

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
FES



Année 2014

Thèse N° 121/014

**Analyse de l'activité Anti plaquettaire du Clopidogrel GT par
le dispositif Verify NOW**

**L'expérience du service de cardiologie CHU HASSAN II de Fès
A propos de 50 cas**

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 13/11/2014

PAR

Mr. ZAMZAMI AMINE

Né le 07/01/1989 à Fès

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
MOTS-CLES :

Clopidogrel- générique -Verify Now - résistance

JURY

M. AKOUDAD HAFID..... PRESIDENT et RAPPORTEUR

Professeur de Cardiologie

Mme . LAHLOU IKRAM.....

Professeur de Cardiologie

Mme. OUAHA LATIFA.....

Professeur de Cardiologie

} JUGES

PLAN

INTRODUCTION :	5
MATERIEL ET METHODES	9
1. Objectifs de l'étude :.....	10
2. Protocole de l'étude :.....	10
3. Mode de recueil des données :.....	14
4. Prélèvement et traitement des échantillons :.....	17
5. Procédure d'essai :.....	17
6. Résultats rapportés.....	19
RESULTATS	20
A. Epidémiologie :.....	21
1. Répartition selon le sexe et l'âge :.....	21
2. Les facteurs de risques cardiovasculaires :.....	22
B. Indication du clopidogrel :.....	24
C. Prise médicamenteuse concomitante :.....	25
D. Bilan biologique.....	26
E. Résultats de l'évaluation de la réponse plaquettaire par le « verify Now ».....	27
Notre Etude en BREF	28
DISCUSSION	29
Maladie Coronarienne :	30
Rôle de la plaquette dans l'hémostase primaire	34
A. Propriétés pharmacologiques :.....	45
B. Le clopidogrel dans les syndromes coronaires aigus :.....	47
C. Variabilité de la réponse au clopidogrel :.....	50

Le Verify-Now	54
1. Description de l'automate :	55
2. Principe :	56
3. Résultats rapportés :	57
Conclusion	59
Résumés.....	62
Bibliographiques	68

Abréviations :

AMPc : adénosine mono phosphate cyclique.

ADP : adénosine di phosphate

ATP : adénosine tri phosphate.

ARA II : antagoniste de récepteur de l'angiotensine.

AVCI : accident vasculaire cérébral ischémique

BB : bêta bloquant

CC : clairance de la créatinine

CV : cardio vasculaire.

CYP : cytochrome

GP : glycoprotéine

HTA : hypertension artérielle

IC : inhibiteur calcique.

IDM : infarctus du myocarde

IEC : inhibiteur des enzymes de conversion

IMC : indice de masse corporelle

IPP : Inhibiteur de la pompe à proton

PCI : percutaneous coronary intervention

PRU :unités de réaction au P2Y12

SCA ST- : syndrome coronaire sans sus décalage du segment ST

SCA ST+ : syndrome coronaire avec sus décalage du segment ST

INTRODUCTION :

La maladie coronaire représente la 1^{ère} cause de mortalité d'origine cardiaque dans les pays occidentaux. Elle est essentiellement liée à la présence de plaques d'athérome qui se déposent au niveau de la lumière coronaire entraînant son obstruction. En fait, l'athérosclérose coronaire est un processus évolutif qui commence certes par la formation de ces plaques athéromateuses mais qui peut se compliquer par la survenue d'une thrombose coronaire et on parle alors d'athérothrombose. En effet, la rupture d'une plaque d'athérome constitue le tournant évolutif de la maladie et le déclencheur de la formation d'un caillot de sang dans la coronaire permettant de définir le syndrome coronaire aigu (SCA). Cette forme grave de la coronaropathie peut être subdivisée en 2 tableaux cliniques en fonction du degré d'obstruction coronaire :

- Le 1^{er} représenté par l'infarctus du myocarde dans lequel le caillot de sang obstrue complètement la lumière coronaire et est responsable d'une nécrose tissulaire myocardique. Cette forme gravissime de syndrome coronaire aigu donne des anomalies électrocardiographiques touchant le segment ST qui est sus-décalé et on parle ainsi de syndrome coronaire aigu avec sus-décalage de ST.
- Le 2^{ème} représenté par les syndromes coronaires sans sus-décalage de ST caractérisés également par la présence d'une thrombose coronaire mais qui n'est pas occlusive.

Dans les 2 situations, la douleur thoracique représente le maître symptôme et la prise en charge s'effectue dans le cadre de l'urgence. L'un des piliers thérapeutiques de cette pathologie est le traitement anti-

thrombotique. Celui-ci est représenté par les médicaments antiplaquettaires qui bloquent la plaquette et donc agissent sur l'hémostase primaire mais également par les anticoagulants qui bloquent le système de la coagulation.

Les traitements antiplaquettaires représentent la pierre angulaire du traitement des patients admis pour syndrome coronaire aigu et/ou bénéficiant d'une angioplastie coronaire. L'association d'une bithérapie antiplaquettaire par aspirine et clopidogrel représente aujourd'hui le gold standard dans la prise en charge de ces patients. Malgré l'efficacité de ces molécules, les récives d'événements ischémiques restent fréquentes, et le concept de mauvaise réponse biologique au clopidogrel a été proposé comme une des hypothèses à ces récives. En effet, de nombreuses études biologiques ont fait état d'une large variabilité interindividuelle de réponse biologique au clopidogrel plaquettaire sous traitement insuffisant. Dans ces travaux, cette réponse biologique a été évaluée par différents tests plaquettaires, les plus utilisés étant les tests de laboratoires (test d'agrégation et test VASP) et le test 'minute' Verify Now. Les mécanismes expliquant cette variabilité de réponse restent imparfaitement connus, mais des facteurs ont pu être clairement identifiés : polymorphismes génétiques, interactions médicamenteuses et facteurs cliniques comme le poids ou le diabète. Plus récemment, cette entité biologique a pu être reliée au pronostic clinique de nos patients avec un pronostic ischémique péjoratif chez les patients identifiés biologiquement comme mauvais répondeurs, et à l'inverse, un risque de complications hémorragiques accru chez les patients présentant la plus forte inhibition plaquettaire sous traitement.

Les objectifs de ce travail réalisé au service de Cardiologie du CHU Hassan II de Fès est d'analyser 2 aspects du clopidogrel :

- Le 1er est clinique et s'intéressera à déterminer le pourcentage de mauvais répondeurs au clopidogrel dans une population de patients coronariens avérés marocains. Cette réponse sera évaluée grâce à un appareil de mesure de l'activité plaquettaire au lit du malade intitulé « Verify Now ».
- Le 2ème est économique puisqu'on va comparer le clopidogrel original (Plavix®) à une molécule générique (Clopidogrel GT®). Celui-ci par définition moins cher permettra de faire des économies de santé s'il s'avère aussi efficace que la molécule originale et ce sur des bases objectives d'évaluation du blocage de la plaquette grâce à la machine Verify Now.

L'étude a envisagé d'inclure 100 patients et nous avons extrait les résultats préliminaires concernant 50 malades enrôlés dans ce travail.

L'originalité de cette étude tient au fait qu'aucun autre travail n'a été réalisé au Maroc sur ce sujet de résistance au clopidogrel mais également au fait que la machine Vertify-now vient d'être acquise pour la première fois au Maroc par le service de cardiologie du CHU Hassan II de Fès.

MATERIEL ET

METHODES

1.Objectifs de l'étude :

- Evaluer la fréquence de la résistance au clopidogrel dans une population de patients coronariens.
- Comparer l'efficacité du clopidogrel générique par rapport à la molécule mère.

2.Protocole de l'étude :

Notre travail constitue l'étape préliminaire d'une étude prospective qui va regrouper 100 malades coronariens, on a extrait les résultats concernant 50 patients chez qui le clopidogrel est prescrit afin de répondre aux deux hypothèses formulées dans l'objectif de l'étude.

Les patients inclus étaient ceux ayant été admis pour un syndrome coronaire aigu sans sus décalage de ST à faible risque ou pour un infarctus du myocarde n'ayant pas bénéficié d'une stratégie de reperfusion. Les patients ne doivent pas être traités par le clopidogrel à leur arrivée à l'hôpital.

On a inclus également les patients ayant un antécédent de syndrome coronaire aigu et dont le clopidogrel a été arrêté il y a au moins un mois.

Le matériel utilisé pour évaluer la réponse plaquettaire est représenté par la machine Verify Now qui sera testée pour la 1ère fois au Maroc (figure 1).

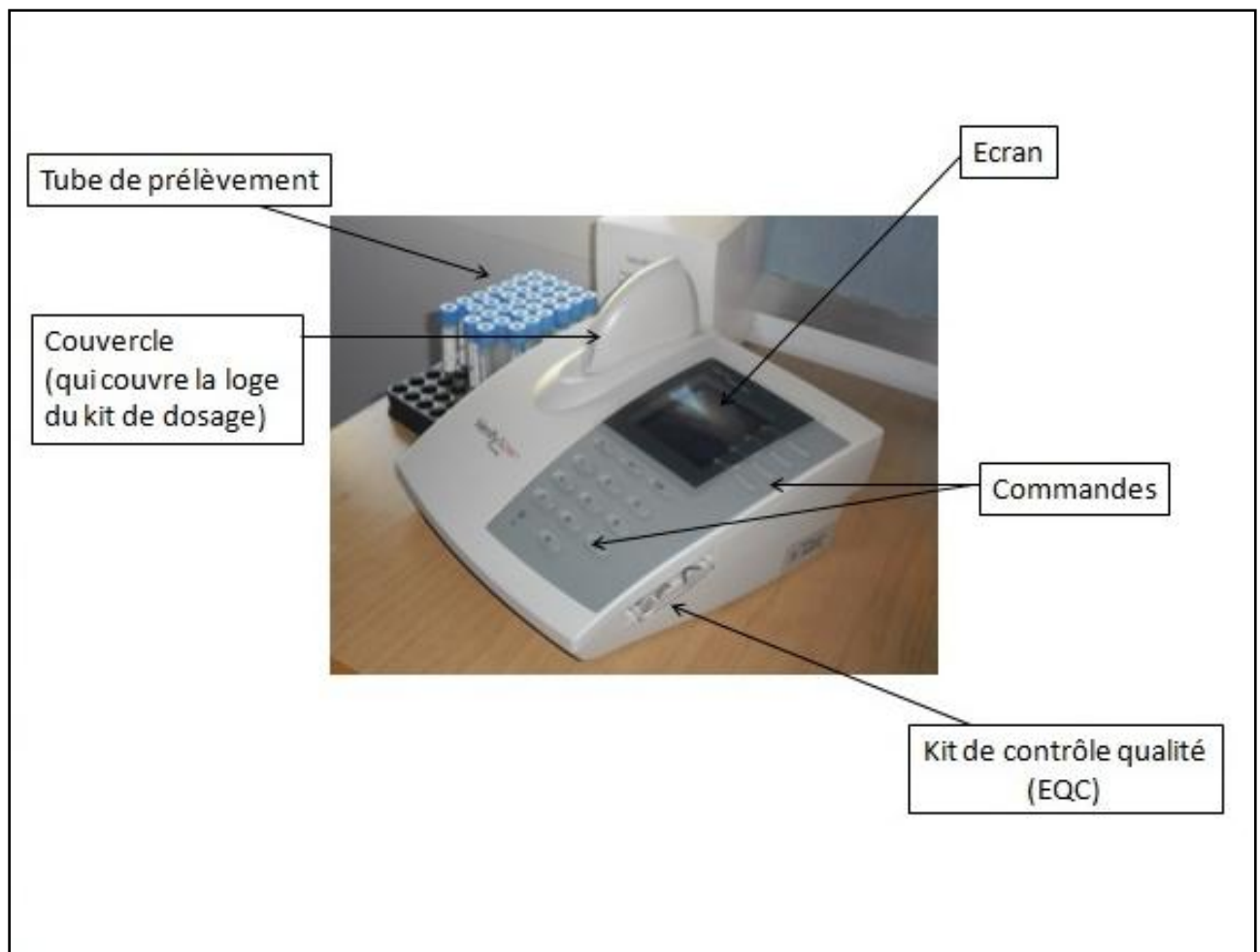


Figure 1 : Description de l'automate « Verify Now »

Le protocole adopté dans notre travail est le suivant (figure 2):

- Après une dose de charge de 300 mg du clopidogrel générique, un dosage par l'automate Verify now en utilisant le kit de dosage P2Y12 (figure 3) est effectué au maximum 8 heures 6 après la prise. Les jours suivants, le patient reçoit une dose de maintenance de 75 mg de Plavix (période de « wash out ») pendant au moins 7 jours. Ensuite, il prend la dose de charge de Plavix avec réalisation d'un test Verify now 8 heures après.

N.B : vu la non disponibilité d'un nombre suffisant de cartouches, le protocole est achevé quand le patient est dit « bon répondeur » au clopidogrel générique.

