

Laurence Camoin-Jau*

Résistance au clopidogrel

RÉSUMÉ

Le clopidogrel (Plavix®) est un anti-plaquettaire oral, appartenant à la famille des thiényopyridines. Il est utilisé dans la prévention des complications thrombotiques artérielles de l'athérosclérose. Son efficacité a été largement démontrée dans des méta-analyses. Cependant, un pourcentage non négligeable de récurrences est observé. Ces observations cliniques soulèvent la notion de résistance au traitement, plusieurs étiologies sont envisagées pour expliquer ce phénomène de résistance. Il faut clairement distinguer l'existence d'une résistance clinique, associée à des événements cliniques, et la résistance biologique, mise en évidence par la persistance d'une réactivité plaquettaire par des tests biologiques. L'instauration d'une surveillance biologique de ces traitements devient d'actualité. Les techniques classiques d'agrégation plaquettaire ne sont pas envisageables en routine. L'étude par cytométrie en flux de la protéine intra-plaquettaire VASP pourrait constituer une approche intéressante.

MOTS-CLÉS

Antiplaquettaires, résistance, surveillance, agrégation plaquettaire, PFA-100®, cytométrie en flux

Clopidogrel resistance

SUMMARY

Clopidogrel (Plavix®) is an oral anti-platelet agent mainly used to prevent arterial thrombosis complicating atherosclerosis. Its efficiency was approved by meta-analysis. However, clinical events are observed under treatment. These observations induce the notion of resistance to treatment and different aetiological factors may explain this resistance. We need to distinguish clinical resistance with a recurrence of clinical ischaemic events despite observation of appropriate therapy and biological resistance characterized by persistence of platelet reactivity. Monitoring of antiplatelet treatment is up to date. Classical platelet aggregation tests are not suited for routine use. Flow cytometry analysis and more particularly, analysis of VASP, an intra-platelet protein, could be useful.

KEYWORDS

Anti-platelet therapy, resistance, monitoring, platelet aggregation, PFA-100®, flow cytometry, VASP

I – Introduction

Le rôle central des plaquettes dans la survenue de complications thrombotiques artérielles est aujourd'hui bien documenté. Ainsi, la meilleure connaissance de l'implication des plaquettes dans les mécanismes physiopathologiques de la thrombose a justifié l'utilisation de médicaments anti-plaquettaires oraux ; aspirine et/ou thiényopyridines (ticlopidine, clopidogrel), dans la prévention primaire et secondaire des complications athérotrombotiques (1). Si l'efficacité de ces traitements a été largement démontrée dans des méta-analyses internationales, le bénéfice de leur utilisation dépend du profil du patient. Il est clairement admis que l'association de l'aspirine et

du clopidogrel réduit l'incidence des événements cliniques notamment chez les patients à haut risque. Cependant, une inefficacité clinique est encore décrite avec un pourcentage non négligeable de récurrences (1). Ainsi, de nouvelles questions se posent : la survenue de ces complications est-elle la conséquence d'une inefficacité des traitements anti-plaquettaires ?

Ces dernières années, la notion de résistance biologique à l'aspirine est apparue dans la littérature, elle fait encore l'objet d'un vif débat. Nous pouvons poser la même question pour le clopidogrel. Peut-on évoquer la notion de résistance au clopidogrel ? En cas de résistance, avons-nous les moyens biologiques pour la mettre en évidence et en expliquer les mécanismes ?

*Laboratoire d'Hématologie - Hôpital de la Conception - 147, Bvd. Baille - 13385 Marseille cedex 5 - Tél.: 04 91 38 39 76 - Fax : 04 38 30 12
E-Mail : lcamoin@ap-hm.fr
INSERM U608 - Faculté de Pharmacie - 27 Bvd Jean Moulin - 13385 Marseille cedex 5

II – Rôle des plaquettes dans la genèse des événements thrombotiques artériels

Les mécanismes responsables de la formation d'un thrombus plaquettaire artériel sont les mêmes que ceux impliqués dans l'hémostase physiologique (2). La gravité de l'athérosclérose coronarienne est surtout liée au risque permanent de déclenchement de processus thrombotique à la surface d'une plaque rompue. L'exposition de cette surface thrombogène au sang entraîne l'adhésion des plaquettes circulantes. Cette étape implique différents récepteurs membranaires plaquettaires (les complexes glycoprotéiques GPIb-IX-V, les récepteurs du collagène, le récepteur de la vitronectine) et des protéines adhésives plasmatiques (facteur von Willebrand et fibrinogène).

