Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Ecole Doctorale Biose (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Sébastien RICHARD

Le 26 Octobre 2011

EXPLORATIONS DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES EXPOSEES A L'ASPIRINE AU DECOURS DE L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL ISCHEMIQUE.

Membres du Jury :

Rapporteurs :	Pr Mathieu ZUBER	PU-PH, Université Paris Descartes, Paris.
	Pr Bernard TARDY	PU-PH, Université Jean Monnet, Saint-Etienne.
Examinateurs :	Pr Xavier DUCROCQ	PU-PH, Université Henri Poincaré, Nancy
	Pr Thomas LECOMPTE	PU-PH, Université Henri Poincaré, Nancy. Directeur de thèse.
	Pr Hervé VESPIGNANI	PU-PH, Université Henri Poincaré, Nancy.
	Dr Corinne FRERE	MCU-PH, Université Aix-Marseille 2, Marseille.
	Dr TOUSSAINT-HACQUARD Marie.	Docteur en Pharmacie. CHU. Nancy. Co-directeur de thèse.

Laboratoire : UMR_S 961 Risque Cardiovasculaire, Rigidité, Fibrose et Hypercoagulabilité. Faculté de médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy.

A mon directeur de thèse,

M le Pr Thomas Lecompte,

Vous m'avez soutenu pendant toutes ces années où s'est déroulé ce travail. Vous m'avez permis de le réaliser en continuant mon activité clinique. Votre enseignement m'a montré que la recherche fondamentale pouvait avoir une application directe et pratique aux soins du patient. Sans vous, la soutenance de cette thèse n'aurait pu avoir lieu et l'ensemble de notre équipe neuro-vasculaire espère pouvoir conduire, avec vous, d'autres projets. Veuillez recevoir toute ma gratitude et mon plus grand respect.

A mon co-directeur de thèse,

Mme le Dr Marie Toussaint-Hacquard,

Vous avez été présente à chaque étape de la conception de ce travail, qui est autant le vôtre que le mien. Vous m'avez enseigné plusieurs manipulations de recherche fondamentale, et en avez même expérimentées certaines, pour la première fois, pour aider à la réalisation de ce projet. Vos compétences me paraissent indispensables pour aider notre équipe à conduire d'autres travaux. Enfin et surtout, votre amitié m'a soutenu pendant ces années.
Soyez assurée de ma profonde gratitude.

A mon président de jury,

M le Pr Xavier Ducrocq,

Vous m'avez présenté au Pr Thomas Lecompte pour ce travail, et m'avez fait confiance pour sa réalisation. Vous m'avez permis de prendre du temps pour me consacrer à la recherche fondamentale Vous êtes mon principal maître d'enseignement, grâce à qui, j'ai la chance d'exercer quotidiennement dans le domaine neuro-vasculaire.
Soyez assuré de toute ma gratitude et mon plus grand respect.

A mon juge et maître,

M le Pr Hervé Vespignani,

C'est à votre initiative et grâce à votre soutien que mon inscription en thèse a eu lieu. Vous m'avez toujours conseillé de m'orienter vers les sciences fondamentales afin de conforter ma pratique clinique et j'espère, aujourd'hui, avoir pu répondre à vos attentes. Vous m'avez encouragé dès mes premières années de médecine, et avait tout fait pour m'intégrer à votre équipe. C'est votre travail et votre enseignement qui me permettent aujourd'hui de soutenir cette thèse et de me sentir capable de le faire.
Veuillez recevoir, maître, toute ma reconnaissance et mon plus grand respect.

A mes rapporteurs,

M le Pr Mathieu Zuber,

M le Pr Bernard Tardy,

Vous me faites l'honneur d'avoir rapidement accepter d'examiner ce travail, et ce malgré les nombreuses activités de pratiques cliniques et d'enseignement que vous pratiquez quotidiennement. Sans votre aide, ce travail n'aurait pu être soutenu dans le temps imparti.
Veuillez recevoir toute ma gratitude et mon plus grand respect.

A mon juge,

Mme le Dr Corinne Frère,

Vous me faites l'honneur, malgré un long trajet, d'accepter de juger ce travail. Votre expérience de biologiste est indispensable à la discussion et permettra d'élaborer d'autres projets de recherche.
Veuillez recevoir toute ma gratitude pour votre disponibilité.

Au Dr Jean-Christophe Lacour,

Pour son enseignement pendant toutes ces années. Pour m'avoir remplacer à de multiples reprises dans le service, afin de me consacrer à ce travail.
Veuillez recevoir toute ma gratitude.

A l'ensemble de l'équipe médicale du CHG de Bar-Le-Duc, en particulier les Dr Lavandier, Dr Evon et Dr Poissenot,

Pour m'avoir toujours soutenu dans ma tâche de médecin « multi-sites » et avoir accepté une organisation parfois difficile, pour me permettre de terminer ce travail.
Veuillez accepter toute ma gratitude.

A l'ensemble de l'équipe médicale du laboratoire d'hémostase et d'hématologie biologique du CHU de Nancy, en particulier les Dr Perrin, Dr Salignac, Dr Frotscher et Dr Eschwege, pour votre accueil et votre soutien.

Ce travail est dédié à :
L'ensemble du **personnel du laboratoire d'hémostase et d'hématologie biologique du CHU de Nancy** qui m'ont tant aidé à la réalisation des tests biologiques, en plus de leur travail habituel, et à l'ensemble de **l'équipe de l'unité neuro-vasculaire du CHU de Nancy** qui a pris à cœur de réaliser au mieux les prélèvements, de les faire acheminer dans les temps, uniquement dans le but de m'aider.
Merci pour tout.

Résumé :

L'aspirine est l'anti-plaquettaire le plus largement prescrit à la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique. Cependant, la survenue de récidives, malgré cette prescription, est fréquente. La description de l'effet de l'aspirine sur l'activité plaquettaire durant cette phase n'a jamais été réalisée. Elle pourrait mettre en évidence une moindre réponse plaquettaire et aider à établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Cinquante patients, ont reçu par voie orale 300 mg d'aspirine, suite à un AVC ischémique. Ensuite, des prélèvements sanguins ont été réalisés : entre 2 et 3 heures (T1), entre 23 et 24 heures (T2) après la prise d'aspirine et, pour des patients déjà traités quotidiennement par une dose inférieure, avant la prise d'aspirine (T0). Les concentrations sériques de thromboxane (TX) B2 ont été mesurées, ainsi que les agrégations induites par l'acide arachidonique, par le collagène à la concentration de 2µg/L (Col2) et 20 µg/L (Col20). Afin de diminuer l'effet des variations de condition d'expérience, les résultats pour Col2 ont été rapportés à ceux pour Col20 (Col2/20).

Tous les patients ont présenté une réponse à l'aspirine visible à T1 avec de plus, des concentrations de TXB_2 abaissées en comparaison à T0. Il existe une récupération de l'activité plaquettaire à T2 comparée à T1, montrée par les concentrations de TXB_2 et le rapport Col2/20.

La dose orale de 300 mg d'aspirine, donnée à la phase aiguë de l'AVC, entraîne une inhibition plaquettaire, mais avec une récupération visible sur 24 heures. Pour les patients déjà traités quotidiennement par une dose inférieure, elle permet de compléter l'inhibition de la voie TXA_2 dépendante.

Mots clés
Accident vasculaire cérébral ischémique
Plaquettes
Aspirine
Anti-plaquettaire

Laboratory effect of aspirin on platelet activity during ischemic stroke.

Summary :

Aspirin is the most commonly used antiplatelet treatment during the acute phase of cerebral ischemic events. But, despite this protection, early ischemic recurrences are frequent, and considered as clinical failures of this therapy.

We studied laboratory parameters of the first 300 mg oral dose of aspirin given, within 48 hours, after ischemic cerebral event. Fifty patients were included. For all patients, two blood sampling were performed, the first, during the third hour after aspirin intake (T1) and the second during the twenty-fourth hour (T2). For patients already treated with a daily dose of aspirin, a supplementary withdrawn was done before aspirin intake (T0). Platelet reactivity was studied on the basis of serum thromboxane (TX) B_2 levels and light transmission aggregometry after stimulation of platelet-rich plasma by acid arachidonic and collagen 2µg/mL reported to results with collagen 20 µg/mL (ratio Col2/20).

Inhibition of platelet activity was observed, at T1, for all patients. There is a significant increase of TXB_2 values, and of relative values of the ratio Col2/20, at T2 as compared to T1. For already aspirin treated patients, there is a significant decrease of TXB_2 levels at T1 as compared to T0.

There is a platelet reactivity recovery within 24 hours, following the first 300 mg oral dose of aspirin, during the acute phase of a cerebral ischemic event, and demonstrated by TXB_2 levels and ratio Col2/20. This fact would favour early ischemic recurrences. However, this dose is able to complete the inhibition of the TXA_2 pathway for already aspirin treated patients.

Key words:
Ischemic stroke
Platelets
Aspirin
Antiplatelet treatment

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION 9

II. L'ACCIDENT VASCULAIRE CÉRÉBRAL 10

1. L'ÉTAT DES LIEUX : UNE PATHOLOGIE GRAVE ET FRÉQUENTE 10
2. LES SOLUTIONS PROPOSÉES 11
3. EMPLOI DES ANTI-PLAQUETTAIRES POUR LE TRAITEMENT DE L'AVC ISCHÉMIQUE 11

III. L'ASPIRINE 12

1. HISTOIRE DE L'ASPIRINE 12
2. L'ACTION DE L'ASPIRINE 16
3. EXAMENS DE BIOLOGIE MÉDICALE UTILISÉS POUR APPRÉCIER LA RÉPONSE AUX ANTI-PLAQUETTAIRES 17

IV. VARIABILITÉ DE RÉPONSE À L'ASPIRINE 20

1. DÉFINITION 20
2. LES DIFFÉRENTS TYPES DE MÉCANISME DE MOINDRE RÉPONSE PLAQUETTAIRE À L'ASPIRINE 21
3. DESCRIPTION DES DIFFÉRENTS MÉCANISMES POSSIBLES POUR CHAQUE TYPE DE VARIABILITÉ DE RÉPONSE PLAQUETTAIRE 22
a. Mécanismes pharmacocinétiques *22*
b. Mécanismes pharmacodynamiques dépendant de la production de TXA_2 ..... *22*
c. Voies d'activation plaquettaire indépendantes de la COX1 et de la production de TXA_2 ..... *24*
d. Mécanismes mixtes, dépendant ou pas de la production de TXA_2 ..... *25*

V. ETUDE DE L'EFFET BIOLOGIQUE DE LA PREMIÈRE DOSE DE 300 MG D'ASPIRINE DONNÉE À LA PHASE AIGUE DE L'AVC ISCHÉMIQUE 39

1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE 39
2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 43
a. Objectif principal *43*
b. Objectifs secondaires *43*
3. CRITÈRES D'ÉVALUATION 44
a. Le critère d'évaluation principal *44*
b. Les critères d'évaluation secondaires *45*
4. MÉTHODE 46
a. Inclusion des patients *46*
b. Agregométrie photométrique *48*
c. Mesure des concentrations de TXB_2 ..... *50*
d. Comptage des plaquettes réticulées *50*
e. Analyse statistique *52*
5. RÉSULTATS 54
a. Caractéristiques de la population *54*
b. Résultats biologiques à T0, T1 et T2 ..... *55*
c. Résultats biologiques à T0 avant et après ajout d'aspirine in vitro dans le PRP *56*
d. Résultats biologiques à T2 avant et après ajout d'aspirine in vitro dans le PRP *57*
e. Evolution des paramètres biologiques entre T1 et T2 ..... *58*
f. Evolution des paramètres biologiques entre T0 et T1 ..... *59*
g. Ensemble des comparaisons des paramètres biologiques : T1-T2 et T0-T1 ..... *60*
h. Corrélations entre variations des concentrations sériques de TXB_2 et de l'agrégation *62*
i. Corrélations entre plaquettes réticulées et concentrations sériques de TXB_2 ..... *63*

VI. DISCUSSION 67

VII. UNE AUTRE SITUATION DE DÉFAUT D'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ PLAQUETTAIRE AU DÉCOURS DE L'AVC ISCHÉMIQUE : LA THROMBOCYTÉMIE ESSENTIELLE 99

VIII. CONCLUSION 108

IX. RÉFÉRENCES 109

Annexe 1 : lettres d'information et formulaires de consentement des patients et de leurs représentants.

Annexe 2 : autre travail publié sur le sujet développé.