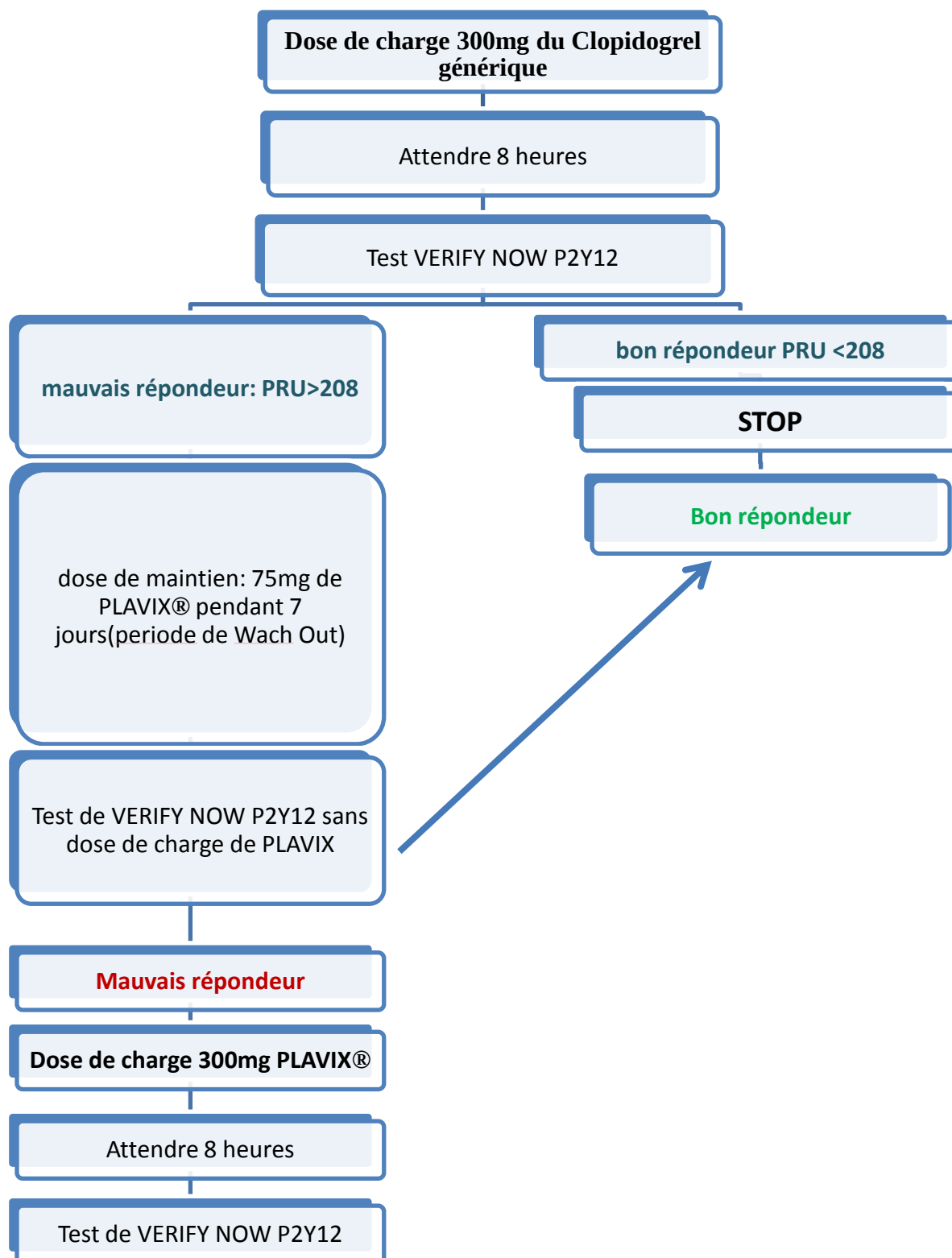


Figure 2 : protocole de l'étude



Figure 3 : Le kit de dosage P2Y12.

Comme pour les thienopyridines, le « Verify- Now » a des kits spéciaux pour l'aspirine et les anti Gp IIb/IIIa.

3.Mode de recueil des données :

Les données recueillies sont extraites d'une fiche d'exploitation pré établie qui englobe les informations personnelles concernant le patient, ses facteurs de risques cardiovasculaires, des renseignements cliniques, biologique, thérapeutique et les étapes du déroulement du test Verify Now.

Evaluation de la réponse plaquettaire au clopidogrel par le

Verify Now P2Y12 test

Nom et prénom:

Age :

Race : noir caucasien

Adresse :

N°

Tel :

Facteurs de risque cardiovasculaire

Diabète

tabagisme

HTA

Ménopause

Hypercholestérolémie

Hypertriglycéridémie

Dyslipidémie mixte

Poids :

IMC :

Périmètre ombilical :

Indication du clopidogrel

Angor stable

SCA ST-

SCA ST Tn+

Score

GRACE :

SCA ST + :

Lyse

ATL

Trt conventionnel

AOMI

ACFA

Biologie

Troponine Ic :

Clearance créatinine :

CRP :

Hémoglobine :

Plaquettes :

TP :

TCA :

Fibrinogène :

Traitement prescrit avec le clopidogrel

Aspirine (préciser la posologie) :

Tirofiban :

Enoxaparine :

Acénocoumarol :

Statine (préciser laquelle et la posologie) :

IPP (préciser lequel et la posologie) :

IEC : β -bloqueur :

Résultat du test Verify-now

* Générique du clopidogrel prescrit : Clopidogrel GT®
Pedovex®

* Dose de charge de 300 mg de clopidogrel générique :

Date : Heure :

* Test après 300 mg du générique :

Date : Heure :

PRU : % d'inhibition :

* Test après 7 jours de Plavix en dose d'entretien en cas de mauvaise réponse au générique:

Date : Heure :

PRU : % d'inhibition :

* Test après 300 mg de plavix® en cas de mauvaise réponse au générique et de mauvaise réponse après 7 jours de Plavix®:

Date : Heure :

PRU : % d'inhibition :

4. Prélèvement et traitement des échantillons :

L'étude s'est déroulée en deux temps : les patients ont été prélevés une première fois à J0 8 heures après la dose de charge par le clopidogrel générique, puis une seconde fois à J8, après la dose de charge de Plavix®.

Les prélèvements ont été effectués sur des tubes anti coagulés de type Vacuette® Greiner Bio-One (2 ml), par une ponction veineuse. Le tube d'échantillon doit être inversé à 5 reprises au moins afin d'assurer le mélange homogène de son contenu. Les échantillons ont ensuite été acheminés sans agitation ni choc thermique au laboratoire. L'ensemble des analyses a été réalisé au cath lab du service de Cardiologie du CHU Hassan II de Fès.

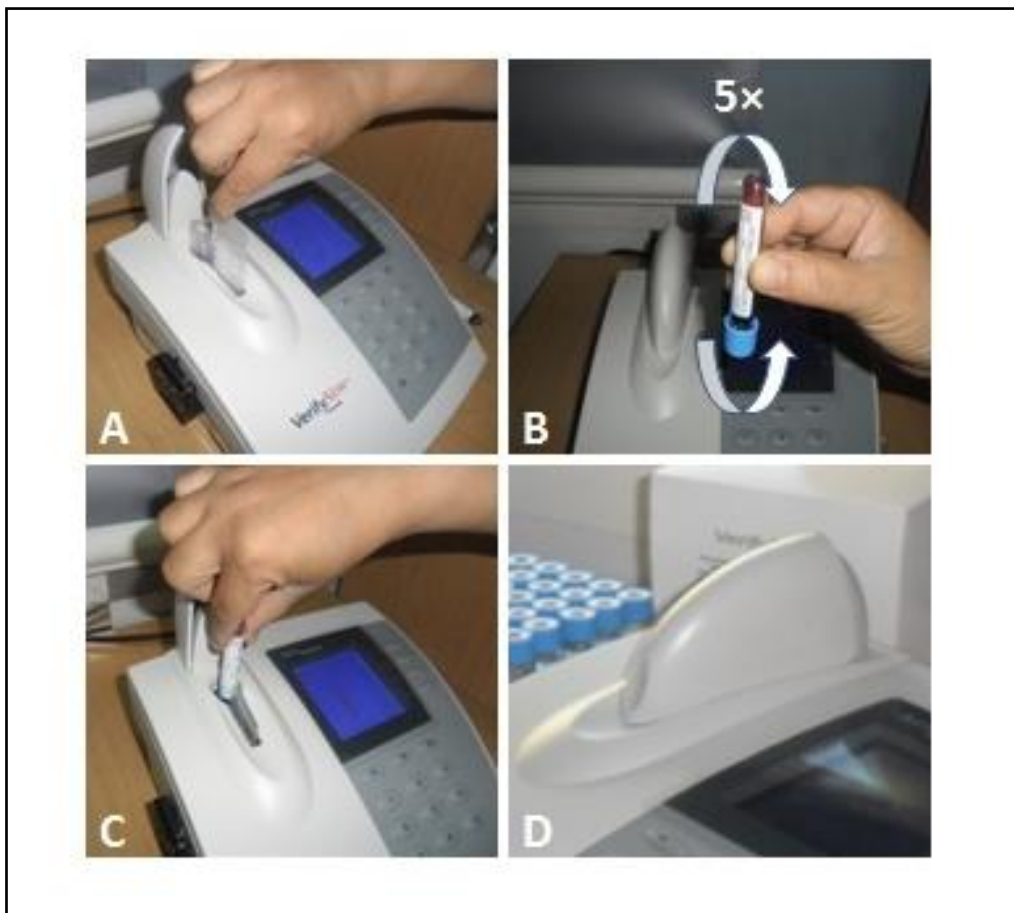
5. Procédure d'essai :

Avant de réaliser l'essai, le sang doit reposer au minimum 10 minutes après le prélèvement, mais pas plus de 4 heures.

Des instructions ont été nécessaires à poursuivre afin de réussir l'essai (figure 4):

1. Ouvrir le sachet en aluminium et retirer le dispositif de dosage. Les dispositifs de dosage ne doivent être manipulés que par leur poignée.
2. Retirer la gaine qui protège l'aiguille du dispositif de dosage en tirant directement la gaine vers le haut.

3. Inverser délicatement le tube échantillon à 5 reprises au moins, puis l'insérer sur l'aiguille du dispositif de dosage. Fermez le couvercle du logement.
4. L'instrument exécutera le test et en affichera le résultat en cinq minutes environ.



Figures 4 : Les étapes de manipulation

6. Résultats rapportés

Le blocage plaquettaire efficace est exprimé avec le test verify now selon 2 valeurs :

- Les Unités de Réaction P2Y12 (PRU) expriment la quantité d'agrégation médiée par le récepteur P2Y12 spécifique des plaquettes et sont calculées en fonction de la vitesse et de l'étendue de l'agrégation plaquettaire dans le canal ADP.
- Le pourcentage d'inhibition (%) qui est le pourcentage de variation par rapport à l'agrégation basale.

Le patient est dit « bon répondeur » si $PRU < 208$ avec un pourcentage d'inhibition $> 15 \%$.

Le patient est dit « mauvais répondeur » si $PRU > 208$ avec un pourcentage d'inhibition $< 15 \%$.

RESULTATS

A. Epidémiologie :

1. Répartition selon le sexe et l'âge :

Dans notre étude 48% des patients sont de sexe féminin versus 52% des hommes avec un sexe ratio de 0.9 (fig5).

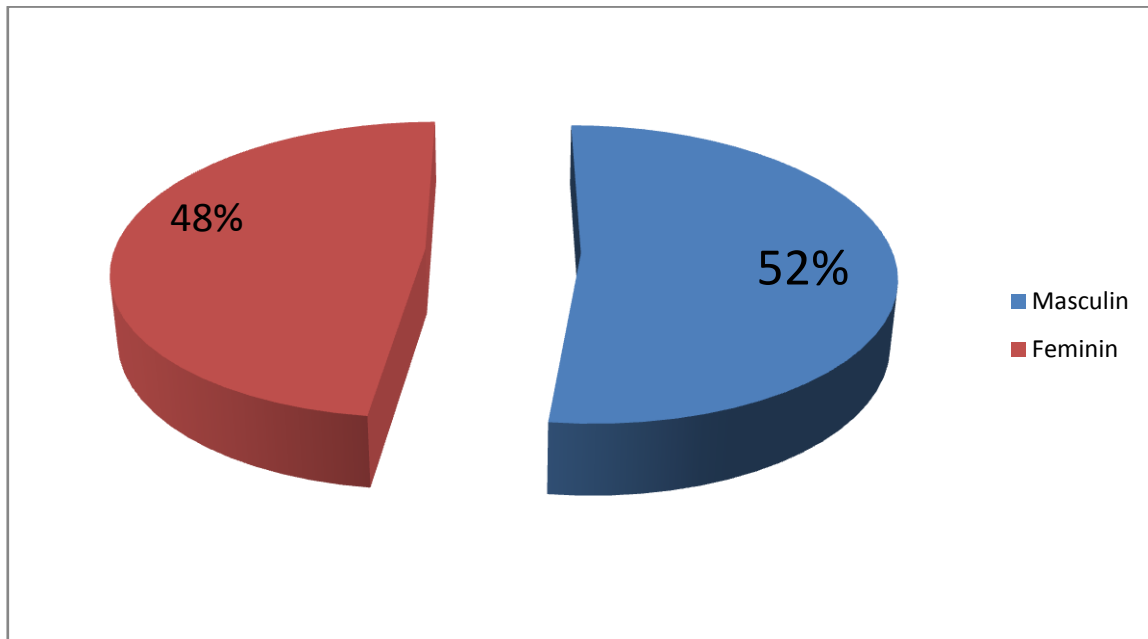


Fig. 5 : Répartition des malades selon le sexe

La tranche d'âge la plus retrouvée est située entre 50 à 69ans

Avec des extrêmes d'âge de 32ans et 79 ans et un âge moyen de 59ans.

