes laissées au repos.⁴⁸ La ré-incubation de ces échantillons avec l'AAS abolissait de nouveau la formation de TxA_2 par les plaquettes. L'inhibition de voies de signalisation impliquées dans la traduction protéique résultait en une inhibition de la formation de TxA_2 , ce qui a mené les investigateurs à postuler qu'une synthèse *de novo* de COX-1 plaquettaire pourrait être en cause.⁴⁸ Pour vérifier cette hypothèse, les chercheurs ont procédé par radiomarquage de l'acide aminé méthionine à la quantification de COX-1 dans la plaquette en réponse à l'activation par la thrombine et le fibrinogène. L'immunoprécipitation avec un antigène spécifique contre la COX-1 a permis de démontrer que de nouvelles enzymes COX-1 étaient formées dans ces plaquettes activées.⁴⁸ Une synthèse protéique plaquettaire activation-dépendante semble donc possible, et pourrait expliquer la formation accrue de TxA_2 en réponse à des agonistes alternatifs dans notre étude chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable.

Cette hypothèse d'une biosynthèse protéique plaquettaire de la COX-1 mérite une investigation plus poussée. Pour mesurer l'expression de nouvelles enzymes COX-1 dans la plaquette en tenant compte du fait que la plaquette est dépourvue de noyau, une méthode possible serait d'incuber l'échantillon de plasma riches en plaquettes avec des acides aminés radiomarqués (par exemple, la méthionine) et de mesurer la concentration de COX-1 dans un échantillon au repos et dans un échantillon après stimulation avec divers agonistes plaquettaires. La différence entre la COX-1 radiomarquée avant et après stimulation avec un agoniste permettrait d'estimer la quantité de COX-1 formée dans la plaquette activée. Il serait intéressant également de déterminer la puissance ou l'efficacité des divers agonistes à induire la synthèse protéique plaquettaire. Il ne serait pas étonnant que les agonistes activant des récepteurs liés à la protéine G_{α_q} , qui dépendent d'une amplification de leur effet par la formation de TxA_2 dans la plaquette, soient les plus efficaces à induire la formation de nouvelles enzymes COX-1. Par conséquent, il serait attendu que la thrombine par son action sur les récepteur PAR-1 et PAR-4 et l'ADP par son

action sur le récepteur P2Y₁, seraient parmi les agonistes les plus performants, tandis que le collagène, l'épineprine et la sérotonine induiraient une synthèse protéique moins importante. Nos résultats d'une formation accrue de TxA₂ en réponse à l'ADP par rapport à l'épineprine et au collagène supportent cette hypothèse.

c) Les répercussions thérapeutiques et perspectives d'avenir

Le rétablissement de la fonction plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique chez certains individus au cours de l'intervalle posologique standard de 24 heures de l'administration d'AAS en prévention d'événements thrombotiques aigus pourrait limiter la protection antithrombotique escomptée avec ce médicament antiplaquettaire. En effet, le bénéfice de l'administration quotidienne de l'AAS semble provenir de l'inhibition soutenue de l'agrégation plaquettaire par l'inhibition irréversible de la COX-1.⁴² Une régénération plaquettaire accélérée expose potentiellement le patient à un risque thrombotique plus élevé en raison de la présence d'une proportion suffisante de plaquettes actives pour esquiver l'inhibition attendue avec la prise quotidienne d'AAS, tel que suggéré par les études menées auprès de sujets souffrant de thrombocyémie essentielle.³²⁵ Une réduction de l'intervalle posologique pourrait être bénéfique pour assurer une inhibition stable de l'agrégation plaquettaire chez des sujets avec un rétablissement précoce de l'activité plaquettaire. Les études futures devraient se concentrer à élucider les mécanismes menant au rétablissement de la capacité de synthétiser la TxA₂ suite à l'administration d'AAS, et si l'hypothèse d'une régénération plaquettaire accélérée est confirmée, tester l'efficacité d'une administration biquotidienne vs unquotidienne d'AAS chez ces patients.

Il est important de reconnaître que notre étude était conçue pour détecter une variabilité dans la réponse à l'AAS administré quotidiennement chez des patients stables souffrant de maladie coronarienne. Ainsi, les résultats de l'étude sont rassurants dans l'ensemble et démontrent que la grande majorité des patients souffrant de maladie coronarienne prenant de l'AAS ont une réponse stable pendant l'intervalle posologique standard de 24 heures. Néanmoins, la documentation de la réponse plaquettaire du sujet

avec un profil de réponse aberrant a permis de suggérer qu'un mécanisme de rétablissement de l'activité plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique puisse expliquer en partie la variabilité de réponse à l'AAS recensée dans la littérature. Bien que ce soit un cas isolé dans cette étude, la cohérence de nos données avec les résultats obtenus chez des patients souffrant de thrombocytémie essentielle traités à l'aide d'AAS étaye la notion qu'un tel profil de réponse puisse ne pas être unique. Ceci a permis de générer des hypothèses sur les mécanismes qui pourraient mener à une telle réponse (incluant la présence de processus inflammatoire ou de toute autre pathologie associée à une régénération plaquettaire accrue). Une meilleure caractérisation de tels sujets est donc nécessaire pour pleinement comprendre les mécanismes moléculaires et biologiques qui expliquent ce phénomène, et potentiellement d'explorer des mesures palliatives telle l'administration biquotidienne d'AAS.

Également, une synthèse protéique activation-dépendante dans la plaquette pourrait expliquer la formation accrue de TxA_2 observée dans notre étude en réponse à la stimulation par l'ADP, l'épinéphrine et le collagène. Toutefois, cette hypothèse devra être testée spécifiquement. Dans notre étude, la mesure de TxB_2 plasmatique se faisait dans le surnageant suite à l'agrégation plaquettaire induite par un agoniste, dans un délai d'environ 5 à 6 minutes. Ainsi, si un mécanisme de formation protéique était en cause, l'induction de la synthèse protéique doit être très rapide, ce qui n'a pas encore été démontré. Dans l'étude d'Evangelista *et al*, la quantification de la COX-1 se faisait 3 heures après l'incubation avec le fibrinogène et la thrombine. Un laps de temps de 5 à 6 minutes pour induire une synthèse protéique dans la plaquette serait cohérent avec le rôle aigu des plaquettes dans le maintien de l'hémostase; néanmoins, cette hypothèse requiert une étude spécifique et approfondie. L'analyse des voies de signalisation impliquées dans la traduction protéique de la plaquette constitue un domaine de recherche innovateur qui pourrait contribuer à expliquer la variabilité interindividuelle de la réponse plaquettaire aux médicaments antiplaquettaires.

B) Étude de la pertinence clinique des tests de fonction plaquettaire pour la prédiction d'événements ischémiques majeurs chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable prenant de l'AAS

Tel que décrit dans le **Chapitre 6**, cette étude visait à comparer les tests de fonction plaquettaire dans leur capacité à identifier les patients les plus à risque de subir des événements cardiovasculaires néfastes en fonction de leur niveau d'inhibition plaquettaire par l'AAS.

i) Résultats majeurs

Le suivi clinique à 3 ans a pu être effectué auprès de 198 sujets (98,5% de la cohorte initiale). De ces 198 sujets, 19 avaient cessé la prise d'AAS au moment du suivi; 8 sujets recevaient un médicament antithrombotique alternatif et 11 sujets avaient cessé la prise de tout médicament antithrombotique. Parmi les 179 sujets prenant toujours de l'AAS, 8 sujets ont admis omettre plus d'une dose par semaine et étaient considérés inadhérents.

Au cours des 3 années qui ont suivi la mesure de la réponse plaquettaire à l'AAS auprès de ces 198 sujets souffrant de maladie coronarienne stable, des événements cardiovasculaires néfastes sont survenus chez 30 sujets, se traduisant en un taux annuel de 5,1%. L'inclusion de la nécessité de subir une procédure de revascularisation portait à 33 le nombre de sujets avec événements cardiovasculaires néfastes, soient 5,6% annuellement.

Aucun des tests de fonction plaquettaire n'était significativement associé à un risque accru de subir un événement cardiovasculaire néfaste, même avec une définition plus souple englobant le besoin de revascularisation. Une analyse logistique multiple conditionnelle a identifié la persistance de symptômes angineux (augmentation du risque de 4,4 fois), la présence d'insuffisance cardiaque (augmentation du risque de 7,9 fois) et la cessation de la prise d'AAS (augmentation du risque de 61 fois) comme variables

prédictives d'événements cardiovasculaires néfastes. L'inclusion forcée des résultats de la fonction plaquettaire par n'importe lequel des tests de fonction plaquettaire n'affectait pas significativement l'association entre les variables prédictives et le risque d'événements cardiovasculaires néfastes.

ii) Discussion

Cette étude prospective comparant 6 tests de fonction plaquettaire couramment utilisés dans la littérature pour mesurer l'effet antiplaquettaire de l'AAS répond à une interrogation importante : la variabilité dans l'inhibition de l'activité plaquettaire dépendante de la COX-1, telle que mesurée par des tests isolant cette voie d'activation plaquettaire, ou une hyperagrégabilité plaquettaire, indépendamment de la voie d'activation plaquettaire étudiée, a-t-elle une répercussion clinique en terme d'occurrence d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de maladie coronarienne stable requérant un traitement chronique à l'aide d'AAS. Nos résultats suggèrent que ni la mesure de l'inhibition de l'activité de la COX-1 plaquettaire, ni la mesure de la réactivité plaquettaire à d'autres stimuli ne prédit la survenue d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de maladie coronarienne stable. Toutefois, la cessation de la prise d'AAS est un prédicteur important d'événements thrombotiques.

a) L'utilité clinique des tests de fonction plaquettaire évaluant l'effet antiplaquettaire d'AAS

Tel que décrit dans le **Chapitre 4**, la valeur prédictive thrombotique des tests de fonction plaquettaire utilisés pour quantifier l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par l'AAS est faible. Néanmoins, des méta-analyses ont rapporté une association positive entre une inhibition inadéquate de la fonction plaquettaire par l'AAS et la survenue d'événements ischémiques aigus.^{9, 272} Parmi les limites majeures de ces méta-analyses, il est important de noter l'inclusion d'études de devis rétrospectif ou cas-témoin, où de nombreuses variables confondantes pouvaient affecter l'association entre la réponse

plaquettaire à l'AAS et la survenue d'événements ischémiques aigus. La nécessité d'études cliniques prospectives pour répertorier la survenue d'événements ischémiques suite à une évaluation de la fonction plaquettaire par une batterie de tests était donc nécessaire pour confirmer l'utilité clinique de l'évaluation de la fonction plaquettaire.²⁷²

Les résultats de notre étude remettent en question l'utilité clinique de l'évaluation de la fonction plaquettaire chez des patients souffrant de maladie coronarienne stable. En effet, indépendamment de la spécificité des tests envers la voie d'activation plaquettaire ciblée par l'AAS, aucun des tests de fonction plaquettaire étudiés ne prédit la survenue d'événements ischémiques aigus dans notre population. Il est important de noter que la taille échantillonnale dans cette étude de suivi ne permettait l'identification de variables augmentant le risque d'événements ischémiques aigus de moins de 2,5 fois. Ainsi, nous ne pouvons exclure un effet plus faible de l'inhibition inadéquate de la fonction plaquettaire par l'AAS sur le risque de subir un événement ischémique aigu.

Une seule étude comparable à la nôtre a été publiée jusqu'à présent.³³⁴ Dans cette étude, 682 sujets souffrant de maladie coronarienne requérant une angiographie coronarienne ont subi des tests de fonction plaquettaire (la mesure de TxB₂ dans le sérum, l'analyse de marqueurs d'activation plaquettaire par cytométrie en flux en réponse à l'acide arachidonique et l'évaluation par PFA-100[®]).³³⁴ Un suivi clinique a pu être complété auprès de 562 sujets, 2 ans après l'évaluation de la réponse plaquettaire à l'AAS. En accord avec nos résultats, tant la mesure de marqueurs d'activation plaquettaire par cytométrie en flux en réponse à l'acide arachidonique que l'évaluation par PFA-100[®] n'était associée à une augmentation significative du risque de subir un événement ischémique aigu.³³⁴ Toutefois, une inhibition insuffisante de la production de TxA₂ dans le sérum semblait augmenter le risque de subir un événement ischémique aigu par analyse univariée de l'ordre de 2,4 fois (intervalle de confiance à 95% allant de 1,053 à 5,463, p=0,037).³³⁴ Toutefois, dans une analyse logistique multiple qui incluait le score TIMI, la dose d'AAS, le décompte plaquettaire, l'indice de masse corporelle, l'utilisation concomitante de clopidogrel, de statines et d'agents hypoglycémifiants, l'association entre la

réponse inadéquate à l'AAS, indépendamment du test de fonction plaquettaire utilisé, et la survenue d'événements ischémiques aigus était non-significative.³³⁴ Ainsi, malgré l'inclusion d'un nombre de patients significativement plus élevé que dans notre étude, avec un risque thrombotique également plus élevé tel que suggéré par la nécessité de subir une angiographie coronarienne et une co-administration de clopidogrel, l'étude de Frelinger *et al.* n'a pu démontrer un lien statistiquement significatif entre une inhibition inadéquate de la fonction plaquettaire par l'AAS et la survenue d'événements ischémiques aigus, en accord avec les résultats de notre étude. Par conséquent, l'utilisation de routine de tests de fonction plaquettaire dans la pratique clinique ne peut être recommandée.

b) La cessation d'AAS comme prédicteur d'événements ischémiques aigus

Le prédicteur le plus important d'événements ischémiques aigus dans notre étude était la cessation d'AAS, qui en augmentait le risque de l'ordre de 61 fois. Ceci est en accord avec des méta-analyses et des revues systématiques qui ont rapporté une association importante entre la cessation d'AAS et la survenue d'événements ischémiques aigus, tel que discuté dans le **Chapitre 5**.^{288, 290}

c) Les répercussions thérapeutiques et perspectives d'avenir

Compte tenu du bénéfice clinique important de l'administration quotidienne d'AAS, il n'est pas surprenant que la cessation de ce médicament chez des patients souffrant de maladie coronarienne à risque d'événements ischémiques soit associée à un accroissement du risque thrombotique. Ce phénomène est d'autant plus inquiétant que les statistiques sur l'adhésion à long terme aux médicaments cardiovasculaires suggèrent que près de 20% des patients cessent la prise d'AAS dans les 12 mois qui suivent son initiation.³³⁵ Ces patients pourraient donc s'exposer à une augmentation non-négligeable du risque de subir un événement ischémique aigu, potentiellement fatal.

Cette étude souligne un fait important : le paramètre le plus prédictif du risque de subir un événement ischémique aigu demeure l'adhésion du patient au traitement qui lui a

été prescrit. Ainsi, bien que les tests de fonction plaquettaire se soient montrés utiles en recherche pour mieux comprendre et quantifier l'effet sur la fonction plaquettaire de l'AAS, leur utilisation dans la pratique clinique devrait être secondaire à l'enseignement au patient pour que ce dernier puisse bien prendre le médicament qui lui a été prescrit. Plusieurs études sont présentement en cours pour évaluer l'utilité clinique de modifier le traitement antiplaquettaire chez des patients avec un résultat de test de fonction plaquettaire inadéquat. La pertinence clinique d'une telle mesure est remise en question par cette étude, où la pertinence clinique des tests de fonction plaquettaire n'a pu être démontrée. La modification de thérapie antiplaquettaire à l'aide d'AAS en fonction des résultats de ces tests de fonction plaquettaire apparaît donc prématurée. Tant que des études cliniques d'envergure à double-aveugle, randomisées en fonction des résultats des tests de fonction plaquettaire à continuer la prise d'AAS à la dose standard recommandée ou à recevoir une thérapie alternative ne seront complétées, l'application des tests de fonction plaquettaire en clinique de façon routinière ne peut être recommandée.³³⁶

C) Évaluation de l'impact sur la fonction plaquettaire de la cessation de la prise quotidienne de clopidogrel

Tel que décrit dans le **Chapitre 6**, la présente étude visait à évaluer l'impact sur la fonction plaquettaire du retrait soudain de clopidogrel chez des patients souffrant de maladie coronarienne stable comparativement à des patients similaires qui ne prennent pas de clopidogrel.

i) Résultats majeurs

Trente-sept sujets souffrant de maladie coronarienne stable devant cesser la prise de clopidogrel et 37 sujets souffrant de maladie coronarienne stable ne prenant pas de clopidogrel ont été recrutés dans cette étude. Ils étaient âgés en moyenne de 65 ± 10 ans, étaient majoritairement de sexe masculin et présentaient des facteurs de risque classiques de

la maladie coronarienne pour lesquels ils recevaient des traitements recommandés par les lignes directrices actuelles. Les sujets qui devaient discontinuer la prise de clopidogrel avaient plus fréquemment subi une intervention coronarienne percutanée, avaient plus de tuteurs coronariens et présentaient moins de symptômes angineux persistants que les sujets ne prenant pas de clopidogrel. Toutes les autres caractéristiques étaient similaires entre les deux groupes.

Le clopidogrel était cessé après un délai médian de 555 jours suite à son initiation (allant de 200 à 2280 jours). Tous les sujets continuaient à prendre de l'AAS quotidiennement, tel que recommandé dans les lignes directrices actuelles. Aucun sujet n'a subi d'événement ischémique aigu pendant l'étude.

Objectifs spécifiques :

1. Étudier l'effet de la cessation abrupte de clopidogrel sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP.
 - a. Le rétablissement de l'agrégation plaquettaire après la cessation de clopidogrel aux niveaux recensés chez des sujets ne prenant pas de clopidogrel prenait environ 3 à 7 jours.
 - b. L'utilisation de l'agrégométrie optique avec de faibles doses d'ADP (0,5 à 2,5 μM) a permis d'observer une agrégation plaquettaire significativement plus élevée chez des sujets ayant cessé le clopidogrel au moins 7 jours auparavant, par rapport à des sujets ne prenant pas de clopidogrel. Cet effet se maintenait jusqu'à 28 jours après la cessation de clopidogrel.
 - c. Avec l'utilisation de doses plus élevées d'ADP (5 et 10 μM), l'agrégation plaquettaire était maximale et similaire entre les sujets cessant le clopidogrel et ceux n'utilisant pas de clopidogrel, indépendamment du délai depuis la cessation du médicament.

- d. L'emploi de VerifyNow[®] P2Y₁₂ mimait le profil de rétablissement observé par agrégométrie optique avec de fortes concentrations d'ADP.
2. Étudier l'effet de la cessation abrupte de clopidogrel sur la sensibilité plaquettaire à l'ADP.
 - a. Les courbes concentration-réponse d'ADP ont dû être analysées qualitativement car un plateau maximal stable de réponse n'a pu être atteint aux doses d'ADP utilisées. Néanmoins, ces courbes suggèrent une sensibilisation plaquettaire à l'ADP chez des sujets ayant cessé le clopidogrel depuis 7 à 28 jours par rapport aux sujets qui ne prenaient pas de clopidogrel, en raison de la nécessité d'une moindre concentration d'ADP pour induire une agrégation plaquettaire importante chez des sujets ayant cessé le clopidogrel depuis 7 à 28 jours par rapport aux sujets qui ne prenaient pas de clopidogrel.
 3. Étudier l'effet de la cessation abrupte de clopidogrel sur les marqueurs inflammatoires.
 - a. Le niveau de hsCRP était similaire entre les sujets ayant cessé le clopidogrel et ceux n'en prenant pas, et ce peu importe le délai depuis la cessation du médicament.

ii) Discussion

Malgré une vaste littérature épidémiologique et observationnelle associant la cessation de clopidogrel à une recrudescence d'événements ischémiques aigus, les causes de ce phénomène demeurent largement inconnues.¹¹ Le débat dans la littérature est considérable; il oppose ceux qui suggèrent que ces événements sont dus au retrait d'un médicament protecteur chez des patients à haut risque thrombotique à ceux qui préconisent que la cessation de clopidogrel induirait une hyperactivité plaquettaire rebond qui pourrait,

en conjonction avec d'autres facteurs cliniques et angiographiques, provoquer des complications thrombotiques.^{300, 304, 306, 309-313} Jusqu'à présent, les données ne permettaient pas de trancher en faveur d'une alternative ou de l'autre.

a) Le rétablissement de la fonction plaquettaire suite à la cessation de clopidogrel

Parmi les premiers à étudier le rétablissement de la fonction plaquettaire suivant le retrait de clopidogrel, Weber *et al.* ont rapporté une tendance vers une activation plaquettaire accrue suivant la cessation de clopidogrel chez 10 volontaires sains traités pendant 7 jours à l'aide de clopidogrel.³¹⁴ Dans cette étude, la fonction plaquettaire était évaluée avant l'initiation du traitement, une heure après la dernière dose de clopidogrel administrée, ainsi que 3, 5 et 7 jours suivant la cessation du traitement. L'étude par cytométrie en flux des marqueurs d'activation plaquettaire en réponse à 30 μ M d'ADP était rapportée. Dans cette étude, le retour aux valeurs pré-traitement de fonction plaquettaire requérait 3 à 7 jours, ce qui est confirmé dans notre étude. Les auteurs soulignent que, après 3 jours suivant la cessation de clopidogrel, environ 30% des plaquettes en circulation agrégeaient en réponse à l'ADP, ce qui supporte l'hypothèse de la genèse de nouvelles plaquettes non-inhibées à partir de mégacaryocytes. Néanmoins, les auteurs ont noté que l'expression de marqueurs d'activation en réponse à l'ADP était accrue 3 à 5 jours après la dernière dose de clopidogrel, ce qui suggérait un état transitoire d'hypersensibilité plaquettaire.³¹⁴ Toutefois, les auteurs ayant limité leur suivi à 7 jours, il est impossible de savoir si un effet rebond persistant était présent chez ces sujets.