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique
AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdiens
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
Col2 : Collagène 2µg/mL
Col10 : Collagène 10µg/mL
Col20 : Collagène 20µg/mL
Col2/10 : Rapport Collagène 2µg/mL / Collagène 10µg/mL
Col2/20 : Rapport Collagène 2µg/mL / Collagène 20µg/mL
Cox : Cycloxygénase
GP : Glycoprotéine
IRMc : Imagerie par Résonance Magnétique Cérébrale
PARs : Protease-Activated Receptors
PG : Prostaglandine
PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP : Plasma Riche en Plaquettes
RCS : Rabbit aorta Contracting Substance
TDMc : Tomodensitométrie Cérébrale
TE : Thrombocytémie essentielle
TIH : Thrombopénie Induite à l'Héparine
TX : Thromboxane.
UNV : Unité Neuro-Vasculaire

I. Introduction

L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est actuellement l'une des pathologies les plus fréquentes, et les plus graves que nous connaissons. Ses conséquences, que ce soit à l'échelle individuelle du patient, ou de la collectivité sont dramatiques. Les axes principaux de lutte contre ce fléau sont la prévention primaire, en insistant sur l'éducation et l'enseignement des règles hygiéno-diététiques à la population, la prévention secondaire, débutant dès les premières heures et, enfin, la prise en charge du patient handicapé. La phase aiguë du traitement de l'AVC est certainement la plus importante, et de sa qualité dépendent les chances de survie et de récupération du patient. L'action rapide du thérapeute doit tendre vers une reperméabilisation rapide du vaisseau, et une protection des neurones en cours d'ischémie. Le développement des unités neuro-vasculaires (UNV), l'emploi de thrombolytiques ont bien montré que l'avenir des patients dépend de cette période. Les récidives ischémiques cérébrales, ou dans d'autres territoires artériels peuvent survenir très précocement, et démontrent que la prévention secondaire doit être envisagée le plus rapidement possible après la survenue de l'AVC. Cette prévention passe par l'administration d'aspirine dés confirmation de la nature ischémique de l'accident. Si cette stratégie réduit le risque de récidive, la protection est loin d'être complète. Or, l'effet biologique de cette première dose d'aspirine n'a jamais été étudié. Nous proposons de décrire l'effet sur les plaquettes de la première dose orale de 300 mg d'aspirine donnée à la phase aiguë de l'AVC ischémique. L'effet sera mesuré à 2 temps distincts afin de détecter une récupération de l'activité plaquettaire, avant la seconde dose donnée habituellement 24 heures plus tard. Les patients présentant l'AVC, alors qu'ils étaient déjà traités par une dose quotidienne d'aspirine inférieure à 300mg, seront également inclus pour évaluer l'utilité de la dose orale, donnée en aigu, dans ce cas précis. Cette étude pourrait permettre de comprendre les mécanismes de moindre réponse plaquettaire à l'aspirine qui participeraient aux récidives ischémiques

précoces. D'autres stratégies thérapeutiques pourraient être proposées à cette période cruciale qui conditionne le devenir du patient. Nous nous sommes également intéressés au cas particulier de patients présentant un AVC ischémique dans un contexte de thrombocytémie essentielle (TE), en nous interrogeant sur la meilleure prévention secondaire. Ce type de recherche entre dans le cadre du plan AVC 2010-2014, conduit par la Haute Autorité de Santé, et qui vise à optimiser le traitement des patients victimes d'AVC.

II. L'accident vasculaire cérébral

1. L'état des lieux : une pathologie grave et fréquente

L'AVC peut se définir par une dysfonction du système nerveux central due à une interruption de la circulation sanguine.

Il peut-être ischémique, dans 85 % des cas, du à un embole empêchant la circulation sanguine, ou bien hémorragique, dans 15% des cas, par rupture intra parenchymateuse du vaisseau sanguin, pouvant entraîner une hypertension intracrânienne avec décès rapide du patient.

Il s'agit d'un grave problème de santé publique. Tous les médecins sont confrontés à cette pathologie. L'incidence annuelle estimée, en France, est de 150 000 cas/an. Spontanément, 25% des patients vont rapidement décéder, en faisant la 3ème cause de décès en France, 25% récupèrent de leur déficit sans séquelles, et 50% gardent un déficit définitif, le plaçant à la première place des causes de handicap. Seulement 40% des patients actifs peuvent reprendre, à terme, leur poste de travail. La moitié des patients présentent une dépression dans l'année qui suit, et 25% seront atteints d'une démence vasculaire dans les 5 ans. Les conséquences économiques qui en découlent sont dramatiques : environ 225 000 dollars US pour un premier AVC jusqu'à la mort du patient, en additionnant le coût direct et la perte de productivité **(1-3).**

2. Les solutions proposées

Afin de diminuer l'impact de cette pathologie, des efforts ont été faits à partir des années 90, en s'intéressant plus particulièrement aux soins donnés à la phase aiguë, c'est-à-dire dans les jours, et même dans les premières heures, qui suivent l'accident.

La création d'UNV a permis aux patients d'accéder à une prise en charge neurologique spécialisée, avec un personnel médical et paramédical formé à la pathologie neuro-vasculaire, et au handicap. Ceci a permis de faire régresser la mortalité et la morbidité de 20%, en comparaison au traitement en service de Neurologie générale **(4).**

L'avènement du traitement thrombolytique intra veineux, instauré dans les 4H30 qui suivent les symptômes, permet la reperméabilisation précoce du vaisseau dans l'AVC ischémique. L'étude ECASS III **(5)** montre que ce traitement, adjoint aux mesures d'UNV, permet à prés de 50% des patients traités d'être valides et autonomes après 3 mois. La thrombectomie et la thrombolyse par voie angiographique **(6)** peuvent compléter la voie intra veineuse et élargir la fenêtre thérapeutique jusqu'à 6 heures. Ce traitement concerne actuellement 10 à 15% des patients de l'UNV de Nancy. L'emploi des anti-plaquettaires durant cette phase est une part importante de la stratégie thérapeutique.

3. Emploi des anti-plaquettaires pour le traitement de l'AVC ischémique

L'aspirine est actuellement l'un des traitements les plus utilisés dans la prévention des accidents ischémiques artériels (**7,8**). Une méta analyse (**9**), regroupant plus de 287 essais cliniques, montre que les anti-plaquettaires (la majorité des patients étaient traités par aspirine) réduisent approximativement de 23% le risque relatif d'AVC ischémique, d'infarctus du myocarde et de mort vasculaire pour des patients atteints de maladies cardio- et cérébro-vasculaires. Pour la prévention secondaire au long terme, son action anti-plaquettaire semble surtout utile pour prévenir les emboles d'origine athéromateuse, ou embole d'artère à artère (**10,11**). Les anti-coagulants sont, eux, recommandés dans le cadre des cardiopathies

emboligènes. D'autres anti-plaquettaires peuvent-être utilisés. L'emploi du clopidogrel (**12**) ou de l'association dypiridamole et aspirine (**13**) montre un bénéfice modéré dans la prévention secondaire des évènements ischémiques, en comparaison avec l'aspirine seule. Le bénéfice obtenu par l'association de l'aspirine avec le clopidogrel est contre balancé par la survenue d'accidents hémorragiques (**14**). Cependant, l'aspirine est actuellement le seul anti-plaquettaire utilisé à la phase aiguë de l'AVC ischémique. Trois études se sont intéressées à son action durant cette phase : IST (**15**) et CAST (**16**) durant les 48 heures qui suivent l'évènement et MAST-I (**17**) durant les 6 premières heures, pour des doses de 160 et 300 mg. Ces études regroupent 60 000 patients et montrent que l'administration d'aspirine pendant cette phase permet d'éviter 9 AVC ischémiques et décès pour 1000 patients traités durant le premier mois. Les récidives ischémiques ne sont pas rares, malgré ce traitement, et concerneraient 7% des AIT et des AVC ischémiques mineurs pour les 7 premiers jours et jusqu'à 11% le premier mois (**18**). La dose de 300mg d'aspirine est également donnée, en pratique courante, pour des patients présentant l'AVC ischémique alors qu'ils étaient déjà traités par une dose quotidienne, en général, inférieure. L'utilité de cette pratique n'a jamais été évaluée.

III. L'aspirine

1. Histoire de l'aspirine

Celle-ci commence dans l'antiquité, où les thérapeutes grecques, tels Hippocrate et Galien, se servaient des propriétés analgésiques de certaines plantes, dont l'écorce de saule (**19,20**). Galien fut le premier à décrire les effets anti-pyrétiques et anti-inflammatoires de l'écorce de saule. Ces observations furent confortées par celles des Assyriens et des Egyptiens. Bien que les anciens physiciens n'aient pas les moyens de comprendre comment l'écorce de saule pouvait soulager les patients, elle fut largement prescrite. Dioscoride, médecin au premier siècle de notre ère, utilisait des décoctions de feuilles et d'écorce de saule contre « la

podagre », c'est-à-dire la goutte. Cette connaissance se répandit dans le monde entier, entraînant une confusion entre l'écorce de saule de nos pays, contenant la salicine, et l'écorce d'arbres de pays lointains, ayant un goût voisin avec des propriétés antipyrétiques, contenant la quinine. En 1633, un moine, nommé Calancha, vivant au Pérou, décrivit les soins apportés contre la fièvre par des écorces d'arbre réduites en poudre. Des jésuites l'importèrent en Europe, sous le nom d'écorce du Pérou, et fut utilisée pendant 2 siècles sans que l'on sache qu'il s'agissait des effets de la quinine.

La première description scientifique de l'utilisation médicale de l'écorce de saule fut réalisée par le Reverand Edward Stone en 1763. En traitant 50 patients atteints de paludisme, il montrait que l'écorce de saule blanc avait les mêmes propriétés que l'écorce du Pérou. Ainsi l'écorce du saule blanc succéda à celle du Pérou, plus rare et plus coûteuse. Le développement de la biochimie au 19ème siècle permit à Fontana en 1825 et, à Henri Leroux en 1826, d'isoler la salicine de l'écorce de saule blanc. En 1838, Raffaele Piria prépara l'acide salicylique à partir de la salicine. En 1874, Mac Legan démontrait l'effet anti-pyrétique, analgésique et anti-inflammatoire des salicylates dans le rhumatisme articulaire aigu, mais au prix d'effets indésirables, dont un goût fort désagréable et une très mauvaise tolérance gastrique. La solution fut découverte par un chimiste français, Charles Frederic Gehrardt, qui réalisa l'acétylation du salicylate pour produire l'acide acétylsalicylique (fig 1). Le procédé était, cependant, long et complexe et sa mort, 3 ans plus tard, laissa sa découverte inexploitée.

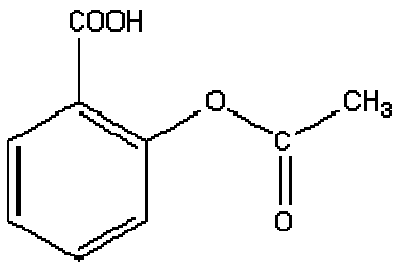


Figure 1 : Formule de l'acide acétylsalicylique

En 1887, 40 ans plus tard, Felix Hoffmann, chimiste allemand, travaillant pour la firme Bayer, désireux de soulager son père, atteint de rhumatisme articulaire et ne supportant plus l'acide salycilique, repris les travaux de Gehrardt et parvint à établir une nouvelle méthode de production de l'acide acétylsalicylique. Il montra qu'il avait les mêmes propriétés que les salicylates. Le nom commercial donné fut « aspirine » : la syllabe « spir » rappelait que l'acide salicylique provenait cette fois, non pas d'écorces de saule, mais de plantes spirées, la lettre « a » rappelait l'acétylation et le suffixe « ine » fut ajouter comme pour la plupart des composés chimiques.





Plante spirée ou Reines des Prés

La firme Bayer ne crut pas de suite aux bienfaits de l'aspirine, préférant développer un nouvel anti-tussif : l'héroïne. Cependant, l'appui d'Arthur Eichengruen, chargé du développement des nouveaux produits chez Bayer, permit à l'aspirine d'être commercialisée en 1899.



Aspirine Bayer

A la fin de la première guerre mondiale, l'aspirine fut très largement prescrite et les enjeux commerciaux furent très importants, à tel point qu'elle fit l'objet de négociations lors du traité de Versailles. Le traité stipula que la marque et le procédé de fabrication appartiendraient au domaine public. En 1919, les alliés obtinrent de la firme Bayer qu'elle leur cède le brevet au titre des dommages de guerre : elle inonde alors la planète.

Le Dr Lawrence L Craven montra dans les années 50 que l'aspirine, prise en doses quotidiennes, réduisait la survenue d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires

cérébraux. Au début des années 60, Harvey J. Weiss posait la question suivante « l'aspirine affecte-t-elle les plaquettes ? ». En 1982, Sir John Vane et Priscilla Piper reçurent le prix Nobel de Médecine pour leurs recherches à propos de substances délivrées par les organes pendant les réactions anaphylactiques. Il s'agissait des prostaglandines (PG) et d'une autre molécule « rabbit aorta contracting substance » (RCS) qui fut nommée par la suite thromboxane (TX) A_2. Ils montrèrent que l'aspirine était capable d'inhiber la production de PG et de RCS. Smith et Willis vérifièrent l'hypothèse chez l'être humain. Roth et al en 1975 (**21**) montrèrent l'acétylation de la cycloxygenase (COX)1 par l'aspirine, avec inhibition irréversible.

2. L'action de l'aspirine

L'aspirine inhibe l'activité des PG H synthases 1 et 2, appelées aussi COX 1 et 2 (**22**) (fig 2). Elle bloque la poche catalytique de la COX en acétylant un résidu sérine 529, empêchant son action sur l'acide arachidonique (AA). L'inhibition de la COX est irréversible (**23,24**). La COX1 est présente de façon constitutive dans les plaquettes. Elle permet, à partir de l'AA, la production de PGH_2, précurseur du TXA_2. Le TXA_2 active les plaquettes, provoque la vasoconstriction et amplifie sa propre production. La COX2 est inductible, trouvée dans les cellules nucléées comme l'endothélium, ou dans les monocytes. Sa présence dans les plaquettes est contreversée. Elle est impliquée dans la synthèse de PG médiatrices de l'inflammation, de PGI_2, induisant une vasodilatation, et de façon moindre, de TXA_2.

L'action inhibitrice de l'aspirine serait beaucoup plus importante pour la COX1 que pour la COX2. L'aspirine est rapidement absorbée dans l'estomac et la partie supérieure de l'intestin. Le pic plasmatique est atteint 30 à 40 minutes après ingestion, pour les formes galéniques standart non « gastro résistantes », et l'inhibition des fonctions plaquettaires est obtenue après 1h (**22**). Sa demie vie est courte (15 à 20 minutes) mais son action à long terme est assurée par le blocage irréversible de la COX. Une dose quotidienne de 75 à 150 mg suffit à

diminuer significativement le risque d'épisode thrombotique artériel en bloquant la COX plaquettaire synthétisée chaque jour. Cependant, une dose plus élevée de 150 à 300 mg est recommandée à la phase aiguë d'un accident thrombotique artériel (**9**).