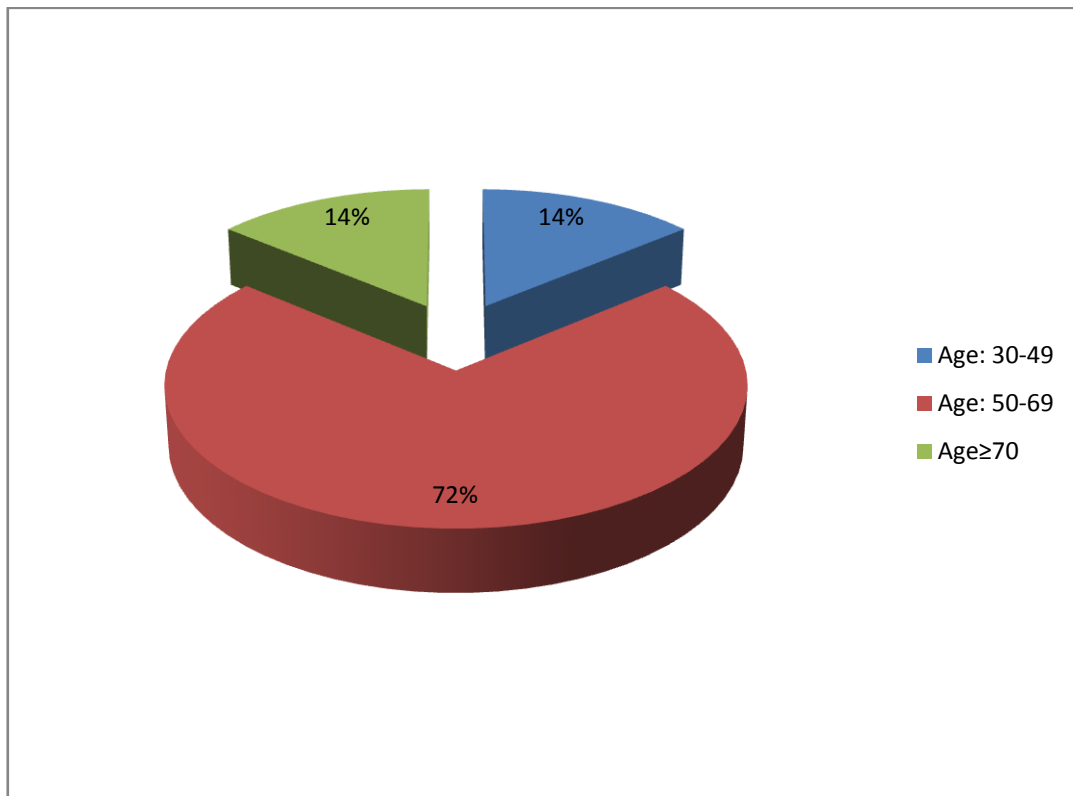


Fig 6 : Répartition selon l'âge

2. Les facteurs de risques cardiovasculaires :

Dans notre étude l'âge et l'HTA viennent à la tête des facteurs de risque retrouvés présents respectivement chez 52% et 44 % des malades. 32% de nos patients sont diabétiques et le tabac est présent chez 28% des cas l'hypercholestérolémie est retrouvée chez 12% des cas. (fig7)

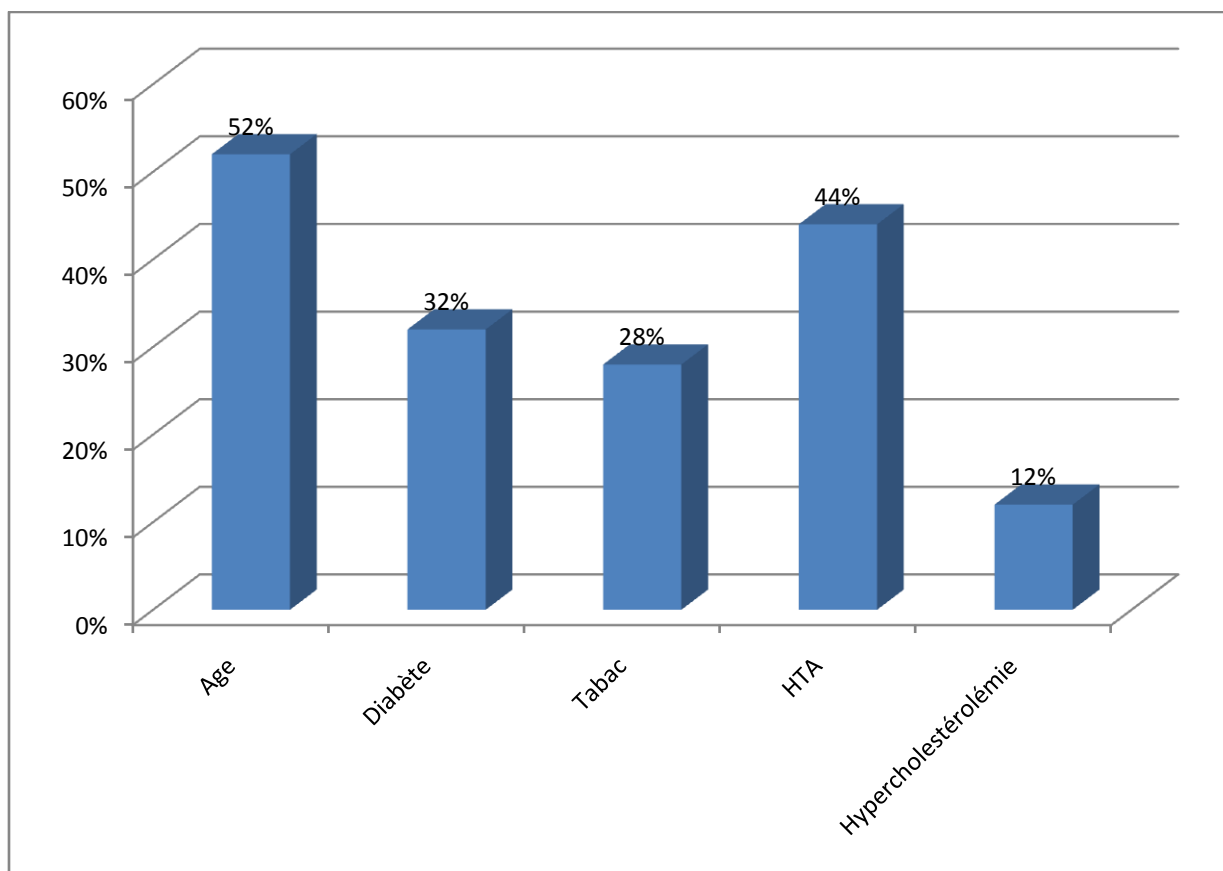


Fig 7 : La fréquence des Facteurs du risque cardiovasculaire.

L'obésité définie comme l'un des facteurs prédisposant à une Résistance au clopidogrel est présente chez 22 % seulement des patients et représentée par l'IMC. (fig8)

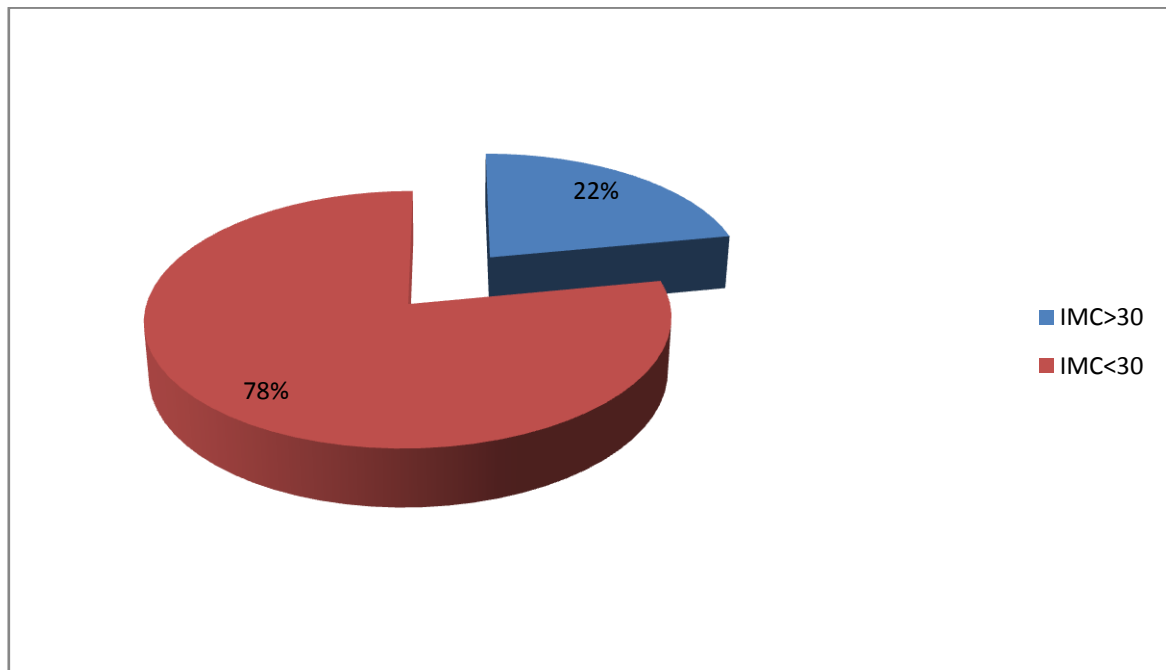


Fig8 : la prévalence de l'obésité

B. Indication du clopidogrel :

58 % des patients ont reçu le clopidogrel dans le cadre du traitement d'un SCA ST- chez 28 % des patients l'indication était un SCA ST+ non revascularisé en tant que traitement conventionnel, l'indication chez 14 % était un angor stable (fig9).

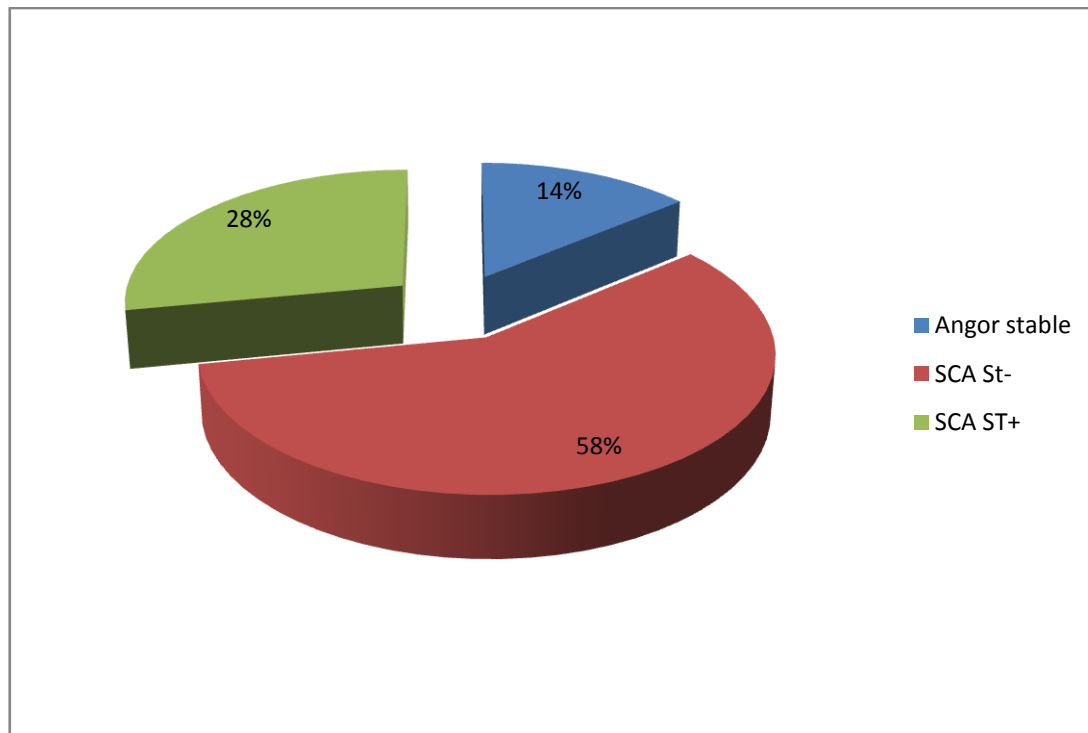


Fig9 :L'indication du clopidogrel

C. Prise médicamenteuse concomitante :

ASPIRINE	IEC	ARA II	BB	IC	STATINE	IPP
50	22	5	22	4	50	24

Tous les patients sont sous aspirine et statine, 22 patient ont reçu un IEC , 5 un ARAII,22 sont mis sous BB, 4 sous IC et 24 patients sous IPP

Le clopidogrel a été arrêté au moins un mois avant le recrutement des patients qui ont été déjà traité par ce dernier.

D. Bilan biologique

La majorité des patients (92 %) ont une Clairance de créatinine Supérieur à 50 (fig 10)

Tous les patients ont un taux de fibrinogène supérieur à 1 g/l.