L'étude PACT (*Platelet Activity after Clopidogrel Termination*) avait pour but d'étudier l'impact de la cessation de clopidogrel sur la fonction plaquettaire chez 15 volontaires sains, en comparaison à la cessation d'un placebo.³³⁷ Dans cette étude, le clopidogrel était administré à une dose de 75 mg par jour pendant 14 jours. L'expression de marqueurs d'activation plaquettaire mesurée par cytométrie en flux était analysée 1, 4, 8, 11, 15 et 45 jours après la discontinuation de clopidogrel ou de placebo. Le rétablissement de la fonction plaquettaire à un niveau comparable à celui présent chez les sujets recevant

le placebo requérait 4 à 8 jours, ce qui est cohérent avec la littérature citée ci-dessus. Après 8 jours suivant la cessation de clopidogrel, l'expression des marqueurs d'activation plaquettaire ne différait pas entre les sujets ayant reçu le clopidogrel et ceux ayant reçu le placebo. Ceci menait les investigateurs à conclure à l'absence d'un effet rebond suivant la cessation de clopidogrel.³³⁷ L'absence de rebond chez ces volontaires sains pourrait être attribuée en partie à la courte période d'administration de clopidogrel, qui aurait pu être insuffisante pour induire de potentiels mécanismes compensatoires menant au rebond, ainsi qu'à la sélection-même de sujets sains, puisqu'il est connu que les sujets souffrant de maladie coronarienne ont des plaquettes et des mégacaryocytes plus réactifs que les sujets sains.^{28, 338}

Dans une étude auprès de 54 sujets diabétiques souffrant de maladie coronarienne concomitante ayant nécessité une intervention coronaire percutanée, Angiolillo et collaborateurs ont étudié l'effet sur la fonction plaquettaire et la réponse inflammatoire de discontinuer le clopidogrel un an après son initiation, tel que recommandé dans les lignes directrices actuelles.³¹⁵ La fonction plaquettaire était analysée par expression de marqueurs d'activation en réponse à l'ADP par cytométrie en flux et par agrégométrie optique induite par l'ADP, tandis que la mesure de hsCRP servait à évaluer la réponse inflammatoire. Les analyses étaient effectuées la veille de la cessation de clopidogrel et un mois après. Suite à la cessation de clopidogrel, les niveaux de hsCRP ont augmenté significativement, ainsi que ceux des marqueurs de l'activation plaquettaire. L'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP était également significativement plus élevée un mois après la cessation de clopidogrel qu'avant. Les auteurs concluaient que la cessation de clopidogrel induisait un état pro-inflammatoire et prothrombotique chez des patients souffrant de maladie coronarienne et de diabète.³¹⁵ Toutefois, l'absence d'un groupe contrôle dans cette étude rend la conclusion discutable, puisque l'argument peut être fait que la cessation d'un inhibiteur d'un récepteur à l'ADP provoquerait sans surprise une augmentation de la réponse à l'ADP chez des sujets ayant discontinué un tel traitement, sans qu'un effet rebond ne soit en cause. Pour déterminer la présence d'un effet rebond, il serait nécessaire

de comparer à l'état basal de réponse à l'ADP chez ces sujets, ou à défaut d'un tel comparateur, un groupe de patients similaires ne prenant pas de clopidogrel pourrait être employé.

Wykrzykowska et collaborateurs ont tenté de reproduire les résultats d'Angiolillo *et al.* dans une étude portant sur 98 sujets souffrant de maladie coronarienne sans diabète concomitant.³¹⁶ Bien qu'une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire ait bien pu être observée, les marqueurs inflammatoires sont restés stables suite à la cessation de clopidogrel, ce qui est en accord avec les résultats de notre étude. Un fardeau inflammatoire accru chez les patients diabétiques pourrait expliquer cette divergence et expliquer en partie le risque aggravé d'événements ischémiques aigus chez les patients souffrant de diabète par rapport à leurs confrères souffrant de maladie coronarienne isolée.

Dans une étude portant sur 69 sujets souffrant de maladie coronarienne ayant reçu un tuteur coronarien au moins 4 semaines auparavant et chez qui la cessation de clopidogrel était recommandée par le cardiologue traitant, Sibbing *et al.* ont comparé l'effet sur la fonction plaquettaire d'une discontinuation subite de clopidogrel à une cessation progressive du médicament sur une période de 4 semaines.³³⁹ Au moment de l'inclusion dans l'étude, les sujets étaient randomisés à double-aveugle à un groupe continuant le clopidogrel pendant 4 semaines puis cessant le clopidogrel subitement ou à un régime de cessation graduelle de clopidogrel (réduction de 50% de la dose par semaine) pendant 4 semaines. Les sujets étaient suivis après la cessation du médicament de l'étude pendant 4 semaines. L'évaluation de l'agrégation plaquettaire se faisait à l'aide d'agrégométrie optique (ADP 1,25, 2,5, 5 et 20 μ M, collagène 0,19 mg/ml et TRAP 24 μ M) et en sang complet à l'aide de Multiplate[®] (ADP 6,4 μ M \pm PGE₁ 9,4 μ M, TRAP 32 μ M et collagène 3,2 μ g/ml).³³⁹ Les échantillons de sang étaient récoltés à l'inclusion dans l'étude (après une angiographie de contrôle pour laquelle tous les sujets recevaient 600 mg de clopidogrel), et 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 semaines après la randomisation. La cessation de clopidogrel a provoqué une augmentation marquée dans les deux groupes de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, tant mesurée en plasma riche en plaquettes qu'en sang complet.³³⁹

Toutefois, le profil de rétablissement de la fonction plaquettaire était similaire entre les deux groupes (cessation soudaine et cessation graduelle de clopidogrel), ce qui a mené les auteurs à conclure en l'absence d'un effet rebond de l'activité plaquettaire suite à la cessation de clopidogrel.³³⁹ Comme dans l'étude d'Angiolillo *et al.* discutée ci-dessus, l'absence d'un groupe contrôle ne prenant pas de clopidogrel représente une limitation importante. En effet, le fait que les profils de rétablissement de la fonction plaquettaire soient similaires entre les deux groupes peut suggérer l'absence d'un effet rebond, ou s'il y avait un effet rebond, ces résultats démontreraient l'inefficacité du régime de sevrage employé par les investigateurs. L'absence d'un groupe contrôle ne prenant pas de clopidogrel ne permet pas de conclure si l'agrégation plaquettaire observée est supérieure, égale ou inférieure à ce qui serait attendu chez des patients similaires ne prenant pas de clopidogrel, et ne permet donc pas de confirmer ou d'infirmer la présence d'un effet rebond dans l'activité plaquettaire suite à la cessation de clopidogrel chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable. Ainsi, le devis de cette étude était inadéquat pour tester l'hypothèse d'un possible rebond de l'activité plaquettaire suite à la cessation de clopidogrel.

En ce qui touche les données obtenues à l'aide de VerifyNow[®] P2Y₁₂, les études sont rares. La plus grande étude rapportée portait sur 45 volontaires sains recevant une dose de charge de 300, 600 ou 900 mg, suivie d'une dose de maintien de 75 mg pendant 6 à 18 jours.³¹¹ La fonction plaquettaire était étudiée quotidiennement pendant 5 jours après la cessation de clopidogrel. Le rétablissement de la fonction plaquettaire au cours des 5 jours suivant la cessation de clopidogrel semblait linéaire.³¹¹ Dans une étude auprès de 14 volontaires sains, le rétablissement de la fonction plaquettaire était observé pendant 8 jours suivant l'administration d'une dose de charge de 600 mg de clopidogrel.³¹² Le retour à des niveaux basaux de fonction plaquettaire requérait environ 7 jours, sans évidence d'un effet transitoire d'hyperactivité plaquettaire. Dans les deux cas, l'effet à plus long terme n'a pas été rapporté.

Notre étude est donc la première à rapporter le rétablissement de la fonction plaquettaire pendant 28 jours après la cessation de clopidogrel chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable en comparaison avec la fonction plaquettaire de sujets similaires ne prenant pas de clopidogrel. Nous confirmons qu'un retour aux niveaux d'agrégation plaquettaire de sujets ne prenant pas de clopidogrel requiert 3 à 7 jours après la cessation du médicament, ce qui est en accord avec les résultats des études précédentes. Par ailleurs, notre étude démontre une sensibilisation des plaquettes nouvellement formées à l'ADP, tel que supporté par le fait que les plaquettes des sujets ayant cessé le clopidogrel pour plus de 7 jours nécessitaient une concentration moindre d'ADP pour induire une agrégation plaquettaire supérieure à celle de sujets comparables ne prenant pas de clopidogrel. Cet effet d'hypersensibilité transitoire est plus apparent à des concentrations physiologiques d'ADP (0,5 à 2,5 μM) qu'à des concentrations élevées (5 à 10 μM d'ADP) fréquemment utilisée dans l'étude de l'agrégation plaquettaire. L'emploi d'une concentration de 20 μM d'ADP dans les cartouches de VerifyNow[®] P2Y₁₂ pourrait aussi expliquer l'absence d'un effet rebond lorsque cette technologie est utilisée pour mesurer la fonction plaquettaire. Ces concentrations supraphysiologiques d'ADP pourraient stimuler maximalelement l'agrégation plaquettaire, ce qui masquerait l'effet rebond perceptible à des niveaux physiologiques d'agoniste.

b) Les mécanismes sous-jacents potentiels

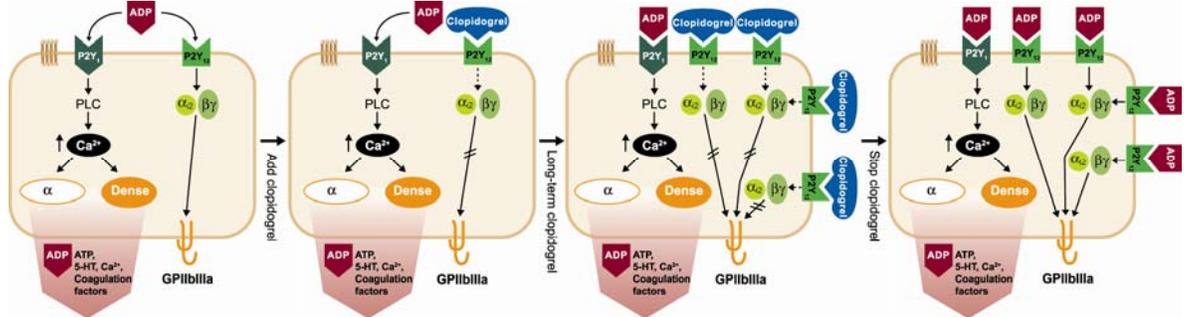
Un antagonisme chronique d'une voie physiologique entraîne fréquemment des mécanismes compensatoires sous forme de régulation à la hausse du nombre des récepteurs ciblés ou un couplage amélioré à des voies de signalisation effectrices, ce qui se manifeste en un effet exagéré à des concentrations physiologiques d'agoniste suivant le retrait de l'inhibiteur.^{340, 341} Bien qu'à première vue, ces mécanismes ne semblent pas s'appliquer aux plaquettes en raison de l'absence d'un noyau ce qui limite l'expression protéique dans la plaquette, certaines études laissent entendre qu'il en soit autrement. En effet, des études récentes ont démontré une capacité des plaquettes à synthétiser des protéines *de novo* dans certaines conditions d'activation plaquettaire, qui pourraient compenser l'absence d'un

noyau dans certaines conditions aiguës.^{47, 48, 50} Il est à noter qu'une synthèse du récepteur P2Y₁₂ dans la plaquette n'a jamais été démontrée jusqu'à présent. Par ailleurs, ces mécanismes requièrent une activation plaquettaire et semblent produire des quantités limitées de protéines, ce qui rend cette explication moins plausible pour justifier un rebond dans l'activité plaquettaire qui se maintient jusqu'à 28 jours après la cessation de clopidogrel.

Un autre mécanisme potentiel pourrait recourir à une modulation de l'expression ou du couplage du récepteur P2Y₁₂ au niveau plaquettaire. Tel que présenté dans le **Chapitre 2**, le récepteur P2Y₁₂ est un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine G_{ai}.³⁷ Contrairement au récepteur P2Y₁ qui, suite à une stimulation soutenue par l'ADP, subit une désensibilisation rapide par internalisation et une resensibilisation par déphosphorylation et recyclage à la membrane plaquettaire, le récepteur P2Y₁₂ semble peu affecté par une stimulation prolongée par l'ADP.³⁴²⁻³⁴⁴ En effet, bien qu'une internalisation du récepteur P2Y₁₂ dans les plaquettes activées ait été rapportée, le recyclage à la surface plaquettaire est très rapide (de l'ordre de quelques secondes) et ce phénomène ne semble pas avoir d'impact fonctionnel sur la plaquette.³⁴² Néanmoins, puisqu'environ 50% des récepteurs P2Y₁₂ sont situés sur la membrane plaquettaire au repos tandis qu'environ 10% des récepteurs P2Y₁₂ sont situés dans des compartiments internes, et que des mécanismes de trafic intraplaquettaires pour le récepteur P2Y₁₂ existent, il est permis de penser qu'un antagonisme soutenu du récepteur P2Y₁₂ pourrait amener des modifications à la hausse du nombre ou du couplage du récepteur P2Y₁₂ plaquettaire membranaire. Cette hypothèse mérite d'être étudiée en détails, où le marquage du récepteur P2Y₁₂ à l'aide d'un anticorps polyclonal permettrait d'identifier le nombre de récepteurs à la surface plaquettaire, tandis que l'étude de la phosphorylation de VASP permettrait de déterminer si son couplage avec des voies signalétiques intraplaquettaires est amélioré. Toutefois, il est à noter que les mécanismes décrits dans ce paragraphe requièrent de quelques secondes à quelques minutes pour se manifester, et il serait improbable qu'ils expliquent un rebond de l'activité plaquettaire noté plusieurs jours, voire semaines, après la cessation de clopidogrel.

Une explication d'intérêt pourrait provenir des précurseurs des plaquettes, soient les mégacaryocytes. Ces cellules plurinucléées sont fortement réactives à leur environnement, et même de petites modifications dans leur environnement influencent la quantité et la morphologie des plaquettes produites.³⁴⁵ Les mégacaryocytes expriment les mêmes protéines intracellulaires et les mêmes récepteurs membranaires que les plaquettes.³²⁹ Spécifiquement, les récepteurs purinergiques P2X₁, P2Y₁ et P2Y₁₂ sont présents sur la membrane mégacaryocytaire et jouent un rôle important dans la transduction des courants calciques dans le mégacaryocyte.³⁴⁶ L'inhibition du récepteur P2Y₁₂ mégacaryocytaire par le clopidogrel pourrait donc, en théorie, entraîner des mécanismes compensatoires dans le mégacaryocyte, ce qui serait transmis aux plaquettes générées par le morcellement de ces cellules. Aucune étude n'a pour le moment rapporté l'effet de l'administration chronique de clopidogrel sur les mégacaryocytes. Toutefois, plusieurs études ont rapporté un effet inhibiteur de l'AAS sur les mégacaryocytes et un tel effet a été suggéré pour la ticlopidine, ce qui laisse croire qu'un effet similaire pourrait se produire avec le clopidogrel.^{329, 347} Si l'administration de clopidogrel se traduisait en une inhibition du récepteur P2Y₁₂ mégacaryocytaire, un mécanisme compensatoire pourrait être engendré et la formation de nouvelles plaquettes hypersensibles à l'ADP pourrait avoir lieu. Tant que l'administration de clopidogrel serait maintenue, l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ plaquettaire par le clopidogrel pourrait masquer cet effet, qui ne serait apparent que suivant la cessation du médicament, après un délai 3 à 7 jours requis pour remplacer une importante proportion des plaquettes inhibées de façon permanente en circulation (**Figure 42**). Cette hypothèse pourrait donc expliquer le délai entre la cessation du clopidogrel et la survenue d'événements ischémiques aigus rapporté dans la littérature épidémiologique. L'induction de la synthèse protéique dans les mégacaryocytes pourrait aussi avoir des répercussions à long terme sur les plaquettes, puisque les protéines une fois produites se retrouveraient dans plusieurs générations de plaquettes, ce qui expliquerait le maintien de l'hyperactivité plaquettaire pendant les semaines qui suivent la cessation de clopidogrel.

Figure 42 : Mécanisme compensatoire potentiel lors de l'administration chronique de clopidogrel



Reproduction autorisée : Lordkipanidzé M, Diodati JG, Pharand C. Possibility of a rebound phenomenon following antiplatelet therapy withdrawal: a look at the clinical and pharmacological evidence. *Pharmacol Ther.* 2009; 123: 178-186. Copyright © 2009 Elsevier Inc.

L'induction d'une régulation à la hausse de l'expression des récepteurs P2Y₁₂ dans les mégacaryocytes par la prise chronique de clopidogrel demeure hypothétique. Néanmoins, une modulation de l'expression du récepteur P2Y₁₂ dans les mégacaryocytes a déjà été suggérée pour la nicotine.³⁴⁸ En effet, dans une étude sur des mégacaryoblastes humains en culture (MEG-01), l'incubation avec la nicotine à des concentrations variant de 0,1 à 1 µM a induit une surexpression du récepteur P2Y₁₂.³⁴⁸ En parallèle, les chercheurs ont démontré que les plaquettes de fumeurs exprimaient significativement plus de récepteurs P2Y₁₂ par rapport aux non-fumeurs, ce qui suggérait que la nicotine contenue dans les cigarettes influençait l'expression des récepteurs P2Y₁₂ des mégacaryocytes *in vivo*, ce qui se traduisait en une expression plus importante dans les plaquettes. Ainsi, la modulation de l'expression du récepteur P2Y₁₂ *in vivo* semble plausible, et devra être spécifiquement évaluée dans les études futures.

Une question qui demeure sans réponse suite à cette discussion est la spécificité au récepteur P2Y₁₂ d'un potentiel rebond de l'activité plaquettaire provoqué par la cessation de clopidogrel. En effet, dans notre étude, une augmentation de sensibilité à l'ADP a été notée, mais l'effet sur les autres agonistes plaquettaires n'a pas été étudié. À la lumière des

résultats présentés dans le **Chapitre 7**, où un rétablissement de la fonction plaquettaire en réponse à l'acide arachidonique malgré une administration quotidienne d'AAS a été décelé, il serait intéressant d'évaluer si la cessation de clopidogrel a un impact sur les autres voies d'activation plaquettaire, mais plus spécifiquement sur la voie de la COX-1 puisque la prise continue à vie d'AAS est recommandée chez les sujets cessant le clopidogrel. En effet, il existe des interactions entre les récepteurs purinergiques et les récepteurs TP sur la plaquette. Une co-localisation des récepteurs P2Y₁ et TP sur la membrane plaquettaire explique en partie qu'une stimulation d'un type de récepteur par son agoniste mène à l'internalisation simultanée des deux types de récepteurs et une désensibilisation subséquente des deux types de récepteur.³⁴⁴ Ce qui est particulièrement intéressant, c'est que l'administration d'AAS atténue la désensibilisation des récepteurs purinergiques, ce qui renforce la notion d'activation croisée des récepteurs (*cross-talk*) au niveau plaquettaire.³⁴⁹ Il s'en suit qu'une inhibition prolongée du récepteur P2Y₁₂ par le clopidogrel pourrait, en théorie, augmenter la sensibilité du récepteur TP plaquettaire à son agoniste endogène, la TxA₂. Une étude approfondie de la sensibilité des plaquettes aux autres agonistes plaquettaires suite à la cessation de clopidogrel pourrait donc démontrer une hypersensibilité croisée de la plaquette, et accroître donc le risque de complications thrombotiques au-delà de la sensibilisation isolée du récepteur P2Y₁₂. Cette hypothèse devra être testée spécifiquement dans les études futures.

c) Les répercussions thérapeutiques et perspectives d'avenir

Aucune étude jusqu'à présent n'a pu démontrer la causalité entre un état d'hyperactivité plaquettaire transitoire suite au retrait du clopidogrel et la survenue d'événements thrombotiques. Néanmoins, la concordance de ces phénomènes dans le temps laisse suspecter qu'un tel lien puisse exister. Notre étude laisse entendre qu'au cours des semaines qui suivent le retrait du clopidogrel, les plaquettes nouvellement générées par les mégacaryocytes sont significativement plus réactives à l'ADP que les plaquettes de patients similaires ne prenant pas de clopidogrel. Ces résultats devront être confirmés dans des études cliniques d'envergure, mais pour que ces résultats soient cliniquement

pertinents, ils devront être obtenus de sujets souffrant de maladie coronarienne qui doivent cesser la prise de clopidogrel à la fin de la période recommandée. En effet, tel que décrit plus haut, les études sur volontaires sains où le clopidogrel est administré à court terme ne semblent pas détecter un signal d'effet rebond, tandis que les études sur sujets souffrant de maladie coronarienne et ayant reçu un traitement chronique de clopidogrel pendant environ un an semblent indiquer que le retrait du clopidogrel provoque une période d'hyperactivité plaquettaire transitoire.^{311, 312, 314-316, 337}

Les mécanismes pathophysiologiques, cellulaires et moléculaires devraient également être investigués. Le fait que le rebond semble plus présent chez les patients souffrant de maladie coronarienne, et encore plus important chez les patients souffrant de diabète concomitant, laisse croire que des voies d'interaction avec la paroi vasculaire (particulièrement en ce qui a trait aux molécules inhibitrices comme le NO ou la PGI₂) pourraient contribuer à ce phénomène. Également, la nécessité d'une inhibition soutenue et prolongée, ainsi que le délai dans l'apparition de l'effet rebond tant au niveau pharmacologique qu'épidémiologique, laisse suspecter que les mégacaryocytes pourraient être en cause dans ce phénomène. Cette hypothèse devrait être testée formellement.