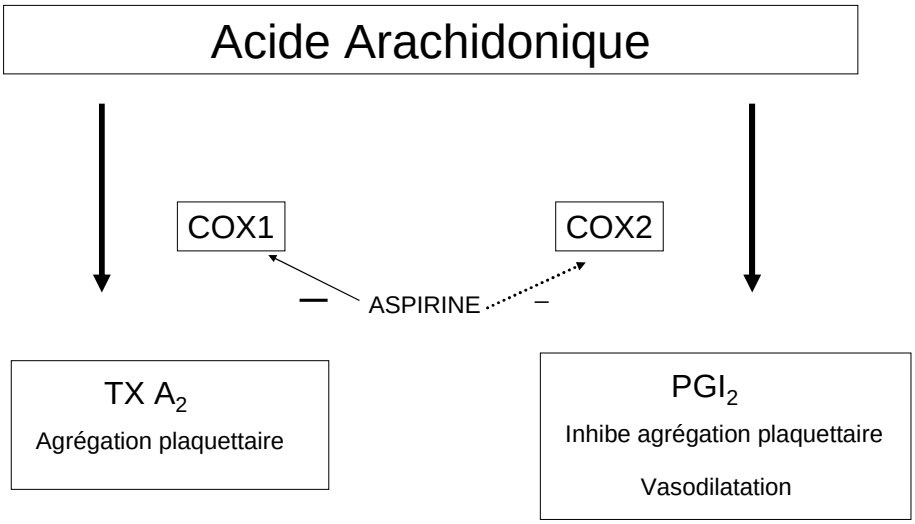


Figure 2 : Synthèse du TXA_2 et mécanisme d'action de l'aspirine.

3. Examens de biologie médicale utilisés pour apprécier la réponse aux anti-plaquettaires

Il n'y a pas de surveillance biologique utilisable en pratique courante pour déterminer l'intensité de l'effet anti-plaquettaire, mais ce retentissement biologique est bien étudié. Ces tests ne sont pas référencés dans la nomenclature des actes de biologie médicale.

L'agrégation photométrique (variation de transmission lumineuse) est un test réalisé dans les laboratoires spécialisés qui permet d'explorer le fonctionnement plaquettaire avec un plasma riche en plaquettes (PRP) anticoagulé avec du citrate puis stimulé par différents agonistes (collagène, ADP, AA…). Les principaux anti-plaquettaires induisent une

thrombopathie caractéristique (**25**). L'aspirine inhibe fortement la réponse à l'AA (fig 3) et l'agrégation dite secondaire (dépendant de la synthèse de TX par les plaquettes activées par l'ADP ou le collagène à faible concentration). La réponse aux fortes concentrations de collagène est préservée, il en est de même quand les plaquettes sont stimulées via leur récepteur à la thrombine.

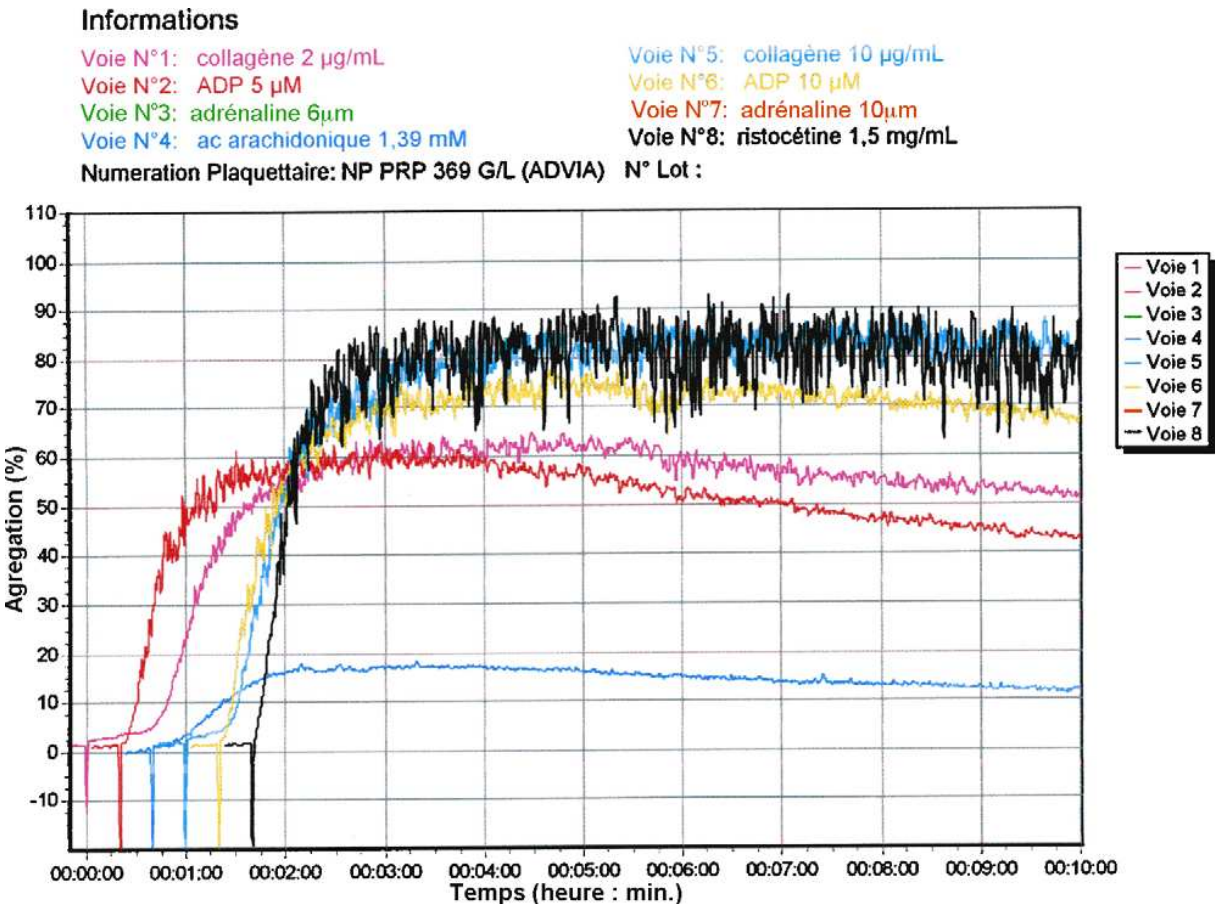


Figure 3 : Profil typique d'agrégation plaquettaire photométrique lors d'un traitement par aspirine. Agrégomètre Soderel medical®.

Plus récemment, un test fondé sur le principe de l'agrégation photométrique, mais réalisé en sang total, et avec une cartouche de réactif spécialement dédiée à la réponse à l'aspirine, a été commercialisé (**VerifyNow®**, Accumetrics) (**26**). Ce test développé pour être réalisé au lit du malade, consiste à quantifier la capacité des plaquettes, après stimulation à l'AA, à se lier à des billes couvertes de fibrinogène. La méthode de détection est basée sur la transmission d'un faisceau lumineux et le résultat est exprimé en ARU (Aspirin Reaction Units) avec un

seuil fixé par le fabricant à 550 ARU, seuil (**27**) au-delà duquel le patient peut être considéré comme mauvais répondeur. Ce test n'explore que la réponse à l'aspirine, sans être spécifique, sur la base de la réactivité à l'AA, effet élémentaire, et ne prend donc pas en compte la réactivité plaquettaire résiduelle.

Parmi les autres tests fonctionnels qui peuvent être utilisés pour apprécier le retentissement biologique de l'aspirine, sont trouvés :

- des tests globaux d'exploration de l'hémostase primaire avec une importante variabilité interindividuelle de sensibilité :

- **temps de saignement *in vivo***

- **PFA-100 *ex vivo*** qui consiste à mesurer avec du sang total, anticoagulé par du citrate, soumis à des contraintes de cisaillement, le temps d'occlusion d'un orifice au centre d'une membrane couverte d'un mélange de collagène/ADP ou de collagène/épinéphrine.

- des tests permettant d'apprécier la réactivité plaquettaire par **cytométrie en flux** : mesure de l'expression membranaire de la P-sélectine notamment, qui est une glycoprotéine peu exprimée lorsque la plaquette est à l'état quiescent, et surexprimée après activation plaquettaire et sécrétion de granules α.

- des tests se proposent de mesurer la réponse à l'aspirine en n'explorant pas la fonctionnalité plaquettaire mais sa capacité résiduelle de synthèse du TXA_2 par dosage de ses métabolites. Le TXA_2 est un composé très instable et rapidement métabolisé.

- **mesure du TXB_2** dans le sérum après stimulation maximale *in vitro* des plaquettes par la thrombine lors de la coagulation du sang total.

- **mesure du 11-déhydro TXB_2 urinaire** reflétant l'ensemble du TX généré *in vivo*, cependant, quelle qu'en soit les sources (plaquettaires et extra-plaquettaires).

IV. Variabilité de réponse à l'aspirine

1. Définition

Helgason et al (**28,29**) ont fait naître le concept, dans le domaine neuro-vasculaire, de « résistance à l'aspirine » montrant des variabilités de réponse plaquettaire, mesurée par agrégométrie photométrique, en fonction de la dose et de la durée de prescription. Puis d'autres travaux ont tenté de démontrer qu'une mauvaise réponse plaquettaire à l'aspirine, mesurée par des examens biologiques *ex vivo*, est associée à un risque important de survenue d'un épisode thrombotique artériel. Cependant, les tests utilisés sont différents entre les études. Dans une population de patients traités par une dose quotidienne d'aspirine, en prévention secondaire de l'AVC ischémique, Grotemeyer et al (**30**) détectaient, sur un suivi de 2 ans, 40 % de récidives thrombotiques artérielles en cas de mauvaise réponse plaquettaire biologique, contre 4 % en cas de bonne réponse. En utilisant l'agrégométrie photométrique pour définir la réponse plaquettaire, Gum et al (**31**) trouvaient 24 % de récidives cliniques dans un groupe de patients avec mauvaise réponse, contre 10 % dans un groupe avec une bonne réponse. Eikelboom et al (**32**) montraient, pour une population traitée quotidiennement par aspirine en prévention secondaire d'un évènement cardio-vasculaire, que l'élimination urinaire de 11 déhydro TXB_2 était un facteur prédictif de survenue d'infarctus du myocarde et de mort cardio-vasculaire. Grundmann et al (**33**) trouvaient 34 % de patients avec une mauvaise réponse plaquettaire à l'aspirine, mesurée par PFA 100, dans une population de patients venant de présenter un AVC ischémique. Plus récemment, Gengo et al (**34**) mesuraient, par agrégométrie photométrique, la réponse plaquettaire à l'aspirine d'une population de patients traités, depuis au moins 2 semaines, suite à un AVC ischémique. Parmi ceux qui avaient présenté une récidive, 66% avaient une mauvaise réponse biologique. Le concept de résistance à l'aspirine reste donc très imprécis. Elle inclue à la fois des épisodes thrombotiques artériels chez des patients traités par aspirine, et des variabilités de réponse

plaquettaire à l'aspirine mesurées par différents examens biologiques *ex vivo* différents. Pour les études citées, la définition de « la résistance biologique » est très variable rendant ainsi les méta-analyses difficiles : une seule a été réalisée (**35**) montrant une association positive entre les évènements cliniques et les résultats des tests biologiques.

2. Les différents types de mécanisme de moindre réponse plaquettaire à l'aspirine

Plusieurs types de moindre réponse à l'aspirine sont différenciés (**36**) :

a. **pharmacocinétique** : L'aspirine n'atteint pas la COX1 et ne peut donc pas l'inhiber. Tout mécanisme qui empêche l'aspirine d'atteindre sa cible, de l'absorption jusqu'au site actif de la COX1, est considéré comme une interaction pharmacocinétique. Différents mécanismes sont possibles : le défaut d'absorption des formes gastro-résistantes ou un blocage réversible du site actif de la COX1 par un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) (**24**).

b. **pharmacodynamique dépendante du TXA_2** : L'aspirine ne parvient pas à affecter suffisamment la production de TXA_2 pour inhiber l'agrégation (**37**). La COX1 pourrait être plus ou moins sensible à l'aspirine, en dehors de toute interaction pharmacocinétique, car étant, par exemple, mutée ou existante sous plusieurs isoformes (**38**). Si la COX1 est bien inhibée par l'aspirine, il existe d'autres moyens de production de TXA_2, comme la COX2, qui est moins sensible à l'aspirine.

c. **pharmacodynamique indépendante du TXA_2** : L'aspirine inhibe bien la production de TXA_2 via le blocage de COX1. Cependant, l'agrégation est activée par d'autres médiateurs, comme les isoprostanes, l'ADP ou la thrombine. La stimulation peut être assez forte pour que l'agrégation ne soit pas affectée par le blocage de la synthèse de TXA_2.