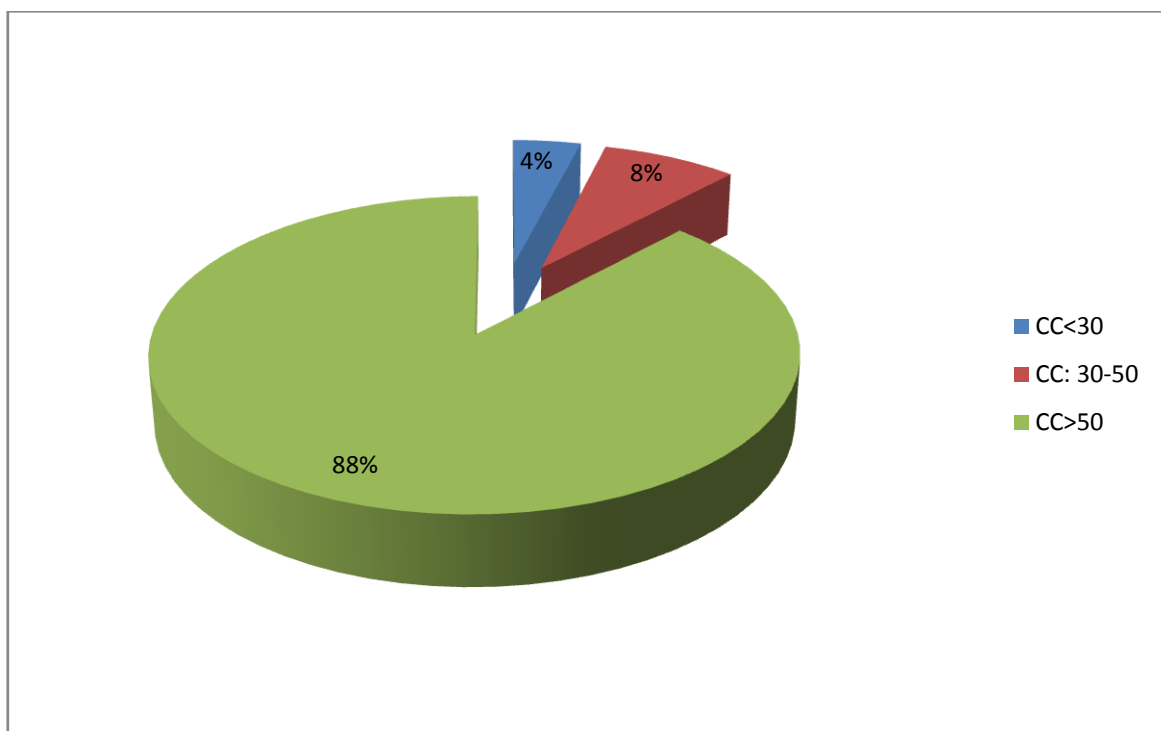


Fig10 : disposition selon la clearance de la créatinine

E. Résultats de l'évaluation de la réponse plaquettaire par le « verify Now »

Les résultats exprimés en PRU et en pourcentage d'inhibition des patients sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Bon répondeurs au Clopidogrel GT	Mauvais répondeurs au clopidogrel GT et Bon répondeurs au Plavix	Mauvais répondeurs (Plavix et Clopidogrel GT)
22	23	5
44%	46%	10%

Tableau d'évaluation de la réponse anti plaquettaire par le Verify Now

Dans notre travail, 44 % des patients ont répondu au Clopidogrel GT. 46 % des malades n'ont pas répondu au générique alors qu'ils avaient une réponse favorable sous Plavix. 5 % des patients n'ont répondu à aucune forme du clopidogrel ce qui constitue une vraie population de résistance naturelle au clopidogrel.

Notre Etude en BREF...

Sur les 50 patients inclus dans l'étude :

- 52 % sont de sexe masculin.
- L'âge moyen est de 59ans avec des extrêmes d'âge allant de 32 à 79ans
- l'âge et l'HTA sont les facteurs de risque les plus retrouvées chez respectivement 53% et 45% des cas suivis du diabète et du tabagisme.
- Seulement 22% des patients sont obèses avec un IMC supérieur à 30
- Le Clopidogrel est prescrit principalement pour un SCA ST- chez 58%, chez 14% des malades pour Angor stable, et chez 28% des cas comme traitement conventionnel des SCA ST+ non revascularisé.
- Tous les patients ont été mis sous aspirine et statine.

L'évaluation de la réponse aux anti plaquettaire a été effectuée par le dispositif Verify Now qui a mis en évidence :

- 44 % des patients ont répondu au Clopidogrel GT (le générique)
- 46 % des malades n'ont pas répondu au générique alors qu'ils avaient une réponse favorable sous Plavix.
- 5 % des patients n'ont répondu à aucune forme du clopidogrel ce qui constitue une vraie population de résistance naturelle au clopidogrel.

DISCUSSION

Maladie Coronarienne :

La maladie coronarienne est une cause de mortalité importante dans le monde occidental. Aux États-Unis par exemple, elle explique la moitié des décès de cause cardiaque et représente la 5ème cause de mortalité de toute cause [1] 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

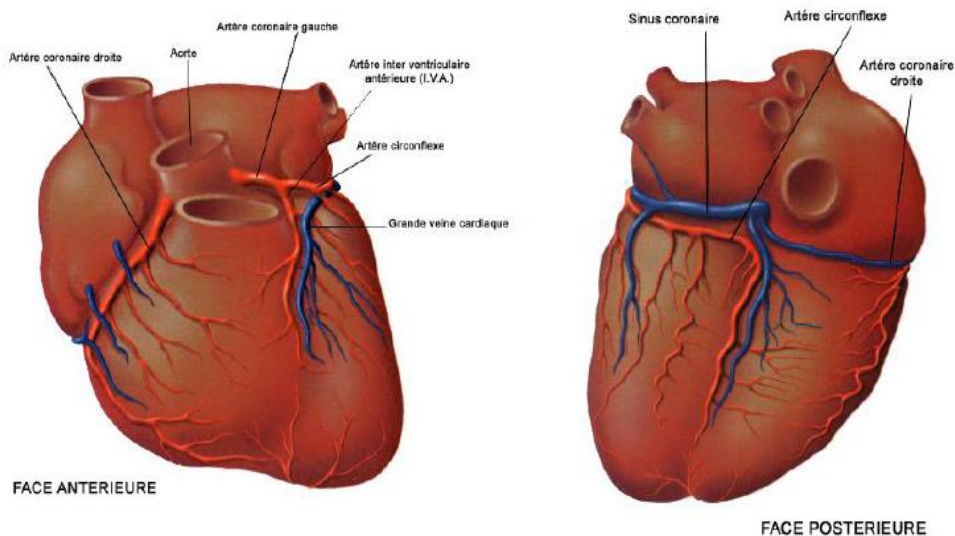
installations de défibrillateurs implantables et 197 000 installations de stimulateurs cardiaques [1]

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 [2] 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[3],[4] 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.[5],[6]

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 11). 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.[7]

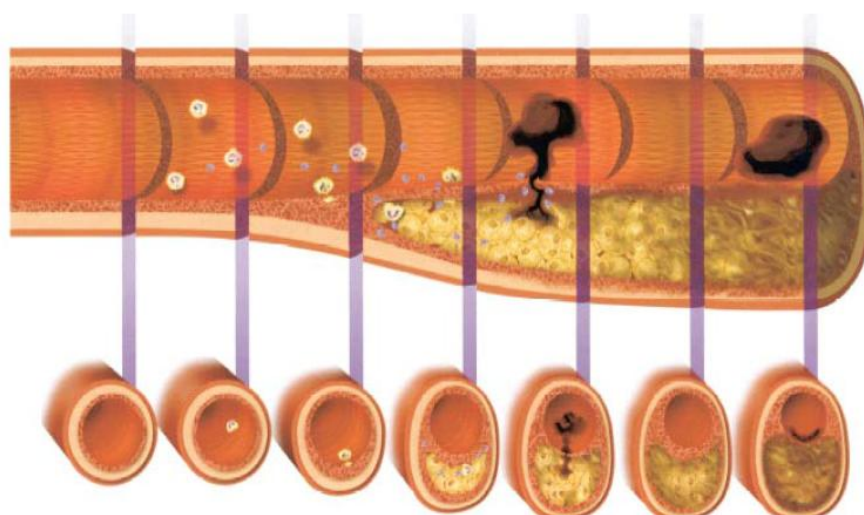


Tiré de : Anatomie de la vascularisation cardiaque. Médecine et santé.
<http://www.medecine-et-sante.com/anatomie/coeurvasc.html> [Accédé le 20 octobre 2009]. Copyright © 1999-2008 SevenMice SARL

Fig 11 : Vascularisation du cœur

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 12).[7] 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 [7]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 12). 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.[7]



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.

Fig12 : la progression de l'athérosclérose avec formation du thrombus

La prévention d'événements ischémiques aigus chez des patients souffrant de maladie coronarienne demeure un défi de taille.

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.

Rôle de la plaquette dans l'hémostase primaire

L'hémostase est définie comme l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux. On distingue classiquement trois temps :

1. l'hémostase primaire ferme la brèche vasculaire par un "thrombus blanc" (clou plaquettaire).
2. la coagulation consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges (thrombus rouge).
3. la fibrinolyse, permet la destruction des caillots, ou la limitation de leur extension.

L'hémostase primaire fait intervenir des éléments cellulaires : cellules endothéliales et plaquettes ainsi que des éléments plasmatiques : facteur Von Willebrand et fibrinogène (Figure 13).

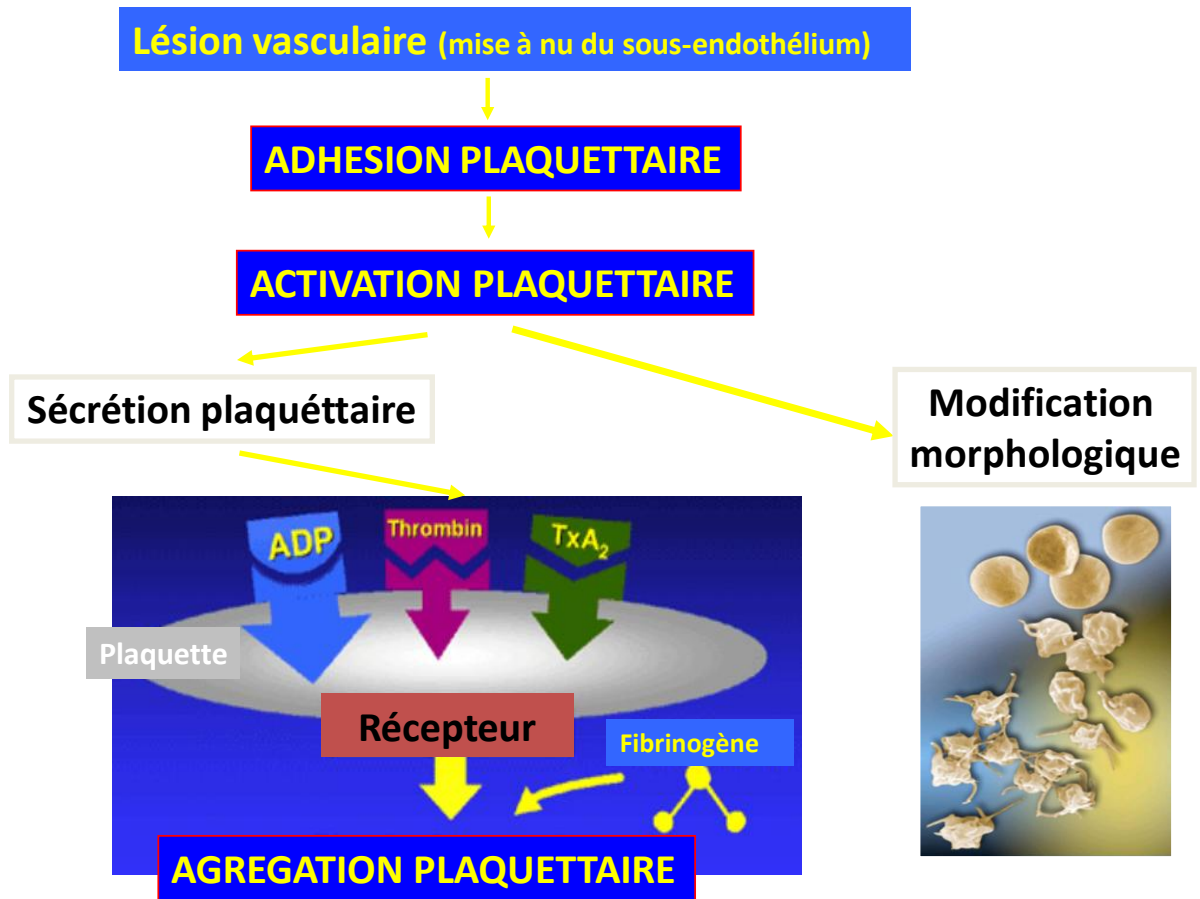


Figure 13 : les étapes de l'hémostase primaire

Les plaquettes sont les plus petits éléments figurés du sang. Elles naissent dans la moelle osseuse (lignée mégacaryocytaire) par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes à travers les sinus médullaires. Leur durée de vie est courte 4 à 8 jours. Cette durée se raccourcit dès qu'il y a activation de l'hémostase [8].

A l'intérieur des plaquettes on trouve, dans le cytoplasme, deux réseaux de canaux :

- le système canaliculaire ouvert, permettant une communication rapide entre des éléments extra cellulaires et l'intérieur des plaquettes

- le système tubulaire dense, lieu de stockage du calcium.
- Dans le cytoplasme on reconnaît également des granulations de trois types :
- Les granules denses (ATP, ADP, sérotonine et calcium).
- Les granules alpha (facteur 4 plaquettaire, beta thromboglobuline, facteur Willebrand).
- Les grains lysosomiaux (hydrolases, phosphatases).