Finalement, au niveau clinique, il serait important de quantifier l'impact clinique d'un tel effet rebond plaquettaire, mais également d'explorer des méthodes de palliation. L'étude DAPT (*The Dual Antiplatelet Therapy Study*, NCT 00977938 sur ClinicalTrials.gov) enrôlera 20 000 sujets ayant subi un syndrome coronarien aigu et une pose de tuteur coronarien, et recevant du clopidogrel ou du prasugrel, à la discrétion du médecin traitant. À la fin de 12 mois après l'initiation du traitement, les sujets seront randomisés à continuer à recevoir une thiényridine ou à recevoir un placebo pendant 18 mois. Après cette période, la cessation du médicament actif ou du placebo sera pratiquée et les sujets seront suivis pendant 3 mois de plus pour vérifier la présence ou non d'un effet rebond clinique. Cette étude permettra donc de répondre à 2 questions importantes, soient quelle est la durée optimale de traitement à l'aide d'une thiényridine après un événement coronarien aigu et y a-t-il un effet rebond suite à la discontinuation d'un médicament

thiénopyridine. Cette étude permettra aussi de déterminer si un tel effet serait un effet de classe ou spécifique au clopidogrel.

L'étude ISAR-CAUTION (*Abrupt Versus Tapered Interruption of Chronic Clopidogrel Therapy After DES Implantation*, NCT00640679 sur ClinicalTrials.gov) enrôlera 3 000 sujets qui seront randomisés à la fin de leur durée de traitement recommandée à recevoir une dose décroissante de clopidogrel sur 4 semaines ou à poursuivre le clopidogrel à pleine dose et à le cesser abruptement après 4 semaines. Cette étude vise donc à vérifier si un calendrier de sevrage du clopidogrel pourrait pallier les effets potentiellement néfastes d'une cessation soudaine du médicament, telle qu'elle est pratiquée présentement.

La compréhension d'un potentiel effet rebond dans l'activité plaquettaire suite à la cessation de clopidogrel repose donc tant sur des études fondamentales sur les mécanismes d'un tel phénomène que sur des études cliniques qui répertorient et tentent d'influencer les manifestations cliniques de ce processus. Ces études permettront de mieux comprendre les risques associés à la cessation de clopidogrel et potentiellement d'ajuster la pratique clinique pour réduire le risque thrombotique chez les sujets souffrant de maladie coronarienne.

Conclusion

Les études présentées dans cet ouvrage se concentrent sur différentes facettes de la variabilité de réponse aux médicaments antiplaquettaires. Elles font partie d'un programme de recherche plus étendu dont le but est l'individualisation des soins aux besoins spécifiques de chaque patient (**Annexe 6**). Dans ce continuum, notre équipe de recherche a tenté de combler l'écart entre l'étude fondamentale mécanistique et l'application des résultats de recherche en clinique. Les études présentées dans cette thèse en sont des exemples percutants, où les résultats de recherche obtenus pourraient avoir un impact direct sur les soins des patients. Ainsi, suite à l'étude sur la durabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS, une révision de la fréquence d'administration de ce médicament pourrait contribuer à une meilleure protection antithrombotique chez certains sujets sélectionnés. Dans l'étude sur l'utilité clinique des tests de fonction plaquettaire, nous retrouvons une leçon importante : l'aspect technologique de la disponibilité de tels tests ne dispense pas l'équipe soignante de la collaboration nécessaire pour s'assurer que le patient puisse bien prendre le médicament qui lui a été prescrit. Dans l'étude sur l'impact de la cessation de clopidogrel sur la fonction plaquettaire, nous questionnons la pratique actuelle de cesser le médicament abruptement chez tous les sujets, et nous ouvrons la porte à la recherche sur différentes modalités pour atténuer un risque thrombotique accru chez certains patients.

Dans tous ces cas, notre programme de recherche vise à identifier les sous-populations de patients qui sont délaissés dans un modèle unique d'application de thérapies. Ces patients qui répondent trop ou trop peu aux procédés standards représentent les patients les plus à risque de complications récurrentes et d'hospitalisations. En ce sens, la recherche translationnelle est essentielle pour mieux comprendre la diversité de processus biologiques propre à chaque individu et à adapter le traitement clinique en conséquence. La solution réside sans doute dans le travail en multidisciplinarité, qui permettra de profiter des expertises particulières des différents professionnels et amènera les résultats de recherche aux patients. Le traitement personnalisé représente donc une avenue future prometteuse, où des données spécifiques à chaque individu, incluant des données génétiques, fonctionnelles et socio-économiques, dirigeront le choix vers le traitement le mieux adapté à chacun.

Le développement et la mise en marché prochaine d'une multitude de traitements antiplaquettaires ciblant des voies distinctes de l'activation plaquettaire permettront d'augmenter les options thérapeutiques éventuelles. La disponibilité grandissante des tests de fonction plaquettaire facilite également l'évaluation fonctionnelle de l'activité plaquettaire propre à chaque individu, pour mieux identifier les voies d'activation plaquettaire à cibler selon une condition clinique donnée. Dans ce contexte, la personnalisation de traitement revêt un intérêt grandissant, puisque chaque patient pourra recevoir un traitement ciblé en fonction de ses besoins et de ses contre-indications. Pour y arriver, ces nouvelles modalités de traitement basées sur les données individuelles des patients devront être étudiées et testées, et tant leur utilité clinique que leur applicabilité en pratique clinique devront être démontrées. Ce changement de paradigme d'une thérapie empirique issue d'études de grande envergure sur des données populationnelles à une thérapie ajustée aux besoins individuels représente donc un vaste champ de recherche, où la majorité des découvertes sont à faire.

Bibliographie

1. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86.
2. Fraker TD, Jr., Fihn SD, Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, Daley J, Deedwania PC, Douglas JS, Ferguson TB, Jr., Fihn SD, Fraker TD, Jr., Gardin JM, O'Rourke RA, Williams SV, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW. 2007 chronic angina focused update of the ACC/AHA 2002 Guidelines for the management of patients with chronic stable angina. *Circulation*. 2007;116:2762-2772.
3. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., Chavey WE, 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation*. 2007;116:e148-304.
4. Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernandez-Aviles F, Fox KA, Hasdai D, Ohman EM, Wallentin L, Wijns W, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Kristensen SD, Widimsky P, McGregor K, Sechtem U, Tendera M, Hellemans I, Gomez JL, Silber S, Funck-Brentano C, Kristensen SD, Andreotti F, Benzer W, Bertrand M, Betriu A, De Caterina R, DeSutter J, Falk V, Ortiz AF, Gitt A, Hasin Y, Huber K, Kornowski R, Lopez-Sendon J, Morais J, Nordrehaug JE, Silber S, Steg PG, Thygesen K, Tubaro M, Turpie AG, Verheugt F, Windecker S. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007;28:1598-1660.

5. Smith SC, Jr., Feldman TE, Hirshfeld JW, Jr., Jacobs AK, Kern MJ, King SB, 3rd, Morrison DA, O'Neil WW, Schaff HV, Whitlow PL, Williams DO, Antman EM, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation*. 2006;113:e166-286.
6. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, Hochman JS, Krumholz HM, Lamas GA, Mullany CJ, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC, Jr. 2007 Focused update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2007;117:296-329.
7. Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis DA, Diodati JG. Aspirin resistance : Truth or dare. *Pharmacol Ther*. 2006;112:733-743.
8. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1157-1164.
9. 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;167:1593-1599.
10. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2007;154:221-231.
11. Lordkipanidzé M, Diodati JG, Pharand C. Possibility of a rebound phenomenon following antiplatelet therapy withdrawal: a look at the clinical and pharmacological evidence. *Pharmacol Ther*. 2009;123:178-186.
12. Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC, Jr., Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P. Heart disease and stroke statistics - 2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006;113:e85-151.

13. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet*. 1999;353:89-92.
14. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA*. 2003;290:891-897.
15. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, Ellis SG, Lincoff AM, Topol EJ. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA*. 2003;290:898-904.
16. Kappagoda CT, Amsterdam EA. Assessment of risk for developing coronary heart disease in asymptomatic individuals. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2009;29:207-219.
17. Buckley DI, Fu R, Freeman M, Rogers K, Helfand M. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2009;151:483-495.
18. Bell A, Hill MD, Herman RJ, Girard M, Cohen E. Management of atherothrombotic risk factors in high-risk Canadian outpatients. *Can J Cardiol*. 2009;25:345-351.
19. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;104:365-372.
20. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J*. 2004;25:1197-1207.
21. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol*. 2006;133:251-258.
22. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res*. 2007;31:1339-1341.
23. Mазzarello P, Calligaro AL, Calligaro A. Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:776-781.
24. Bizzozero G. Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv path. Anat. Physiol. klin. Med*. 1882;90:261-332 (traduit en anglais par Beck EA. On a new blood particle and its role in thrombosis and blood coagulation. Berne, Suisse, Hans Huber, 1982).
25. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:381-392.

26. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol.* 1998;60:3-24.
27. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005;115:3339-3347.
28. van der Loo B, Martin JF. A role for changes in platelet production in the cause of acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:672-679.
29. Hartley PS. Platelet senescence and death. *Clin Lab.* 2007;53:157-166.
30. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol.* 2001;8:270-276.
31. Freedman JE. Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation.* 2005;112:2725-2734.
32. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007;109:5087-5095.
33. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:17-20.
34. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:403-412.
35. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res.* 2008;122:786-803.
36. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Daurman HL, Becker RC. Platelet functions beyond haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1759-1766.
37. Gachet C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther.* 2005;108:180-192.
38. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost.* 2008;99:466-472.
39. Brass LF. The molecular basis of platelet activation. In: Hoffman R, Furie B, McGlave P, Silberstein LE, eds. *Hematology: Basic Principles and Practice.* 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2008:1793-1804.

40. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol.* 1991;68:11B-15B.
41. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1187-1205.
42. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation.* 2000;101:1206-1218.
43. Chamorro A. TP receptor antagonism: a new concept in atherothrombosis and stroke prevention. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27 Suppl 3:20-27.
44. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2009;102:248-257.
45. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1381-1389.
46. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2002;1:273-288.
47. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost.* 2009;7:241-246.
48. Evangelista V, Manarini S, Di Santo A, Capone ML, Ricciotti E, Di Francesco L, Tacconelli S, Sacchetti A, D'Angelo S, Scilimati A, Sciulli MG, Patrignani P. De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res.* 2006;98:593-595.
49. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:s17-24.
50. Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets.* 2008;19:395-404.
51. Lévesque H, Lafont O. L'aspirine à travers les siècles: rappel historique. *Rev Med Interne.* 2000;21 Suppl 1:8s-17s.
52. Devulder B. Immortelle aspirine... *Rev Med Interne.* 2000;21 Suppl 1:5s-7s.
53. Jack DB. One hundred years of aspirin. *Lancet.* 1997;350:437-439.
54. Samama MM, Elalamy I. Aspirine et hémostase. *Rev Med Interne.* 2000;21 Suppl 1:27s-34s.

55. Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5292-5297.
56. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J*. 2001;15:2057-2072.
57. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231:232-235.
58. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research*. 2003;110:255-258.
59. Tanasescu S, Lévesque H, Thuillez C. Pharmacologie de l'aspirine. *Rev Med Interne*. 2000;21 Suppl 1:18s-26s.
60. Ray WA, Stein CM, Hall K, Daugherty JR, Griffin MR. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease: an observational cohort study. *Lancet*. 2002;359:118-123.
61. Capone ML, Sciulli MG, Tacconelli S, Grana M, Ricciotti E, Renda G, Di Gregorio P, Merciaro G, Patrignani P. Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1295-1301.
62. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med*. 2001;345:1809-1817.
63. Kurth T, Glynn RJ, Walker AM, Chan KA, Buring JE, Hennekens CH, Gaziano JM. Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Circulation*. 2003;108:1191-1195.
64. Benedek IH, Joshi AS, Pieniaszek HJ, King SY, Kornhauser DM. Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*. 1995;35:1181-1186.
65. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126:234S-264S.
66. Cerletti C, Bonati M, del Maschio A, Galletti F, Dejana E, Tognoni G, de Gaetano G. Plasma levels of salicylate and aspirin in healthy volunteers: relevance to drug interaction on platelet function. *J Lab Clin Med*. 1984;103:869-877.

67. Feldman M, Cryer B. Aspirin absorption rates and platelet inhibition times with 325-mg buffered aspirin tablets (chewed or swallowed intact) and with buffered aspirin solution. *The American Journal of Cardiology*. 1999;84:404-409.
68. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008;133:199S-233S.
69. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest*. 1982;69:1366-1372.
70. FitzGerald GA, Oates JA, Hawiger J, Maas RL, Roberts LJ, 2nd, Lawson JA, Brash AR. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *J Clin Invest*. 1983;71:676-688.
71. Weksler BB, Pett SB, Alonso D, Richter RC, Stelzer P, Subramanian V, Tack-Goldman K, Gay WA, Jr. Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med*. 1983;308:800-805.
72. Boss AH, Boysen G, Olseen JS. Effect of incremental doses of aspirin on bleeding time, platelet aggregation and thromboxane production in patients with cerebrovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 1985;15:412-414.
73. Di Minno G, Silver MJ, Murphy S. Monitoring the entry of new platelets into the circulation after ingestion of aspirin. *Blood*. 1983;61:1081-1085.
74. Perneby C, Wallen NH, Rooney C, Fitzgerald D, Hjemdahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thromb Haemost*. 2006;95:652-658.
75. Sonksen JR, Kong KL, Holder R. Magnitude and time course of impaired primary haemostasis after stopping chronic low and medium dose aspirin in healthy volunteers. *Br J Anaesth*. 1999;82:360-365.
76. Vilahur G, Choi BG, Zafar MU, Viles-Gonzalez JF, Vorchheimer DA, Fuster V, Badimon JJ. Normalization of platelet reactivity in clopidogrel-treated subjects. *J Thromb Haemost*. 2007;5:82-90.
77. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative

- meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373:1849-1860.
78. Pedersen AK, FitzGerald GA. Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med*. 1984;311:1206-1211.
 79. de Gaetano G, Cerletti C, Dejana E, Latini R. Pharmacology of platelet inhibition in humans: implications of the salicylate-aspirin interaction. *Circulation*. 1985;72:1185-1193.
 80. Pappas JM, Westengard JC, Bull BS. Population variability in the effect of aspirin on platelet function. Implications for clinical trials and therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 1994;118:801-804.
 81. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 2001;88:230-235.
 82. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thrombosis Research*. 2002;107:45-49.
 83. Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I. Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research*. 2003;108:37-42.
 84. Christiaens L, Macchi L, Herpin D, Coisne D, Duplantier C, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance to aspirin in vitro at rest and during exercise in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Thrombosis Research*. 2003;108:115-119.
 85. Friend M, Vucenik I, Miller M. Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ*. 2003;326:82-83.
 86. 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. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:961-965.
 87. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Ragot S, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet P1A1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T kozak (GP Ib[alpha]) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1115-1119.
 88. Addad F, Hassine M, Ben Farhat M, Abderrazak F, Chakroun T, Gamra H, Hamdi S, Betbout F, Samama M, Elalamy I. Variabilité intra-individuelle de l'effet

antiagrégant plaquettaire de l'aspirine chez le coronarien. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005;98:979-983.

89. Chen WH, Lee PY, Ng W, Kwok JY, Cheng X, Lee SW, Tse HF, Lau CP. Relation of aspirin resistance to coronary flow reserve in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *The American Journal of Cardiology.* 2005;96:760-763.
90. Coma-Canella I, Velasco A, Castano S. Prevalence of aspirin resistance measured by PFA-100. *Int J Cardiol.* 2005;101:71-76.
91. Crowe B, Abbas S, Meany B, de Haan J, Cahill MR. Detection of Aspirin Resistance by PFA-100: Prevalence and Aspirin Compliance in Patients with Chronic Stable Angina. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:420-425.
92. Dussailant NG, Zapata MM, Fardella BP, Conte LG, Cuneo VM. [Frequency and characteristics of aspirin resistance in Chilean cardiovascular patients]. *Rev Med Chil.* 2005;133:409-417.
93. Hobikoglu GF, Norgaz T, Aksu H, Ozer O, Erturk M, Nurkalem Z, Narin A. High frequency of aspirin resistance in patients with acute coronary syndrome. *Tohoku J Exp Med.* 2005;207:59-64.
94. Kuliczkowski W, Halawa B, Korolko B, Mazurek W. Aspirin resistance in ischaemic heart disease. *Kardiol Pol.* 2005;62:14-25.
95. Lee PY, Chen WH, Ng W, Cheng X, Kwok JY, Tse HF, Lau CP. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2005;118:723-727.
96. Pamukcu B, Oflaz H, Acar RD, Umman S, Koylan N, Umman B, Nisanci Y. The role of exercise on platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease: exercise induces aspirin resistant platelet activation. *J Thromb Thrombolysis.* 2005;20:17-22.
97. Sadiq PA, Puri A, Dixit M, Ghatak A, Dwivedi SK, Narain VS, Saran RK, Puri VK. Profile and prevalence of aspirin resistance in Indian patients with coronary artery disease. *Indian Heart J.* 2005;57:658-661.
98. Lordkipanidzé 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;28:1702-1708.

99. Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, Reeves MJ, Barber K, DeFranco A. Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2005;95:973-975.
100. Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, Vered Z, Krakover R, Kaluski E, Kornberg A. Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J.* 2004;147:293-300.
101. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: Effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:122-130.
102. Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. *Thrombosis Research.* 2003;112:275-283.
103. Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, Crean P, Shields DC, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost.* 2005;3:2340-2345.
104. Hetherington SL, Singh RK, Lodwick D, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. Dimorphism in the P2Y1 ADP receptor gene is associated with increased platelet activation response to ADP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:252-257.
105. Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, Ginsburg G, Parker A, Kottke-Marchant K, Topol EJ. Aspirin resistance and a single gene. *The American Journal of Cardiology.* 2005;95:805-808.
106. Faraday N, Becker DM, Becker LC. Pharmacogenomics of platelet responsiveness to aspirin. *Pharmacogenomics.* 2007;8:1413-1425.
107. Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;66:222-232.
108. Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J-I. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke.* 2000;31:591-595.
109. Borna C, Lazarowski E, van Heusden C, Ohlin H, Erlinge D. Resistance to aspirin is increased by ST-elevation myocardial infarction and correlates with adenosine diphosphate levels. *Thromb J.* 2005;3:10.
110. Papp E, Havasi V, Bene J, Komlosi K, Czopf L, Magyar E, Feher C, Feher G, Horvath B, Marton Z, Alexy T, Habon T, Szabo L, Toth K, Meleg B. Glycoprotein IIIA gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? *Ann Pharmacother.* 2005;39:1013-1018.

111. Santos MT, Valles J, Lago A, Tembl J, Sanchez E, Moscardo A, Cosin J. Residual platelet thromboxane A₂ and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease. *J Thromb Haemost.* 2008;6:615-621.
112. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Eiroa AM, Aznar J. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest.* 1991;87:571-580.
113. Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, Sanchez E, Broekman MJ, Marcus AJ. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality : the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation.* 1998;97:350-355.
114. Patrignani P. Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. *Thrombosis Research.* 2003;110:281-286.
115. Rajendran S, Chirkov YY. Platelet hyperaggregability: impaired responsiveness to nitric oxide ("platelet NO resistance") as a therapeutic target. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2008;22:193-203.
116. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88:756-762.
117. Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:259-269.
118. Basarici I, Altekin RE, Demir I, Yilmaz H. Associations of isoprostanes-related oxidative stress with surrogate subclinical indices and angiographic measures of atherosclerosis. *Coron Artery Dis.* 2007;18:615-620.
119. Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2004;38:105-122.
120. Csiszar A, Stef G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress-induced isoprostane formation may contribute to aspirin resistance in platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66:557-558.
121. Kranzhofer R, Ruef J. Aspirin resistance in coronary artery disease is correlated to elevated markers for oxidative stress but not to the expression of cyclooxygenase (COX) 1/2, a novel COX-1 polymorphism or the P1A(1/2) polymorphism. *Platelets.* 2006;17:163-169.

122. Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, Drzewoski J. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *J Mol Med.* 2005;83:148-158.
123. Gresner P, Dolnik M, Waczulikova I, Bryszewska M, Sikurova L, Watala C. Increased blood plasma hydrolysis of acetylsalicylic acid in type 2 diabetic patients: a role of plasma esterases. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760:207-215.
124. Adebayo GI, Williams J, Healy S. Aspirin esterase activity - Evidence for skewed distribution in healthy volunteers. *Eur J Intern Med.* 2007;18:299-303.
125. Lordkipanidzé M, Diodati JG, Turgeon J, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C. Platelet count, not oxidative stress, may contribute to inadequate platelet inhibition by aspirin. *Int J Cardiol.* 2009;doi:10.1016/j.ijcard.2009.1001.1037.
126. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikan M, Tellez A, DeLao T, Granada JF, Dong JF, Kleiman NS, Lev EI. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:743-749.
127. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, Delao T, Bergeron AL, Dong JF, Kleiman NS. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost.* 2007;5:490-496.
128. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schror K, Hohlfeld T. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation.* 2003;108:542-547.
129. Gresele P, Momi S. Pharmacologic profile and therapeutic potential of NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin, for cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006;24:148-168.
130. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2008;118:18-35.
131. Verbeuren TJ. [Terutroban and endothelial TP receptors in atherogenesis]. *Med Sci (Paris).* 2006;22:437-443.
132. Gaussem P, Reny JL, Thalamas C, Chatelain N, Kroumova M, Jude B, Boneu B, Fiessinger JN. The specific thromboxane receptor antagonist S18886: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1437-1445.