3. Description des différents mécanismes possibles pour chaque type de variabilité de réponse plaquettaire

a. Mécanismes pharmacocinétiques

Il s'agit du plus fréquent (**36**). Le défaut d'observance du traitement est la première cause à évoquer. La diminution de l'absorption digestive peut être incriminée, Alberts et al (**39**) ont montré une réponse plaquettaire, mesurée par le PFA 100, moindre pour les formes « gastro-résistantes » d'aspirine. Ces formes sont prescrites pour diminuer la toxicité gastrique de l'aspirine, cependant, l'absorption a lieu dans l'intestin où le pH est plus élevé que dans l'estomac. L'aspirine est alors inactivée par désacétylation et moins soluble, donc moins absorbée. Le poids par augmentation du volume de distribution peut être un facteur de moindre réponse (**40**). La prise d'aspirine doit être quotidienne afin de prendre en compte le renouvellement plaquettaire (**41**). La prise concomitante d'AINS peut gêner l'action de l'aspirine sur la COX : Catella-Lawson et al (**24**) ont montré qu'une dose d'ibuprofène, administrée avant l'aspirine, inhibe son action sur l'agrégation plaquettaire. Ces données sont confortées par Kurth et al (**42**) et Hudson et al (**43**) : l'ibuprofène diminue l'effet protecteur de l'aspirine contre l'infarctus du myocarde. Il provoque une inhibition compétitive de la COX1 sur le même site que l'aspirine mais le blocage, contrairement à l'aspirine, est réversible. De ce fait, l'ibuprofène bloque temporairement l'accès de la COX1 à l'aspirine. L'aspirine, ayant une demie vie très courte, n'est plus présente dans la circulation quand le site actif de la COX1 est libéré par l'AINS. L'une des solutions serait de prendre l'aspirine au moins 2 heures avant l'AINS.

b. Mécanismes pharmacodynamiques dépendant de la production de TXA_2

Certains agissent en diminuant la sensibilité de la COX 1 à l'aspirine et représentent de vrais mécanismes de moindre réponse. Le polymorphisme du gène de la COX1 a souvent été

étudié, dans l'hypothèse d'une moindre réponse due à une modification du site actif de l'enzyme. Cependant les données de la littérature sont contradictoires. Hillarp et al (**44**) ont séquencé le gène de la COX1 de 68 patients venant de présenter un AVC ischémique malgré un traitement par aspirine, et ont réalisé une agrégométrie photométrique avec le PRP de ces patients. Si 14 variants furent identifiés, aucun ne semblait lié à une modification de l'agrégabilité plaquettaire. L'unique sujet étudié par Fontana et al (**45**) montrant une « vraie résistance » n'avait pas de mutation de COX1. Cependant, Faraday et al (**46**) ont montré un possible lien héréditaire concernant la réponse plaquettaire à l'aspirine, en étudiant 517 familles avec une atteinte coronaire chez des sujets jeunes. Maree et al (**47**) et Lepäntalo et al (**38**) ont étudié l'agrégation plaquettaire chez des sujets avec une maladie cardio-vasculaire stable, et avec une dose quotidienne d'aspirine. Les variations du gène de la COX1 semblent moduler la réponse plaquettaire à l'aspirine. Cependant, l'effectif de Lepäntalo et al est réduit, ne s'appuyant que sur 5 patients avec une mauvaise réponse biologique à l'aspirine, et ces 2 études ne montrent aucune corrélation avec des évènements cliniques. Enfin, Halushka et al (**48**) ont montré qu'un polymorphisme du gène de la COX1 pourrait, cette fois, augmenter la sensibilité de l'enzyme à l'aspirine.

D'autres mécanismes agissent en produisant du TXA_2 par d'autres sources que la COX1 :

La COX2 est une enzyme inductible, trouvée dans les cellules nucléées dont les macrophages, les monocytes et les cellules endothéliales. Elle est induite par des stimuli inflammatoires. Elle peut conduire à la formation de PGH_2, de leucotriènes et d'isoprostanes. Les PGH2 sont des précurseurs du TXA_2. Les plaquettes, privées de l'action de COX1 par l'aspirine, pourront cependant produire du TXA_2 grâce à la synthèse de PGH2 par la COX2 (**49-51**). Ainsi, la COX2 agit en permettant la production de TXA_2 malgré l'inhibition de la COX1 et synthétise d'autres composés favorisant l'agrégation plaquettaire. Son action délétère dans l'ischémie

cérébrale a également été montrée (**52**). Les mutations du gène de la COX2 ont également été incriminées (**53**).

c. Voies d'activation plaquettaire indépendantes de la COX1 et de la production de TXA_2

Il ne s'agit pas de cibles de l'aspirine et ne peuvent donc pas être qualifiées de vrais mécanismes de moindre réponse (fig 4). La sécrétion de catécholamines, favorisée par l'exercice physique, peut être responsable d'une augmentation de l'activité plaquettaire (**54-56**). Les catécholamines favorisent la libération d'ADP et son action sur l'agrégation ainsi que celle de la thrombine. Ces voies étant indépendantes de celle de la COX1, l'aspirine est inefficace pour les inhiber.

Les isoprostanes sont des isomères des PG D, E, F. (fig 5). Ils naissent de l'oxydation des lipides membranaires, comme l'AA, par une voie indépendante des COX (**57**). Ces composés induisent une vasoconstriction et une augmentation de l'agrégabilité plaquettaire via les récepteurs du TXA_2 (**58,59**). Leur production peut être favorisée par le stress, le diabète, le tabac, l'hypercholestérolémie, l'hyperhomocystéinémie et le vieillissement. Des leucotriènes pourraient avoir la même action (**60**).

L'interaction des plaquettes avec d'autres cellules peut favoriser leur activation.

L'ajout d'érythrocytes dans le PRP de patients sous aspirine, accentue l'agrégation plaquettaire par le collagène, donc par des phénomènes TXA_2 indépendants (**61-63**). Leur action est certainement multiple, car leur présence avec les plaquettes augmente les concentrations de thromboglobuline, d'ADP, de TXA_2 (**64**) et de P-selectines qui contribuent à l'interaction entre les plaquettes (**65**).

Les leucocytes peuvent se lier également aux plaquettes et favoriser l'agrégation. Des complexes leucocytes/plaquettes sont trouvés de façon plus importante à la phase aiguë et à la

convalescence de l'AVC ischémique et dans l'ischémie des membres inférieurs (**66**). Les plaquettes peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires et attirer des leucocytes sur le site d'agrégation (**67,68**).

d. Mécanismes mixtes, dépendant ou pas de la production de TXA_2

Des facteurs de risque cardio-vasculaires peuvent être associés à une moins bonne réponse plaquettaire à l'aspirine (**69**) : L'hypertension artérielle (**70**), le tabagisme (**71,72**), l'hypercholestérolémie totale et le LDL cholesterol (**73-75**). L'implication du sexe masculin reste discutée (**76**). La réponse plaquettaire à l'aspirine est moins bonne pour les patients diabétiques (**77**) : Watala et al (**78**) ont montré une bonne inhibition plaquettaire, *ex vivo*, par l'aspirine pour 69% d'un groupe de sujets sains contre seulement 29% d'un groupe de sujets atteints d'un diabète de type 2. Cette mauvaise réponse est surtout observée pour des concentrations élevées d'hémoglobine glyquée, de cholesterol total, des concentrations basses de HDL cholesterol et pour les sujets jeunes, pour qui le renouvellement plaquettaire est plus important. Les plaquettes du sujet diabétique sont plus grandes, avec une meilleure réactivité aux agonistes de l'agrégation, et ont plus de gycoprotéines (GP) IIb/IIIa (**77,78**). Il existerait une compétition entre l'acétylation des protéines plaquettaires par l'aspirine et la gycosylation due à l'hyperglycémie (**78**). La COX1 serait donc rendue moins sensible à l'acétylation de l'aspirine par phénomène de glycosylation. Des études *in vitro* montrent que l'augmentation des concentrations d'aspirine peut permettre de favoriser son action d'acétylation (**79**). Enfin, l'hyperglycémie peut être responsable de la production de TX et d'isoprostanes (**80**).

Pharmacocinétiques.	**Pharmacodynamiques TXA_2 dépendants.**	**Pharmacodynamiques TXA_2 indépendants.**
Défaut de compliance.* Défaut d'absorption. Formes gastro-résistantes.* Volume de distribution. Interactions médicamenteuses : AINS.*	Mutation de COX1. Synthèse de PGH_2 par COX2.* Diabète : glycosylation de la COX1. Renouvellement plaquettaire.	Secrétions de catécholamines et ADP et activation des récepteurs P2. Activation des récepteurs PARs par la thrombine. Isoprostanes.* Interactions des plaquettes avec érythrocytes et leucocytes. Diabète : plaquettes de plus grande taille avec plus de GP IIb/IIIa et production isoprostanes.

* : causes démontrées.

Tableau 1 : Classification des mécanismes de variabilité de réponse plaquettaire à l'aspirine.

Les différentes voies d'activation plaquettaire.

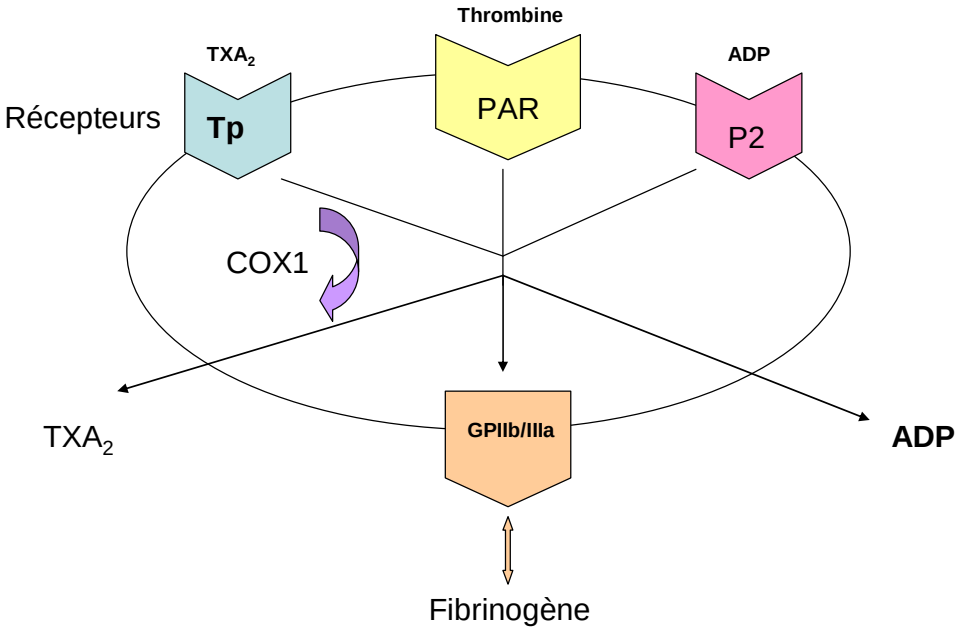


Figure 4 : l'activation plaquettaire peut-être réalisée par la liaison d'agonistes avec leurs récepteurs respectifs entraînant la libération de TXA_2, d'ADP et la liaison des récepteurs GP II_b-III_a avec le fibrinogène.

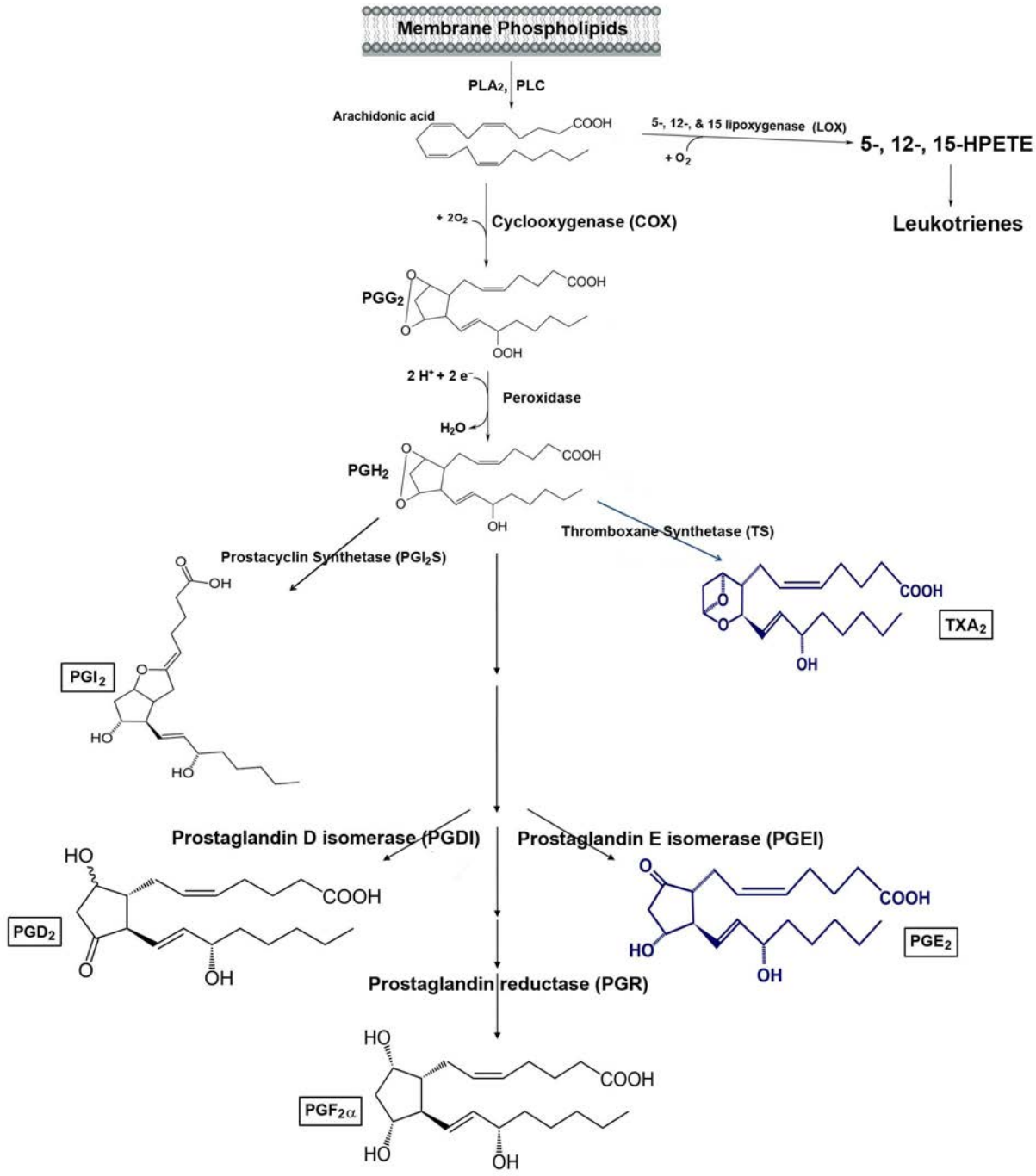


Figure 5 : représentation schématique des différentes voies de métabolisme de l'AA. (Figure extraite de Ting et al, Journal of Biomedical Science 2010).
L'AA est libéré de la membrane phospholipidique par les phospholipases A et C. Il est métabolisé ensuite par les COX pour donner naissance au TXA_2, vasoconstricteur et activateur plaquettaire, et aux PGI , inhibitrices plaquettaires et vasodilatatrices. Des voies annexes peuvent synthétiser des PGD, E et F, appelées isoprostanes capables de se lier aux récepteurs Tp.