Cette phase initiale d'adhésion induit une activation plaquettaire. Il s'agit d'un processus complexe qui implique un changement de forme

complexe. Cette molécule, inactive lorsque les plaquettes sont au repos, acquiert alors la capacité de fixer le fibrinogène et d'agréger les plaquettes. Ces plaquettes stimulées synthétisent en outre du thromboxane A₂ à partir de l'acide arachidonique membranaire, qui est aussi un puissant agoniste de l'agrégation plaquettaire. Cette réaction sécrétoire est autocatalytique, elle entraîne une libération d'ADP qui va activer d'autres plaquettes. L'ADP est l'un des plus importants cofacteurs de l'activation plaquettaire. Il active les plaquettes par l'intermédiaire de deux récepteurs purinergiques à 7 domaines transmembranaires : les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂. Le récepteur P2Y₁ est couplé à une protéine G_{αq}, il est responsable de l'initiation de l'agrégation plaquettaire à l'ADP par l'intermédiaire de la mobilisation des réserves de calcium intraplaquettaire. Le récepteur P2Y₁₂, couplé à une protéine G_{αi2}, complète et amplifie la réponse agrégante et stabilise l'agrégat plaquettaire (3).

NOTE

Cet article constitue l'adaptation d'un poster, «Resistance aux thiénopyridines», présenté lors des 15èmes Journées de Biologie de Marseille.

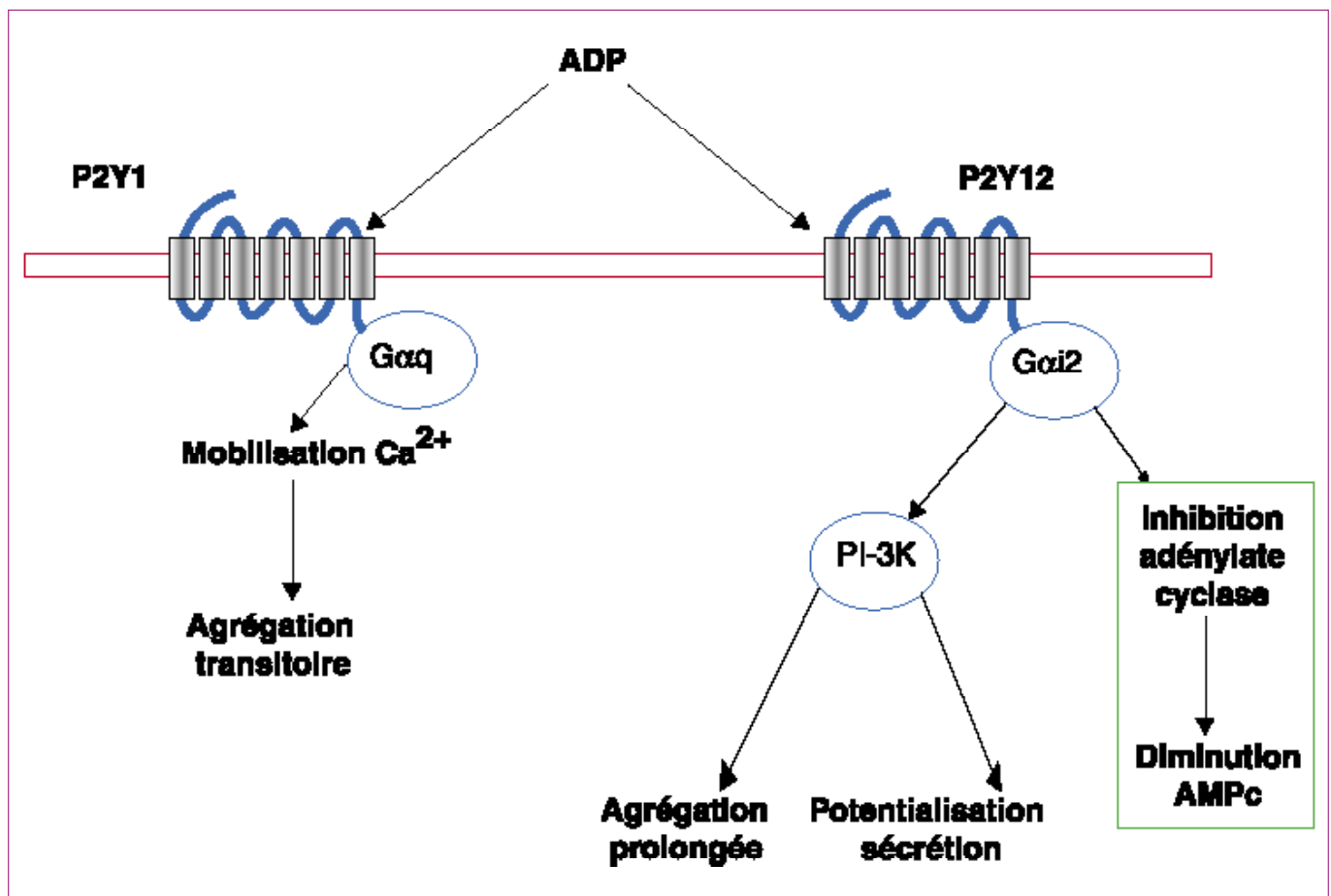
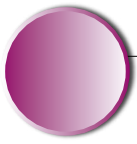