Les plaquettes dès leur sortie du vaisseau adhèrent à la structure sous endothéliale mise à nu par la brèche vasculaire. L'adhésion se produit en grande partie par la GP Ib qui se colle au sous endothélium grâce au facteur Willebrand. C'est la phase d'adhésion plaquettaire (figure 14).

Adhésion plaquettaire

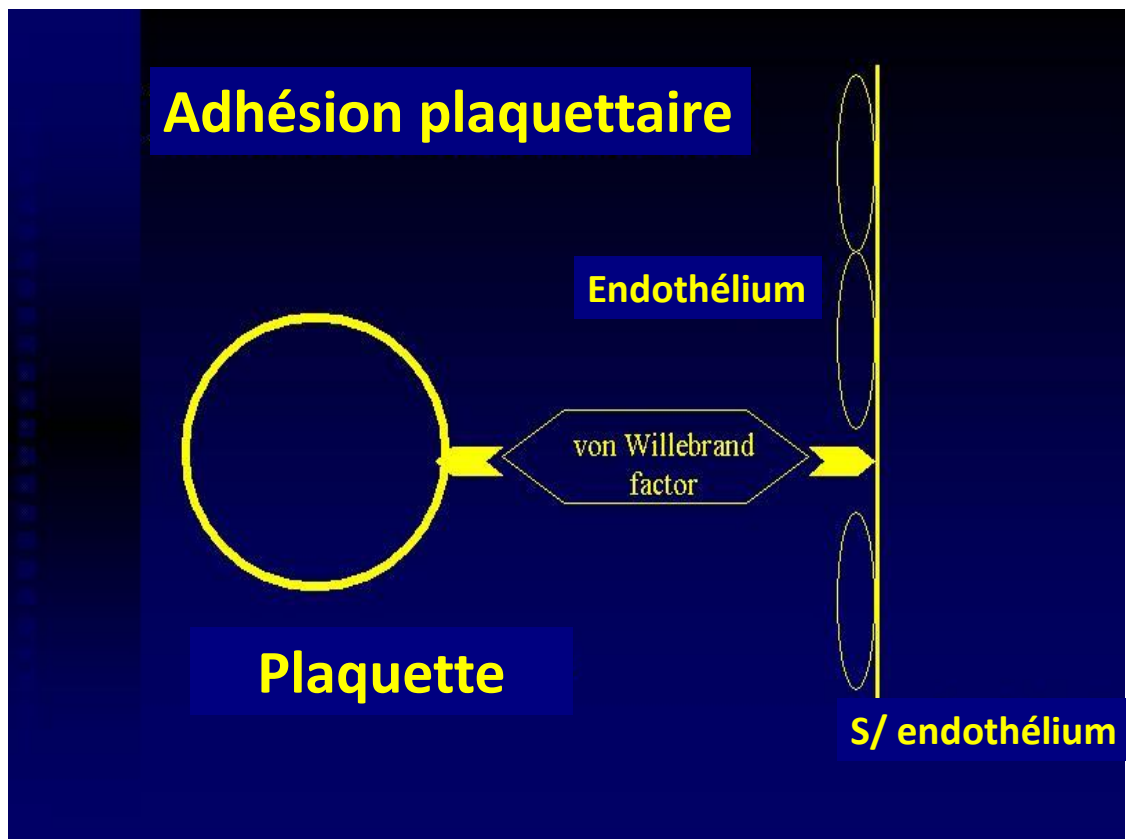
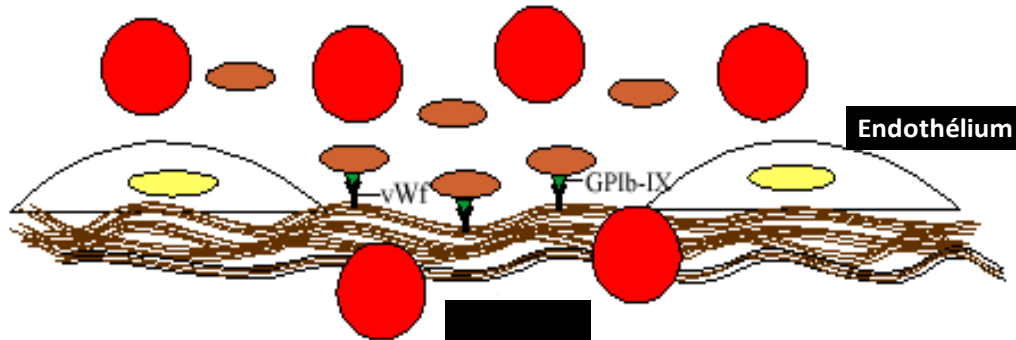


Figure 14 : l'adhésion plaquettaire

Les plaquettes adhérentes s'activent et recrutent d'autres plaquettes circulantes, c'est la phase d'activation plaquettaire. Sur la première couche de plaquettes se fixent d'autres plaquettes (figure 15).

Activation et agrégation plaquettaire

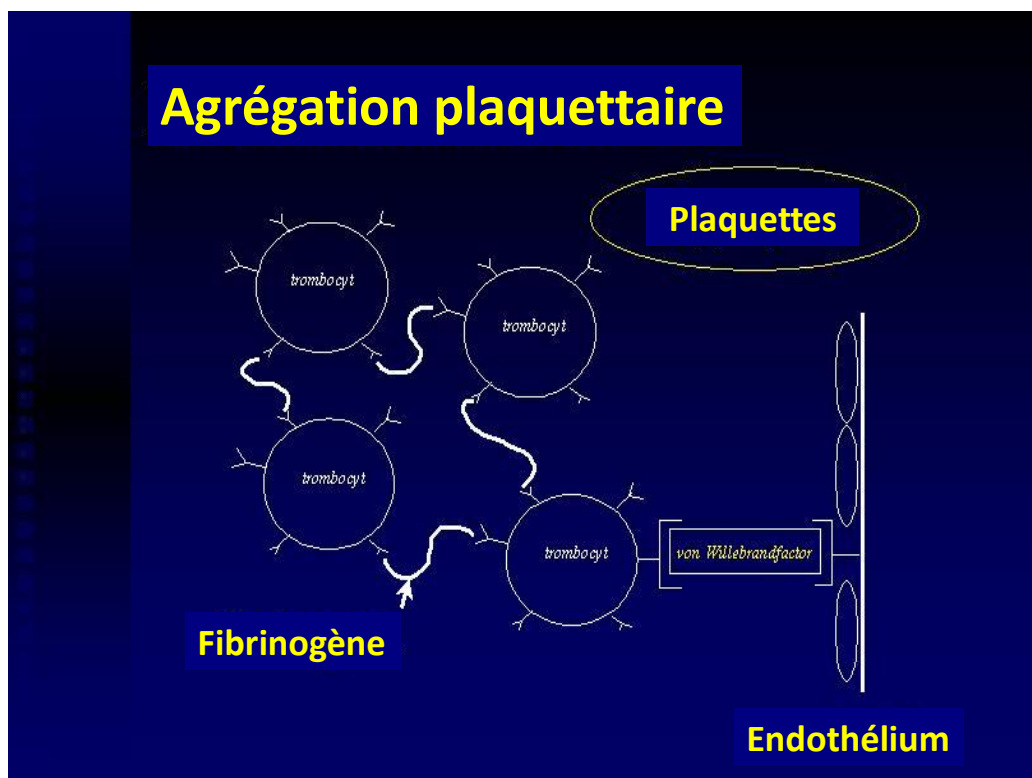
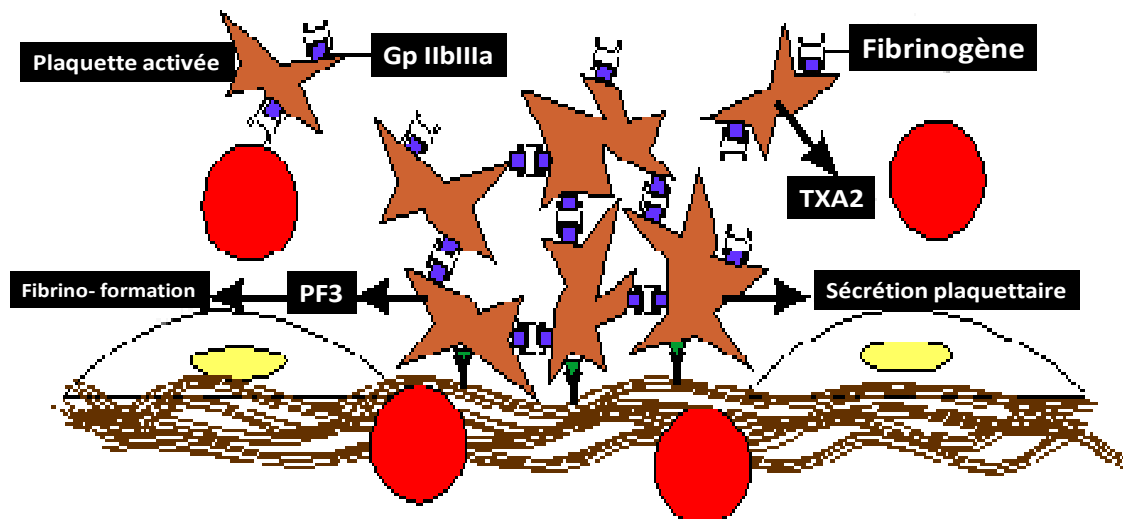


Figure 15 : l'activation et l'agrégation plaquettaire

Les GP IIb/IIIa de surface, lors de l'activation plaquettaire subissent une modification conformationnelle qui leur permet de fixer le fibrinogène en présence de calcium. L'agrégation plaquettaire se fait ainsi grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes, créant un premier thrombus fragile (agrégation réversible). Grâce à la libération des enzymes et du contenu granulaire des plaquettes, le caillot se solidifie (agrégation irréversible) constituant le thrombus blanc ou clou plaquettaire [9].

Les récepteurs purinergiques à l'ADP :

Les plaquettes comportent un grand nombre de récepteurs glycoprotéiques à leur surface. Ces récepteurs sont impliqués dans des mécanismes d'activation, d'inhibition, d'adhésion ou d'agrégation plaquettaire. Plus de 40 récepteurs ont ainsi été identifiés à la surface des plaquettes. Parmi les plus récemment identifiés se trouvent les récepteurs purinergiques à l'ADP.

L'ADP (adénosine di-phosphate) est l'un des activateurs plaquettaires les plus puissants connus. Il s'agit d'un nucléotide libéré par les granules denses des plaquettes en réponse à une activation plaquettaire par la thrombine ou le collagène, ainsi que par les cellules endothéliales endommagées au site de lésion vasculaire. Il s'agit d'une molécule associant une base purique (adénine), un sucre (ribose) et deux groupements phosphates ($C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$; 427,2 g/mol) (figure 16).

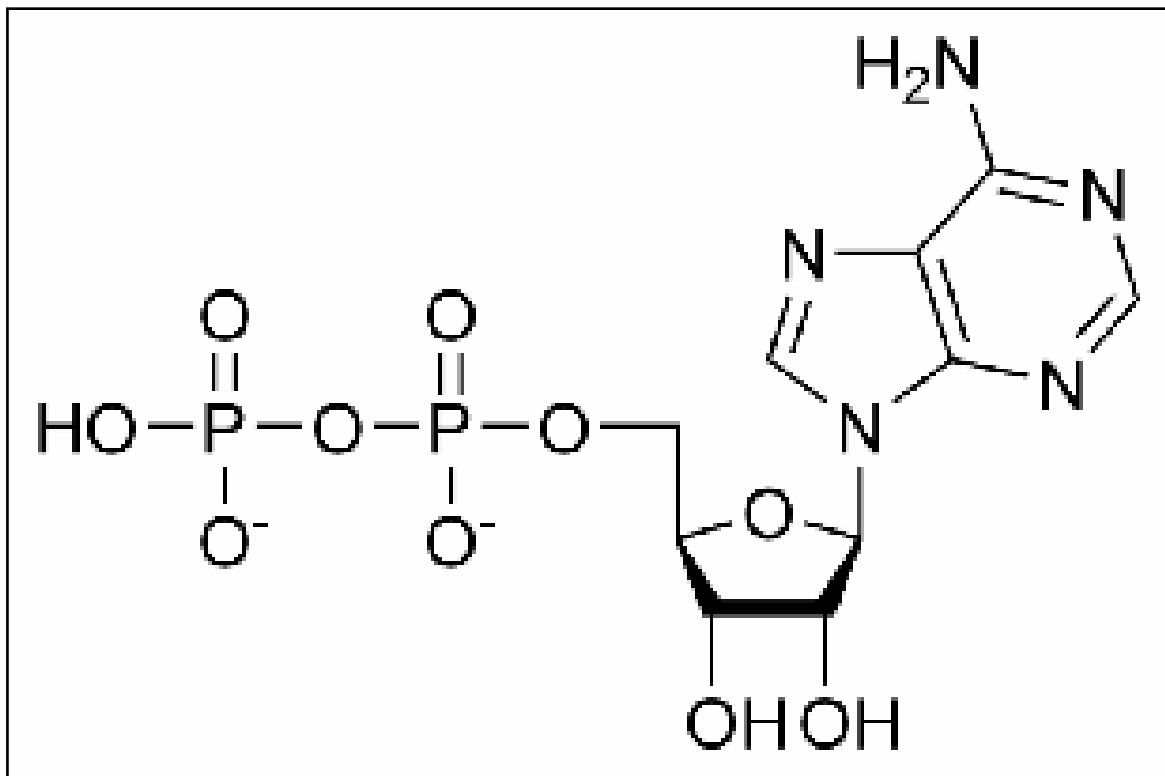


Figure 16: Structure chimique de l'ADP.