133. Belhassen L, Pelle G, Dubois-Rande JL, Adnot S. Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1198-1204.
134. Hennerici MG. Rationale and design of the Prevention of Cerebrovascular and Cardiovascular Events of Ischemic Origin with Terutroban in Patients with a History of Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack (PERFORM) Study. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27 Suppl 3:28-32.
135. Wallentin L. P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J*. 2009;30:1964-1977.
136. Farid NA, Kurihara A, Wrighton S. Metabolism and Disposition of the Thienopyridine Antiplatelet Drugs Ticlopidine, Clopidogrel, and Prasugrel in Humans. *J Clin Pharmacol*. 2009;doi: 10.1177/0091270009343005.
137. Kam PC, Nethery CM. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments. *Anaesthesia*. 2003;58:28-35.
138. Noble S, Goa KL. Ticlopidine. A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the prevention of cerebral ischaemia and stroke. *Drugs Aging*. 1996;8:214-232.
139. Haushofer A, Halbmayer WM, Prachar H. Neutropenia with ticlopidine plus aspirin. *Lancet*. 1997;349:474-475.
140. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;339:1665-1671.
141. Bertrand ME, Legrand V, Boland J, Fleck E, Bonnier J, Emmanuelson H, Vrolix M, Missault L, Chierchia S, Casaccia M, Niccoli L, Oto A, White C, Webb-Peploe M, Van Belle E, McFadden EP. Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. The full anticoagulation versus aspirin and ticlopidine (FANTASTIC) study. *Circulation*. 1998;98:1597-1603.
142. Urban P, Macaya C, Rupprecht HJ, Kiemeneij F, Emanuelsson H, Fontanelli A, Pieper M, Wesseling T, Sagnard L. Randomized evaluation of anticoagulation versus antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients: the

- multicenter aspirin and ticlopidine trial after intracoronary stenting (MATTIS). *Circulation*. 1998;98:2126-2132.
143. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med*. 1996;334:1084-1089.
 144. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ*. 1994;308:81-106.
 145. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation*. 2000;102:624-629.
 146. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). . *Lancet*. 1996;348:1329-1339.
 147. The clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001;345:494-502.
 148. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet*. 2001;358:527-533.
 149. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288:2411-2420.
 150. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005;366:1607-1621.
 151. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, Lopez-Sendon JL, Montalescot G, Theroux P, Claeys MJ, Cools F, Hill KA, Skene AM, McCabe CH, Braunwald E. Addition

of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2005;352:1179-1189.

152. Patti G, Colonna G, Pasceri V, Pepe LL, Montinaro A, Di Sciascio G. Randomized trial of high loading dose of clopidogrel for reduction of periprocedural myocardial infarction in patients undergoing coronary intervention: results from the ARMYDA-2 (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study. *Circulation.* 2005;111:2099-2106.
153. Montalescot G, Sideris G, Meuleman C, Bal-dit-Sollier C, Lellouche N, Steg PG, Slama M, Milleron O, Collet JP, Henry P, Beygui F, Drouet L. 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;48:931-938.
154. von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, Schomig E, Kastrati A, Schomig A. Absorption, metabolization, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial. *Circulation.* 2005;112:2946-2950.
155. Michelson AD, Linden MD, Furman MI, Li Y, Barnard MR, Fox ML, Lau WC, McLaughlin TJ, Frelinger AL. Evidence that pre-existent variability in platelet response to ADP accounts for 'clopidogrel resistance'. *J Thromb Haemost.* 2007;5:75-81.
156. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation.* 2003;107:2908-2913.
157. Heestermans AA, van Werkum JW, Taubert D, Seesing TH, von Beckerath N, Hackeng CM, Schomig E, Verheugt FW, ten Berg JM. Impaired bioavailability of clopidogrel in patients with a ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb Res.* 2008;122:776-781.
158. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, Kastrati A, Schomig A, Schomig E. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80:486-501.
159. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramirez C, Sabate M, Fernandez C, Hernandez-Antolin R, Escaned J, Alfonso F, Macaya C. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting:

- should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol.* 2004;16:169-174.
160. Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, Schomig A, Schomig E. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost.* 2004;92:311-316.
 161. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, Guyer KE, Tait AR, Bates ER. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation.* 2004;109:166-171.
 162. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009;360:354-362.
 163. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, Steg PG, Ferrieres J, Danchin N, Becquemont L. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009;360:363-375.
 164. Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, Rumsfeld JS. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *Jama.* 2009;301:937-944.
 165. Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, Szmitko PE, Austin PC, Tu JV, Henry DA, Kopp A, Mamdani MM. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ.* 2009;180:713-718.
 166. Motovska Z, Widimsky P, Petr R, Bilkova D, Marinov I, Simek S, Kala P. Factors influencing clopidogrel efficacy in patients with stable coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention: statin's advantage and the smoking "paradox". *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;53:368-372.
 167. Fontana P, Hulot JS, De Moerloose P, Gaussem P. Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost.* 2007;5:2153-2155.
 168. Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation.* 2003;108:989-995.
 169. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabate M, Fernandez C, Stranieri C, Trabetti E, Pignatti PF, Macaya C. PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004;15:89-93.

170. Cooke GE, Liu-Stratton Y, Ferketich AK, Moeschberger ML, Frid DJ, Magorien RD, Bray PF, Binkley PF, Goldschmidt-Clermont PJ. Effect of platelet antigen polymorphism on platelet inhibition by aspirin, clopidogrel, or their combination. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:541-546.
171. Nguyen TA, Lordkipanidze M, Diodati JG, Palisaitis DA, Schampaert E, Turgeon J, Pharand C. Week-long high-maintenance dose clopidogrel regimen achieves better platelet aggregation inhibition than a standard loading dose before percutaneous coronary intervention: results of a double-blind, randomized clinical trial. *J Interv Cardiol*. 2009;22:368-377.
172. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, Boyer C, Panagides D, Wittenberg O, Simeoni MC, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1404-1411.
173. Palmerini T, Barozzi C, Tomasi L, Sangiorgi D, Marzocchi A, De Servi S, Ortolani P, Bacchi Reggiani L, Alessi L, Lauria G, Bassi M, Branzi A. A randomised study comparing the antiplatelet and antiinflammatory effect of clopidogrel 150mg/day versus 75mg/day in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction and poor responsiveness to clopidogrel: Results from the DOUBLE study. *Thromb Res*. 2009.
174. von Beckerath N, Kastrati A, Wiecek A, Pogatsa-Murray G, Sibbing D, Graf I, Schomig A. A double-blind, randomized study on platelet aggregation in patients treated with a daily dose of 150 or 75 mg of clopidogrel for 30 days. *Eur Heart J*. 2007;28:1814-1819.
175. Angiolillo DJ, Bernardo E, Palazuelos J, Desai B, Weisberg I, Alfonso F, Guzman LA, Hernandez-Antolin R, Zenni MZ, Macaya C, Fernandez-Ortiz A, Bass TA. Functional impact of high clopidogrel maintenance dosing in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions. Results of a randomized study. *Thromb Haemost*. 2008;99:161-168.
176. Collet JP, Silvain J, Landivier A, Tanguy ML, Cayla G, Bellemain A, Vignolles N, Gallier S, Beygui F, Pena A, Montalescot G. Dose effect of clopidogrel reloading in patients already on 75-mg maintenance dose: the Reload with Clopidogrel Before Coronary Angioplasty in Subjects Treated Long Term with Dual Antiplatelet Therapy (RELOAD) study. *Circulation*. 2008;118:1225-1233.
177. Matetzky S, Fefer P, Shenkman B, Varon D, Savion N, Hod H. Effectiveness of reloading to overcome clopidogrel nonresponsiveness in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2008;102:524-529.

178. Neubauer H, Lask S, Engelhardt A, Mugge A. How to optimise clopidogrel therapy? Reducing the low-response incidence by aggregometry-guided therapy modification. *Thromb Haemost.* 2008;99:357-362.
179. Trenk D, Hochholzer W, Muller B, Stratz C, Valina CM, Schmiebusch P, Buttner HJ, Neumann FJ. Antiplatelet response to the 150-mg maintenance dose of clopidogrel in patients with insufficient platelet inhibition after clopidogrel loading for elective coronary stent placement. *EuroIntervention.* 2008;4:214-221.
180. Campo G, Valgimigli M, Gemmati D, Percoco G, Catozzi L, Frangione A, Federici F, Ferrari F, Tebaldi M, Luccarelli S, Parrinello G, Ferrari R. Poor responsiveness to clopidogrel: drug-specific or class-effect mechanism? Evidence from a clopidogrel-to-ticlopidine crossover study. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1132-1137.
181. Franchini M, Mannucci PM. New antiplatelet agents: why they are needed. *Eur J Intern Med.* 2009;20:733-738.
182. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357:2001-2015.
183. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Tantry US, Gesheff T, Wei C, Teng R, Antonino MJ, Patil SB, Karunakaran A, Kereiakes DJ, Parris C, Purdy D, Wilson V, Ledley GS, Storey RF. Randomized Double-Blind Assessment of the ONSET and OFFSET of the Antiplatelet Effects of Ticagrelor Versus Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Artery Disease. Randomized Double-Blind Assessment of the ONSET and OFFSET of the Antiplatelet Effects of Ticagrelor Versus Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Disease: The ONSET/OFFSET Study. *Circulation.* 2009;doi: 10.1161/circulationaha.1109.912550.
184. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA, Freij A, Thorsen M. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361:1045-1057.
185. Gurbel PA, Bliden KP, Antonino MJ, Stephens G, Gretler DD, Jurek MM, Pakyz RE, Shuldiner AR, Conley PB, Tantry US. The effect of elinogrel on high platelet reactivity during dual antiplatelet therapy and the relation to cyp 2c19*2 genotype: first experience in patients. *J Thromb Haemost.* 2009.
186. Bhatt DL, Lincoff AM, Gibson CM, Stone GW, McNulty S, Montalescot G, Kleiman NS, Goodman SG, White HD, Mahaffey KW, Pollack CV, Jr., Manoukian SV, Widimsky P, Chew DP, Cura F, Manukov I, Tousek F, Jafar MZ, Arneja J,

- Skerjanec S, Harrington RA. Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI. *N Engl J Med*. 2009;361:2330-2341.
- 187.** Harrington RA, Stone GW, McNulty S, White HD, Lincoff AM, Gibson CM, Pollack CV, Jr., Montalescot G, Mahaffey KW, Kleiman NS, Goodman SG, Amine M, Angiolillo DJ, Becker RC, Chew DP, French WJ, Leisch F, Parikh KH, Skerjanec S, Bhatt DL. Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI. *N Engl J Med*. 2009;361:2318-2329.
- 188.** Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest*. 1999;104:1731-1737.
- 189.** Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med*. 1999;5:1199-1202.
- 190.** Pfefferkorn JA, Choi C, Winters T, Kennedy R, Chi L, Perrin LA, Lu G, Ping YW, McClanahan T, Schroeder R, Leininger MT, Geyer A, Schefzick S, Atherton J. P2Y1 receptor antagonists as novel antithrombotic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18:3338-3343.
- 191.** Morales-Ramos AI, Mecom JS, Kiesow TJ, Graybill TL, Brown GD, Aiyar NV, Davenport EA, Kallal LA, Knapp-Reed BA, Li P, Londregan AT, Morrow DM, Senadhi S, Thalji RK, Zhao S, Burns-Kurtis CL, Marino JP, Jr. Tetrahydro-4-quinolinamines identified as novel P2Y(1) receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18:6222-6226.
- 192.** Chang H, Yanachkov IB, Michelson AD, Li Y, Barnard MR, Wright GE, Frelinger AL, 3rd. Agonist and antagonist effects of diadenosine tetraphosphate, a platelet dense granule constituent, on platelet P2Y1, P2Y12 and P2X1 receptors. *Thromb Res*. 125:159-165.
- 193.** Cattaneo M, Lecchi A, Ohno M, Joshi BV, Besada P, Tchilibon S, Lombardi R, Bischofberger N, Harden TK, Jacobson KA. Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y 1 receptor. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:1995-2002.
- 194.** Siddique A, Butt M, Shantsila E, Lip GY. New antiplatelet drugs: beyond aspirin and clopidogrel. *Int J Clin Pract*. 2009;63:776-789.
- 195.** Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:154-169.

196. Sallustio F, Rotondo F, Di Legge S, Stanzione P. Cilostazol in the Management of Atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8:doi: BSP/CVP/E-Pub/00056.
197. Jeong YH, Hwang JY, Kim IS, Park Y, Hwang SJ, Lee SW, Kwak CH, Park SW. Adding cilostazol to dual antiplatelet therapy achieves greater platelet inhibition than high maintenance dose clopidogrel in patients with acute myocardial infarction: Results of the adjunctive cilostazol versus high maintenance dose clopidogrel in patients with AMI (ACCEL-AMI) study. *Circ Cardiovasc Interv*. 2010;3:17-26.
198. Lee SW, Park SW, Yun SC, Kim YH, Park DW, Kim WJ, Lee JY, Lee CW, Hong MK, Kim JJ, Park SJ. Triple antiplatelet therapy reduces ischemic events after drug-eluting stent implantation: Drug-Eluting stenting followed by Cilostazol treatment REduces Adverse Serious cardiac Events (DECREASE registry). *Am Heart J*. 2010;159:284-291 e281.
199. Hildemann SK, Bode C. Improving antiplatelet therapy for atherothrombotic disease. *Hamostaseologie*. 2009;29:349-355.
200. The TRA-CER Executive and Steering Committees. The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA*CER) trial: study design and rationale. *Am Heart J*. 2009;158:327-334 e324.
201. de Gaetano G, Crescente M, Cerletti C. Current concepts about inhibition of platelet aggregation. *Platelets*. 2008;19:565-570.
202. Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2004;110:e489-493.
203. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci*. 2003;28:307-317.
204. Matzdorff A. Platelet function tests and flow cytometry to monitor antiplatelet therapy. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:393-399.
205. Harrison P. Advances in platelet counting. *Br J Haematol*. 2000;111:733-744.
206. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1705-1709.
207. Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol*. 2004;93:456-458.

208. Blais N, Pharand C, Lordkipanidze M, Sia YK, Merhi Y, Diodati JG. Response to aspirin in healthy individuals. Cross-comparison of light transmission aggregometry, VerifyNow system, platelet count drop, thromboelastography (TEG) and urinary 11-dehydrothromboxane B(2). *Thromb Haemost.* 2009;102:404-411.
209. Swallow RA, Agarwala RA, Dawkins KD, Curzen NP. Thromboelastography: potential bedside tool to assess the effects of antiplatelet therapy? *Platelets.* 2006;17:385-392.
210. 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;18:497-505.
211. Shenkman B, Einav Y, Salomon O, Varon D, Savion N. Testing agonist-induced platelet aggregation by the Impact-R [Cone and plate(let) analyzer (CPA)]. *Platelets.* 2008;19:440-446.
212. Shenkman B, Matetzky S, Fefer P, Hod H, Einav Y, Lubetsky A, Varon D, Savion N. Variable responsiveness to clopidogrel and aspirin among patients with acute coronary syndrome as assessed by platelet function tests. *Thromb Res.* 2008;122:336-345.
213. Spectre G, Brill A, Gural A, Shenkman B, Touretsky N, Mosseri E, Savion N, Varon D. A new point-of-care method for monitoring anti-platelet therapy: application of the cone and plate(let) analyzer. *Platelets.* 2005;16:293-299.
214. Nicholson N, Panzer-Knodle S, Haas N, Taite B, Szalony J, Page J, Feigen L, Lansky D, Salyers A. Assessment of platelet function assays. *American Heart Journal.* 1998;135:S170-178.
215. Haubelt H, Anders C, Hellstern P. Can platelet function tests predict the clinical efficacy of aspirin? *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:404-410.
216. Lordkipanidzé M, Pharand C, Nguyen TA, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG. Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *Eur Heart J.* 2008;29:2877-2885.
217. Lennon MJ, Gibbs NM, Weightman WM, McGuire D, Michalopoulos N. A comparison of Plateletworks and platelet aggregometry for the assessment of aspirin-related platelet dysfunction in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2004;18:136-140.
218. Campbell J, Ridgway H, Carville D. Plateletworks[®]: a novel point of care platelet function screen. *Mol Diagn Ther.* 2008;12:253-258.

219. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG. Evaluation of the platelet count drop method for assessment of platelet function in comparison with "gold standard" light transmission aggregometry. *Thromb Res.* 2009;124:418-422.
220. Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *J Clin Pathol.* 1986;39:701-712.
221. Marea AO, Curtin RJ, Dooley M, Conroy RM, Crean P, Cox D, Fitzgerald DJ. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1258-1263.
222. Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, Bhatt DL, Steg PG, Montalescot G, Johnston SC, Steinhubl SR, Mak KH, Easton JD, Hamm C, Hu T, Fox KA, Topol EJ. Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. *Circulation.* 2008;118:1705-1712.
223. 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;105:1650-1655.
224. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey TV. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost.* 1998;79:885-896.
225. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods.* 2000;21:259-270.
226. Weber AA, Adamzik M, Bachmann HS, Gorlinger K, Grandoch M, Leineweber K, Müller-Beissenhirtz H, Wenzel F, Naber C. Methods to evaluate the pharmacology of oral antiplatelet drugs. *Herz.* 2008;33:287-296.
227. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost.* 1999;82:1145-1152.
228. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, Schinzel R. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem.* 2005;51:957-965.

229. Blindt R, Stellbrink K, de Taeye A, Muller R, Kiefer P, Yagmur E, Weber C, Kelm M, Hoffmann R. The significance of vasodilator-stimulated phosphoprotein for risk stratification of stent thrombosis. *Thromb Haemost.* 2007;98:1329-1334.
230. Bonello L, Paganelli F, Dignat-George F, Camoin-Jau L, Barragan P. Two strategies of clopidogrel loading dose to decrease the frequency of clopidogrel resistance in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res.* 2008;122:285-288.
231. Frere C, Cuisset T, Quilici J, Camoin L, Carvajal J, Morange PE, Lambert M, Juhan-Vague I, Bonnet JL, Alessi MC. ADP-induced platelet aggregation and platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Thromb Haemost.* 2007;98:838-843.
232. Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol.* 2006;98:S4-S10.
233. Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D, Monbouquette R, Reisman M, Gray W, Block PC, Block EH, Ladenheim M, Simon DI. Incidence of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA. *The American Journal of Cardiology.* 2003;92:1492-1494.
234. Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med.* 2001;138:152-163.
235. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost.* 2006;4:312-319.
236. von Pape KW, Aland E, Bohner J. Platelet function analysis with PFA-100 in patients medicated with acetylsalicylic acid strongly depends on concentration of sodium citrate used for anticoagulation of blood sample. *Thrombosis Research.* 2000;98:295-299.
237. Favaloro EJ. Clinical application of the PFA-100. *Curr Opin Hematol.* 2002;9:407-415.
238. Jilma-Stohlawetz P, Hergovich N, Homoncik M, Dzirlo L, Horvath M, Janisiw M, Panzer S, Jilma B. Impaired platelet function among platelet donors. *Thromb Haemost.* 2001;86:880-886.
239. Feuring M, Schultz A, Losel R, Wehling M. Monitoring acetylsalicylic acid effects with the platelet function analyzer PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:411-415.

240. Chakroun T, Addad F, Abderazek F, Ben-Farhat M, Hamdi S, Gamra H, Hassine M, Ben-Hamda K, Samama MM, Elalamy I. Screening for aspirin resistance in stable coronary artery patients by three different tests. *Thromb Res.* 2007;121:413-418.
241. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Marcucci R, Poli S, Romano E, Valente S, Giglioli C, Fedi S, Gensini GF, Abbate R, Prisco D. Comparison of different methods to evaluate the effect of aspirin on platelet function in high-risk patients with ischemic heart disease receiving dual antiplatelet treatment. *Am J Clin Pathol.* 2007;128:143-149.
242. Harrison P, Segal H, Blasbery K, Furtado C, Silver L, Rothwell PM. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke.* 2005;36:1001-1005.
243. Harrison P, Segal H, Silver L, Syed A, Cuthbertson FC, Rothwell PM. Lack of reproducibility of assessment of aspirin responsiveness by optical aggregometry and two platelet function tests. *Platelets.* 2008;19:119-124.
244. McGlasson DL, Fritsma GA. Comparison of four laboratory methods to assess aspirin sensitivity. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008;19:120-123.
245. Nielsen HL, Kristensen SD, Thygesen SS, Mortensen J, Pedersen SB, Grove EL, Hvas AM. Aspirin response evaluated by the VerifyNow Aspirin System and light transmission aggregometry. *Thromb Res.* 2008;123:267-273.
246. Pedersen SB, Grove EL, Nielsen HL, Mortensen J, Kristensen SD, Hvas AM. Evaluation of aspirin response by Multiplate(R) whole blood aggregometry and light transmission aggregometry. *Platelets.* 2009:1-6.
247. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, Gesheff T, Chaganti SK, Etherington A, Tantry US. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation.* 2007;115:3156-3164.
248. Schafer A, Weinberger S, Flierl U, Eigenthaler M, Stork S, Walter U, Ertl G, Bauersachs J. ADP-induced platelet aggregation frequently fails to detect impaired clopidogrel-responsiveness in patients with coronary artery disease compared to a P2Y12-specific assay. *Thromb Haemost.* 2008;100:618-625.
249. Agarwal S, Coakley M, Reddy K, Riddell A, Mallett S. Quantifying the effect of antiplatelet therapy: a comparison of the platelet function analyzer (PFA-100) and

- modified thromboelastography (mTEG) with light transmission platelet aggregometry. *Anesthesiology*. 2006;105:676-683.
250. Dyszkiewicz-Korpanty A, Olteanu H, Frenkel EP, Sarode RM. Clopidogrel anti-platelet effect: An evaluation by optical aggregometry, impedance aggregometry, and the Platelet Function Analyzer (PFA-100). *Platelets*. 2007;18:491-496.
251. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Marcucci R, Giglioli C, Antoniucci D, Gensini GF, Abbate R, Prisco D. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *J Thromb Haemost*. 2007;5:1839-1847.
252. Kotzailias N, Elwischger K, Sycha T, Rinner W, Quehenberger P, Auff E, Muller C. Clopidogrel-induced platelet inhibition cannot be detected by the platelet function analyzer-100 system in stroke patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2007;16:199-202.
253. van Werkum JW, van der Stelt CA, Seesing TH, Hackeng CM, ten Berg JM. A head-to-head comparison between the VerifyNow P2Y12 assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2516-2518.
254. von Beckerath N, Pogatsa-Murray G, Wieczorek A, Sibbing D, Schomig A, Kastrati A. Correlation of a new point-of-care test with conventional optical aggregometry for the assessment of clopidogrel responsiveness. *Thromb Haemost*. 2006;95:910-911.
255. Jakubowski JA, Payne CD, Li YG, Brandt JT, Small DS, Farid NA, Salazar DE, Winters KJ. The use of the VerifyNow P2Y12 point-of-care device to monitor platelet function across a range of P2Y12 inhibition levels following prasugrel and clopidogrel administration. *Thromb Haemost*. 2008;99:409-415.
256. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schomig A, Kastrati A, von Beckerath N. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost*. 2008;99:121-126.
257. Bracey AW, Grigore AM, Nussmeier NA. Impact of Platelet Testing on Presurgical Screening and Implications for Cardiac and Noncardiac Surgical Procedures. *Am J Cardiol*. 2006;98:25N-32N.
258. Dickinson KJ, Troxler M, Homer-Vanniasinkam S. The surgical application of point-of-care haemostasis and platelet function testing. *Br J Surg*. 2008;95:1317-1330.