Figure 1

Représentation schématique des deux récepteurs plaquettaires à l'ADP. Lors d'une stimulation par de l'ADP, le récepteur P2Y₁ est responsable de la mobilisation des stocks internes de calcium, du changement de forme des plaquettes et d'une agrégation transitoire. Le récepteur P2Y₁₂ est responsable d'une amplification des réponses et de la stabilisation de l'agrégation.

de la plaquette, une diminution de l'AMPc et la sécrétion de molécules pro-agrégantes. Cette phase d'activation entraîne une augmentation du nombre de GPIIb/IIIa à la surface plaquettaire et un changement conformationnel de ce



La phase finale d'agrégation durant laquelle les plaquettes se fixent sur les molécules de fibrinogène libre, est à l'origine de la formation du thrombus plaquettaire. C'est la glycoprotéine IIb/IIIa (CD41), rendue alors active, qui est impliquée dans cette agrégation.

La progression de ce thrombus blanc peut générer un processus occlusif responsable de la symptomatologie ischémique artérielle. Ainsi, l'inhibition directe de l'agrégation plaquettaire devrait permettre de réduire l'incidence des complications aiguës.

III - Le clopidogrel : mécanisme d'action

Le clopidogrel est un antiplaquettaire appartenant à la classe des thiényopyridines. Il inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, en bloquant de façon spécifique et irréversible le récepteur P2Y₁₂. Le clopidogrel est inactif *in vitro*, en effet, c'est une prodrogue qui doit être métabolisée au niveau hépatique par différents cytochromes, mais essentiellement par l'isoforme CYP 3A4 du cytochrome hépatique P450. Le dérivé carboxylé inactif SR26334 bloque de façon irréversible le récepteur P2Y₁₂ lors du passage hépatique des plaquettes. Le P2Y₁₂ agit par l'intermédiaire de plusieurs voies de signalisation (*figure 1*, page précédente). En revanche, le récepteur P2Y₁ n'est pas modifié par une prise de clopidogrel, il conserve sa capacité à initier l'agrégation plaquettaire. Ainsi, le clopidogrel bloque indirectement l'activation ADP-dépendante de la GPIIb/IIIa (4).

Classiquement, le clopidogrel est administré à la dose de 75 mg (2). Dans ces conditions, une inhibition des fonctions plaquettaires est obtenue en moyenne après 3 à 7 jours de traitement. L'administration d'une dose de charge, allant de 300 à 600 mg, permet d'atteindre une inhibition des fonctions plaquettaires dans les heures qui suivent l'ingestion (5).

IV - Définition de la résistance

Dans un contexte d'atteinte artérielle pluri-systémique, l'utilisation d'un antiplaquettaire s'impose en raison des bénéfices démontrés par cette thérapie au niveau cardiovasculaire. En ce qui concerne le choix de l'antiplaquettaire, l'étude CAPRIE a comparé l'efficacité de l'ASA (325 mg) à celle du clopidogrel (75 mg) chez des patients sélectionnés pour leurs antécédents d'infarctus du myocarde, d'AVC ou d'une maladie vasculaire périphérique. Cette étude a démontré que le risque cumulatif d'accidents cérébraux ischémiques, d'infarctus du myocarde ou de décès d'origine vasculaire était réduit de façon significative (réduction du risque re-

latif de 8,7 %) avec le clopidogrel par rapport à l'ASA. Cependant, un nombre non négligeable de patients aux antécédents d'événements cardiovasculaires récidivent malgré le traitement, la prévalence des récurrences variant de 5 à 15 % selon les études (6).