L'activation des plaquettes par l'ADP est médiée par les récepteurs purinergiques de type P2 [10].

Cette famille de récepteurs est composée de deux groupes :

- Le récepteur P2X1, couplé à un canal ionique : qui est un récepteur ionotrope de type canal calcique. Il est également présent sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Il est responsable de l'entrée rapide du calcium extracellulaire dans les plaquettes initiant un changement de forme plaquettaire lors de son activation.
- Les récepteurs P2Y1 et P2Y12, couplés aux protéines G :

Le récepteur P2Y1 est couplé par l'intermédiaire de la protéine Gq à la phospholipase C (PLC). Lors de l'activation du récepteur par l'ADP, la PLC

permet la mobilisation du calcium à partir des sites de stockage intracellulaire. Il en résulte un changement de la morphologie de la plaquette associée à une réorganisation des récepteurs GPIIb/IIIa en surface, entraînant l'initiation de l'agrégation plaquettaire. Cette action est transitoire et réversible.

Le récepteur P2Y₁₂ quant à lui, est couplé négativement à l'adényl-cyclase par l'intermédiaire d'une protéine Gi [11] .

La stimulation de ce récepteur par l'ADP inhibe la formation d'AMP cyclique (AMPc) par cette enzyme, avec pour conséquence l'amplification du processus agrégatoire , la stabilisation irréversible les agrégats et la stimulation de l'excrétion du contenu des granules. Ce récepteur est spécifiquement inhibé par les thiénoypyridines telles que le clopidogrel [12].

Le clopidogrel

A. Propriétés pharmacologiques :

1. Propriétés pharmacocinétiques

Le clopidogrel ou Hydrogénosulfate de clopidogrel est un antiagrégant plaquettaire oral de la classe des thiénopyridines. Il inhibe la coagulation sanguine par une inhibition irréversible de la liaison de l'adénosine-5'-diphosphate (ADP) au récepteur plaquettaire purinergique P2Y₁₂, ce qui entraîne une inhibition non compétitive de l'effet thrombogène de l'ADP [13].

Le clopidogrel est une pro-drogue qui doit être activé en métabolite actif par des iso enzymes hépatiques et intestinales du cytochrome P450 (CYP), notamment CYP3A4 et CYP2C19 [14, 15, 16] .

La figure 17 résume le mode d'action du clopidogrel :

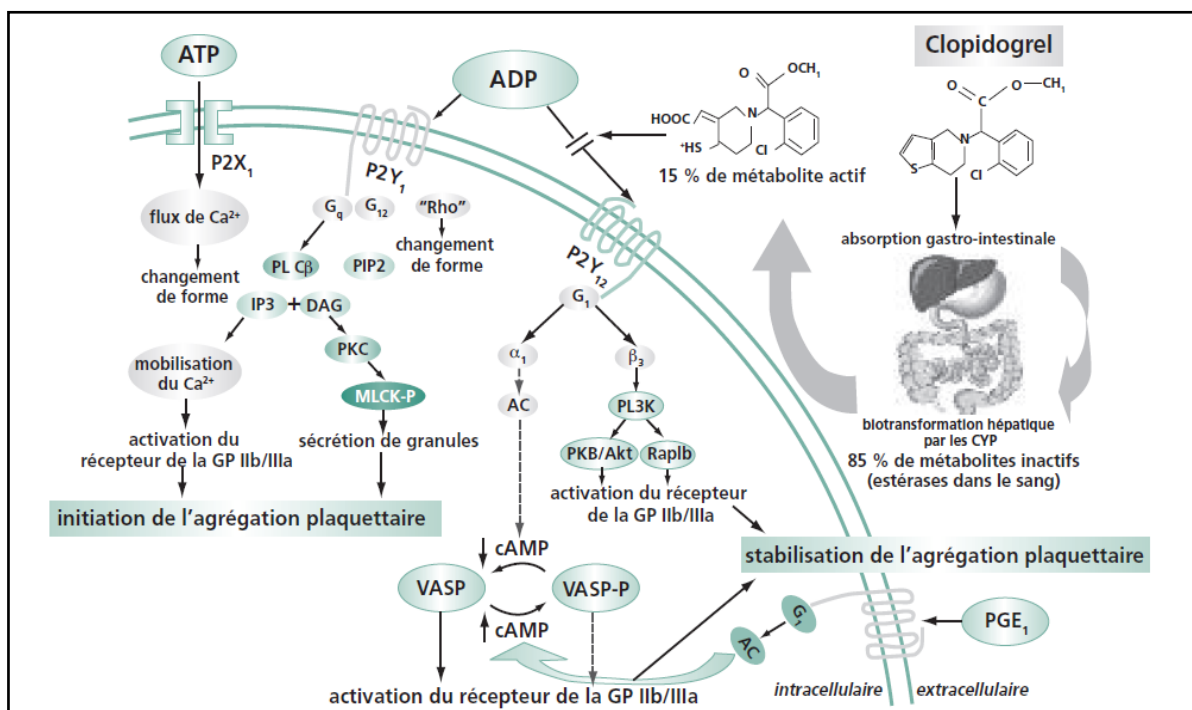


Figure 17: Mode d'action du clopidogrel .

Des voies métaboliques concurrentes majeures (estérases) dégradent rapidement environ 90% du clopidogrel en métabolite acide carboxylique inactif, tandis que le métabolite actif, qui présente une demi-vie très courte, peut former des ponts disulfures stables avec les deux cystéines libres dans les domaines extracellulaires du récepteur plaquettaire P2Y₁₂ [17, 18]

La figure 18 schématise la voie conduisant à la formation du métabolite actif :

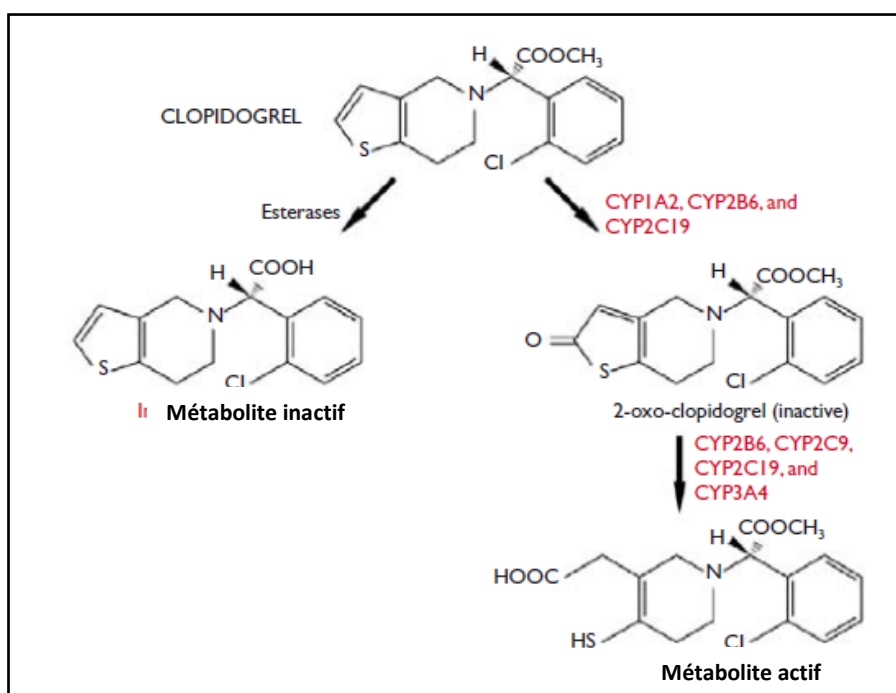


Figure 18: Voie métabolique du clopidogrel conduisant à la formation du métabolite pharmacologiquement actif .

2. Propriétés pharmacodynamiques

La liaison de l'ADP est nécessaire pour l'activation du récepteur du complexe glycoprotéine (GP) IIb/IIIa, qui est le site de liaison du fibrinogène. Le fibrinogène assure la liaison des plaquettes entre elles afin de former l'agrégat plaquettaire. Par conséquent, le clopidogrel inhibe irréversiblement l'activation du récepteur du complexe GP IIb/ IIIa, la liaison du fibrinogène à ce récepteur, et par conséquent l'agrégation plaquettaire [19, 20].

Les plaquettes exposées au clopidogrel sont inhibées pour toute leur durée de vie et le retour à une fonction plaquettaire normale dépend donc du renouvellement des plaquettes. A l'état d'équilibre, le taux moyen d'inhibition associé à une dose journalière de 75 mg se situe entre 40 et 60%.

B. Le clopidogrel dans les syndromes coronaires aigus :

Le clopidogrel a été mis sur le marché en 1997 suite aux conclusions de l'étude CAPRIE. Cette étude portant sur près de 20000 patients a comparé les effets du clopidogrel versus l'aspirine dans la prévention secondaire des récurrences athérombotiques chez des patients ayant présenté un infarctus du myocarde (IDM), un AVC ou présentant les signes d'une artérite des membres inférieurs. Le clopidogrel s'est ainsi montré au moins aussi efficace que l'aspirine en réduisant significativement le taux d'événements cardiovasculaires majeurs tels que décès d'origine vasculaire, IDM, AVC ou hospitalisation pour événements ischémiques [21].

Par ailleurs, Il n'existe pas d'essai randomisé comparant le clopidogrel à l'aspirine dans le syndrome coronaire aigu. Le premier essai à comparer l'association aspirine + clopidogrel et l'aspirine seule est l'étude CURE. Les résultats de l'étude sont en faveur d'une positivité sur le critère principal, avec surtout une efficacité sur la réduction du nombre d'IDM [22].

Une sous-étude de la précédente (PCI-CURE), chez les patients de CURE bénéficiant d'une angioplastie (n=2658), a testé à la fois l'intérêt de la dose de charge de clopidogrel, et l'intérêt de la poursuite de la bithérapie antiplaquettaire pendant un an.

Les principaux résultats sont nettement en faveur de l'association prolongée de l'aspirine et du clopidogrel, ainsi que de la dose de charge de clopidogrel avant angioplastie, en cas de d'IDM.

Après angioplastie, l'ajout d'une thiénopyridine à l'aspirine a permis de progresser dans la diminution du taux de thrombose de stent . Le premier essai à démontrer l'efficacité du clopidogrel après pose de stent dans l'angor stable dans CREDO (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation). Il concerne des patients stables bénéficiant d'une angioplastie recevant du clopidogrel en prétraitement (dose de charge de 300mg) suivi d'aspirine.

L'efficacité de l'association dans l'angioplastie après un angor instable, a été établie dans CURE [22] (Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Ischemic Events). En effet, pour les patients de CURE bénéficiant d'une angioplastie (20% de l'effectif total), dans le groupe clopidogrel, il est

constaté une diminution de 30% du risque relatif de survenue de décès cardiovasculaires, d'IDM ou de revascularisation en urgence de la lésion cible à 28 jours, alors que la diminution du risque relatif de survenue de décès cardio-vasculaire ou d'IDM à un an est de 31% [23] . Dans l'IDM, l'efficacité de la bithérapie antiplaquettaire (aspirine+clopidogrel) a été montré à la fois dans COMMIT-CCS2 (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial / Second Chinese Cardiac Study) et dans CLARITY-TIMI (Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) [24, 25].

L'étude CLARITY a l'avantage d'avoir eu une analyse pré-spécifiée de 1863 patients évaluant l'impact de la dose de charge en prétraitement contre une dose faite au moment de l'angioplastie, avec un net bénéfice pour la première option, puisque le critère composite décès CV/IDM/AVC à 30 jours est diminué avec un risque relatif de 41%. La grande faiblesse de cette étude est l'arrêt du suivi au 30ème jour.

Après un pontage aorto-coronaire, la prescription de l'association aspirine (75-160 mg/j) + clopidogrel 75 mg/j pendant un an est recommandée après un pontage coronaire en cas d'infarctus.

La prescription de clopidogrel 75 mg/j au long cours en monothérapie est recommandée après pontage coronaire en cas d'infarctus en alternative à l'aspirine.

En résumé [26] :

- Au cours d'un SCA ST -, le clopidogrel est donné en association avec l'aspirine, avec une dose de charge de 600 mg puis 75 mg/j.
- Au cours d'un SCA ST +, le clopidogrel est donné en association avec l'aspirine, la dose de charge étant de 600 mg en cas d'angioplastie primaire et de 300 mg en cas de fibrinolyse associée (sauf chez les sujets de plus 75 ans où la dose de charge n'est pas recommandée).
- Au décours d'un SCA, l'association aspirine plus clopidogrel (75mg/) est recommandée pour une durée de 1 an.
- Quand un patient se présente pour un SCA et est déjà traité par 75 mg de clopidogrel, il est souhaitable de refaire une dose charge (conformément aux recommandations précédentes) .