Journal des Maladies Vasculaires (2009) 34, 16–25

Disponible en ligne sur ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

MISE AU POINT

Variabilité de réponse plaquettaire à l'aspirine et nouvelles cibles thérapeutiques☆

Variable platelet response to aspirin and new therapeutic targets

S. Richard[a,b], M. Toussaint-Hacquard[a,c], T. Lecompte[a,c,*]

[a] *Inserm U734 « nouvelles approches antithrombotiques », faculté de médecine, université de Nancy, CHU de Nancy, Nancy, France*
[b] *Service de neurologie, hôpital Central, CHU de Nancy, 29, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, CO 34, 54035 Nancy cedex, France*
[c] *Service d'hématologie biologique—hémostase médicale, hôpitaux de Brabois, CHU de Nancy, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France*

Reçu le 20 octobre 2008 ; accepté le 30 octobre 2008
Disponible sur Internet le 24 décembre 2008

MOTS CLÉS
Antiplaquettaire ;
Aspirine ;
Résistance ;
Tests de laboratoire ;
Nouveaux antithrombotiques

Résumé L'aspirine, traitement préventif de première intention des événements thrombotiques artériels, inhibe irréversiblement la cyclooxygénase (COX) 1, isoforme prédominante dans les plaquettes, impliquée, au sein d'une voie d'amplification, dans la production de thromboxane (TX) A_2, vasoconstricteur et activateur plaquettaire. Les récidives ischémiques malgré cette thérapeutique ne sont pas rares et ont fait naître la notion de « résistance à l'aspirine » lorsque les premières études de laboratoire ont suggéré la possibilité d'un effet réduit du traitement. Pour clarifier, le terme de résistance (vraie) devrait être réservé aux cas où la COX1 n'est pas inhibée ex vivo et ne peut être inhibée in vitro pour des raisons intrinsèquement plaquettaires (ce qui n'a jamais été rapporté). Une inhibition de COX1 est qualifiée d'insuffisante en l'absence de modification du comportement plaquettaire TX-dépendant. Les récepteurs au TX peuvent être aussi stimulés par des agonistes dont la production est indépendante de COX1. Les mécanismes de réponse insuffisante sont pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques ; les seconds dépendent ou non du TX. Ce dernier cas correspond à une part anormalement élevée de comportement plaquettaire qui ne dépend pas de la stimulation des récepteurs au TX. Ce comportement ne peut être affecté ni par aspirine, ni par aucun autre médicament agissant sur cette voie. Une bonne compréhension des mécanismes est indispensable et doit aider notamment à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.
© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

☆ Communication présentée au 42e congrès du Collège français de pathologie vasculaire, Paris, 12 mars 2008.

* Auteur correspondant.
Adresses e-mail : s.richard@chu-nancy.fr (S. Richard), m.toussaint-hacquard@chu-nancy.fr (M. Toussaint-Hacquard), thomas.lecompte@chu-nancy.fr (T. Lecompte).
0398-0499/$ - see front matter © 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.jmv.2008.10.009

KEYWORDS
Antiplatelet drugs;
Aspirin;
Resistance;
Laboratory tests;
Newer antithrombotic drugs

Summary Aspirin is the first-line oral antiplatelet drug to prevent thromboembolic arterial occlusions. Aspirin irreversibly inhibits cyclooxygenase (COX) 1 involved in the platelet production of thromboxane (TX) A_2, an inducer of vasoconstriction and a platelet activating agent. Recurrent vascular events despite aspirin intake, combined with laboratory evidence of poor antiplatelet effect, suggested what has been called "aspirin resistance". For clarity's sake a real aspirin resistance would be the absence of COX1 inhibition due to intrinsic platelet factors (which has never been reported). What has been described is (expected) variability. COX1 inhibition can be insufficient to modify TX-dependent platelet behaviour. Other agonists, the production of which does not involve COX1, can stimulate TX-receptors. The antiplatelet effect of aspirin can be insufficient for pharmacokinetic or pharmacodynamic reasons, the latter being further classified as TX-dependent or not. If platelets are so reactive that responses are more TX-independent than normally, then neither aspirin nor any drugs acting on this pathway can do the job. These mechanisms should be better understood and diagnosed, and this is the prerequisite for the development of newer antiplatelet agents.
© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

L'aspirine est actuellement le traitement per os de première ligne pour la prévention des accidents ischémiques artériels [1,2]. Une méta-analyse [3], regroupant plus de 280 essais cliniques, montre que les antiplaquettaires (la grande majorité des patients dans le groupe à l'étude contre placebo étaient traités par aspirine) réduisent approximativement de 23 % le risque relatif d'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, d'infarctus du myocarde et de mort vasculaire pour des patients atteints de maladies cardio- et cérébrovasculaires. La survenue d'épisodes thrombotiques artériels chez des patients déjà traités par aspirine n'est donc pas rare et a fait naître la notion de « résistance à l'aspirine » lorsque les premières études de laboratoire ont suggéré la possibilité d'un effet réduit du traitement.

Ce concept s'est clarifié : les échecs cliniques sont des épisodes thrombotiques artériels chez des patients déjà traités par aspirine ; la résistance biologique est l'extrême, rare, d'un spectre de variabilité de réponse plaquettaire biologique à l'aspirine mis en évidence ex vivo par différents types de tests. Fait capital, la corrélation entre les événements cliniques et les résultats des tests de laboratoire est fortement suggérée mais pas totalement démontrée. La compréhension des mécanismes de résistance à l'aspirine pourra conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques d'inhibition du fonctionnement plaquettaire.

L'action de l'aspirine

L'aspirine inhibe l'activité des prostaglandines (PG) H synthases 1 et 2, appelées aussi cyclooxygénases (COX) 1 et 2 [4]. Elle bloque la poche catalytique de la COX en acétylant un résidu sérine 529, empêchant son action sur l'acide arachidonique. L'inhibition de la COX est irréversible [5,6]. La COX1 est présente de façon constitutive dans les plaquettes. Elle permet, à partir de l'acide arachidonique, la production de PGH_2, précurseur du thromboxane (TX) A_2. Le TXA_2 active les plaquettes, amplifie sa propre production et provoque la vasoconstriction ; c'est un système d'amplification de l'activation plaquettaire. La COX2 est inductible et trouvée dans les cellules nucléées comme l'endothélium ou dans les monocytes. Sa présence dans les plaquettes est controversée. Elle est impliquée dans la synthèse de PG médiatrices de l'inflammation, de PGI_2, induisant une vasodilatation, et de façon moindre, de TXA_2. L'action inhibitrice de l'aspirine paraît beaucoup plus importante pour la COX1 que pour la COX2.

L'aspirine est rapidement absorbée dans l'estomac et la partie supérieure de l'intestin pour une forme galénique standard, a fortiori comme sel de lysine très soluble dans l'eau. Le pic plasmatique est atteint 30 à 40 minutes après ingestion et l'inhibition des fonctions plaquettaires est obtenue après une heure [4]. Sa demi-vie est courte (15 à 20 minutes) mais son action à long terme est assurée par le blocage irréversible de la COX. Une dose quotidienne de 75 à 160 mg suffit à diminuer significativement le risque d'épisode thrombotique artériel en bloquant la COX des plaquettes mises en circulation chaque jour. Une dose initiale de 160 à 300 mg est recommandée à la phase aiguë d'un accident thrombotique artériel [3].

Tests de laboratoire utilisés pour apprécier la réponse biologique aux antiplaquettaires

Il n'y a pas de surveillance biologique utilisable en pratique courante pour déterminer l'intensité de l'effet antiplaquettaire, mais ce retentissement biologique est bien étudié. Ces tests ne sont pas référencés dans la nomenclature des actes de biologie médicale.

« L'agrégation photométrique » (variation de transmission lumineuse) est un test réalisé dans les laboratoires spécialisés qui permet d'explorer le fonctionnement plaquettaire avec un plasma riche en plaquettes (PRP) anticoagulé avec du citrate puis stimulé par différents agonistes (collagène, ADP...) ou mis en présence d'acide arachidonique, précurseur du TX. Les principaux antiplaquettaires induisent une thrombopathie caractéristique [7]. L'aspirine inhibe fortement la réponse à l'acide arachidonique (Fig. 1) et l'agrégation dite secondaire (dépendant de la synthèse de TX par les plaquettes activées par l'ADP ou le collagène ou la thrombine à faible concentration). La réponse aux fortes

concentrations de collagène est préservée ; il en est de même de la réponse des plaquettes stimulées puissamment via leur récepteur à la thrombine. C'est la méthode ancienne la plus utilisée dans les études et dans le développement des médicaments antiplaquettaires.

Récemment, un test réalisé en sang total et avec une cartouche de réactif spécialement dédiée à la réponse à l'aspirine a été commercialisé (VerifyNow®, Accumetrics) ; il a été conçu pour être réalisé au lit du malade [8]. Ce test consiste à quantifier la capacité des plaquettes, après incubation avec de l'acide arachidonique, à se lier à des billes couvertes de fibrinogène. La méthode de détection repose sur la transmission d'un faisceau lumineux et le résultat est exprimé en Aspirin Reaction Units (ARU) avec un seuil fixé par le fabricant à 550 ARU, seuil [9] au-delà duquel le patient peut être considéré comme mauvais répondeur. Ce test n'explore que la réponse à l'aspirine, sur la base de la réactivité à l'acide arachidonique, effet élémentaire.

Parmi les autres tests fonctionnels qui peuvent être utilisés pour apprécier le retentissement biologique de l'aspirine, sont trouvés :

- des tests globaux d'exploration de l'hémostase primaire avec une importante variabilité interindividuelle avant et après aspirine :
  - « temps de saignement in vivo »,
  - « PFA-100 ex vivo » qui consiste à mesurer avec du sang total, anticoagulé par du citrate, soumis à des contraintes de cisaillement, le temps d'occlusion d'un orifice au centre d'une cartouche couverte d'un mélange de collagène/ADP ou de collagène/adrénaline ;
- des tests permettant d'apprécier la réactivité plaquettaire par « cytométrie en flux » : mesure de l'expression membranaire de la P-sélectine notamment qui est une glycoprotéine (GP) peu exprimée lorsque la plaquette est à l'état quiescent et surexprimée après activation plaquettaire et sécrétion de granules α ;
- des tests se proposant de mesurer la réponse à l'aspirine en n'explorant pas la fonctionnalité plaquettaire proprement dite mais sa capacité résiduelle de synthèse du TXA_2 par dosage de ses métabolites. Le TXA_2 est un composé très instable et rapidement métabolisé :
  - « dosage du TXB_2 dans le sérum » après stimulation maximale in vitro des plaquettes par la thrombine lors de la coagulation du sang total,
  - « dosage du 11-déhydro TXB_2 urinaire » reflétant l'ensemble du TX généré in vivo, quelle qu'en soit la source (plaquettaire et extraplaquettaire) toutefois.