Ces observations cliniques ont soulevé le concept de résistance aux antiplaquettaires. C'est pour l'aspirine que cette notion a été évoquée en premier, il y a plusieurs années déjà. Il est capital de dissocier la notion de résistance clinique, qui correspond à la récurrence de manifestations cardiovasculaires sous traitement, de celle de résistance biologique évaluée par des tests de laboratoire qui mettent en évidence la persistance d'une réactivité plaquettaire. La corrélation entre la résistance biologique et la résistance clinique n'est pas clairement définie. En effet, les prévalences de la résistance biologique, quelque soient les études réalisées, sont nettement supérieures à celles des résistances cliniques (7).

De même que pour l'aspirine, une résistance biologique peut être observée lors d'un traitement par clopidogrel. Les études de plus en plus nombreuses, mêmes si elles utilisent des outils biologiques différents sur des cohortes de patients hétérogènes, démontrent l'hétérogénéité des réponses au clopidogrel.

Différents mécanismes à l'origine de ce phénomène ont été suggérés.

- Le défaut d'observance est une cause non négligeable de variabilité, mais il ne peut expliquer à lui seul une telle variabilité dans l'efficacité du traitement.
- Une variabilité dans l'absorption intestinale a aussi été évoquée, en effet, les variations de l'absorption entérique pourraient limiter la quantité de clopidogrel accessible à la transformation hépatique en métabolite actif.
- Le clopidogrel étant une prodrogue, la métabolisation hépatique semble jouer un rôle important dans la variabilité interindividuelle. Des interactions entre le clopidogrel et certaines statines utilisant la voie du cytochrome P450 ont de même été mises en évidence et pourraient justifier la variabilité interindividuelle décrite (8).
- Un polymorphisme génétique du récepteur à l'ADP a été récemment décrit. Ces résultats très préliminaires décrivent l'existence d'un haplotype qui serait associé à une moindre réponse au traitement (9).

Ainsi, aujourd'hui, de nombreuses hypothèses documentent ces processus de résistance biologique. Il est fort probable que l'origine de ces résistances soit multifactorielle. Quel qu'en soit le mécanisme, nous serons amenés à évaluer l'activité biologique de ces traitements antiplaquettaires dans le futur. Cependant, il nous reste à déterminer les outils biologiques les mieux adaptés.

V - Evaluation biologique de l'efficacité du clopidogrel

Il n'existe pas aujourd'hui de recommandations internationales pour évaluer l'efficacité biologique des antiplaquettes. Plusieurs approches sont disponibles, certaines évaluent de façon globale l'hémostase primaire ; d'autres à l'inverse étudient de façon spécifique la voie de l'ADP inhibée par le clopidogrel. Il existe ainsi une grande hétérogénéité dans la définition de cette résistance biologique en fonction de la méthode utilisée.

1. Platelet function analyzer-100

Le Platelet Function analyzer-100 (PFA-100®), commercialisé par la société Dade-Behring, évalue de façon globale l'hémostase primaire dans des conditions de force de cisaillement élevées, à travers la mesure de la Capacité Hémostatique Plaquettaire (CHP). Celle-ci indique, sous des conditions de flux définies, la capacité d'un échantillon de sang total à former, *in vitro*, un clou plaquettaire. En pratique, l'échantillon sanguin, soumis à des conditions de flux, traverse une cartouche perforée, imprégnée d'agonistes plaquettaires. Deux types de cartouches existent. Elles sont soit imprégnées de collagène et d'épinéphrine soit de collagène et d'ADP.

Le PFA-100® a démontré ses performances dans le diagnostic et le suivi des maladies hémorragiques de l'hémostase primaire, telles que la maladie de Willebrand et certaines thrombopathies (10). Dans le suivi des traitements par clopidogrel, c'est la cartouche collagène/ADP qui serait la mieux adaptée. Cependant, son utilisation dans cette indication est décevante. La plupart des travaux ont mis en avant son défaut de sensibilité, probablement par une concentration trop élevée en ADP. Le développement de cartouches moins concentrées en ADP permettrait probablement d'adapter cette technique au suivi biologique du clopidogrel.

2. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux présente de nombreux avantages : elle permet d'étudier les plaquettes en sang total à partir d'un faible échantillon de prélèvement. Encore aujourd'hui exclusivement réservées à des laboratoires spécialisés, ces méthodes vont probablement se développer et se simplifier.

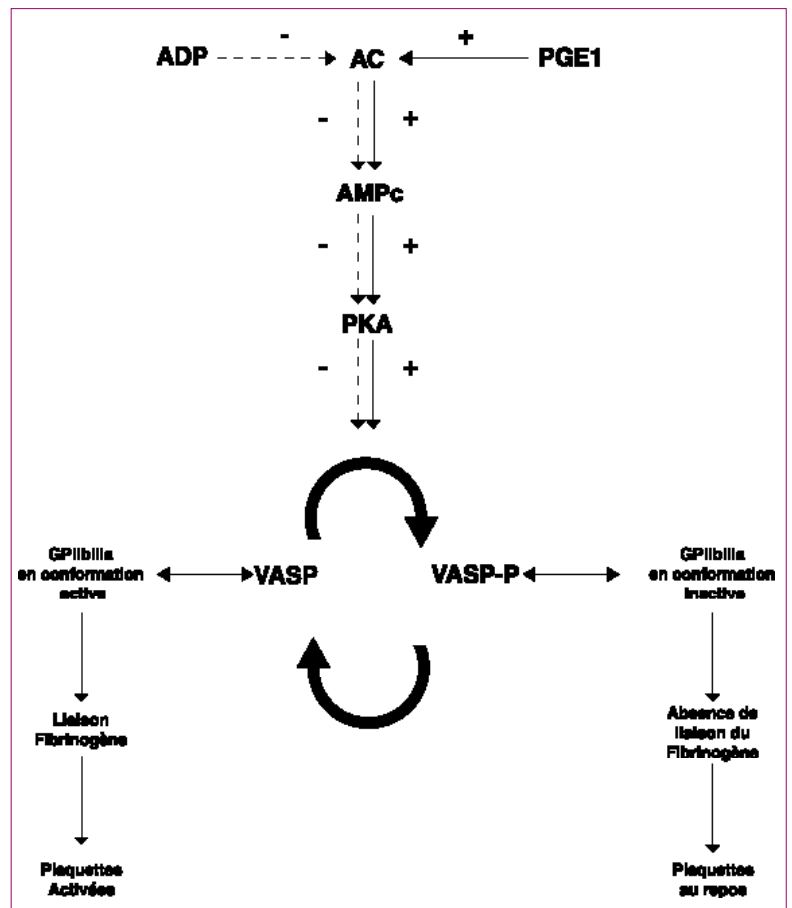
3. Evaluation de l'activation plaquettaire

Cette méthode consiste à quantifier certaines glycoprotéines sur des plaquettes au repos et après activation par des agonistes plaquettaires. L'ADP est l'agoniste de choix pour évaluer l'activité du clopidogrel. Si le traitement anti-plaquettaire est biologiquement actif, la stimulation par l'ADP n'induit pas d'augmentation de ces marqueurs à la surface plaquettaire. Il est classique d'étudier dans ces différentes conditions le comportement de la Glycoprotéine IIb-IIIa (CD41)

Figure 2

Phosphorylation de VASP et activation des plaquette. Dans les plaquettes au repos, VASP est à l'état phosphorylé ; cet état est associé à une conformation inactive de la GPIIbIIIa, qui ne peut donc pas fixer le fibrinogène circulant. Lorsque le récepteur P2Y12 est activé par de l'ADP, VASP est déphosphorylé et la GPIIbIIIa acquiert alors une conformation active, qui permet la liaison du fibrinogène et donc le processus d'agrégation plaquettaire.

AC : adénylate cyclase ; ADP : adénosine 5' di-phosphate, AMPc : adénosine monophosphate, PGE1 : prostaglandine E1.



et de la P-Sélectine (CD62P). Cette technique est peu ou pas utilisée pour la surveillance des résistances aux anti-plaquettaires.