Dans notre étude, le clopidogrel a été indiqué pour un syndrome coronaire aigu sans sus décalage de ST chez deux patients et pour un infarctus du myocarde chez cinq patients.

C. Variabilité de la réponse au clopidogrel :

L'efficacité du clopidogrel a largement été démontrée pour traiter les complications artérielles de l'athérosclérose. Cependant un nombre non négligeable de patients récidive sous ce traitement. Plusieurs études cliniques démontrent une large variabilité de la réponse plaquettaire, avec une augmentation du risque d'événements thrombotiques en cas de réponse insuffisante, ainsi qu'une aggravation des risques d'hémorragie chez les

patients hyper-répondeurs. A partir de ces observations cliniques, le concept de « résistance biologique » au clopidogrel a été proposé [27, 28].

Une étude a porté sur la capacité différentielle de réponse plaquettaire chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires [29].

Serebruany et coll. ont démontré que la réponse à l'hydrogénosulfate de clopidogrel de 544 patients présentait une distribution normale, avec un changement moyen de l'agrégation plaquettaire de 41,9% pour l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par rapport à la situation initiale, lorsque l'agrégation a été induite par une dose d'ADP de 5 $\mu\text{mol/l}$. Une réponse insuffisante et une réponse excessive, respectivement définies de façon arbitraire par une différence inférieure et supérieure de deux écarts types par rapport à la moyenne, ont été observées respectivement chez 4,2% et 4,8% des patients (figure 19).

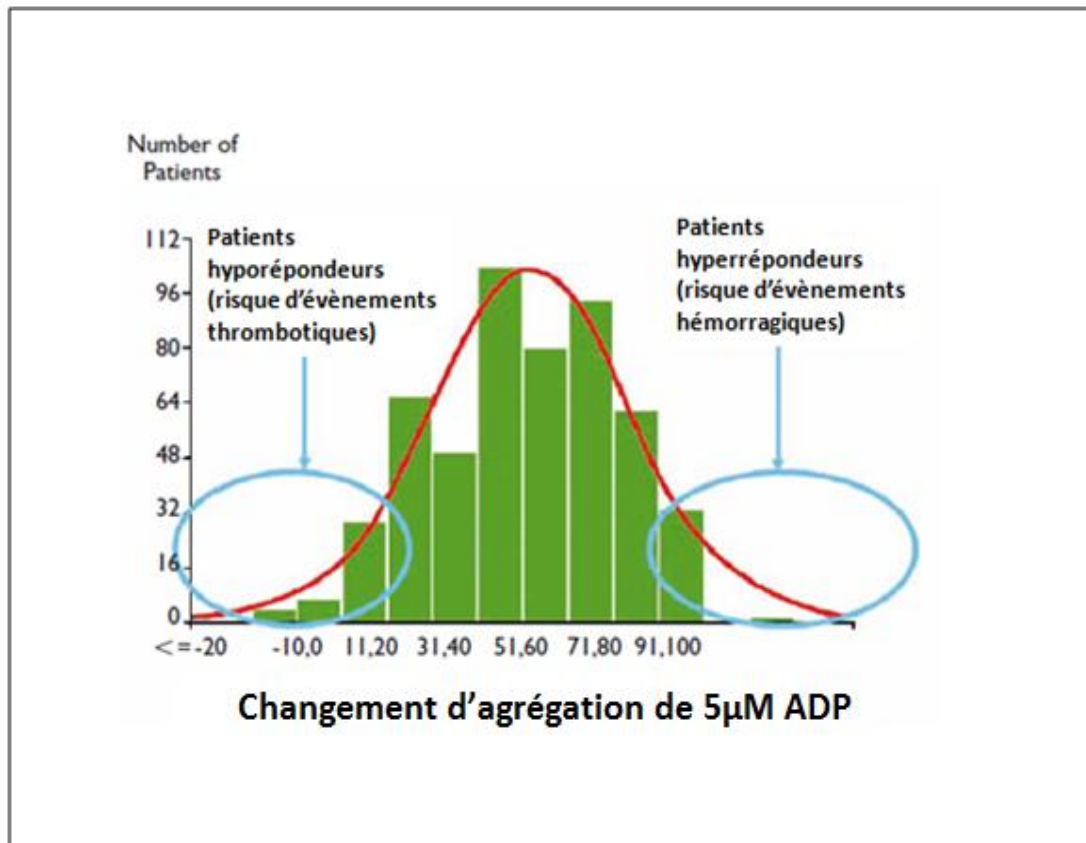


Figure 19 : Distribution de l'agrégation plaquettaire induite chez les patients traités par le clopidogrel [29].

Les raisons pouvant expliquer cette variabilité interindividuelle sont les suivantes : variation de l'absorption, du métabolisme, sensibilité des récepteurs, surcharge pondérale, réactivité plaquettaire, mais également non-observance du traitement.

Le facteur génétique joue un rôle très important dans cette variabilité par le biais du phénomène de polymorphisme génétique du système des CYP 450 qui est impliqué dans son activation métabolique, et en particulier celui du CYP 450 2 C19.

Les patients traités avec du clopidogrel et qui présentent un allèle associé à une perte de fonction du 2 C19 semblent avoir à la fois une agrégabilité plaquettaire moins inhibée et une fréquence plus importante d'événements cardiovasculaires [30].

Les mécanismes proposés entraînant une variabilité de la réponse individuelle au clopidogrel est résumé dans la figure 20 :

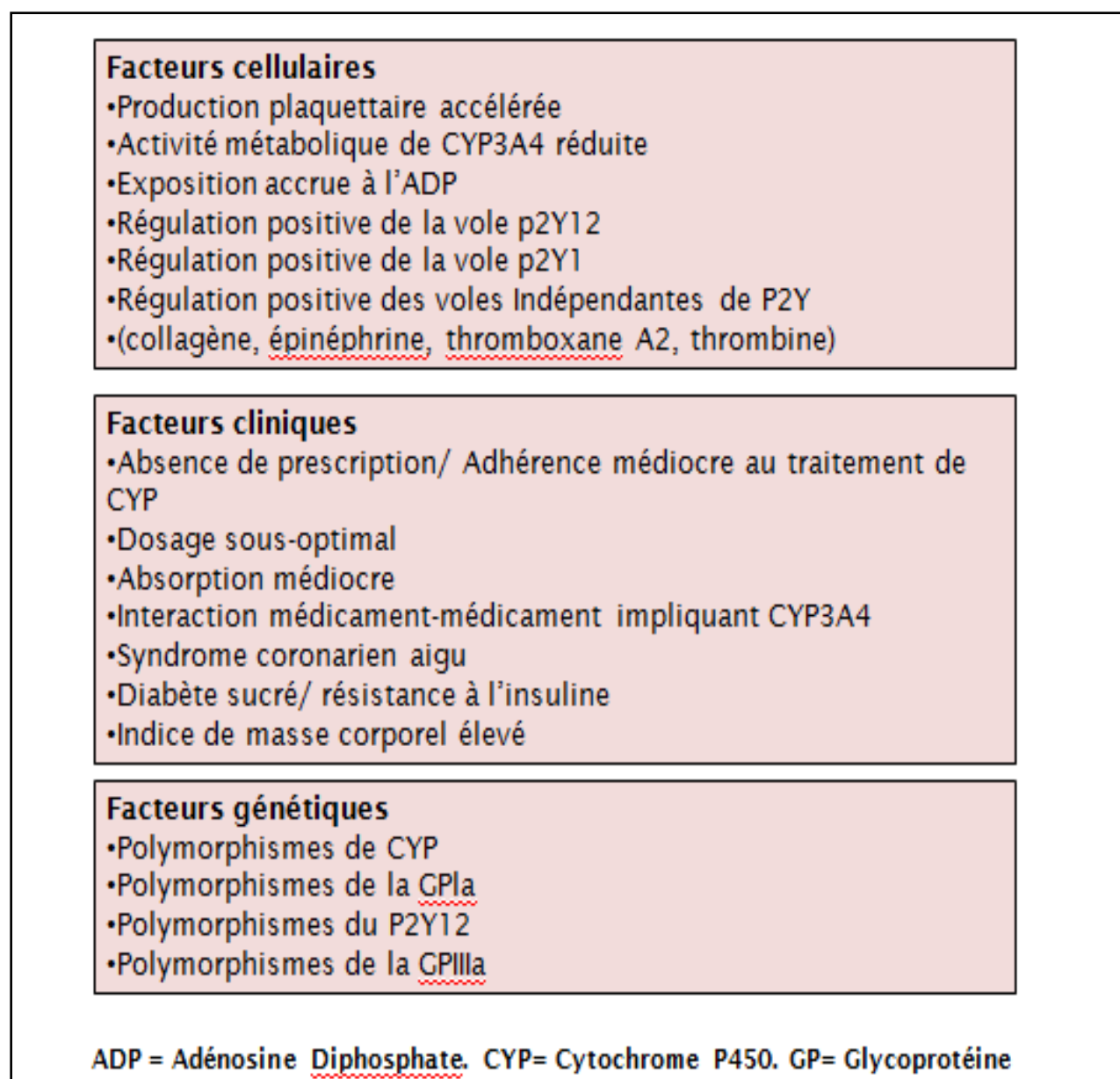


Figure 20 : Les mécanismes proposés entraînant une variabilité de la réponse individuelle au clopidogrel [31]

Le Verify-Now

1. Description de l'automate :

Le système « Verify Now » est un système de détection optique basé sur la turbidimétrie qui mesure l'agrégation induite par les plaquettes. Le système se compose d'un instrument, d'un dispositif de dosage jetable et de matériels destinés au contrôle de la qualité. Les mesures de contrôle de la qualité comprennent un contrôle de la qualité électronique (EQC) de l'instrument, des contrôles de qualité humide (WQC) à deux concentrations différentes, des contrôles de qualité internes et des contrôles d'expédition. L'instrument gère l'ensemble de la séquence de dosage, la température, le mélange réactif-échantillon et exécute des auto- diagnostics. A la fin du test, le degré de la fonction plaquettaire est déterminé et le résultat est affiché.

Le dispositif contient une préparation lyophilisée de billes revêtues de fibrinogène humain, un agoniste des plaquettes, et un tampon. L'échantillon de sang entier du patient est automatiquement distribué depuis le tube de prélèvement sanguin vers le dispositif de dosage par l'instrument, évitant ainsi toute manipulation de l'échantillon de sang par l'utilisateur.

2. Principe :

Le test « Verify Now » P2Y12 est conçu pour mesurer le blocage du récepteur P2Y12 des plaquettes par une thiénopyridine notamment le clopidogrel et le prasugrel. Le test est basé sur la capacité des plaquettes activées de lier le fibrinogène. Des microparticules revêtues de fibrinogène s'agrègent dans le sang entier en proportion du nombre de récepteurs GP IIb/IIIa plaquettaires exprimés. La vitesse d'agrégation des microbilles est plus rapide et plus reproductible si les plaquettes sont activées ; c'est pourquoi le réactif adénosine-5-diphosphate (ADP/PGE1) est incorporé dans le canal de dosage afin d'induire l'activation des plaquettes tout en excluant la formation de fibrine. Le réactif est formulé de manière à mesurer spécifiquement l'agrégation plaquettaire médiée par le récepteur P2Y12. La transmittance de la lumière augmente lorsque les plaquettes activées lient les billes revêtues de fibrinogène et s'agrègent. L'instrument mesure les changements du signal optique et exprime les résultats en Unités de Réaction au P2Y12 (PRU).

D'une manière similaire, deux autres activateurs, l'iso-TRAP (peptide activant le récepteur de la thrombine) avec le PAR4-AP (peptide activant le PAR4) et des microparticules revêtues de fibrinogène sont incorporées dans un deuxième canal du dispositif de dosage. L'instrument mesure le changement de transmittance de la lumière dans ce canal, calcule la fonction plaquettaire basale de l'échantillon, et affiche le résultat en terme de pourcentage d'inhibition pour l'échantillon.

3. Résultats rapportés :

Le test Verify Now P2Y12 donne deux résultats pour chaque test :

- Les Unités de Réaction P2Y12 (PRU) expriment la quantité d'agrégation médiée par le récepteur P2Y12 spécifique des plaquettes et sont calculées en fonction de la vitesse et de l'étendue de l'agrégation plaquettaire dans le canal ADP.
- Le pourcentage d'inhibition (%) qui est le pourcentage de variation par rapport à l'agrégation basale [32].

Dans notre étude, tous les malades testés par la molécule mère (Plavix®) se sont avérés de bons répondeurs au médicament sur les critères retenus et ceux qui n'ont pas répondu au clopidogrel générique ont par ailleurs bien répondu au clopidogrel Plavix.

La figure 21 schématise le déroulement de la phase d'agrégation dans les puits de mesure :

- A. Quand l'agrégation est importante, la transmittance de lumière est supérieure à la valeur seuil et donc le traitement est inefficace.
- B. Quand l'agrégation est minime, la transmittance de lumière est inférieure à la valeur seuil et donc le traitement est efficace.