259. Watson HG, Greaves M. Can we predict bleeding? *Semin Thromb Hemost.* 2008;34:97-103.
260. Cuisset T, Cayla G, Frere C, Quilici J, Poyet R, Gaborit B, Bali L, Morange PE, Alessi MC, Bonnet JL. Predictive value of post-treatment platelet reactivity for occurrence of post-discharge bleeding after non-ST elevation acute coronary syndrome. Shifting from antiplatelet resistance to bleeding risk assessment? *EuroIntervention.* 2009;5:325-329.
261. Sibbing D, Schulz S, Braun S, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, Schomig A, von Beckerath N, Kastrati A. Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. *J Thromb Haemost.* 2009:doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03709.x.
262. Stejskal D, Vaclavik J, Lacnak B, Proskova J. Aspirin resistance measured by cationic propyl gallate platelet aggregometry and recurrent cardiovascular events during 4 years of follow-up. *Eur J Intern Med.* 2006;17:349-354.
263. Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost.* 1997;78:1003-1007.
264. 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;43:1122-1126.
265. Chen WH, Cheng X, Lee PY, Ng W, Kwok JY, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2007;120:631-635.
266. Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Fedi S, Giglioli C, Valente S, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol.* 2006;98:1156-1159.
267. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, de Gaetano G, Cerletti C. PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a meta-analysis of 19 studies comprising 3,003 patients. *Thromb Haemost.* 2008;99:1129-1131.
268. Addad F, Chakroun T, Abderazek F, Ben-Farhat M, Hamdi S, Dridi Z, Gamra H, Hassine M, Samama MM, Elalamy I. Response variability to aspirin and one-year

- prediction of vascular events in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2009;doi: 10.1007/s11239-11009-10335-11231.
269. Gulmez O, Yildirim A, Kaynar G, Konas D, Aydinalp A, Ertan C, Ozin B, Muderrisoglu H. Effects of persistent platelet reactivity despite aspirin therapy on cardiac troponin I and creatine kinase-MB levels after elective percutaneous coronary interventions. *J Thromb Thrombolysis*. 2008;25:239-246.
270. Pamukcu B, Oflaz H, Onur I, Oncul A, Ozcan M, Umman B, Mercanoglu F, Meric M, Nisanci Y. Clinical relevance of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease: a prospective follow-up study (PROSPECTAR). *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18:187-192.
271. Christiaens L, Ragot S, Mergy J, Allal J, Macchi L. Major clinical vascular events and aspirin-resistance status as determined by the PFA-100 method among patients with stable coronary artery disease: a prospective study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19:235-239.
272. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008;336:195-198.
273. Geisler T, Langer H, Wydymus M, Gohring K, Zurn C, Bigalke B, Stellos K, May AE, Gawaz M. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J*. 2006;27:2420-2425.
274. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP, Fischer B, Valina CM, Ferenc M, Gick M, Caputo A, Buttner HJ, Neumann FJ. Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1742-1750.
275. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Paniccchia R, Moschi G, Gori AM, Abbate R, Antoniucci D. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:2312-2317.
276. Gurbel PA, Antonino MJ, Bliden KP, Dichiara J, Suarez TA, Singla A, Tantry US. Platelet reactivity to adenosine diphosphate and long-term ischemic event occurrence following percutaneous coronary intervention: a potential antiplatelet therapeutic target. *Platelets*. 2008;19:595-604.
277. Cayla G, Macia JC, Rabesandratana H, Roubille F, Gervasoni R, Pasquie JL, Barbotte E, Schved JF, Leclercq F. Flow cytometric assessment of vasodilator-

stimulated phosphoprotein: prognostic value of recurrent cardiovascular events after acute coronary syndromes. *Arch Cardiovasc Dis.* 2008;101:743-751.

278. Patti G, Nusca A, Mangiacapra F, Gatto L, D'Ambrosio A, Di Sciascio G. Point-of-care measurement of clopidogrel responsiveness predicts clinical outcome in patients undergoing percutaneous coronary intervention results of the ARMYDA-PRO (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty-Platelet Reactivity Predicts Outcome) study. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1128-1133.
279. Price MJ, Endemann S, Gollapudi RR, Valencia R, Stinis CT, Levisay JP, Ernst A, Sawhney NS, Schatz RA, Teirstein PS. Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur Heart J.* 2008;29:992-1000.
280. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Kelder JC, Ruven HJ, Bal ET, Deneer VH, Harmsze AM, van der Heyden JA, Rensing BJ, Suttorp MJ, Hackeng CM, ten Berg JM. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA.* 2010;303:754-762.
281. Antman EM, Cohen M, Bernink PJ, McCabe CH, Horacek T, Papuchis G, Mautner B, Corbalan R, Radley D, Braunwald E. The TIMI risk score for unstable angina/non-ST elevation MI: A method for prognostication and therapeutic decision making. *JAMA.* 2000;284:835-842.
282. Morrow DA, Antman EM, Parsons L, de Lemos JA, Cannon CP, Giugliano RP, McCabe CH, Barron HV, Braunwald E. Application of the TIMI risk score for ST-elevation MI in the National Registry of Myocardial Infarction 3. *JAMA.* 2001;286:1356-1359.
283. Eagle KA, Lim MJ, Dabbous OH, Pieper KS, Goldberg RJ, Van de Werf F, Goodman SG, Granger CB, Steg PG, Gore JM, Budaj A, Avezum A, Flather MD, Fox KA. A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month postdischarge death in an international registry. *JAMA.* 2004;291:2727-2733.
284. Brieger D, Fox KA, Fitzgerald G, Eagle KA, Budaj A, Avezum A, Granger CB, Costa B, Anderson FA, Jr., Steg PG. Predicting freedom from clinical events in non-ST-elevation acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events. *Heart.* 2009;95:888-894.
285. Elbarouni B, Goodman SG, Yan RT, Welsh RC, Kornder JM, Deyoung JP, Wong GC, Rose B, Grondin FR, Gallo R, Tan M, Casanova A, Eagle KA, Yan AT. Validation of the Global Registry of Acute Coronary Event (GRACE) risk score for

in-hospital mortality in patients with acute coronary syndrome in Canada. *Am Heart J.* 2009;158:392-399.

286. Alexander JH, Harrington RA, Tuttle RH, Berdan LG, Lincoff AM, Deckers JW, Simoons ML, Guerci A, Hochman JS, Wilcox RG, Kitt MM, Eisenberg PR, Califf RM, Topol EJ, Karsh K, Ruzyllo W, Stepinska J, Widimsky P, Boland JB, Armstrong PW. Prior aspirin use predicts worse outcomes in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. PURSUIT Investigators. Platelet IIb/IIIa in Unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. *Am J Cardiol.* 1999;83:1147-1151.
287. Collet JP, Montalescot G, Blanchet B, Tanguy ML, Golmard JL, Choussat R, Beygui F, Payot L, Vignolles N, Metzger JP, Thomas D. Impact of prior use or recent withdrawal of oral antiplatelet agents on acute coronary syndromes. *Circulation.* 2004;110:2361-2367.
288. Burger W, Chemnitz JM, Kneissl GD, Rucker G. Low-dose aspirin for secondary cardiovascular prevention - cardiovascular risks after its perioperative withdrawal versus bleeding risks with its continuation - review and meta-analysis. *J Intern Med.* 2005;257:399-414.
289. Ferrari E, Benhamou M, Cerboni P, Marcel B. Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:456-459.
290. Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Agostoni P, Abbate A, Fusaro M, Burzotta F, Testa L, Sheiban I, Sangiorgi G. A systematic review and meta-analysis on the hazards of discontinuing or not adhering to aspirin among 50 279 patients at risk for coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2006;27:2667-2674.
291. Grines CL, Bonow RO, Casey DE, Jr., Gardner TJ, Lockhart PB, Moliterno DJ, O'Gara P, Whitlow P. Prevention of premature discontinuation of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery stents: a science advisory from the American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, American College of Surgeons, and American Dental Association, with representation from the American College of Physicians. *Circulation.* 2007;115:813-818.
292. Love MP, Schampaert E, Cohen EA, Webb JG, Anderson TJ, Labinaz M, Tanguay JF, Dzavik V. The Canadian Association of Interventional Cardiology and the Canadian Cardiovascular Society joint statement on drug-eluting stents. *Can J Cardiol.* 2007;23:121-123.

293. Ayyanathan S, Hersh D, Coplan NL, Garratt K. The problem of stent thrombosis associated with drug-eluting stents and the optimal duration of dual antiplatelet therapy. *Prev Cardiol.* 2009;12:59-64.
294. Cutlip DE. Stent thrombosis: historical perspectives and current trends. *J Thromb Thrombolysis.* 2000;10:89-101.
295. Cutlip DE, Baim DS, Ho KK, Popma JJ, Lansky AJ, Cohen DJ, Carrozza JP, Jr., Chauhan MS, Rodriguez O, Kuntz RE. Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials. *Circulation.* 2001;103:1967-1971.
296. Jeremias A, Sylvia B, Bridges J, Kirtane AJ, Bigelow B, Pinto DS, Ho KK, Cohen DJ, Garcia LA, Cutlip DE, Carrozza JP, Jr. Stent thrombosis after successful sirolimus-eluting stent implantation. *Circulation.* 2004;109:1930-1932.
297. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, Airolidi F, Chieffo A, Montorfano M, Carlino M, Michev I, Corvaja N, Briguori C, Gerckens U, Grube E, Colombo A. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA.* 2005;293:2126-2130.
298. Ong AT, McFadden EP, Regar E, de Jaegere PP, van Domburg RT, Serruys PW. Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:2088-2092.
299. Park DW, Park SW, Park KH, Lee BK, Kim YH, Lee CW, Hong MK, Kim JJ, Park SJ. Frequency of and risk factors for stent thrombosis after drug-eluting stent implantation during long-term follow-up. *Am J Cardiol.* 2006;98:352-356.
300. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2584-2591.
301. Airolidi F, Colombo A, Morici N, Latib A, Cosgrave J, Buellesfeld L, Bonizzoni E, Carlino M, Gerckens U, Godino C, Melzi G, Michev I, Montorfano M, Sangiorgi GM, Qasim A, Chieffo A, Briguori C, Grube E. Incidence and predictors of drug-eluting stent thrombosis during and after discontinuation of thienopyridine treatment. *Circulation.* 2007;116:745-754.
302. Eisenstein EL, Anstrom KJ, Kong DF, Shaw LK, Tuttle RH, Mark DB, Kramer JM, Harrington RA, Matchar DB, Kandzari DE, Peterson ED, Schulman KA, Califf RM. Clopidogrel use and long-term clinical outcomes after drug-eluting stent implantation. *JAMA.* 2007;297:159-168.

303. Flores-Rios X, Marzoa-Rivas R, Abugattas-de Torres JP, Pinon-Esteban P, Aldama-Lopez G, Salgado-Fernandez J, Calvino-Santos R, Vazquez-Rodriguez JM, Vazquez-Gonzalez N, Castro-Beiras A. Late thrombosis of paclitaxel-eluting stents: long-term incidence, clinical consequences, and risk factors in a cohort of 604 patients. *Am Heart J*. 2008;155:648-653.
304. Ho PM, Peterson ED, Wang L, Magid DJ, Fihn SD, Larsen GC, Jesse RA, Rumsfeld JS. Incidence of death and acute myocardial infarction associated with stopping clopidogrel after acute coronary syndrome. *JAMA*. 2008;299:532-539.
305. Aoki J, Lansky AJ, Mehran R, Moses J, Bertrand ME, McLaurin BT, Cox DA, Lincoff AM, Ohman EM, White HD, Parise H, Leon MB, Stone GW. Early stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with drug-eluting and bare metal stents: the Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy trial. *Circulation*. 2009;119:687-698.
306. Eisenberg MJ, Richard PR, Libersan D, Filion KB. Safety of short-term discontinuation of antiplatelet therapy in patients with drug-eluting stents. *Circulation*. 2009;119:1634-1642.
307. Kimura T, Morimoto T, Nakagawa Y, Tamura T, Kadota K, Yasumoto H, Nishikawa H, Hiasa Y, Muramatsu T, Meguro T, Inoue N, Honda H, Hayashi Y, Miyazaki S, Oshima S, Honda T, Shiode N, Namura M, Sone T, Nobuyoshi M, Kita T, Mitsudo K. Antiplatelet therapy and stent thrombosis after sirolimus-eluting stent implantation. *Circulation*. 2009;119:987-995.
308. Schulz S, Schuster T, Mehilli J, Byrne RA, Ellert J, Massberg S, Goedel J, Bruskin O, Ulm K, Schomig A, Kastrati A. Stent thrombosis after drug-eluting stent implantation: incidence, timing, and relation to discontinuation of clopidogrel therapy over a 4-year period. *Eur Heart J*. 2009;30:2714-2721.
309. van Werkum JW, Heestermans AA, Zomer AC, Kelder JC, Suttorp MJ, Rensing BJ, Koolen JJ, Brueren BR, Dambrink JH, Hautvast RW, Verheugt FW, ten Berg JM. Predictors of coronary stent thrombosis: the Dutch Stent Thrombosis Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1399-1409.
310. Komatsu T, Tamai Y, Takami H, Yamagata K, Fukuda S, Munakata A. Study for determination of the optimal cessation period of therapy with anti-platelet agents prior to invasive endoscopic procedures. *J Gastroenterol*. 2005;40:698-707.
311. Price MJ, Coleman JL, Steinhubl SR, Wong GB, Cannon CP, Teirstein PS. Onset and offset of platelet inhibition after high-dose clopidogrel loading and standard daily therapy measured by a point-of-care assay in healthy volunteers. *Am J Cardiol*. 2006;98:681-684.

312. Price MJ, Teirstein PS. Dynamics of platelet functional recovery following a clopidogrel loading dose in healthy volunteers. *Am J Cardiol.* 2008;102:790-795.
313. Collet JP, Montalescot G, Steg PG, Steinhubl SR, Fox KA, Hu TF, Johnston SC, Hamm CW, Bhatt DL, Topol EJ. Clinical outcomes according to permanent discontinuation of clopidogrel or placebo in the CHARISMA trial. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009;102:485-496.
314. Weber AA, Braun M, Hohlfeld T, Schwippert B, Tschöpe D, Schror K. Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52:333-336.
315. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Clopidogrel withdrawal is associated with proinflammatory and prothrombotic effects in patients with diabetes and coronary artery disease. *Diabetes.* 2006;55:780-784.
316. Wykrzykowska JJ, Warnholtz A, de Jaeger P, Curzen N, Oldroyd KG, Collet JP, Ten Berg JM, Rademaker T, Goedhart D, Lissens J, Kint PP, Serruys PW. Effect of clopidogrel discontinuation at 1 year after drug eluting stent placement on soluble CD40L, P-selectin and C-reactive protein levels: DECADES (Discontinuation Effect of Clopidogrel After Drug Eluting Stent): a multicenter, open-label study. *J Thromb Thrombolysis.* 2009;28:410-417.
317. Mani H, Luxembourg B, Klaffling C, Erbe M, Lindhoff-Last E. Use of native or platelet count adjusted platelet rich plasma for platelet aggregation measurements. *J Clin Pathol.* 2005;58:747-750.
318. Patrono C, Rocca B. Aspirin, 110 years later. *J Thromb Haemost.* 2009;7:258-261.
319. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest.* 1975;56:624-632.
320. Patrono C, Ciabattoni G, Patrignani P, Pugliese F, Filabozzi P, Catella F, Davi G, Forni L. Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation.* 1985;72:1177-1184.
321. Rocca B, Secchiero P, Ciabattoni G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, Melloni E, Maggiano N, Zauli G, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *PNAS.* 2002;99:7634-7639.

322. Davi G, Guagnano MT, Ciabattoni G, Basili S, Falco A, Marinopicolli M, Nutini M, Sensi S, Patrono C. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *Jama*. 2002;288:2008-2014.
323. Fabris F, Randi ML. Essential thrombocythemia: past and present. *Intern Emerg Med*. 2009.
324. Gangat N, Tefferi A. Pharmacotherapy of essential thrombocythemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9:1679-1685.
325. Dragani A, Pascale S, Recchiuti A, Mattoscio D, Lattanzio S, Petrucci G, Mucci L, Ferrante E, Habib A, Ranelletti FO, Ciabattoni G, Davi G, Patrono C, Rocca B. The contribution of cyclooxygenase-1 and -2 to persistent thromboxane biosynthesis in aspirin-treated essential thrombocythemia: implications for antiplatelet therapy. *Blood*. 2009;doi: 10.1182/blood-2009-1108-236679.
326. Sullivan PS, McDonald TP. Acetylsalicylic acid stimulates murine megakaryocyte precursor cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1990;194:216-220.
327. Clift RE, Cottrell MB, McDonald TP. Thrombopoietin production in mice treated with acetylsalicylic acid. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991;198:656-660.
328. Schick BP, Schick PK. Megakaryocyte biochemistry. *Semin Hematol*. 1986;23:68-87.
329. Cazenave JP, Gachet C. Anti-platelet drugs: do they affect megakaryocytes? *Baillieres Clin Haematol*. 1997;10:163-180.
330. Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, Saito H. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1985;66:1384-1392.
331. Mroske C, Plant MH, Franks DJ, Laneuville O. Characterization of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 enzyme expression during differentiation of the megakaryocytic cell line MEG-01. *Exp Hematol*. 2000;28:411-421.
332. Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:147-152.
333. Wolber EM, Jelkmann W. Thrombopoietin: the novel hepatic hormone. *News Physiol Sci*. 2002;17:6-10.
334. Frelinger AL, 3rd, Li Y, Linden MD, Barnard MR, Fox ML, Christie DJ, Furman MI, Michelson AD. Association of Cyclooxygenase-1-Dependent and -Independent

- Platelet Function Assays With Adverse Clinical Outcomes in Aspirin-Treated Patients Presenting for Cardiac Catheterization. *Circulation*. 2009;120:2586-2596.
- 335.** Kulkarni SP, Alexander KP, Lytle B, Heiss G, Peterson ED. Long-term adherence with cardiovascular drug regimens. *Am Heart J*. 2006;151:185-191.
- 336.** Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, Pulcinelli FM, Cerletti C, Rao AK. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1309-1311.
- 337.** Frelinger AL, Barnard MR, Fox ML, Michelson AD. The Platelet Activity after Clopidogrel Termination (PACT) study. *Circulation*. 2009;120:S1145 (abstract).
- 338.** Bath PM, Gladwin AM, Carden N, Martin JF. Megakaryocyte DNA content is increased in patients with coronary artery atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1348-1352.
- 339.** Sibbing D, Stegherr J, Braun S, Mehilli J, Schulz S, Seyfarth M, Kastrati A, von Beckerath N, Schomig A. A double-blind, randomized study on prevention and existence of a rebound phenomenon of platelets after cessation of clopidogrel treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:558-565.
- 340.** Hjemdahl P, Olsson G. Rebound phenomena following withdrawal of long-term beta-adrenoceptor blockade. *Acta Med Scand Suppl*. 1982;665:43-47.
- 341.** Ferratini M. Risk of rebound phenomenon during nitrate withdrawal. *Int J Cardiol*. 1994;45:89-96.
- 342.** Baurand A, Eckly A, Hechler B, Kauffenstein G, Galzi JL, Cazenave JP, Leon C, Gachet C. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol Pharmacol*. 2005;67:721-733.
- 343.** Mundell SJ, Barton JF, Mayo-Martin MB, Hardy AR, Poole AW. Rapid resensitization of purinergic receptor function in human platelets. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1393-1404.
- 344.** Nurden P, Poujol C, Winckler J, Combrie R, Pousseau N, Conley PB, Levy-Toledano S, Habib A, Nurden AT. Immunolocalization of P2Y1 and TPalpha receptors in platelets showed a major pool associated with the membranes of alpha-granules and the open canalicular system. *Blood*. 2003;101:1400-1408.
- 345.** Schafer AI. Thrombocytosis. *N Engl J Med*. 2004;350:1211-1219.

346. Tolhurst G, Vial C, Leon C, Gachet C, Evans RJ, Mahaut-Smith MP. Interplay between P2Y(1), P2Y(12), and P2X(1) receptors in the activation of megakaryocyte cation influx currents by ADP: evidence that the primary megakaryocyte represents a fully functional model of platelet P2 receptor signaling. *Blood*. 2005;106:1644-1651.
347. DiPerri T, Pasini FL, Frigerio C, Blardi P, Centini F, Messa GL, Ghezzi A, Volpi L. Pharmacodynamics of ticlopidine in man in relation to plasma and blood cell concentration. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;41:429-434.
348. Shanker G, Kontos JL, Eckman DM, Wesley-Farrington D, Sane DC. Nicotine upregulates the expression of P2Y12 on vascular cells and megakaryoblasts. *J Thromb Thrombolysis*. 2006;22:213-220.
349. Young JP, Beckerman J, Vicini S, Myers A. Acetylsalicylic acid enhances purinergic receptor-mediated outward currents in rat megakaryocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298:C602-610.