Notion de « résistance à l'aspirine »

Helgason et al. [10,11] ont fait naître le concept, dans le domaine neurovasculaire, de « résistance à l'aspirine » montrant des variabilités de réponse plaquettaire, mesurées par agrégométrie photométrique, en fonction de la dose et de la durée de prescription. Puis d'autres travaux ont tenté de démontrer qu'une mauvaise réponse plaquettaire à l'aspirine, mesurée par des tests biologiques ex vivo, est associée à un risque important de survenue d'un épisode thrombotique artériel. Cependant, les tests utilisés sont différents selon les études. Dans une population de patients traités par une dose quotidienne d'aspirine, en prévention secondaire de l'AVC ischémique, Grotemeyer

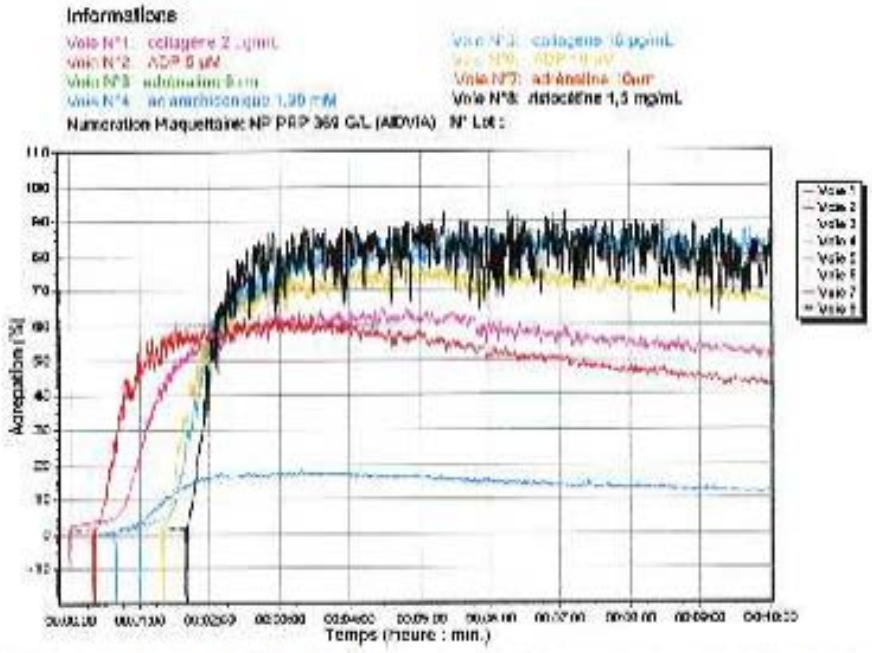


Figure 1 Profil typique d'agrégation plaquettaire photométrique lors d'un traitement par aspirine. Agrégomètre Soderel Medical®.
Typical photometric pattern of platelet aggregation in a patient taking aspirin. Agregometer Soderel Medical®.

et al. [12] comptaient, avec un suivi de deux ans, 40 % de récidives thrombotiques artérielles en cas de mauvaise réponse plaquettaire biologique contre 4 % en cas de bonne réponse. En utilisant l'agrégométrie photométrique pour mesurer la réponse plaquettaire, Gum et al. [13] trouvaient 24 % de récidives dans un groupe de patients avec mauvaise réponse contre 10 % dans un groupe avec une bonne réponse. Eikelboom et al. [14] montraient, pour une population traitée quotidiennement par aspirine en prévention secondaire d'un événement cardiovasculaire, que l'élimination urinaire de 11-déhydro-TxB_2 était un facteur prédictif de survenue d'infarctus du myocarde et de mort cardiovasculaire. Grundmann et al. [15] trouvaient 34 % de patients avec une mauvaise réponse plaquettaire à l'aspirine, mesurée par PFA 100, dans une population de patients venant de présenter un AVC ischémique. Plus récemment, Gengo et al. [16] trouvaient 66 % de patients avec une mauvaise réponse plaquettaire, mesurée par agrégométrie photométrique, alors qu'ils venaient de présenter une récidive d'AVC ischémique malgré un traitement quotidien par aspirine. Le concept de résistance à l'aspirine reste donc très imprécis. Il inclut à la fois des épisodes thrombotiques artériels chez des patients traités par aspirine et des variabilités de réponse plaquettaire à l'aspirine mesurées par des tests biologiques ex vivo différents. Pour les études citées, la définition de la résistance biologique est très variable rendant ainsi les méta-analyses difficiles, certaines montrant une association positive entre les événements cliniques et les résultats des tests de laboratoire [17].

Les différents mécanismes de moindre réponse plaquettaire à l'aspirine (Tableau 1)

Plusieurs mécanismes, hypothétiques ou bien établis, d'atténuation de l'effet antiplaquettaire de l'aspirine (si le médicament est bien pris) doivent être différenciés [18] :

- pharmacocinétique : l'aspirine n'atteint pas la COX1 et ne peut donc pas l'inhiber. Tout facteur qui empêche l'aspirine d'atteindre sa cible, de l'absorption jusqu'au site actif de la COX1, constitue une altération pharmacocinétique. Différents cas de figure sont possibles : défaut d'absorption avec les formes gastrorésistantes ou blocage réversible du site actif de la COX1 par un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) – interaction pharmacocinétique négative [6] ;
- pharmacodynamique impliquant le système du TXA_2 : l'aspirine ne parvient pas à affecter suffisamment la production de TXA_2 pour inhiber les réponses fonctionnelles dont l'agrégation dépendante du système du TXA_2 [19]. Le cas extrême est que la COX1 est insensible à l'aspirine, en dehors de toute interaction pharmacocinétique, car elle pourrait, par exemple, être mutée [20]. La COX1 peut être bien inhibée par l'aspirine, mais il existe d'autres sources de TXA_2 – des voies métaboliques impliquant la COX2 ou d'autres agonistes du récepteur pour le TXA_2 comme des isoprostanes ;
- pharmacodynamique indépendant de la voie d'amplification du TXA_2 : l'aspirine inhibe bien la production de TXA_2. La stimulation par l'ADP, le collagène ou la thrombine peut être assez forte pour que l'agrégation ne soit pas affectée par le blocage de la synthèse de TXA_2. Les plaquettes des malades peuvent être anormalement réactives et la part des réponses indépendantes de l'amplification de l'activation par le TXA_2 est alors accrue.

Vraie résistance et pseudorésistance

Fontana et al. [21] ont étudié l'effet d'une dose quotidienne de 100 mg d'aspirine chez 96 volontaires sains en mesurant les concentrations sériques de TxB_2 et l'agrégation plaquettaire par agrégométrie photométrique, PFA 100 et VerifyNow®. Ainsi, ils considèrent comme une « vraie résistance » à l'aspirine un défaut d'inhibition d'agrégation plaquettaire avec une concentration élevée de TxB_2. L'aspirine, dans ce cas, ne semble pas agir sur sa cible : la COX1 (Fig. 2a et b). Cette résistance est décrite chez un seul sujet. Dans ce cas il n'a pas été mis en évidence de mutation de la COX1 et la présence d'un facteur sanguin extraplaquettaire, empêchant l'action de l'aspirine, a été suggérée. Cependant, pour ce sujet, l'augmentation des doses d'aspirine réussit à vaincre la résistance. L'insensibilité de la COX1 n'est pas totale et la « vraie résistance » du sujet est donc discutable. Ils définissent une « pseudorésistance » à l'aspirine par un défaut d'inhibition plaquettaire mais avec une concentration abaissée de TxB_2. L'aspirine agit bien sur la COX1 et inhibe la production de TXA_2, mais d'autres voies viennent stimuler l'agrégation plaquettaire (Fig. 2c). Ce cas concerne 28 sujets.

Une vraie résistance ne devrait se définir que par l'absence totale d'action de l'aspirine sur la COX1, donc n'affectant absolument pas la concentration de TXA_2. En conditions expérimentales in vitro, la réponse plaquettaire à l'aspirine est nulle. Cela pourrait être décrit, par exemple, pour des mutations du site d'acétylation de COX1. En revanche, en cas d'hyperactivité plaquettaire, l'aspirine peut diminuer des concentrations basales élevées de TXA_2, mais de façon insuffisante pour inhiber efficacement l'agrégation. Dans ce cas, l'aspirine agit bien sur sa cible et la réponse plaquettaire existe. Une production de TXA_2 via la COX2 peut donner ce type de réponse à l'aspirine. Ces deux types de moindre réponse sont donc très différents de par leurs mécanismes, leur fréquence et certainement de par les solutions qui pourront être proposées.

Description des différents mécanismes possibles pour chaque type de variabilité de réponse plaquettaire

Le mécanisme le plus fréquent est certainement pharmacocinétique [18].

Le défaut d'observance du traitement est la première cause à évoquer. La diminution de l'absorption digestive peut être incriminée, Alberts et al. [22] ont montré une réponse plaquettaire, mesurée par le PFA 100, moindre pour les formes gastrorésistantes. Ces formes sont prescrites pour diminuer la toxicité gastrique de l'aspirine, cependant, l'absorption a lieu dans l'intestin où le pH est plus élevé que dans l'estomac. L'aspirine est alors inactivée par

Tableau 1 Classification des mécanismes de variabilité de réponse plaquettaire à l'aspirine.
Classification of mechanisms of variable platelet response to aspirin.

Pharmacocinétiques	Pharmacodynamiques TXA_2 dépendants	Pharmacodynamiques TXA_2 indépendants
Défaut de compliance*	Mutation de COX1	Sécrétions de catécholamines et ADP et activation des récepteurs P2
Défaut d'absorption Formes gastrorésistantes*	Synthèse de PGH_2 par COX2*	
Volume de distribution	Diabète : glycosylation de la COX1	Activation des récepteurs PAR par la thrombine
Interactions médicamenteuses : AINS*	Renouvellement plaquettaire	Isoprostanes* Interactions des plaquettes avec érythrocytes et leucocytes Diabète : plaquettes de plus grande taille avec plus de GP IIb/IIIa et production isoprostanes

* Causes démontrées.

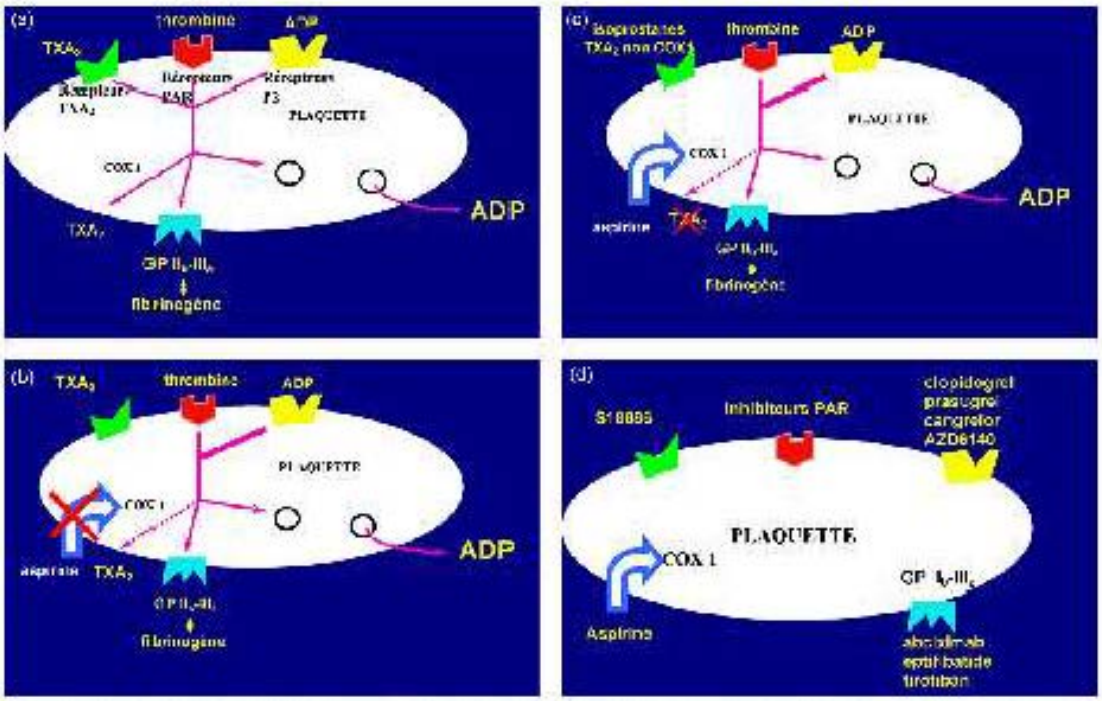


Figure 2 a : les différentes voies d'activation plaquettaire et mécanismes de l'agrégation. L'activation plaquettaire peut être réalisée par la liaison d'agonistes avec leurs récepteurs respectifs entraînant la libération de TXA_2, d'ADP et la liaison des récepteurs GP IIb/IIIa avec le fibrinogène ; b : ce que peut être une résistance vraie à l'aspirine. L'aspirine est incapable d'inhiber la COX1 et de diminuer la synthèse de TXA_2 ; c : pseudorésistance à l'aspirine. L'aspirine inhibe bien la COX1 mais la stimulation par d'autres agonistes est suffisamment forte pour que l'activation plaquettaire ne soit pas affectée par l'inhibition de la synthèse de TXA_2 ; d : les différentes cibles d'inhibition de l'activité plaquettaire. Chaque récepteur entraînant une activation plaquettaire (récepteurs pour le TXA_2, la thrombine, l'ADP), via sa liaison avec un agoniste, représente une cible thérapeutique d'inhibition de l'activation plaquettaire. Les inhibiteurs des GP IIb/IIIa empêchent la liaison des plaquettes avec le fibrogène.

a: pathways of platelet activation and mechanisms of aggregation. Platelet activation can occur by agonists binding with their receptors, releasing TXA_2, ADP and $GP\ II_b/III_a$ receptors binding with fibrinogen; b: what would be true aspirin resistance? Aspirin cannot inhibit COX1 and decrease TXA_2 synthesis; c: pseudoaspirin resistance. Aspirin inhibits COX1 but the stimulation via other agonists is sufficiently strong such that platelet activation is unaffected by the inhibition of TXA_2 synthesis; d: targets for inhibiting platelet activity. Each receptor triggers platelet activation (TXA_2 receptors, thrombin, ADP) via its bond with an agonist, a therapeutic target for inhibiting platelet activation. GP IIb/IIIa inhibitors block platelet binding with fibrogen.

désacétylation et moins soluble, donc moins absorbée. Le poids par augmentation du volume de distribution peut être un facteur de résistance [23]. La prise d'aspirine doit être quotidienne afin de prendre en compte le renouvellement plaquettaire [24]. La prise concomitante d'AINS peut gêner l'action de l'aspirine sur la COX : Catella-Lawson et al. [6] ont montré qu'une dose d'ibuprofène, administrée avant l'aspirine, inhibe son action sur l'agrégation plaquettaire. Ces données sont confortées par Kurth et al. [25] et Hudson et al. [26] : l'ibuprofène diminue l'effet protecteur de l'aspirine contre l'infarctus du myocarde. Il provoque une inhibition compétitive de la COX1 sur le même site que l'aspirine mais le blocage, contrairement à l'aspirine, est réversible. De ce fait, l'ibuprofène bloque temporairement l'accès de la COX1 à l'aspirine. L'aspirine, ayant une demi-vie très courte, n'est plus présente dans la circulation quand le site actif de la COX1 est libéré par l'AINS. L'une des solutions serait de prendre l'aspirine au moins deux heures avant l'AINS.