4. Analyse de la phosphorylation de VASP

La protéine VASP (vasodilatator stimulated phosphoprotein) appartient à la famille des Ena/ Vasp protéines. Il s'agit d'une protéine intracellulaire ubiquitaire, présente dans de nombreuses cellules eucaryotes (11). Dans la plaquette, elle existe sous deux formes : une forme phosphorylée (VASP-P) et une forme non phosphorylée (VASP). Elle participe à la régulation de la dynamique du cytosquelette et à l'activation de la GPIIbIIIa. Son activité dépend de son niveau de phosphorylation ; lui-même inversement corrélé à l'état de stimulation du récepteur P2Y12 (figure 2). L'étude de VASP est donc très spécifique du récepteur P2Y12, lui-même cible du traitement par clopidogrel. Le niveau de phosphorylation de VASP peut être

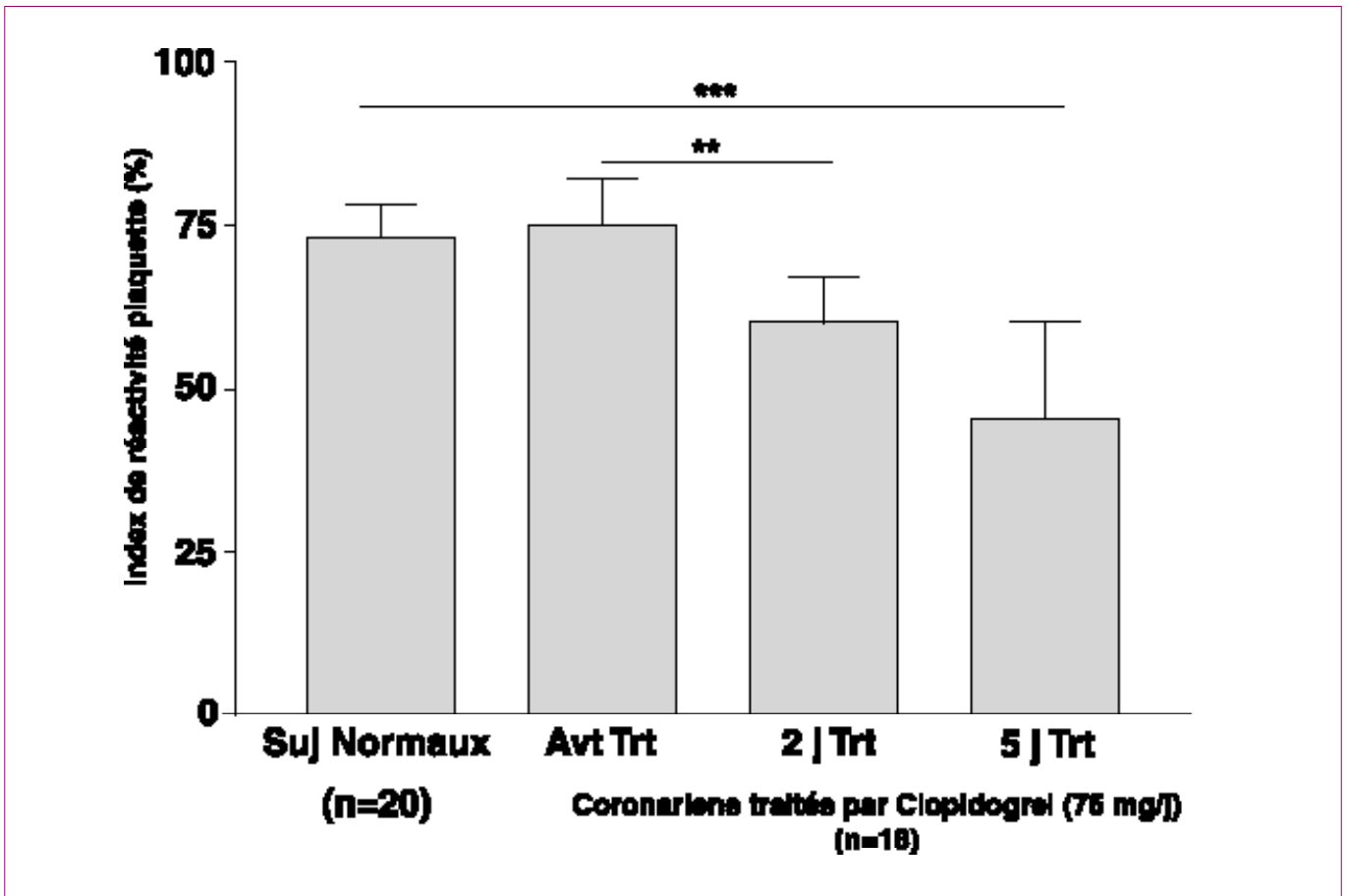
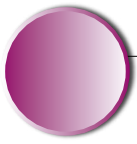