Annexe 1 : Formulaire de collecte de données pour l'étude sur la stabilité de l'effet antiplaquettaire de l'AAS sur 24 heures

Patient's initials: ___ Number: ___

INCLUSION CRITERIA		
<i>In this section, if the answer "no" is selected to any criterion, the patient is not eligible</i>		
Adult patient, aged 18 years or older	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Patient suffering from stable CAD, on chronic ASA therapy (325 mg daily)	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Patient willing to participate to the study and to sign informed consent form	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
EXCLUSION CRITERIA		
<i>In this section, if the answer "yes" is selected to any criterion, the patient is not eligible</i>		
Acute coronary syndrome or revascularization in the last 3 months prior to enrolment	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Concurrent ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, including COX-2 selective anti-inflammatory drugs), clopidogrel, ticlopidine, dipyridamole, warfarin or acenocoumarol	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Frequent (more than once a week) use of non-prescription NSAIDs or drugs containing aspirin in the 10 days prior to enrolment	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Major surgical procedure within 1 month before enrolment	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Hemorrhagic diathesis or known platelet dysfunction	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Platelet count outside the 100 to 450 x 10 ⁹ /L range	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Hematocrit < 25% or Haemoglobin < 100 g/L	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
Patient undergoing dialysis for chronic renal failure	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no

SUBJECT'S CHARACTERISTICS			
		Patient's initials: _____	
		Number: _____	
1	Allergies to drugs	<input type="checkbox"/> none	<input type="checkbox"/> yes: _____
2	Date of birth	_____/_____/_____ (day/month/year)	
3	Gender	<input type="checkbox"/> female	<input type="checkbox"/> male
4	Platelet count	<input type="checkbox"/> between 100 000 to 450 000/ μ L	
5	Haemoglobin	Hematocrit _____	
6	Weight	_____ kg	_____ lbs
7	Height	_____ m	_____ in
8	BMI	_____ kg/m^2	
SUBJECT'S CONDITION AND CO-MORBIDITIES			
9	Family history of early cardiovascular disease	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
10	Prior myocardial infarction	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
11	Prior unstable angina	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
12	Prior coronary revascularization	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
13	Stable angina	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
14	Heart failure	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
15	Hypertension	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
16	Hypercholesterolemia	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
17	Diabetes	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
18	Stroke or TIA	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
19	Peripheral vascular disease	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
20	Kidney diseases / Chronic renal failure	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
21	Liver diseases	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
22	Gastro-intestinal disorders (ulcer, dyspepsia), other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
23	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
24	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no

Patient's initials: _____	Number: _____
---------------------------	---------------

SUBJECT'S MEDICATION						
25	Antiplatelet agent	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
26	ACEi	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
27	ARB	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
28	β – blocker	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
29	Diuretics	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
				Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
30	Lipid-lowering agent	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
31	Calcium channel blocker	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
32	Nitrates	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
33	Hypoglycaemic agent	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
34	Other	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
35	Other	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
36	Other	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
37	Vitamins	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
				Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
				Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
38	Over-the-counter products	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
				Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
				Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
39	Natural products	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
				Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____

Sampling time: Baseline Post-ASA 1h 3h 8h 24h

Patient's initials: ___	Number: ____
-------------------------	--------------

INVESTIGATOR'S SECTION	
59	Arachidonic acid 1.6 mM Platelet aggregation (LTA): _____ % TxB ₂ concentration:
60	ADP 2 μM Platelet aggregation (LTA): _____ % TxB ₂ concentration:
61	ADP 20 μM Platelet aggregation (LTA): _____ % TxB ₂ concentration:
62	Epinephrine 2 μM Platelet aggregation (LTA): _____ % TxB ₂ concentration:
63	Epinephrine 20 μM Platelet aggregation (LTA): _____ % TxB ₂ concentration:
64	Collagen 1 μg/ml Platelet aggregation (LTA): _____ % TxB ₂ concentration:
65	Collagen 10 μg/ml Platelet aggregation (LTA): _____ % TxB ₂ concentration:

Annexe 2 : Étude-mère sur la comparaison de six tests de fonction plaquettaire évaluant la réponse plaquettaire à l'AAS chez des sujets souffrant de maladie coronarienne stable

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG

Publié dans *European Heart Journal*. 2007; 28: 1702-1708

A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease

Marie Lordkipanidzé est le principal auteur de cet article.

Contribution : Marie Lordkipanidzé a participé à la conception et au design de l'étude, au recrutement des sujets, à l'analyse et l'interprétation des résultats, à la rédaction de l'ébauche du manuscrit ainsi qu'à sa révision en réponse aux commentaires des coauteurs et sera responsable des corrections lors de la révision par les pairs du journal visé

Abstract

Aims—We sought to compare the results obtained from six major platelet function tests in the assessment of the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease.

Methods and Results—Two hundred and one patients with stable coronary artery disease receiving daily aspirin therapy (≥ 80 mg) were recruited. Platelet aggregation was measured by: 1) Light transmission aggregometry (LTA) after stimulation with 1.6 mM of arachidonic acid (AA), 2) LTA after adenosine diphosphate (5, 10, and 20 μ M) stimulation, 3) whole blood aggregometry, 4) PFA-100[®], 5) VerifyNow Aspirin[®]; urinary 11-dehydro-thromboxane B₂ concentrations were also measured. Eight patients (4%, 95% CI 0.01-0.07) were deemed resistant to aspirin by LTA and AA. The prevalence of aspirin resistance varied according to the assay used: 10.3-51.7% for LTA using adenosine diphosphate as the agonist, 18.0% for whole blood aggregometry, 59.5% for PFA-100[®], 6.7% for VerifyNow Aspirin[®], and finally, 22.9% by measuring urinary 11-dehydro-thromboxane B₂ concentrations. Results from these tests showed poor correlation and agreement between themselves.

Conclusion—Platelet function tests are not equally effective in measuring aspirin's antiplatelet effect and correlate poorly amongst themselves. The clinical usefulness of the different assays to classify correctly patients as aspirin resistant remains undetermined.

KEYWORDS: aspirin; coronary artery disease; platelet aggregation; thromboxane.

Introduction

Aspirin is one of the most widely used drugs worldwide.¹ First employed for its anti-inflammatory and antipyretic properties, it is now predominantly used in cardiology for its antiplatelet effects. Aspirin inhibits platelet aggregation through irreversible acetylation of platelet cyclooxygenase (COX) enzyme, blocking the transformation of arachidonic acid (AA) into thromboxane (Tx) A₂, a potent vasoconstricting and aggregating agent.² As a result, the use of aspirin reduces the risk of stroke, myocardial infarction, or death by approximately 25% in patients with cardiovascular disease.³

Despite its high efficacy, safety, and low cost, aspirin may not benefit all patients equally. Although there is no consensual definition of aspirin resistance, it is generally accepted that incomplete suppression of platelet aggregation as assessed by platelet function assays constitutes biochemical unresponsiveness of platelets to the inhibitory action of aspirin, a definition used herein.⁴⁻⁷ An overview of the literature reveals that 0.4 to 83.3% of patients do not respond to this drug.⁵ However, the exact prevalence of aspirin resistance in patients suffering from stable coronary artery disease (CAD) remains unclear; this may be attributable to differences in studied populations, lack of formal definition of aspirin response, and use of non-standardized diagnostic methods.⁵

A myriad of tests are currently available to assess inhibition of platelet function induced by aspirin and their methodologies are diverse.⁸ Light transmission aggregometry (LTA), the current gold standard,⁸ evaluates luminosity as aggregation occurs in platelet-rich plasma (PRP) following stimulation with a platelet agonist.^{9, 10} Although this test has been used for over 40 years and was shown to predict clinical outcomes in aspirin resistant patients, poor standardization and the requirement for manipulation by a skilled technician limit its use to specialized laboratories.⁸⁻¹¹ In order to palliate these shortcomings, various point-of-care assays have been developed, but scarcely validated in large patient cohorts. Nonetheless, little is known about the comparability or interchangeability of these tests to assess aspirin response.

Hence, we present the first study designed to compare results simultaneously obtained from six major platelet function tests in the assessment of the prevalence of aspirin resistance in patients with stable CAD.

Methods

Patients

Two hundred and one consecutive patients with stable CAD (diagnosis based on a positive stress test or angiographically documented coronary artery stenosis) were enrolled in this study from the outpatient cardiology clinic of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Canada, from June 2005 to March 2006. All patients had received daily aspirin therapy (≥ 80 mg daily) for at least 1 month. Exclusion criteria were acute coronary syndrome or revascularization within the last 6 months; concurrent ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID, including COX-2 selective anti-inflammatory drugs), clopidogrel, ticlopidine, dipyridamole, warfarin, or acenocoumarol; self-reported use of non-prescription NSAID or drugs containing aspirin in the 10 days preceding enrolment; major surgical procedure within 1 month of enrolment; platelet count outside the 100 to 450 $\times 10^9/L$ range; hematocrit $< 25\%$ or hemoglobin < 100 g/L; and chronic renal failure requiring dialysis. This study, which complies with the Declaration of Helsinki, was approved by the local Scientific and Ethics Review Board and all patients gave written informed consent.

Urine and blood sampling

After enrolment, a morning urine sample was brought in by the patient, within 2 hours of collection. Upon arrival, compliance with therapy was assessed by a personal interview. Blood samples were then obtained from patients, between 7 AM and noon, following a 12-hour fast, 2 to 12 hours after the ingestion of the last aspirin dose, in order to eliminate any effect of circadian variation on platelet function. The first 2 mL of blood, drawn by venipuncture through a 21-gauge needle, were discarded. Then, blood was drawn into five 3.5-ml evacuated tubes containing 3.2% sodium citrate. All blood samples were processed within 2 hours of collection.

Platelet aggregation assessment

Light transmission aggregometry

Platelet aggregation was assessed in PRP at 37°C by LTA. PRP was obtained by centrifugation of citrated whole blood for 10 minutes at 1000 rpm and adjusted to 250 to 450 $\times 10^9/L$ with platelet poor plasma (obtained by centrifugation of the remaining blood

for 10 minutes at room temperature at 3000 rpm) if needed. Aggregation was measured with a ChronoLog Aggregometer (540 model, Pennsylvania, USA) and was expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline after the addition of AA, using platelet poor plasma as reference. Although no consensus exists on the optimal AA concentration to be used to induce reliable and reproducible platelet aggregation while minimizing interindividual variability, the use of 1.6 mM (0.5 mg/ml) has been suggested as appropriate for the study of COX inhibitors through aggregometry.^{12, 13} Consequently, the primary agonist used was AA (LTA_{AA}; ChronoLog, Pennsylvania, USA) at such a concentration. Subjects having residual platelet aggregation $\geq 20\%$ despite daily aspirin therapy were considered aspirin resistant, as this cut-off has been frequently used in the past and associated with increased risk of suffering from adverse cardiac events.^{11, 14-22} Because LTA_{AA} is considered the gold standard for the detection of patients resistant to aspirin, it was used as the phenotypic identifier for comparison with other concurrent tests.

Adenosine diphosphate (ADP; Sigma Aldrich, Ontario, Canada) was also used as an agonist (LTA_{ADP}; 5, 10, and 20 μM). Previous investigators have reported that subjects having residual ADP-induced platelet aggregation $\geq 70\%$ despite daily aspirin therapy were aspirin resistant.^{11, 14-16, 18, 20-22} Some authors have used the combination of LTA_{AA} (residual platelet aggregation $\geq 20\%$) and LTA_{ADP} (10 μM ; residual platelet aggregation $\geq 70\%$) criteria to define aspirin resistance.^{14, 15, 18}

Whole blood aggregometry

Whole blood aggregometry (WBA) measures electrical impedance (maximal amplitude) between two electrodes immersed in whole blood 5 minutes after addition of a platelet agonist (AA, 1.6 mM), using a ChronoLog Aggregometer (560 model, Pennsylvania, USA).^{9, 10, 12, 23} Although an impedance $> 0 \Omega$ has been considered by some investigators as representative of inadequate response to aspirin,^{24, 25} a cut-off value of 3 Ω was chosen, based on previous results obtained in our laboratory from healthy volunteers, and recently used by other investigators.²⁶

Platelet function analyzer (PFA-100[®])

PFA-100[®] (Dade Behring, Illinois, USA) is a point-of-care assay that assesses platelet aggregation under high shear, mimicking platelet-rich thrombus formation after

injury to a small vessel wall under flow conditions.^{10, 23, 27} Whole blood was transferred into standard cartridges and time necessary to occlude a microscopic aperture in a membrane coated with collagen and epinephrine (CEPI) was measured. Subjects were considered aspirin resistant if their closure time was in the normal range (< 193 seconds) despite aspirin treatment, as stipulated by the manufacturer.

VerifyNow Aspirin[®]

The VerifyNow Aspirin[®] point-of-care system (Accumetrics, California, USA) is based on turbidimetric optical detection of platelet aggregation in whole blood.^{9, 10, 23} Whole blood was transferred into standard cartridges containing a lyophilized preparation of human fibrinogen-coated beads and arachidonic acid. As aggregation occurs, the system converts luminosity transmittance results into Aspirin Reaction Units. Subjects for which the assay yielded a result ≥ 550 Aspirin Reaction Units, cut-off value previously associated with increased risk of adverse ischemic events, despite aspirin treatment were considered aspirin resistant.²⁸⁻³⁰

Urinary 11-dehydro-thromboxane B₂ (dTxB₂) measurement

Urinary dTxB₂ concentrations were measured using an enzyme immunoassay kit (11-dehydro-thromboxane B₂ EIA Kit, Cayman Chemical, Michigan, USA). Concentrations in the range of 10 to 1000 pg/ml can be measured with confidence, with a specificity approaching 100%.³¹ Urinary dTxB₂ concentrations were normalized for urinary creatinine concentrations. Subjects presenting dTxB₂ levels ≥ 67.9 ng/mmol of creatinine were considered aspirin resistant, as previously suggested.³²

Sample size and statistical analysis

A sample size of 193 subjects was predetermined to estimate the prevalence of aspirin resistance and to detect a correlation coefficient of at least 0.2 between any of the paired platelet aggregation data sets obtained from the different platelet function assays, with a power of 80% and level of significance of 0.05 (PASS 2002, NCSS 2004 Statistical software, Utah, USA).

Continuous variables are presented as means \pm standard deviation and categorical variables are presented as frequencies and percentages. Correlations between results obtained with the various assays, irrespective of aspirin resistance classification, were

established using Spearman's correlation coefficient, where the null hypothesis was $\rho = 0$. The agreement between the aspirin resistance status assessed by the various platelet function tests in rapport with LTA_{AA} was evaluated with the use of the κ statistic. A two-sided p-value of < 0.05 was considered significant. Analyses were performed with SPSS 14.0 for Windows (SPSS Institute, Illinois, USA).

Results

Of the 201 subjects studied, 155 (71.1%) were male. Mean age was 66.5 ± 10.4 years (range from 34 to 91 years). All subjects received daily aspirin therapy for at least 1 month (110 were on 80 mg daily, 10 on 81 mg daily, 1 on 162.5 mg daily, 79 on 325 mg daily, and 1 on 1300 mg daily). Due to technical fallbacks, two hundred subjects underwent analysis of platelet aggregation by LTA and whole blood impedance, with AA as the agonist. ADP was also used at various concentrations as the agonist with LTA: 184 subjects were tested with 5 μM , 173 with 10 μM , and 178 with 20 μM . Platelet aggregation results were obtained by PFA-100[®] for 200 subjects and by VerifyNow Aspirin[®] for 195 subjects. Urinary analysis of dTxB₂ was carried out in all 201 subjects.

Eight subjects were found to be aspirin resistant, as defined by LTA_{AA} (prevalence of 4%, 95% CI 0.01-0.07). The measure of platelet aggregation by LTA_{AA} segregated patients into two exclusive and distinct groups according to their aspirin resistance status (Figure 1 A).

The application of previously reported assay-specific cut-off values resulted in important variation in the prevalence of aspirin resistance, from 2.8 to 59.5% (Figure 2). When the results obtained with these assays were divided into two groups, patients resistant or sensitive to aspirin based on LTA_{AA} results, much overlap was noted above and below the specific cut-off value for each test (Figure 1 B-F). This is supported by the Spearman's correlation coefficients and the κ statistics (Tables 1 and 2) that were calculated to assess correlation and agreement between the various platelet function tests. Overall, correlation between various platelet assays and LTA_{AA} , and among themselves was poor (from -0.12 to 0.29). The assay that provided the best correlation with LTA_{AA} was WBA ($r=0.24$, $p=0.001$), but correlation was weak. VerifyNow Aspirin[®], the point-of-care assay marketed for the specific indication of detecting platelet inhibition by aspirin, demonstrated a poor

correlation ($r=0.13$, $p=0.06$) with the gold standard, as well as poor agreement in the detection of aspirin resistant patients ($\kappa=0.25$, $p<0.0001$). The degree of agreement between the various assays and LTA_{AA} in relation to resistance status was weak at best (from -0.03 to 0.25). This was further reflected by the sensitivity and specificity of the various assays in reference to LTA_{AA} (Table 3). Most tests lacked sensitivity, or the capacity to detect aspirin resistant subjects, while reported higher specificity, or the capacity to correctly identify subjects responding to aspirin. Concordantly, the negative predictive values of the different platelet function assays were generally high, while their positive predictive values, or their capacity to predict truly aspirin resistant patients, were particularly low (between 2% and 23%).

Discussion

Our study is the first to compare simultaneously in the same population six different assays used to evaluate aspirin non-responsiveness. Using LTA_{AA} , patients suffering from stable CAD were found to present a low prevalence of aspirin resistance, prevalence that was highly variable when other assays were used. This was associated with overall poor correlations between the different platelet function tests and notably low agreement between tests in terms of classifying subjects as aspirin resistant or sensitive. In view of the fact that the various assays measured different aspects of platelet function, the apparent lack of correlation between assays should come as no surprise.

The major flaw of most studies assessing platelet response to aspirin is the use of aspirin resistance definitions based on arbitrary, clinically non-validated cut-off values. Although previous investigations have observed an association between lack of platelet function inhibition, as assessed by some of the platelet function assays, and worse clinical outcomes, the clinical relevance of the various tests and their respective thresholds remains to be established.^{11, 33-38}

Of the assays available to quantify the antiplatelet effect of aspirin, LTA_{AA} is considered the historical gold standard because of its relatively high specificity for platelet COX; AA is used as the agonist to exploit the specific pathway affected by aspirin (COX-dependent TxA_2 synthesis).^{8, 10, 39} Notwithstanding, LTA_{AA} presents inherent limitations that should not be ignored, mostly the fact that it requires operator expertise.^{8, 9} Moreover,

AA can generate other platelet activating molecules than TxA_2 after transformation through the lipooxygenase pathway (lipid hydroperoxides) or through nonenzymatic oxidation (isoprostanes).^{40, 41} Although these alternative activating pathways are generally considered minor, the resulting molecules could hypothetically induce platelet aggregation in response to AA despite adequate COX inhibition and falsely lead to the conclusion that certain individuals are not responding to aspirin. Nevertheless, the 4% prevalence of aspirin resistance found in the current study via LTA_{AA} is in agreement with a recent systematic review, which has found a pooled unadjusted prevalence of 6% (95%CI 0-12%) with this methodology.⁴² Furthermore, when all platelet function assays were considered, the mean prevalence of aspirin resistance was much higher, namely 24% (95%CI 20-28%), in conformity with current results.⁴²

ADP has also been used as an agonist to assess response to aspirin by LTA, usually in conjunction with other platelet function assays.^{11, 14, 15, 18} Although it is not specific to the COX pathway, its administration in low concentrations (1 - 3 μM) requires an active COX to induce measurable irreversible platelet aggregation.^{13, 23, 39} In contrast, platelet stimulation with higher ADP concentrations (10 - 20 μM) results in aggregation largely TxA_2 -independent.³⁹ In our study, the use of high ADP concentrations translated into higher levels of platelet aggregation, no correlation with LTA_{AA} results, and a higher rate of falsely aspirin resistant patients. The use of a moderate concentration of ADP (5 μM), which depends only partially on TxA_2 synthesis, provided no added benefit in terms of correlation with LTA_{AA} results, but led to a slightly better agreement with the latter assay in identifying aspirin non-response in patients. Alternatively, some investigators have used results from a combination of assays, LTA_{AA} and LTA_{ADP} , to define resistance to aspirin in patients with stable CAD; all reported a low prevalence consistent with our results.^{11, 14, 15, 18}

In whole blood, platelet aggregation may be triggered by numerous mechanisms, and accordingly, WBA by electrical impedance was reported to convey certain advantages over LTA in detecting the effect of antiplatelet drugs in a more physiologically relevant way.⁴³⁻⁴⁷ However, in our study as in others, results of platelet aggregation in whole blood and PRP were not closely correlated.^{10, 13} WBA may be less consistent and more difficult to interpret than LTA, partly due to unpredictable interactions between platelets and whole

blood elements, including transcellular prostanoid formation by monocytes or direct stimulation of platelet degranulation by erythrocytes.⁴³⁻⁴⁵ Because these mechanisms of platelet activation may bypass the inhibition provided by aspirin, platelet aggregation measured in whole blood may not be as sensitive to the effect of aspirin as that assessed in PRP.⁴⁸

Although readily available, the capacity of PFA-100[®] and VerifyNow Aspirin[®] to adequately quantify platelet response to aspirin remains debatable. The PFA-100[®] device, US Food and Drug Administration (FDA)-approved to detect platelet dysfunction, is one of the most widely used point-of-care assays to detect aspirin resistance, partly because of its rapidity and ease of use.²⁷ However, our results show that its methodology is insensitive to inhibition by aspirin. Most studies that have compared PFA-100[®] to LTA have also reported poor correlations between the two assays, independently of the agonist used, with higher proportions of aspirin resistance with the former.^{15, 16, 49} It could be argued that PFA-100[®] measures a general state of platelet hyperactivity engendered by shear stress, collagen, and epinephrine stimulation, which can not be expected to be completely inhibited by aspirin. Furthermore, von Willebrand factor levels, which are known to be elevated in patients with CAD, have been shown to modulate assay results; this could result in a falsely elevated prevalence of aspirin resistance in this population.⁵⁰ Since PFA-100[®] methodology is not specific to the aspirin-sensitive COX pathway, it seems less suitable for the detection of aspirin resistance.