Pour les mécanismes pharmacodynamiques dépendant de la production de TXA_2, certains agissent en diminuant la sensibilité de la COX 1 à l'aspirine et représentent de vrais mécanismes de résistance.

Le polymorphisme du gène de la COX1 a souvent été étudié dans l'hypothèse d'une résistance due à une modification du site actif de l'enzyme. Cependant, les données de la littérature sont diverses. Hillarp et al. [27] ont séquencé le gène de la COX1 de 68 patients venant de présenter un AVC ischémique malgré un traitement par aspirine et ont réalisé une agrégométrie photométrique avec le PRP de ces patients. Si 14 variants furent identifiés, aucun ne semblait lié à une modification de l'agrégabilité plaquettaire. L'unique patient de Fontana et al. [21] montrant une « vraie résistance » n'avait pas de mutation de COX1. Cependant, Faraday et al. [28] ont montré un possible lien héréditaire concernant la réponse plaquettaire à l'aspirine, en étudiant 517 familles avec une atteinte coronaire chez des sujets jeunes. Maree et al. [29] et Lepantalo et al. [20] ont étudié l'agrégation plaquettaire chez des sujets avec une maladie cardiovasculaire stable et avec une dose quotidienne d'aspirine. Les variabilités du gène de la COX1 semblent moduler la réponse plaquettaire à l'aspirine. Cependant, l'effectif de Lepantalo et al. est réduit, ne s'appuyant que sur cinq patients avec une mauvaise réponse biologique à l'aspirine et ces deux études ne montrent aucune corrélation avec des événements cliniques. Enfin, Halushka et al. [30] ont montré que le polymorphisme du gène de la COX1 pourrait, cette fois, augmenter la sensibilité de l'enzyme à l'aspirine.

D'autres mécanismes agissent en produisant du TXA_2 par d'autres sources que la COX1.

La COX2 est une enzyme inductible, trouvée dans les cellules nucléées, les macrophages, les monocytes et les cellules endothéliales. Elle est induite par des stimuli inflammatoires. Elle peut conduire à la formation de PGH_2, de leucotriènes et d'isoprostanes. Les PGH_2 sont des précurseurs du TXA_2. Les plaquettes, privées de l'action de COX1 par l'aspirine, pourront cependant produire du TXA_2 grâce à la synthèse de PGH_2 par la COX2 [31–33]. Ainsi, la COX2 agit en permettant la production de TXA_2 malgré l'inhibition de la COX1 et synthétise d'autres composés favorisant l'agrégation plaquettaire. Son action délétère dans l'ischémie cérébrale a également été montrée [34]. Les mutations du gène de la COX2 ont également été invoquées [35].

Il existe des voies d'activation plaquettaire indépendantes de la COX1 et de la production de TXA_2. Il ne s'agit pas de cibles de l'aspirine et ne peuvent donc pas être qualifiées de vrais mécanismes de résistance.

La sécrétion de catécholamines, favorisée par l'exercice physique, peut être responsable d'une augmentation de l'activité plaquettaire [36–38]. Les catécholamines favorisent la libération d'ADP et son action sur l'agrégation ainsi que celle de la thrombine. Ces voies étant indépendantes de celle de la COX1, l'aspirine est inefficace pour les inhiber.

Les isoprostanes sont des isomères des PG D, E, F. Ils naissent de l'oxydation des lipides membranaires, comme l'acide arachidonique, par une voie indépendante des COX, non enzymatiques [39]. Ces composés induisent une vasoconstriction et une augmentation de l'agrégabilité plaquettaire via les récepteurs du TXA_2 [40,41]. Leur production peut être favorisée par le stress, le diabète, le tabac, l'hypercholestérolémie, l'hyperhomocystéinémie et le vieillissement. Ce dernier cas de figure peut être rangé dans les mécanismes pharmacodynamiques, impliquant le système du TXA_2, qui partagent le fait d'être surmontables par antagonisation du récepteur pour le TXA_2. Enfin certains leucotriènes pourraient avoir le même type d'action [42].

L'interaction des plaquettes avec d'autres cellules peut favoriser leur activation.

L'ajout d'érythrocytes dans le PRP de patients sous aspirine, accentue l'agrégation plaquettaire par le collagène, donc par des phénomènes TXA_2 indépendants [43–45]. Leur action est certainement multiple, car leur présence avec les plaquettes augmente les concentrations d'ADP, de TXA_2 [46] et de P-sélectine qui contribuent à l'interaction entre les plaquettes [47].

Les leucocytes peuvent également adhérer aux plaquettes et favoriser l'agrégation (agrégation hétérotypique). Des conjugués leucocytes–plaquettes sont trouvés de façon plus importante à la phase aiguë et à la convalescence de l'AVC ischémique [48] et au cours de l'ischémie des membres inférieurs. Les plaquettes peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires et attirer des leucocytes sur le site d'agrégation [49,50].

Certains mécanismes sont mixtes, dépendant ou non de la production de TXA_2. Des facteurs de risques cardiovasculaires peuvent être associés à une moins bonne réponse plaquettaire à l'aspirine [51] : l'hypertension artérielle [52], le tabagisme [53,54], l'hypercholestérolémie totale et le LDL cholestérol [55–57]. L'implication du sexe masculin reste discutée [58]. La réponse plaquettaire à l'aspirine est moins bonne pour les patients diabétiques [59] : Watala et al. [60] ont montré une bonne inhibition plaquettaire, ex vivo, par l'aspirine pour 69 % d'un groupe de sujets sains contre seulement 29 % d'un groupe de sujets atteints d'un diabète de type 2. Cette mauvaise réponse est surtout observée pour des concentrations élevées d'hémoglobine glyquée et de cholestérol total et des concentrations basses de HDL cholestérol et pour les sujets jeunes pour qui le renouvellement plaquettaire est plus important. Les plaquettes du sujet diabétique sont plus grandes, avec une meilleure réactivité aux agonistes de l'agrégation et ont plus de GP IIb/IIIa [59]. Il existerait une compétition entre l'acétylation des protéines plaquettaires par l'aspirine et la glycosylation due

à l'hyperglycémie [60]. La COX1 serait donc rendue moins sensible à l'acétylation de l'aspirine par phénomène de glycosylation. Des études in vitro montrent que l'augmentation des concentrations d'aspirine peut permettre de favoriser son action d'acétylation [61]. Enfin, l'hyperglycémie peut être responsable de la production de TX et d'isoprostanes [62].

Les solutions : de nouvelles cibles pharmacologiques ?

Si une dose de 75 à 150 mg est recommandée et considérée comme suffisante en prévention secondaire [3], il existe peut-être des variabilités interindividuelles d'absorption, de volume de distribution, de renouvellement plaquettaire qui peuvent rendre ces doses habituelles insuffisantes [63,64]. Une augmentation des doses peut permettre de vaincre le défaut d'inhibition plaquettaire [11,65]. Afin de répondre au renouvellement plaquettaire, il pourrait être proposé de passer d'une à deux prises quotidiennes.

Une meilleure connaissance de l'activation plaquettaire et de ses acteurs a permis d'envisager de nouvelles cibles pharmacologiques. De nouvelles molécules pourraient être une réponse aux défauts d'inhibition de l'activation plaquettaire par l'aspirine (Fig. 2c).

Afin de répondre à la production de TXA_2 malgré l'inhibition de la COX1, un blocage direct des récepteurs du TXA_2 est proposé. Une nouvelle molécule, S18886 [66], est actuellement évaluée en prévention secondaire de l'AVC ischémique, comparée à l'aspirine, en phase III, clinique.

Pour les mécanismes indépendants du système TXA_2, chaque voie d'activation plaquettaire représente une cible thérapeutique potentielle.

L'activation des récepteurs P2 par l'ADP joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire [67]. Les thiénopyridines bloquent le $P2Y_{12}$ de façon irréversible. Ticlopidine est actuellement peu prescrite à cause du risque d'atteinte médullaire hématologique. Ce médicament a été remplacé par clopidogrel qui est utilisé pour la prévention secondaire des complications ischémiques artérielles de l'athérome, avec une légère supériorité sur l'aspirine montrée par l'étude Caprie [68]. Cependant, il existe également avec clopidogrel des variabilités de réponse plaquettaire [69,70]. Clopidogrel doit être converti en métabolite actif, notamment par le cytochrome *P450 3A4*. De nombreux médicaments empruntent la même voie et peuvent interférer avec son métabolisme. Le polymorphisme des récepteurs $P2Y_{12}$, des cytochromes et les variabilités pharmacocinétiques sont également incriminés [71]. Prasugrel a été comparé à clopidogrel par des tests biologiques [72] et en prévention des phénomènes thrombotiques après pose d'endoprothèses coronaires [73]. Les résultats montrent une diminution des événements thrombotiques artériels mais au prix d'une augmentation des complications hémorragiques. La plus grande efficacité de prasugrel serait due à une meilleure conversion, et moins dépendante du cytochrome *P450*, de la prodrogue en métabolite actif. D'autres molécules, antagonistes réversibles des récepteurs $P2Y_{12}$, comme cangrelor [74] ou AZD6140 [75], sont en cours d'évaluation.

Une étude prospective randomisée (*the aspirin nonresponsiveness and clopidogrel endpoint trial* [ASCET]) est actuellement en cours afin d'évaluer, chez des patients avec une pathologie coronaire non répondeurs à l'aspirine, l'intérêt d'un *switch* par clopidogrel [76].

Les GP IIb/IIIa jouent un rôle important dans la formation du thrombus plaquettaire en liant les plaquettes activées au fibrinogène [77]. Des inhibiteurs des GP IIb/IIIa, abciximab, eptifibatide et tirofiban, sont actuellement utilisés pour encadrer les angioplasties coronariennes. Tirofiban [78] et eptifibatide (étude Resistor) sont actuellement étudiés, pour ce même geste, en cas de résistance à l'aspirine et/ou à clopidogrel.

Les récepteurs *protease-activated receptors* (PAR) peuvent être activés par la thrombine et interviennent alors dans l'agrégation plaquettaire et, plus largement, dans la thrombose artérielle athéromateuse [79]. Des inhibiteurs de ces récepteurs sont donc en cours d'évaluation.

Pour répondre aux mécanismes de résistance, des associations de molécules agissant sur différentes cibles de l'activation plaquettaire ont été proposées. Dipyridamole inhibe la phosphodiestérase plaquettaire et la captation de l'adénosine. L'European Stroke Prevention Study [80] et l'étude Esprit [81] ont démontré que l'association d'aspirine à faible dose (deux fois 25 mg/j) et de dipyridamole à action prolongée (deux fois 200 mg/j) était plus efficace que l'aspirine seule en prévention secondaire de l'AVC ischémique. L'association de l'aspirine à clopidogrel est utilisée en prévention secondaire des complications thrombotiques des angioplasties coronariennes [82]. Cependant, l'étude Match [83] ne montre pas de bénéfice significatif, en prévention secondaire des épisodes thrombotiques artériels au long cours, de cette association comparée à clopidogrel seul avec, de plus, une augmentation des complications hémorragiques. Si l'association entre deux antiplaquettaires avec des mécanismes d'action différents, comme l'aspirine et clopidogrel, semble synergique, il existe pourtant des phénomènes communs de résistance à ces molécules. Lev et al. [84] ont montré que 47,4% de patients avec une mauvaise réponse plaquettaire à l'aspirine avaient également une mauvaise réponse à clopidogrel. Les mécanismes invoqués sont des phénomènes associés au diabète et un renouvellement plaquettaire plus accéléré.

Conclusion

La notion de « résistance à l'aspirine » est l'extrême rare et jusqu'à ce jour jamais démontré, d'une moindre réponse plaquettaire à l'aspirine. En effet, il faut différencier à un extrême (jamais rapporté) les défauts complets d'inhibition de la COX1 par l'aspirine qui constituent une résistance vraie et à l'autre extrême du spectre de la variabilité de réponse les stimulations de l'agrégation plaquettaire qui sont indépendantes du TXA_2, et qui ne sont pas la cible de l'aspirine, ni d'aucun inhibiteur de la voie du TXA_2. Le terme de « variabilité de réponse plaquettaire à l'aspirine », avec des mauvais répondeurs mais aussi à l'inverse des sujets particulièrement sensibles, paraît donc plus adapté.

Une analyse précise de la cause de moindre réponse doit être menée pour arriver à des propositions thérapeutiques logiques qui resteront à valider par des études cliniques interventionnelles appropriées. En cas d'échec clinique, l'utilisation de tests de laboratoire éprouvés pour-

rait permettre d'identifier les mécanismes responsables et d'apporter la meilleure solution thérapeutique.

Conflits d'intérêts

Aucun.

Références

[1] Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th ed.). Chest 2008;133:199S–233S.

[2] Patrono C, Rocca B. Aspirin: promise and resistance in the new millenium. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:s25–32.

[3] 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] Sztriha LK, Sas K, Vecsei L. Aspirin resistance in stroke: 2004. J Neurol Sci 2005;229-230:163–9.