Figure 3
Analyse de la phosphorylation de VASP par cytométrie en flux chez des volontaires sains et des patients coronariens sous aspirine (250 mg) et clopidogrel avant traitement (0 jour), après 2 et 4 jours d'aspirine et de clopidogrel.

mesuré par cytométrie de flux grâce à une trousse commercialisée par la société Stago (Platelet-VASP®, Diagnostica Stago, France). Le principe de dosage consiste à comparer le niveau de phosphorylation de VASP entre un état d'inhibition plaquettaire et un état d'activation induit par de l'ADP. Le résultat est exprimé en index de réactivité plaquettaire. En pratique, un index de réactivité plaquettaire proche de 0 % indique une absence totale de réactivité plaquettaire à l'ADP soit un blocage complet du récepteur P2Y12. Chez les sujets sains, en absence de traitement par clopidogrel, cet index est de l'ordre de 80 % ; des résultats similaires sont obtenus chez des patients coronariens non traités par clopidogrel. Le test est insensible à la prise d'aspirine. Chez les patients traités par clopidogrel, l'index de réactivité est significativement diminué, de l'ordre 50 % (figure 3). Cependant, les valeurs obtenues sont très dispersées (de 5 à 85 %). De plus, 30 % des patients présentent

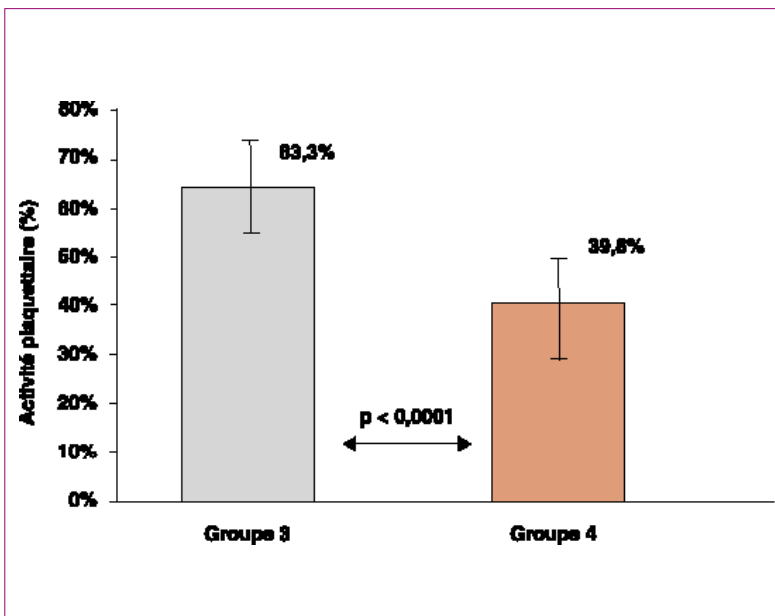


Figure 4
Phosphorylation de VASP chez des patients ayant présentés une thrombose intra stent (groupe 3, n=16) comparée à des patients n'ayant pas présenté de thrombose intra stent (groupe 4, n=30). La réactivité plaquettaire est plus élevée dans le groupe 3 correspondant à une faible phosphorylation de VASP et donc à une faible inhibition de l'agrégation plaquettaire (12).

un index de réactivité plaquettaire comparable à celui obtenu chez des sujets non traités. Dans un travail préliminaire, réalisé chez patients présentant une thrombose de stent après angioplastie, nous avons obtenu un index de réactivité plaquettaire supérieur à 50 % dans 93 % des cas (*figure 4*) (12). Ces résultats sont encore préliminaires mais sont encourageants. La mesure de la phosphorylation de VASP pourrait s'avérer être un test intéressant pour évaluer l'efficacité du traitement par clopidogrel. Outre la spécificité de ce marqueur, la trousse actuellement commercialisée présente de nombreux avantages : délai d'exécution court (moins de 1 heure), délai dans la réalisation du dosage (stabilité de 24 heures à température ambiante).