The VerifyNow Aspirin[®] assay is a novel point-of-care assay, specifically designed and FDA-approved to detect platelet inhibition by aspirin, that has been shown to predict future clinical outcomes.³³ Because it is performed in whole blood, some of the limitations discussed with WBA apply. Notwithstanding, a good correlation ($r=0.902$) was reported between results obtained with this assay and by LTA, however using epinephrine as the agonist.²⁸ Yet in our study, the correlation between VerifyNow Aspirin[®] and LTA_{AA} results was poor, and the test's sensitivity (0.38) was notably lower than that previously reported (0.87 – 0.95).^{28, 29} It should be noted however that previous comparisons were made with the earlier cartridges, which used cationic propyl gallate as agonist instead of AA. Moreover, our data showed that agreement between VerifyNow Aspirin[®] and LTA_{AA} in determining the ASA resistance status was equally low. Although these results were

surprising given the use of the same platelet agonist (AA), similar ones were also observed by Harrison *et al.* in a population of patients suffering from transient ischemic attacks and stroke.¹⁶

It is well established that Tx_{B2} is the major metabolite of platelet Tx_{A2} in plasma.⁵¹ The presence of its metabolite, dTx_{B2}, in urine is believed to be predominantly attributable to platelet activation and should decrease after aspirin treatment.⁵² In our study however, urinary dTx_{B2} measurements showed only mild correlation with LTA_{AA}. This poor reflection of platelet activity has been suspected in the literature following a report of a discrepancy between levels of platelet Tx_{B2} produced by collagen-stimulated platelet aggregation in plasma and urinary measurements of dTx_{B2}.⁵³ Urinary dTx_{B2} is a global index of Tx_{A2} synthesis, which may originate from other blood elements such as erythrocytes and monocytes and from renal biosynthesis.^{45, 51, 54} Accordingly, high levels of urinary dTx_{B2} despite daily aspirin therapy may be a reflection of a larger non-platelet production, unaffected by cardioprotective aspirin doses, as opposed to increased platelet activity as it has been previously suggested.³⁴

As we demonstrated, platelet function assays show great variability in differentiating between aspirin resistant and sensitive patients. We believe the non-standardized use of these assays and the absence of a formal definition explains much of the disparity reported in the literature in regards to the prevalence of aspirin resistance. As expected, platelet function assays that exploit the COX pathway (e.g. LTA with AA or low-dose ADP as the agonists, AA-induced WBA, and VerifyNow Aspirin[®]) are more sensitive in detecting aspirin inhibition and reveal lower proportions of aspirin resistance than non-specific platelet function tests (e.g. PFA-100[®]). However, none of these assays correlate strongly with the current gold standard, nor display relevant agreement in the determination of aspirin resistance status. Notwithstanding, their results have been shown to predict worse clinical outcomes in patients under chronic aspirin treatment, which can alternatively be attributed to increased platelet activity as opposed to aspirin resistance per se.^{11, 33-35} In fact, one could argue that comparing assay results to those of a gold standard is irrelevant; instead all assays should be tested to determine cut-off values that best predict clinical outcomes to then establish their validity as a test to detect aspirin resistance.

In principle, platelet function testing may be of great value to determine the efficacy of antiplatelet drugs. However, results from our study suggest that conclusions drawn could be highly dependent on the test used and results from various assays are clearly not interchangeable. Hence, the clinical usefulness of the different platelet function tests to detect appropriately aspirin resistant patients remains uncertain. Further research is warranted to better understand the platelet activation pathways involved in platelet response to aspirin, in order to allow specific targeting with various platelet function assays and to determine the threshold to be used to best predict clinical outcomes.

Acknowledgments

This study was made possible through a grant from the Fondation de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal and the Fonds de Recherche en Cardiologie of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal. Dr Turgeon is supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Québec Heart and Stroke Foundation.

We wish to acknowledge the technical assistance of our laboratory technician, Edmond Sia, as well as the assistance of our research nurse, Céline Groulx. We would like to recognize the work of Thuy Anh Nguyen, clinical pharmacist, who has reviewed this manuscript.

Conflict of Interest: none declared

References

1. Jack DB. One hundred years of aspirin. *Lancet*. 1997;350:437-439.
2. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231:232-235.
3. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86.
4. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006;367:606-617.
5. Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis DA, Diodati JG. Aspirin resistance : Truth or dare. *Pharmacol Ther*. 2006;112:733-743.
6. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Sanak M. Aspirin resistance. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1655-1662.
7. Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, Pulcinelli FM, Cerletti C, Rao AK. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1309-1311.
8. Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2004;110:e489-493.
9. Harrison P. Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol*. 2000;111:733-744.
10. Nicholson N, Panzer-Knodle S, Haas N, Taite B, Szalony J, Page J, Feigen L, Lansky D, Salyers A. Assessment of platelet function assays. *Am Heart J*. 1998;135:S170-178.
11. 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. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:961-965.
12. Burke J, Kraft WK, Greenberg HE, Gleave M, Pitari GM, VanBuren S, Wagner JA, Waldman SA. Relationship of arachidonic acid concentration to cyclooxygenase-dependent human platelet aggregation. *J Clin Pharmacol*. 2003;43:983-989.
13. Hutton RA, Ludlam CA. Platelet function testing. *J Clin Pathol*. 1989;42:858-864.
14. Dussailant NG, Zapata MM, Fardella BP, Conte LG, Cuneo VM. [Frequency and characteristics of aspirin resistance in Chilean cardiovascular patients]. *Rev Med Chil*. 2005;133:409-417.

15. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2001;88:230-235.
16. Harrison P, Segal H, Blasbery K, Furtado C, Silver L, Rothwell PM. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke.* 2005;36:1001-1005.
17. Marea AO, Curtin RJ, Dooley M, Conroy RM, Crean P, Cox D, Fitzgerald DJ. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1258-1263.
18. Sadiq PA, Puri A, Dixit M, Ghatak A, Dwivedi SK, Narain VS, Saran RK, Puri VK. Profile and prevalence of aspirin resistance in Indian patients with coronary artery disease. *Indian Heart J.* 2005;57:658-661.
19. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1705-1709.
20. Wenaweser P, Dorffler-Melly J, Imboden K, Windecker S, Togni M, Meier B, Haerberli A, Hess OM. Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1748-1752.
21. Kranzhofer R, Ruef J. Aspirin resistance in coronary artery disease is correlated to elevated markers for oxidative stress but not to the expression of cyclooxygenase (COX) 1/2, a novel COX-1 polymorphism or the P1A(1/2) polymorphism. *Platelets.* 2006;17:163-169.
22. Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, Guthikonda S, Granada J, DeLao T, Bray PF, Kleiman NS. Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:27-33.
23. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci.* 2003;28:307-317.
24. Golanski J, Chlopicki S, Golanski R, Gresner P, Iwaszkiewicz A, Watala C. Resistance to aspirin in patients after coronary artery bypass grafting is transient:

- impact on the monitoring of aspirin antiplatelet therapy. *Ther Drug Monit.* 2005;27:484-490.
25. Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, Drzewoski J. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *J Mol Med.* 2005;83:148-158.
 26. Ivandic BT, Giannitsis E, Schlick P, Staritz P, Katus HA, Hohlfeld T. Determination of aspirin responsiveness by use of whole blood platelet aggregometry. *Clin Chem.* 2007;53:614-619.
 27. Feuring M, Schultz A, Losel R, Wehling M. Monitoring acetylsalicylic acid effects with the platelet function analyzer PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:411-415.
 28. Coleman JL, Wang JC, Simon DI. Determination of individual response to aspirin therapy using the Accumetrics *Ultegra* RPFA-ASA system. *Point of Care.* 2004;3:77-82.
 29. Malinin A, Spergling M, Muhlestein B, Steinhubl S, Serebruany V. Assessing aspirin responsiveness in subjects with multiple risk factors for vascular disease with a rapid platelet function analyzer. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004;15:295-301.
 30. Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D, Monbouquette R, Reisman M, Gray W, Block PC, Block EH, Ladenheim M, Simon DI. Incidence of aspirin nonresponsiveness using the *Ultegra* Rapid Platelet Function Assay-ASA. *Am J Cardiol.* 2003;92:1492-1494.
 31. Perneby C, Granstrom E, Beck O, Fitzgerald D, Harhen B, Hjemdahl P. Optimization of an enzyme immunoassay for 11-dehydro-thromboxane B(2) in urine: comparison with GC-MS. *Thromb Res.* 1999;96:427-436.
 32. Fritsma GA, Ens GE, Alvord MA, Carroll AA, Jensen R. Monitoring the antiplatelet action of aspirin. *JAAPA.* 2001;14:57-62.
 33. 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;43:1122-1126.

34. 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;105:1650-1655.
35. Yilmaz MB, Balbay Y, Caldir V, Ayaz S, Guray Y, Guray U, Korkmaz S. Late saphenous vein graft occlusion in patients with coronary bypass: possible role of aspirin resistance. *Thromb Res*. 2005;115:25-29.
36. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Barbou F, Morange PE, Hovasse T, Bonnet JL, Alessi MC. High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost*. 2006;4:542-549.
37. Marcucci R, Panicia R, Antonucci E, Gori AM, Fedi S, Giglioli C, Valente S, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol*. 2006;98:1156-1159.
38. Pamukcu B, Oflaz H, Oncul A, Umman B, Mercanoglu F, Ozcan M, Meric M, Nisanci Y. The role of aspirin resistance on outcome in patients with acute coronary syndrome and the effect of clopidogrel therapy in the prevention of major cardiovascular events. *J Thromb Thrombolysis*. 2006;22:103-110.
39. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1980-1987.
40. Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 2004;38:105-122.
41. Buchanan MR. Biological basis and clinical implications of acetylsalicylic acid resistance. *Can J Cardiol*. 2006;22:149-151.
42. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J*. 2007;153:175-181.
43. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Eiroa AM, Aznar J. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest*. 1991;87:571-580.

44. Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, Sanchez E, Broekman MJ, Marcus AJ. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality : the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation*. 1998;97:350-355.
45. Patrignani P. Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. *Thromb Res*. 2003;110:281-286.
46. Dyszkiewicz-Korpanty AM, Frenkel EP, Sarode R. Approach to the assessment of platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2005;11:25-35.
47. Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *J Clin Pathol*. 1986;39:701-712.
48. Perneby C, Wallen NH, Rooney C, Fitzgerald D, Hjemdahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thromb Haemost*. 2006;95:652-658.
49. Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J, Acuna C, Guerrero JA, Vicente V. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke*. 2005;36:276-280.
50. Chakroun T, Gerotziafas G, Robert F, Lecrubier C, Samama MM, Hatmi M, Elalamy I. In vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Haematol*. 2004;124:80-85.
51. 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;83:5861-5865.
52. Tohgi H, Konno S, Tamura K, Kimura B, Kawano K. Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin. *Stroke*. 1992;23:1400-1403.
53. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in

cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1271-1278.

54. FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation.* 1983;67:1174-1177.

Figure legends

Figure 1. Distribution of platelet aggregation results as measured by various platelet function assays

A. Platelet aggregation measured by light transmission aggregometry using AA as the agonist. **B.** Platelet aggregation measured by light transmission aggregometry using ADP as the agonist, at concentrations of 5, 10, and 20 μM . **C.** Platelet aggregation in whole blood measured by electrical impedance. **D.** Closure time by PFA-100[®]. **E.** Aspirin response by VerifyNow Aspirin[®]. **F.** Urinary dTxB₂ concentration.

Open circles indicate aspirin sensitive patients as per LTA_{AA} ; closed red circles represent aspirin resistant patients as per LTA_{AA} . Horizontal dotted lines indicate test-specific cut-off values for aspirin resistance, as reported in the literature. The arrow indicates the zone within which patients are considered aspirin resistant.

Figure 2. Prevalence of aspirin resistance determined by various platelet function assays

*Definition used by Gum *et al*, Dussailant *et al*, and Sadiq *et al*.^{11, 14, 18}

Table 1. Correlation coefficients between platelet function tests*

	<i>LTA</i>			<i>WBA</i>	<i>Point-of-care assays</i>		<i>Urinary dTxB₂</i>
	ADP 5 μM	ADP 10 μM	ADP 20 μM	AA 1.6 mM	PFA-100 [®]	VerifyNow Aspirin [®]	
LTA							
AA 1.6 mM	0.063	0.091	0.058	0.243†	-0.120	0.133	0.175†
ADP 5 μM	-	0.827†	0.718†	0.290†	0.101	-0.030	-0.064
ADP 10 μM	-	-	0.714†	0.281†	0.086	-0.012	-0.071
ADP 20 μM	-	-	-	0.282†	0.094	0.023	0.014
WBA							
AA 1.6 mM	-	-	-	-	0.061	0.119	-0.025
Point-of-care assays							
PFA-100 [®]	-	-	-	-	-	0.189†	-0.124
VerifyNow Aspirin [®]	-	-	-	-	-	-	0.151†

*It 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, and superior to 0.8 shows good correlation; †p < 0.05.

Table 2. Degree of agreement on aspirin resistance status between various platelet function assays and LTA_{AA} expressed in terms of the κ statistic*

Platelet function assays	κ statistic*	p-value
LTA		
ADP 5 μ M	0.250	< 0.0001
ADP 10 μ M	0.168	0.002
ADP 20 μ M	0.019	0.531
WBA, AA 1.6 mM	0.173	0.001
Point-of-care assays		
PFA-100 [®]	0.019	0.392
VerifyNow Aspirin [®]	0.247	< 0.0001
Urinary dTxB ₂	-0.033	0.475

* It is generally accepted that a κ statistic between 0 and 0.2 translates into slight agreement, 0.2 to 0.4 into fair agreement, 0.4 to 0.6 into moderate agreement, 0.6 to 0.8 into substantial agreement, and 0.8 to 1 into almost perfect agreement.

Table 3: Sensitivity, specificity and predictive values of various platelet function assays to detect aspirin resistance using LTA after AA stimulation as the standard

Platelet function test	Sensitivity* (CI_{0.95})	Specificity† (CI_{0.95})	Positive predictive value‡ (CI_{0.95})	Negative predictive value§ (CI_{0.95})
LTA, ADP 5 µM (n = 184)	0.50 (0.43-0.57)	0.91 (0.87-0.95)	0.21 (0.15-0.27)	0.98 (0.96-1.0)
LTA, ADP 10 µM (n = 173)	0.67 (0.60-0.74)	0.84 (0.78-0.90)	0.13 (0.08-0.18)	0.99 (0.98-1.0)
LTA, ADP 20 µM (n = 178)	0.63 (0.56-0.70)	0.49 (0.42-0.56)	0.05 (0.02-0.08)	0.97 (0.94-1.0)
WBA, AA 1.6 mM (n = 200)	0.63 (0.56-0.70)	0.84 (0.79-0.89)	0.14 (0.09-0.19)	0.98 (0.96-1.0)
PFA-100® (n = 200)	0.75 (0.69-0.81)	0.40 (0.33-0.47)	0.05 (0.02-0.08)	0.97 (0.95-0.99)
VerifyNow Aspirin® (n = 195)	0.38 (0.31-0.45)	0.95 (0.92-0.98)	0.23 (0.17-0.29)	0.97 (0.95-0.99)
Urinary dTxB ₂ (n = 201)	0.13 (0.08-0.18)	0.77 (0.71-0.83)	0.02 (0-0.04)	0.95 (0.92-0.98)

Figure 1.

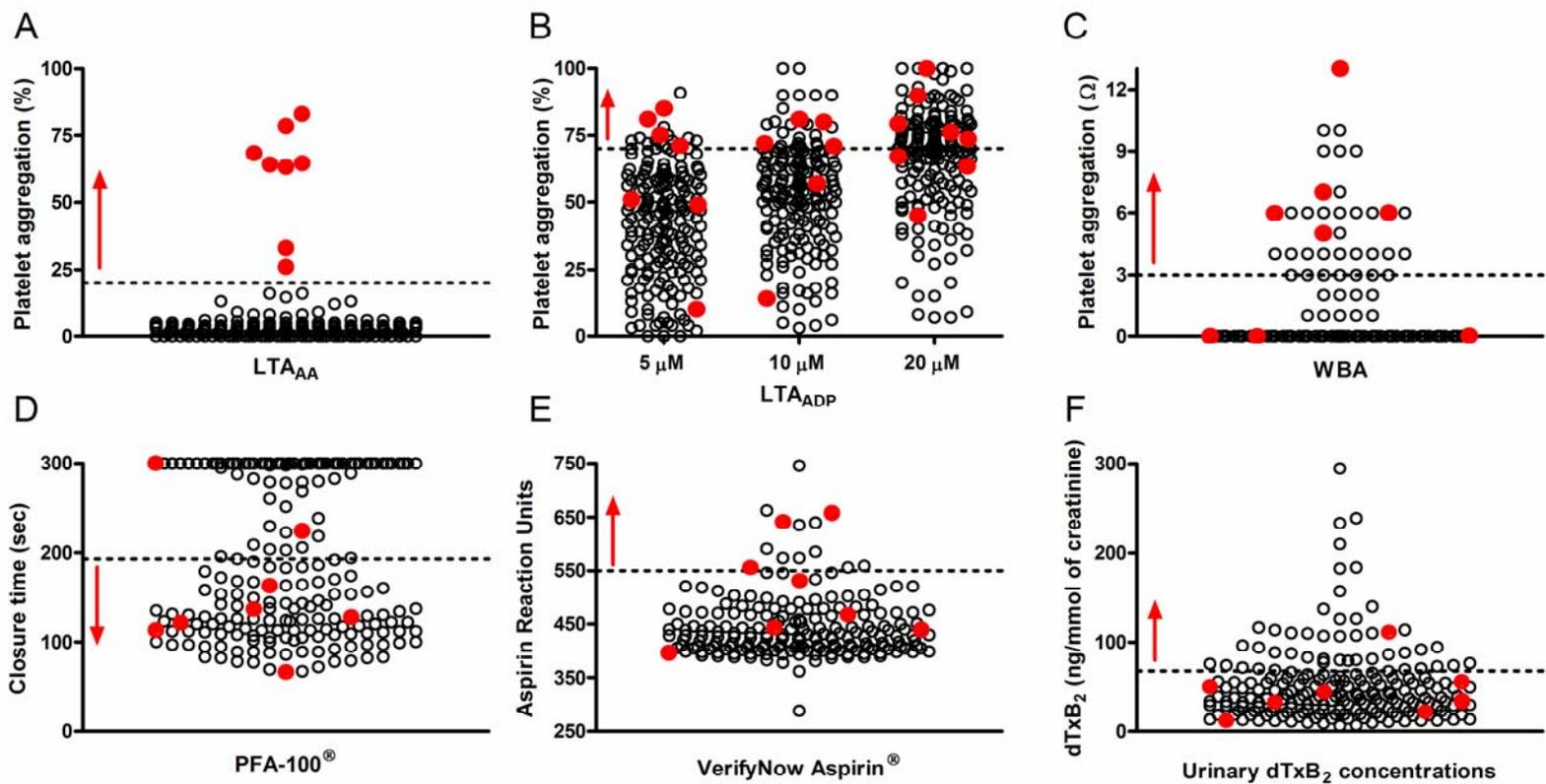
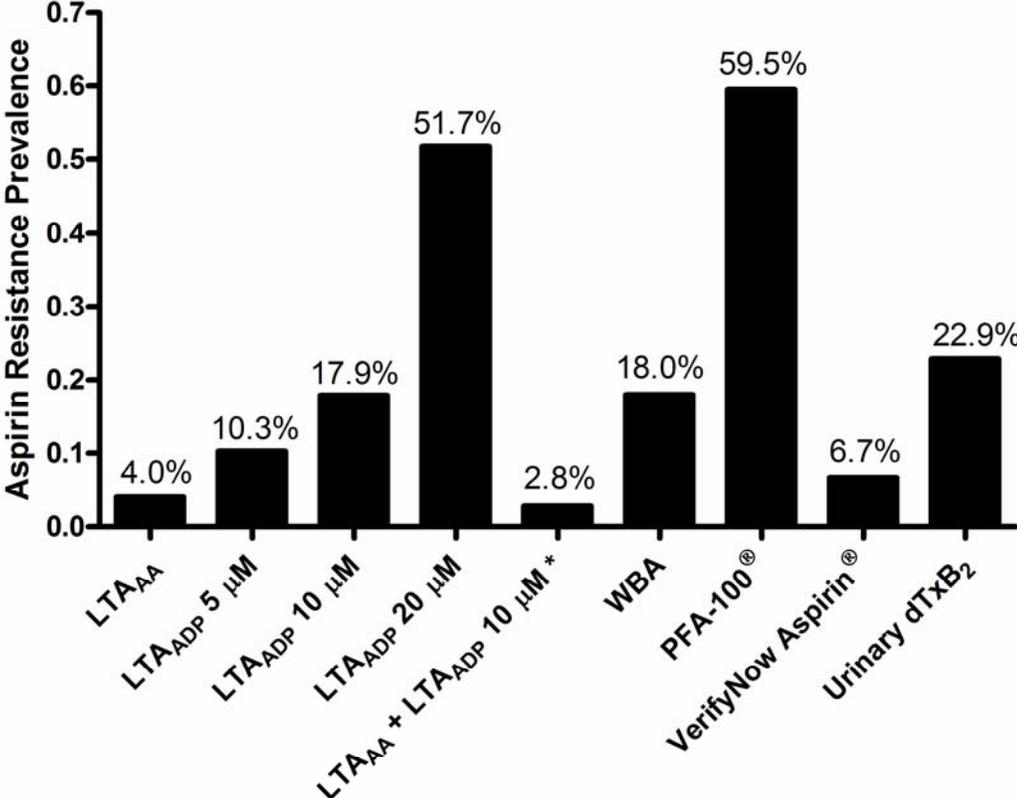


Figure 2.