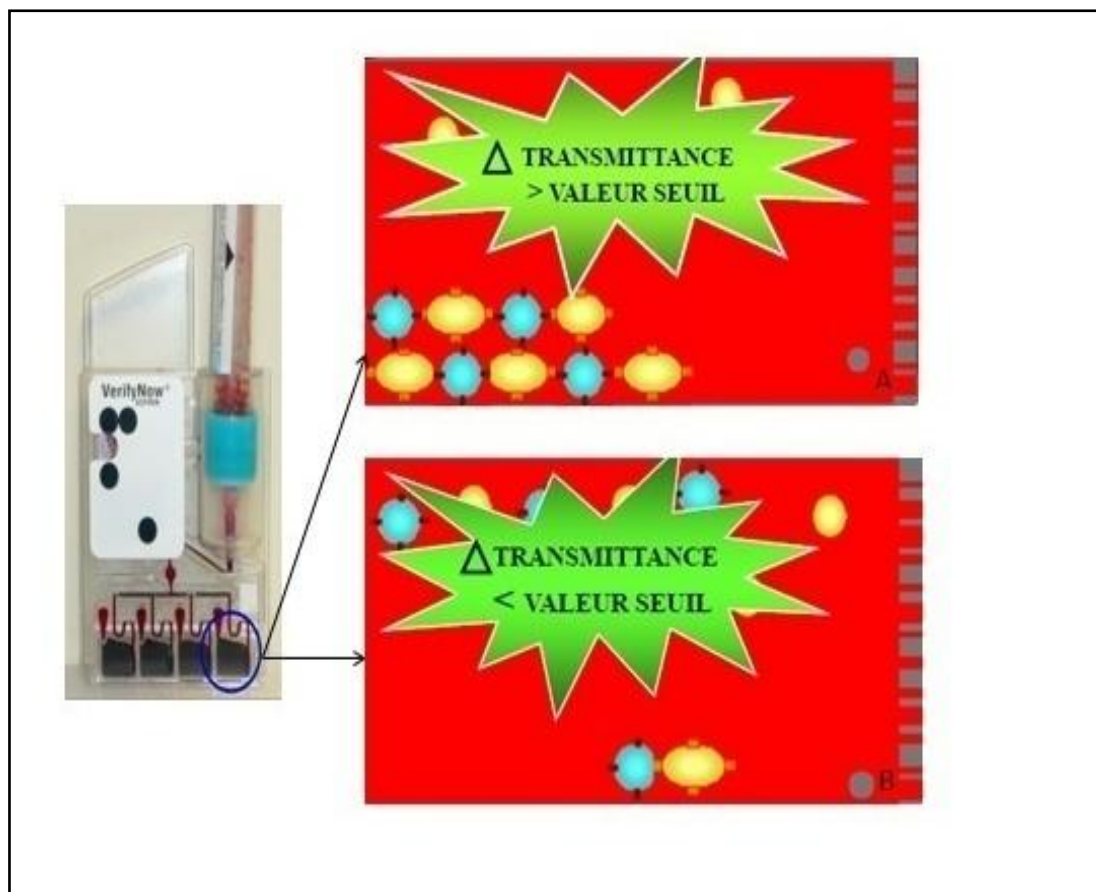


Figure 21: Déroulement de la phase d'agrégation dans les puits de mesure.

Conclusion

Tous les malades testés par la molécule mère (Plavix®) se sont avérés de bons répondeurs au médicament sur les critères retenus sauf 5 patients résistants. Ceci ne constitue en aucun cas un jugement de la prévalence de la résistance au clopidogrel vu le faible échantillon des malades.

Tous les malades qui n'ont pas répondu au clopidogrel générique ont par ailleurs bien répondu au clopidogrel Plavix ce qui pourrait être expliqué par un manque d'efficacité du clopidogrel générique sans pour autant conclure car l'étude a un très faible effectif.

Cette étude préliminaire suscite les réflexions suivantes :

- La mauvaise réponse des patients au Clopidogrel générique pousse le prescripteur à continuer l'étude pour avoir un échantillon plus grand et pouvoir avancer des conclusions. Ceci est capital vu le rôle important du clopidogrel dans l'arsenal thérapeutique de l'urgence coronaire qui ne doit souffrir d'aucun manque d'efficacité de ce produit.
- Etant donnée la fréquence de la résistance au clopidogrel dans les études internationales de même que l'impact de cette anomalie sur le pronostic des patients, une analyse de la résistance au clopidogrel sur une population marocaine est fondamentale.
- Le résultat de ce type d'étude qui teste la sensibilité au clopidogrel peut pousser à mettre en place un algorithme de prise en charge de ces patients et utilisant les autres molécules inhibant les récepteurs P2Y₁₂ malgré le fait qu'actuellement elles ne sont pas encore disponibles au maroc.

- Etant donné l'impact positif des génériques sur l'économie de santé, pouvoir tester ces produits au lit du malade constitue une avancée majeure qui permettra de rassurer le médecin dans sa prescription.

Résumés

Résumé :

Le traitement antiplaquettaire représente la pierre angulaire du traitement des patients admis pour un syndrome coronaire aigu et ou bénéficiant d'une angioplastie coronaire.

malgré l'efficacité de ces molécules les récives d'événement ischémiques restent fréquentes et le concept de mauvaise réponse biologique a été proposé comme une des hypothèses à ces récives , en effet il existe une large variabilité interindividuelle de la réponse au clopidogrel .

C'est une étude prospective réalisée au service de Cardiologie du CHU Hassan II sur une période d'une année. Elle a englobé des patients âgés de plus de 15 ans ayant été hospitalisés pour cardiopathie ischémique et mis sous clopidogrel. Les malades ont été tout d'abord chargés par le clopidogrel générique puis par le clopidogrel original s'il n'y a pas eu de réponse initiale. L'effet antiplaquettaire a été évalué par le dispositif « verifynow ».

50 patients sont recrutés dans cette étude qui a essayé d'analyser 2 aspects du clopidogrel :

- Le 1^{er} est clinique et s'intéressera à déterminer le pourcentage de mauvais répondeurs au clopidogrel dans une population de patients coronariens avérés marocains. Cette réponse sera évaluée grâce à un appareil de mesure de l'activité plaquettaire au lit du malade intitulé « VerifyNow ».

- Le 2ème est économique puisqu'on va comparer le clopidogrel original (Plavix®) à une molécule générique (Clopidogrel GT®). Celui-ci par définition moins cher permettra de faire des économies de santé s'il s'avère aussi efficace que la molécule originale et ce sur des bases objectives d'évaluation du blocage de la plaquette grâce à la machine VerifyNow.

Tous les malades testés par la molécule mère Plavix ont bien répondu au médicament sur les critères retenus sauf 5 qui sont considérés comme résistants .

Seulement 22 patients ont bien répondu au Clopidogrel générique (Clopidogrel GT) ce qui pourrait être expliqué par un manque d'efficacité du clopidogrel générique sans pour autant conclure car l'étude a un faible effectif.

L'originalité de cette étude tient au fait qu'aucun autre travail n'a été réalisé au Maroc sur ce sujet de résistance au clopidogrel mais également au fait que la machine Vertify-now vient d'être acquise pour la première fois au Maroc par le service de cardiologie du CHU Hassan II de Fès.

ABSTRACT :

Antiplatelet therapy is the cornerstone of treatment for patients admitted for acute coronary syndrome or coronary angioplasty. Despite the efficacy of these molecules recurrence ischemic events are frequent and the concept of bad biological response has been proposed as a hypothesis to these recurrences, in fact there is a wide interindividual variability in response to clopidogrel.

This is a prospective study conducted in the department of Cardiology CHU Hassan II over a period of one year. It included patients aged over 15 years who were hospitalized for ischemic heart disease and placed under clopidogrel. The patients were initially charged by the generic clopidogrel followed by the original clopidogrel if there was no initial response. The antiplatelet effect was evaluated by the device "verify now". 50 patients were enrolled in this study that tried to analyze two aspects of clopidogrel:

λ The first is clinical and will focus on determining the percentage of poor responders to clopidogrel in a population of coronary patients found Moroccans. This response will be evaluated using a device for measuring platelet activity at the bedside on "Verify Now".

λ The second is economic, since the original will compare clopidogrel (Plavix) to a generic molecule (Clopidogrel GT®). It will by definition be cheaper to save health if it is as effective as the original molecule and on objective assessment of blocking the plate through the machine bases Verify Now.

All patients tested by the parent drug Plavix responded well to the drug on the criteria except 5 which are considered resistant. Only 22 patients responded well to generic Clopidogrel (Clopidogrel GT) which could be explained by a lack of effectiveness of generic clopidogrel without conclusion because the study has a small sample size.

The originality of this study lies in the fact that no other work has been done on this subject in Morocco resistance to clopidogrel but also the fact that the Verify Now Machine has been acquired for the first time in Morocco the cardiology department of the CHU Hassan II of Fez.

ملخص

العلاج المضادة للصفائح هو حجر الزاوية في علاج المرضى الذين يتم إدخالهم لمتلازمة الشريان التاجي الحادة أو رأب الأوعية التاجية .

على الرغم من فعالية هذه الجزيئات هناك تكرار الحوادث الإقفارية متكررة، وقد اقترح مفهوم استجابة بيولوجية سيئة كفرضية لتكرار هذه الحوادث ، في الواقع هناك تباین واسع بين الأفراد في الاستجابة لعقار Clopidogrel

يتعلق الأمر بدراسة استطلاعية أجريت في قسم أمراض القلب بالمستشفى الجامعي الحسن الثاني على مدى سنة واحدة . وشملت المرضى الذين تزيد أعمارهم عن 15 عاما والذين نقلوا الى المستشفى لمرض القلب الإقفاري وضعت تحت CLOPIDOGREL. تم إختبار المرضى في البداية من قبل « Glopidogrel GT » يليه « Plavix » إذالم يكن هناك استجابة مبدئية . تم تقييم تأثير مضاد للصفائح من قبل الجهاز « VerifyNow »

تم تسجيل 50 مريضا في هذه الدراسة التي حاولت تحليل جانبين من عقار Clopidogrel : الأول هو السريرية وسترکز على تحديد نسبة المستجيبين لعقار Clopidogrel GT في مرضى الشريان التاجي . وسيتم تقييم هذه الاستجابة باستخدام جهاز لقياس نشاط الصفائح الدموية « VerifyNow »

والثانية اقتصادية،.(سنقارن إستجابة الأصلي Clopidogrel (Plavix) بالمتجانس Clopidogrel GT لأنه أرخص إذا كان فعالا مثل الأصلي جميع المرضى اختبرها من قبل (plavix) الأم استجاب بشكل جيد للدواء على المعايير باستثناء 5 والتي تعتبر مقاومة .

استجاب فقط 22 للمتناس (يمكن تفسير عدم فعالية عقار Clopidogrel GT دون الاستنتاج لأن الدراسة تهتم بعينة صغيرة من المرضى.

تميز هذه الدراسة يكمن في حقيقة أنه لم ينجز أي عمل آخر عن هذا الموضوع في المقاومة لعقار clopidogrel المغرب ولكن أيضا حقيقة أن VerifyNow – تم الحصول عليها لأول مرة في المغرب قسم أمراض القلب بفاس.

Bibliographiques

- [1]. 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.
- [2]. Hutton RA, Ludlam CA. Platelet function testing. *J Clin Pathol.* 1989;42:858–864.
- [3]. Dussallant 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. XVIII
- [4]. 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.
- [5]. 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.
- [6]. Maree 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.

- [7]. 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.
- [8] .Rodak BF. Hematology, Clinical Principles and Applications.2nd ed. Philadelphia: W.B Saunders; 2002:609–753.
- [9] . Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: Review and update. *Clin Chem*. 2000;46:1260– 1269.
- [10]. Nurden, P. and A. Nurden, Identification du nouveau récepteur plaquettaire de l'ADP, le P2Y₁₂, cible de traitements anti-thrombotiques. *Médecine et Science*, 2001. 17(6–7): p. 788– 789.
- [11]. Foster, C.J., et al., Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest*, 2001. 107(12): p. 1591–8.
- [12] .Geiger, J et al., Specific impairment of human platelet P2Y (AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel.*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(8): p. 2007–11.
- [13]. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409:202–7.

- [14] . Savi P, Herbert JM, Pflieger AM, et al. Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. *Biochem Pharmacol* 1992; 44:527–32.
- [15]. Savi P, Combalbert J, Gaich C, et al. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450–1A. *Thromb Haemost* 1994; 72:313–7.
- [16]. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010;38:92–9.
- [17] . Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, et al. A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2009;37:2145–52.
- [18] . Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003;101:3908–1.
- [19]. Geiger J, Brich J, Honig–Liedl P, et al. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptormediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2007–11.

- [20]. Payne CD, Li YG, Small DS, et al. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:555–62.
- [21] .A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE).CAPRIE Steering Committee.*Lancet*, 1996. 348(9038): p. 1329–39.
- [22] . Mehta SR , Yusuf S; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) Study Investigators. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme; rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J*. 2000;21:2033–41.
- [23]. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ. 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– 33.
- [24] . Chen ZM, Jiang LX, Chen YP. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction. *Lancet* 2005;366: 1607–21.
- [25]. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, Lopez-Sendon JL, Montalescot G, Theroux P. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2005;352:1179–89.

- [26] .J.M. Juliard. Les antagonistes des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ dans les syndromes coronaires aigus. *Mor J Cardiol* 2012; 6: 10–15.
- [27] .Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation* 2007;115:2196–207.
- [28]. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel : A review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1157–64.
- [29] .Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, et al. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:246–51.
- [30]. Mega JL, Simon T, Collet JP, Anderson JL et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* 2010 ; 304 (16) :1821–1830.
- [31]. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et coll. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1895–1900.
- [32] .Site Internet :www.accumetrics.com.