5. Agrégation plaquettaire

Cette analyse, réalisée exclusivement par des laboratoires spécialisés, est une des méthodes les plus fiables pour évaluer les fonctions plaquettaires. Elle est encore aujourd'hui considérée comme le « Gold Standard ». Elle consiste à mesurer l'agrégation plaquettaire d'un plasma riche en plaquettes (PRP), obtenu après centrifugation à faible vitesse d'un échantillon sanguin prélevé sur citrate de sodium. L'intensité de l'agrégation plaquettaire est mesurée par l'augmentation de la transmission lumineuse à travers le PRP après stimulation par un agoniste. Les paramètres pré-analytiques doivent être respectés rigoureusement : délai de traitement de l'échantillon, standardisation des paramètres de centrifugation, ajustement de la numération plaquettaire.

C'est l'ADP qui est l'agoniste de choix pour évaluer l'efficacité biologique des thiénopyridines. De nombreux travaux ont évalué l'activité plaquet-

taire résiduelle après traitement par clopidogrel par cette méthode. Cependant, l'analyse des modes opératoires révèle de nombreuses différences aussi bien sur la dose de clopidogrel absorbée, la durée du traitement, la concentration en ADP utilisée, que sur l'interprétation des résultats. Malgré tout, il en ressort une grande variabilité inter-individuelle. Le pourcentage de patients considérés comme non-répondeurs, c'est à dire présentant une agrégation plaquettaire résiduelle, est compris entre 15 à 40 % selon les études (13).

VI - Conclusion

L'efficacité du clopidogrel est connue, cependant la notion de variabilité interindividuelle semble acquise au regard des données de la littérature. Les mécanismes de cette variabilité sont complexes et probablement multifactoriels. Il est tout d'abord important d'harmoniser la définition de la variabilité interindividuelle et de déterminer l'approche biologique à utiliser. De plus, l'absence de normalisation des tests de laboratoire rend difficile leur comparaison. Néanmoins, le problème est d'une telle actualité que très rapidement des normes seront établies et permettront d'avoir un test adapté et validé pour la mise en évidence de la résistance biologique. Seule classe d'anti-thrombotique sans surveillance biologique, les antiplaquettaires bénéficieront, dans les années à venir, eux aussi de cette prise en charge biologique. Il reste cependant à démontrer la relation entre la résistance biologique et la résistance clinique sur de larges cohortes de patients. Il est probable que l'attitude thérapeutique sera modifiée et adaptée aux examens de laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) MEHTA SR, YUSUF S., The clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trials investigators (CURE). 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.
- (2) ROSS R. Atherosclerosis : an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 1999, **340**, 115.
- (3) HARIPRIYA S., SWAMINATHAN M., SOOCHONG K. et al. Role of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels in P2Y12 receptor-mediated platelet functional responses. *Blood*, 2004, **104**, 1335-1343.
- (4) SAVI P, PEREILLO JM, UZABIAGA MF et al, Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb. Haemost.*, 2000, **84**, 891-896.
- (5) ANGIOLILLO DJ, FERNANDEZ-ORTIZ A, BERNARDO E et al High clopidogrel loading dose during coronary stenting: effects on drug response and interindividual variability. *Eur. heart J.*, 2004, **25**, 1903-1910.
- (6) CAPRIE Steering committee. A randomised, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet*, 1996, **348**, 1329-1338.
- (7) DROUET L. La résistance aux anti-plaquettaires existe-elle ? *STV*, 2003, **15**, 507-515.
- (8) MÜLLER I, BESTA F, SCHULZ C et al. Effets of statins on platelet inhibition by a high loading dose of clopidogrel. *Circulation*, 2003, **108**, 2195-2197
- (9) FONTANA P, DUPONT A, GANDRILLE S et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*, 2003, **108**, 989-995.
- (10) FAVALORO EJ, Clinical application of the PFA-100®, *Current Opin. Hematol.*, 2002, **9**, 407-415.
- (11) 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**(3), 1145-1152.
- (12) BARRAGAN P, BOUVIER JL, ROQUEBERT PO et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc. Interv.* 2003, **59**(3), 295-302.
- (13) GURBEL PA, BLIDEN KP, HIATT BL et al. Clopidogrel for coronary stenting response variability, drug resistance and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*, 2003, **107**, 2908-2913