Annexe 3 : Entrevue téléphonique pour l'étude de suivi

Bonjour, je m'appelle NOM DE L'INTERVENANT et je vous appelle de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Je vous téléphone car vous avez participé à un projet de recherche le DATE DE PARTICIPATION pour vérifier l'efficacité de l'AAS à éclaircir votre sang. J'aimerais savoir si vous seriez disposé à répondre à quelques questions concernant votre santé pour faire suite à votre participation à l'étude. Si vous ne voulez pas participer, ce n'est pas un problème et ça ne changera pas les soins apportés par votre médecin. Votre nom ne sera pas utilisé et vos réponses seront anonymes. Le questionnaire est d'une durée d'environ 10 minutes. Vous pouvez choisir d'arrêter l'entretien ou vous pouvez choisir de ne pas répondre aux questions à n'importe quel moment. Voudriez-vous prendre 10 minutes pour discuter de votre état de santé des 3 dernières années?

Depuis le DATE DE PARTICIPATION À L'ÉTUDE :

1 – Avez-vous subi infarctus du myocarde ou de l'angine instable (crise cardiaque)?

Si oui, quand?

À quel centre hospitalier avez-vous été traité?

(Si autre centre hospitalier que HSCM, demander la permission de faire venir le dossier d'archives)

2 – Avez-vous subi un accident vasculaire cérébral?

Si oui, quand?

À quel centre hospitalier avez-vous été traité?

(Si autre centre hospitalier que HSCM, demander la permission de faire venir le dossier d'archives)

3 – Avez-vous des séquelles de votre accident vasculaire cérébral telles que paralysie?

4 – Avez-vous subi une intervention coronarienne percutanée (pose de tuteur/stent dans une artère coronarienne) ou été opéré pour des pontages?

Si oui, à quel moment et à quel centre hospitalier?

(Si autre centre hospitalier que HSCM, demander la permission de faire venir le dossier d'archives)

5 – Quels médicaments prenez-vous en ce moment pour éclaircir le sang?

Si il y a eu des changements dans les 3 dernières années, depuis quand le nouveau régime a-t-il été introduit?

Prenez-vous vos médicaments régulièrement?

Vous arrive-t-il d'oublier de prendre vos médicaments plus d'une journée par semaine?

6 – Me permettez-vous de contacter votre pharmacie pour vérifier la liste de médicaments que vous avez pris au cours des 3 dernières années qui pourrait interagir avec vos médicaments pour éclaircir le sang?

Si oui, prendre en nom le nom et le numéro de téléphone de la pharmacie

Je vous remercie du temps que vous avez pris pour répondre à ces questions. Bonne journée!

Annexe 4 : Formulaire de collecte de données pour l'étude de suivi

Patient's initials: ___	Number: ___
-------------------------	-------------

SUBJECT'S CHARACTERISTICS				
Available for follow-up	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes		
Verbal consent obtained	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes		
Ejection fraction at time of enrolment	_____ %			
Extent of CAD at time of enrolment	<input type="checkbox"/> 1 vessel	<input type="checkbox"/> 2 vessel	<input type="checkbox"/> 3 vessel	<input type="checkbox"/> Left main

MACCE SINCE ASPIRIN RESISTANCE SCREENING			
Death	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes	When : _____
	Cause:		Where : _____
	If hospitalization not at HSCM, consent to have access to medical file?		<input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes
Myocardial infarction	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes	When : _____
			Where : _____
	If hospitalization not at HSCM, consent to have access to medical file?		<input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes
Unstable angina	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes	When : _____
			Where : _____
	If hospitalization not at HSCM, consent to have access to medical file?		<input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes
Stroke or TIA	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes	When : _____
			Where : _____
	If hospitalization not at HSCM, consent to have access to medical file?		<input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes

Sequelae of stroke (i.e. paralysis)	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes	When : _____	
			Where : _____	
	If hospitalization not at HSCM, consent to have access to medical file?		<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes
PCI	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes	When : _____	
			Where : _____	
	If hospitalization not at HSCM, consent to have access to medical file?		<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes
CABG	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes	When : _____	
			Where : _____	
	If hospitalization not at HSCM, consent to have access to medical file?		<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> yes
Antiplatelet agents	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____	
	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____	
	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____	
Self-reported compliance	<input type="checkbox"/> > 80%	<input type="checkbox"/> < 80%		
Pharmacy	Phone number: _____			
	Antiplatelet medication and compliance in the last 3 months preceding event or follow-up confirmed: <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes			

Annexe 5 : Formulaire de collecte de données pour l'étude sur la cessation de clopidogrel

Group: _____		Patient's initials: _ _ _	Number: ____
INCLUSION CRITERIA			
<i>In this section, if the answer "no" is selected to any criterion, the patient is not eligible</i>			
	Adult patient, aged 18 years or older	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	➤ Patient suffering from stable CAD scheduled to discontinue clopidogrel therapy at least one month after stent implantation	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	OR	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	➤ Stable clopidogrel-free CAD patient		
	Patient willing to participate to the study and to sign informed consent form	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
EXCLUSION CRITERIA			
<i>In this section, if the answer "yes" is selected to any criterion, the patient is not eligible</i>			
	Acute coronary syndrome or revascularization in the last 3 months prior to enrolment	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	Concurrent ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, including COX-2 selective anti-inflammatory drugs), ticlopidine, dipyridamole, warfarin or acenocoumarol	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	Major surgical procedure within 1 month before enrolment	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	Platelet count outside the 100 000 to 450 000/ μ L range	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	Hematocrit < 25% or Haemoglobin < 100 g/L	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
	Patient undergoing dialysis for chronic renal failure	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no

Group: _____	Patient's initials: ___	Number: ____
--------------	-------------------------	--------------

SUBJECT'S CHARACTERISTICS			
1	Allergies to drugs	<input type="checkbox"/> none	<input type="checkbox"/> yes: _____
2	Date of birth	____ / ____ / ____	(day/month/year)
3	Gender	<input type="checkbox"/> female	<input type="checkbox"/> male
4	Race	<input type="checkbox"/> Caucasian	<input type="checkbox"/> Black <input type="checkbox"/> Other: _____
5	Alcohol use	<input type="checkbox"/> never	<input type="checkbox"/> sometimes <input type="checkbox"/> regularly
6	Tobacco use	<input type="checkbox"/> smoker	<input type="checkbox"/> non smoker
7	Physical exercise	<input type="checkbox"/> none	<input type="checkbox"/> yes duration: _____ minutes frequency: _____ times a week
8	Platelet count		<input type="checkbox"/> between 100 000 to 450 000/ μ L
9	Haemoglobin		Hematocrit _____
10	Weight	_____ kg	_____ lbs
11	Height	_____ m	_____ in
12	BMI	_____ kg/m^2	
13	Fasting blood glucose	_____ mmol/L	
14	Glycated haemoglobin	_____ %	
15	Total cholesterol	_____ mmol/L	
16	HDL cholesterol	_____ mmol/L	
17	LDL cholesterol	_____ mmol/L	
18	Triglycerides	_____ mmol/L	

Group: _____	Patient's initials: ____	Number: ____
--------------	--------------------------	--------------

SUBJECT'S CONDITION AND CO-MORBIDITIES			
19	Family history of early cardiovascular disease	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
20	Prior myocardial infarction	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
21	Prior unstable angina	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
22	Prior coronary revascularization	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
23	Stent type: _____		
24	Time from clopidogrel initiation: _____ days		
25	Stable angina	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
26	Heart failure	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
27	Hypertension	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
28	Hypercholesterolemia	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
29	Diabetes	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
30	Stroke or TIA	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
31	Peripheral vascular disease	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
32	Kidney diseases / Chronic renal failure	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
33	Liver diseases	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
34	Gastro-intestinal disorders (ulcer, dyspepsia), other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
35	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
36	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
37	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
38	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
39	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no
40	Other: _____	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no

Group: _____	Patient's initials: ___	Number: ____
--------------	-------------------------	--------------

SUBJECT'S MEDICATION						
41	Antiplatelet agent	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
42	ACEi	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
43	ARB	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
44	β – blocker	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
45	Diuretics	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
				Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
46	Lipid-lowering agent	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
47	Calcium channel blocker	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
48	Nitrates	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
49	NSAIDs	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
50	Hypoglycaemic agent	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
51	Other	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
52	Other	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
53	Other	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____

Group: _____	Patient's initials: ___	Number: ____
--------------	-------------------------	--------------

SUBJECT'S USE OF OTHER SUBSTANCES						
54	Vitamins	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____	Dose: _____	Frequency: _____
55	Over-the-counter products	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____ Agent: _____ Agent: _____	Dose: _____ Dose: _____ Dose: _____	Frequency: _____ Frequency: _____ Frequency: _____
56	Natural products	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____ Agent: _____	Dose: _____ Dose: _____	Frequency: _____ Frequency: _____
57	Homeopathy	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____ Agent: _____	Dose: _____ Dose: _____	Frequency: _____ Frequency: _____
58	Illicit drugs	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Agent: _____ Agent: _____ Agent: _____	Dose: _____ Dose: _____ Dose: _____	Frequency: _____ Frequency: _____ Frequency: _____

Annexe 6 : Résumé des accomplissements académiques

Publications dans des revues avec comité de pairs :

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C. Evidence of a pharmacological rebound following discontinuation of clopidogrel therapy in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2010 [soumis]

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Palisaitis DA, Schampaert E, Turgeon J, Pharand C. Genetic determinants of response to aspirin: appraisal of 4 candidate genes. *Thromb Haemost* 2010 [soumis]

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C. Clinical predictiveness of six major platelet function tests used to assess aspirin response in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J* 2009 [soumis]

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG. Heterogeneity in platelet cyclooxygenase inhibition by aspirin in coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2010; doi:10.1016/j.ijcard.2010.02.025

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Turgeon J, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C. Platelet count, not oxidative stress, may contribute to inadequate platelet inhibition by aspirin. *Int J Cardiol* 2009; doi:10.1016/j.ijcard.2009.01.037

Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis DA, Schampaert E, Diodati JG. Insights into the interpretation of light transmission aggregometry for evaluation of platelet aggregation inhibition by clopidogrel. *Thromb Res* 2009; 124: 546-53

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Schampaert E, Palisaitis DA, Pharand C. Prevalence of unresponsiveness to aspirin and/or clopidogrel in patients with stable coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2009; 104:1189-93

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG. Evaluation of the platelet count drop method for assessment of platelet function in comparison with “gold standard” light transmission aggregometry. *Thromb Res* 2009; 124: 418-22

Nguyen TA*, **Lordkipanidzé M***, Diodati JG, Palisaitis DA, Schampaert E, Turgeon J, Pharand C. Week-long high-maintenance dose clopidogrel regimen achieves better platelet aggregation inhibition than a standard loading dose before percutaneous coronary intervention; results of a double blind, randomized clinical trial. *J Interv Cardiol* 2009; 22: 368-77

* Ces auteurs ont contribué de façon égale à ce manuscrit et se partagent le rôle de premier auteur

Blais N, Pharand C, **Lordkipanidzé M**, Sia YK, Merhi Y, Diodati JG. Response to aspirin in healthy individuals - Cross-comparison of light transmission aggregometry, VerifyNow system, platelet count drop, thromboelastography (TEG) and urinary 11-dehydrothromboxane B₂. *Thromb Haemost* 2009; 102: 404-11

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Pharand C. Possibility of a rebound phenomenon following antiplatelet therapy withdrawal: A look at the clinical and pharmacological evidence. *Pharmacol Ther* 2009; 123: 178-86

Lordkipanidzé M, Pharand C, Nguyen TA, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG. Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *Eur Heart J* 2008; 29: 2877-85

Lordkipanidzé M, Pharand C, Nguyen TA, Schampaert E, Diodati JG. Assessment of VerifyNow P2Y₁₂ assay accuracy in evaluating clopidogrel-induced platelet inhibition. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 372-8

Lordkipanidzé M, Pharand C, Diodati JG. Comparison of different methods of measurement of aspirin resistance : Using the appropriate statistic. *Eur Heart J* 2008; 29: 138-9 (lettre à l'éditeur)

Lordkipanidzé 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; 28:1702-8

Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis D, Diodati JG. Aspirin Resistance: Truth or Dare. *Pharmacol Ther* 2006; 112:733-43

Communications :

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Schampaert E, Palisaitis DA, Sia E, Pharand C. Effect of clopidogrel discontinuation on platelet function. *Circulation* 2009; 120: S1032 (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Sia E, Diodati JG. Platelet inhibition by aspirin is not uniformly stable during a standard 24-hour interval dosing regimen. *Can J Cardiol* 2009; 25: 197B (abstract)

Pharand C, **Lordkipanidzé M**, Palisaitis DA, Turgeon J, Schampaert E, Diodati JG. Oxidative stress does not contribute to aspirin resistance in coronary disease patients. *Pharmacy World & Science* 2009; 31: 122 (abstract)

Pharand C, Nguyen TA, **Lordkipanidzé M**, Palisaitis DA, Turgeon J, Schampaert E, Diodati JG. Effect of four different clopidogrel doses given before PCI on platelet function. *Pharmacy World & Science* 2009; 31: 122-3 (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Sia E, Diodati JG. The platelet count drop method for evaluation of platelet function is suboptimal compared with “gold standard” light transmission aggregometry. *Can J Cardiol* 2008; 24: 60E (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Palisaitis DA, Sia E, Diodati JG. P2Y₁₂-ADP receptor inhibition with clopidogrel assessed by final aggregation in comparison with maximal aggregation provides different results. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: e104 (abstract)

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Schampaert E, Palisaitis DA, Sia E, Pharand C. Inadequate platelet response to aspirin and clopidogrel is assay-specific, and occurs through distinct mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: e139 (abstract)

Blais N, **Lordkipanidzé M**, Pharand C, Sia YK, Merhi Y, Diodati JG. 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. *Blood* 2007; 110: 934 (abstract)

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Schampaert E, Palisaitis DA, Sia E, Pharand C. Inadequate platelet response to aspirin and clopidogrel is assay-specific, and occurs through distinct mechanisms. *Can J Cardiol* 2007; 23: 99C (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Nguyen TA, Schampaert E, Palisaitis DA, Sia E, Diodati JG. P2Y₁₂-ADP receptor inhibition with clopidogrel can be assessed by maximal or final aggregation. *Can J Cardiol* 2007; 23: 145C (abstract)

Pharand C, **Lordkipanidzé M**, Palisaitis DA, Turgeon J, Schampaert E, Diodati JG. Lack of agreement between 6 major platelet function assays commonly used to assess the prevalence of aspirin resistance in stable coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: e52 (abstract)

Pharand C, **Lordkipanidzé M**, Palisaitis DA, Turgeon J, Schampaert E, Diodati JG. Aspirin resistance in stable coronary artery disease patients is associated with increased platelet turnover, but not oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: e52 (abstract)

Pharand C, **Lordkipanidzé M**, Palisaitis DA, Schampaert E, Diodati JG. The VerifyNow[®] P2Y₁₂ assay does not eliminate the need for a baseline sample in evaluating inhibition of platelet aggregation by clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: e81 (abstract)

Pharand C, **Lordkipanidzé M**, Nguyen TA, Palisaitis DA, Turgeon J, Schampaert E, Diodati JG. Assays evaluating platelet inhibition provided by clopidogrel yield significantly different results and correlate poorly among themselves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: e110 (abstract)

Pharand C, Nguyen TA, **Lordkipanidzé M**, Palisaitis DA, Turgeon J, Schampaert E, Diodati JG. Prolonged prophylactic administration of high-dose clopidogrel before elective percutaneous coronary intervention is more effective than the standard 300 mg bolus in inhibiting platelet aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: e110 (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Diodati JG, Palisaitis DA, Bélanger F, Sia YK, Schampaert E, Turgeon J. Evaluation of the effect of the PI^{A1/A2} dimorphism, of the P2Y₁ receptor gene 1622A/G mutation and of the COX-1 gene 22C/T mutation on platelet response to aspirin. *Circulation* 2006; 114: II-488 (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis DA, Turgeon J, Sia YK, Schampaert E, Diodati JG. Low aspirin resistance prevalence in stable coronary artery patients as measured by arachidonic acid-stimulated optical aggregometry: A comparison with six major platelet function tests. *Can J Cardiol* 2006; 22: 227D (abstract)

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Palisaitis DA, Turgeon J, Sia YK, Schampaert E, Pharand C. Aspirin resistance in stable coronary artery patients: Implication of oxidative stress. *Can J Cardiol* 2006; 22: 151D (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Nguyen TA, Palisaitis DA, Turgeon J, Sia YK, Schampaert E, Diodati JG. Effect of different dosing regimens of clopidogrel given before elective percutaneous coronary intervention on platelet function. *Can J Cardiol* 2006; 22: 103D-104D (abstract)

Lordkipanidzé M, Diodati JG, Nguyen TA, Palisaitis DA, Turgeon J, Sia YK, Schampaert E, Pharand C. The Degree of Inhibition of Platelet Aggregation by Clopidogrel: A Comparison of Five Platelet Function Tests. *Can J Cardiol* 2006; 22: 134D (abstract)

Lordkipanidzé M, Pharand C, Diodati JG, Palisaitis DA, Bélanger F, Sia YK, Schampaert E, Turgeon J. Evaluation of the effect of the PI^{A1/A2} dimorphism, of the P2Y₁ receptor gene 1622A/G mutation and of the COX-1 gene 22C/T mutation on platelet response to aspirin. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 360 (abstract)

Turgeon J, **Lordkipanidzé M**, Pharand C, Diodati JG, Nguyen TA, Palisaitis DA, Bélanger F, Sia YK, Schampaert E. Evaluation of the effect of the H2 haplotype and CYP3A5 polymorphisms on the antiplatelet response to clopidogrel given before elective percutaneous coronary intervention. *Am J Hum Genet* 2006; 79 : 360 (abstract)

Prix et distinctions :

Bourse de voyage, Forum des jeunes chercheurs, Institut de la santé circulatoire et respiratoire 2010

ABSTRACT SÉLECTIONNÉ POUR PRÉSENTATION AU FORUM DES JEUNES CHERCHEURS

Bourse de mérite, Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales, Université de Montréal 2009

DOSSIER ACADÉMIQUE EXCEPTIONNEL

Bourse de rédaction, Faculté de pharmacie, Université de Montréal 2009

ACHÈVEMENT DES TRAVAUX DOCTORAUX DANS LES DÉLAIS PRESCRITS

Prix du Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) 2009

MEILLEURE COMMUNICATION SCIENTIFIQUE PRÉSENTÉE À LA 9^{ÈME} JOURNÉE ANNUELLE DE LA RECHERCHE DE L'HÔPITAL DU SACRÉ-CŒUR DE MONTRÉAL

Prix de recherche Fondation canadienne pour la pharmacie - AFPC 2009

MEILLEUR ARTICLE DE L'ANNÉE 2008 SUR LA RECHERCHE SUR LA PRATIQUE PHARMACEUTIQUE, PRÉSENTÉ À L'ASSEMBLÉE ANNUELLE DE L'ASSOCIATION DES FACULTÉS DE PHARMACIE DU CANADA

Prix Wal-Mart Canada - Association des Facultés de Pharmacie du Canada 2009

LEADER ACADÉMIQUE DU FUTUR

- Prix Centenaire de la recherche Pfizer Canada* 2008
**POUR EXCELLENCE ACADÉMIQUE ET RÉALISATION EN RECHERCHE REMIS À UN
ÉTUDIANT AU PHD DÉTENTEUR D'UN DIPLÔME DE 1^{ER} CYCLE EN PHARMACIE**
- Prix de présentation étudiante, Société Canadienne de Cardiologie* 2008
DEUXIÈME PRIX – CATÉGORIE SCIENCES CLINIQUES
- Prix du Réseau en santé cardiovasculaire, Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)* 2008
**MEILLEURE COMMUNICATION SCIENTIFIQUE ORALE PRÉSENTÉE À LA 8^{ÈME} JOURNÉE
ANNUELLE DE LA RECHERCHE DE L'HÔPITAL DU SACRÉ-CŒUR DE MONTRÉAL**
- Prix de recherche GlaxoSmithKline - Association des Facultés de Pharmacie du Canada* 2008
**MEILLEUR ARTICLE SCIENTIFIQUE DE L'ANNÉE 2007, PRÉSENTÉ À L'ASSEMBLÉE
ANNUELLE DE L'ASSOCIATION DES FACULTÉS DE PHARMACIE DU CANADA**
- Bourse Gisèle Des Groseillers, Université de Montréal* 2008
**POUR EXCELLENCE ACADÉMIQUE ET RÉALISATION EN RECHERCHE AU DOCTORAT
DANS LE DOMAINE DE LA PHARMACOLOGIE OU DE LA THÉRAPEUTIQUE**
- Abstract sélectionné en tant que « Featured Research »* 2007
CONGRÈS CANADIEN SUR LA SANTÉ CARDIOVASCULAIRE 2007
- P2Y₁₂-ADP receptor inhibition with clopidogrel can be assessed by maximal or final aggregation
- Bourse d'excellence, Faculté des Études Supérieures, Université de Montréal* 2007
DOSSIER ACADÉMIQUE EXCEPTIONNEL
- 7^{ème} Journée annuelle de la recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal* 2007
PRIX DE PRÉSENTATION – SECTION AFFICHE
- Bourse de formation, Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ)* 2007 – 2010
BOURSE DE DOCTORAT POUR PROFESSIONNEL DE LA SANTÉ

- Abstract sélectionné pour couverture médiatique « Early Press Release »* 2007
CONGRÈS ANNUEL DE L'ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY
▪ Aspirin resistance in stable coronary artery disease patients is associated with increased platelet turnover, but not oxidative stress
- Prix de présentation étudiante, Société Canadienne de Cardiologie* 2006
PREMIER PRIX – CATÉGORIE SCIENCES CLINIQUES
- Programme de bourses “Ayez du Cœur”, Société Canadienne de Cardiologie* 2006
ÉTUDIANT CANADIEN PROMETTEUR
- 6^{ème} Journée annuelle de la recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal* 2006
TROISIÈME PRIX – CATÉGORIE MEILLEURES PRÉSENTATIONS ORALES
- Bourse de recrutement au Doctorat, Université de Montréal* 2006
ÉTUDIANT PROMETTEUR EN PREMIÈRE ANNÉE DE DOCTORAT
- Liste d'honneur du doyen de la Faculté des Études Supérieures, Université de Montréal* 2006
MÉMOIRE CLASSÉ DANS LES MEILLEURS 5 RANGS PERCENTILES