[5] Patrono C, Rocca B. Drug insight: aspirin resistance. Fact or fashion? Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2007;4:42–50.

[6] Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. N Engl J Med 2001;345:1809–17.

[7] Lecompte T. Antiplatelet agents and their therapeutic use. Rev Prat 1999;49:1627–33.

[8] Malinin AI, Atar D, Callahan KP, McKenzie ME, Serebruany VL. Effect of a single dose aspirin on platelets in humans with multiple risk factors for coronary artery disease. Eur J Pharmacol 2003;462:139–43.

[9] Nielsen HL, Kristensen SD, Thygesen SS, Mortensen J, Pedersen SB, Grove EL, et al. Aspirin response evaluated by the VerifyNow® Aspirin System and Light Transmission Aggregometry. Thromb Res 2008 [Epub ahead of print].

[10] Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuler JJ, McClelland TJ, et al. Aspirin response and failure in cerebral infarction. Stroke 1993;24:345–50.

[11] Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, et al. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. Stroke 1994;25:2331–6.

[12] Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin nonresponder. A pilot-study including 180 poststroke patients. Thromb Res 1993;71:397–403.

[13] 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;41:961–5.

[14] 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;105:1650–5.

[15] Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, Dichgans J, Topka H. Aspirin nonresponder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. J Neurol 2003;250:63–6.

[16] Gengo FM, Rainka M, Robson M, Gengo MF, Forrest A, Hourihane M, et al. Prevalence of platelet nonresponsiveness to aspirin in patients treated for secondary stroke prophylaxis and in patients with recurrent ischemic events. J Clin Pharmacol 2008;48:335–43.

[17] 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;167:1593–9.

[18] Hohlfeld T, Weber AA, Junghans U, Schumacher M, Boucher M, Schror K, et al. Variable platelet response to aspirin in patients with ischemic stroke. Cerebrovasc Dis 2007;24:43–50.

[19] Pulcinelli FM, Riondino S, Celestini A, Pignatelli P, Trifiro E, Di Renzo L, et al. Persistent production of platelet thromboxane A2 in patients chronically treated with aspirin. Thromb Haemost 2005;3:2784–9.

[20] Lepantalo A, Mäkkelsson J, Resendiz JC, Viiri L, Backman JT, Kankuri E, et al. Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. Thromb Haemost 2006;95:253–9.

[21] Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P. Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. Thromb Haemost 2006;4:813–9.

[22] Alberts MJ, Bergman DL, Molner E, Jovanovic BD, Ushiwata I, Teruya J. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. Stroke 2004;35:175–8.

[23] Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. Stroke 2006;37:2153–8.

[24] Perneby C, Wallen NH, Rooney C, Fitzgerald D, Hjemdahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. Thromb Haemost 2006;95:652–8.

[25] Kurth T, Glynn RJ, Walker AM, Chan KA, Buring JE, Hennekens CH, et al. Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. Circulation 2003;108:1191–5.

[26] Hudson M, Baron M, Rahme E, Pilote L. Ibuprofen may abrogate the benefits of aspirin when used for secondary prevention of myocardial infarction. J Rheumatol 2005;32:1589–93.

[27] Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin nonresponders with recurrence of stroke. Thromb Res 2003;112:275–83.

[28] Faraday N, Yanek LR, Mathias R, Herrera-Galeano JE, Vaidya D, Moy TF, et al. Heritability of platelet responsiveness to aspirin in activation pathways directly and indirectly related to cyclooxygenase-1. Circulation 2007;115:2490–6.

[29] Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. Thromb Haemost 2005;3:2340–5.

[30] Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. Clin Pharmacol Ther 2003;73:122–30.

[31] Camacho M, Vila L. Transcellular formation of thromboxane A(2) in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I synthase activity. Thromb Res 2000;99:155–64.

[32] Patrignani P. Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. Thromb Res 2003;110:281–6.

[33] Cipollone F, Rocca B, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:246–55.

[34] Dore S, Otsuka T, Mito T, Sugo N, Hand T, Wu L, et al. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. Ann Neurol 2003;54:155–62.

[35] Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. J Thromb Thrombolysis 2002;14:51–8.

[36] Larsson PT, Wallen NH, Hjemdahl P. Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. Circulation 1994;89:1951–7.

[37] Li N, Wallen NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. Circulation 1999;100:1374–9.

[38] Hurlen M, Seljeflot I, Arnesen H. Increased platelet aggregability during exercise in patients with previous myocardial infarction. Lack of inhibition by aspirin. Thromb Res 2000;99:487–94.

[39] 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 PIA(1/2) polymorphism. Platelets 2006;17:163–9.
[40] Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. Stroke 1997;28:844–9.
[41] 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;66:557–8.
[42] Cipollone F, Ganci A, Greco A, Panara MR, Pasquale M, Di Gregorio D, et al. Modulation of aspirin-insensitive eicosanoid biosynthesis by 6-methylprednisolone in unstable angina. Circulation 2003;107:55–61.
[43] Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. J Clin Invest 1991;87:571–80.
[44] Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, et al. 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;97:350–5.
[45] Santos MT, Valles J, Lago A, Tembl J, Sanchez E, Moscardo A, et al. Residual platelet thromboxane A2 and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease. Thromb Haemost 2008;6:615–21.
[46] Valles J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martinez-Sales V, Portoles M, et al. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. Blood 1991;78:154–62.
[47] Valles J, Santos MT, Aznar J, Martinez M, Moscardo A, Pinon M, et al. Platelet–erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: downregulation by aspirin ex vivo. Blood 2002;99:3978–84.
[48] McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, et al. Platelet degranulation and monocyte–platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. Br J Haematol 2004;125:777–87.
[49] Freedman JE. CD40-CD40L and platelet function: beyond hemostasis. Circ Res 2003;92:944–6.
[50] Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. Circ Res 2003;92:1041–8.
[51] Faraday N, Becker DM, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Segal JB, Moy TF, et al. Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. Am J Cardiol 2006;98:774–9.
[52] Macchi L, Petit E, Brizard A, Gil R, Neau JP. Aspirin resistance in vitro and hypertension in stroke patients. Thromb Haemost 2004;2:2051–3.
[53] Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. Circulation 1995;92:2432–6.
[54] Ikonomidis I, Lekakis J, Vamvakou G, Andreotti F, Nihoyannopoulos P. Cigarette smoking is associated with increased circulating proinflammatory and procoagulant markers in patients with chronic coronary artery disease: effects of aspirin treatment. Am Heart J 2005;149:832–9.
[55] Szczeklik A, Musial J, Undas A, Swadzba J, Gora PF, Piwowarska W, et al. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:948–54.
[56] Markuszewski L, Rosiak M, Golanski J, Rysz J, Spychalska M, Watala C. Reduced blood platelet sensitivity to aspirin in coronary artery disease: are dyslipidaemia and inflammatory states possible factors predisposing to suboptimal platelet response to aspirin? Basic Clin Pharmacol Toxicol 2006;98:503–9.
[57] Friend M, Vucenik I, Miller M. Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. BMJ 2003;326:82–3.
[58] Becker DM, Segal J, Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Bray PF, et al. Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. JAMA 2006;295:1420–7.
[59] Fateh-Moghadam S, Plockinger U, Cabeza N, Htun P, Reuter T, Ersel S, et al. Prevalence of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes. Acta Diabetol 2005;42:99–103.
[60] Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin): its relation to metabolic control. Thromb Res 2004;113:101–13.
[61] Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, et al. 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;8:148–58.
[62] Sacco M, Pellegrini F, Roncaglioni MC, Avanzini F, Tognoni G, Nicolucci A. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. Diabetes Care 2003;26:3264–72.
[63] Zimmermann N, Weber AA, Hohlfeld T. Aspirin "Resistance". Herz 2008;33:270–8.
[64] Gladding P, Webster M, Ormiston J, Olsen S, White HI. Antiplatelet drug nonresponsiveness. Am Heart J 2008;155:591–9.
[65] Syrbe G, Redlich H, Weidlich B, Ludwig J, Kopitzsch S, Gockefitz A, et al. Individual dosing of ASA prophylaxis by controlling platelet aggregation. Clin Appl Thromb Hemost 2001;7:209–13.
[66] Gaussem P, Reny JL, Thalamas C, Chatelain N, Kroumova M, Jude B, et al. The specific thromboxane receptor antagonist S18886: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. Thromb Haemost 2005;3:1437–45.
[67] Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. Expert Rev Cardiovasc Ther 2007;5:45–55.
[68] A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. Lancet 1996;348:1329–39.
[69] Hacquard M, Angioi M, Lecompte T, Vigneron C. Inter-individual variability in the laboratory response to the aspirin–clopidogrel combination: are patients with stent occlusion "resistant" to treatment? Ann Pharm Fr 2007;65:169–73.
[70] De Miguel A, Ibanez B, Badimon JJ. Clinical implications of clopidogrel resistance. Thromb Haemost 2008;100:196–203.
[71] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, et al. Influence of aspirin resistance on platelet function profiles in patients on long-term aspirin and clopidogrel after percutaneous coronary intervention. Am J Cardiol 2006;97:38–43.
[72] Serebruany VL, Midei MG, Meilman H, Malinin AI, Lowry DR. Platelet inhibition with prasugrel (CS-747) compared with clopidogrel in patients undergoing coronary stenting: the subset from the JUMBO study. Postgrad Med J 2006;82:404–10.
[73] Antman EM, Wiviott SD, Murphy SA, Voitk J, Hasin Y, Widimsky P, et al. Early and late benefits of prasugrel in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: a TRITON–TIMI 38 (TRial to Assess Improvement

in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet InhibitioN with Prasugrel—Thrombolysis In Myocardial Infarction) analysis. J Am Coll Cardiol 2008;51:2028—33.
[74] Angiolillo DJ, Guzman LA. Clinical overview of promising nonthienopyridine antiplatelet agents. Am Heart J 2008;156:S23—8.
[75] Cannon CP, Husted S, Harrington RA, Scirica BM, Emanuelsson H, Peters G, et al. Safety, tolerability, and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 trial. J Am Coll Cardiol 2007;50:1844—51.
[76] Pettersen AA, Seljeflot I, Abdelnoor M, Arnesen H. Unstable angina, stroke, myocardial infarction and death in aspirin nonresponders. A prospective, randomized trial. The ASCET (ASpirin nonresponsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial) design. Scand Cardiovasc J 2004;38:353—6.
[77] Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. Nature 2008;451:914—8.
[78] Valgimigli M, Campo G, de Cesare N, Vranckx P, Hamon M, Angiolillo DJ, et al. Tailoring treatment with tirofiban in patients showing resistance to aspirin and/or resistance to clopidogrel (3T/2R). Rationale for the study and protocol design. Cardiovasc Drugs Ther 2008;22:313—20.
[79] Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. Thromb Haemost 2008;99:305—15.
[80] Sivenius J, Cunha L, Diener HC, Forbes C, Laakso M, Lowenthal A, et al. Second European Stroke Prevention Study: antiplatelet therapy is effective regardless of age. ESPS2 Working Group. Acta Neurol Scand 1999;99:54—60.
[81] Halkes PH, van Gijn J, Kappelle LJ, Koudstaal PJ, Algra A. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. Lancet 2006;367:1665—73.
[82] Steinhubl SR, Berger PB, Mann III JT, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. JAMA 2002;288:2411—20.
[83] Bezerra DC, Bogousslavsky J. Antiplatelets in stroke prevention: the MATCH trial. Some answers, many questions and countless perspectives. Cerebrovasc Dis 2005;20: S109—118S.
[84] Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, Guthikonda S, Granada J, DeLao T, et al. 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.

V. Etude de l'effet biologique de la première dose de 300 mg d'aspirine donnée à la phase aiguë de l'AVC ischémique

1. Présentation générale

Nous avons souhaité étudier l'effet biologique de la première dose orale de 300mg d'aspirine donnée à la phase aiguë de l'AVC ischémique, en le mesurant à 2 temps différents. Nous voulions mettre en évidence une récupération de l'activité plaquettaire dans les 24 heures qui suivent la prise. Nous nous sommes intéressés, également, aux cas des patients qui reçoivent cette prescription, alors qu'ils étaient déjà traités par une dose quotidienne d'aspirine inférieure à 300 mg. L'effet biologique de l'aspirine à cette phase n'avait jamais été étudié. L'analyse de la moindre réponse peut permettre d'apporter la meilleure solution thérapeutique à la phase aiguë de l'AVC, afin de diminuer la survenue de récidives thrombotiques artériels : augmentation de la dose et de la fréquence d'administration de l'aspirine ou emploi et développement d'autres anti-plaquettaires (clopidogrel, S1886) (**81**). L'une des hypothèses de moindre réponse plaquettaire à l'aspirine pouvant être avancée, est celle d'un turn over plaquettaire accru à la phase aiguë de l'évènement ischémique produisant des plaquettes immatures, réticulées, capables de produire COX1, après leur exposition à l'aspirine, grâce à l'ARNm qu'elles contiennent (**82**).

En étude préliminaire, nous avons collecté les résultats d'agrégométries photométriques de 17 patients, à la phase aiguë de l'AVC ischémique (7 premiers jours). Ces tests avaient été réalisés pour s'assurer de la bonne réponse plaquettaire à l'aspirine, avec un prélèvement dans les heures qui suivent la prise d'aspirine (entre H1 et H4) et à distance de la prise (entre H21 et H24). Pour chaque prélèvement, une agrégométrie photométrique a été réalisée avec pour réactif : l'AA (1,39 mmol/L) et le collagène à 2 concentrations, 2 µg/mL, (réponse partiellement dépendante du TXA_2) et 10 µg/mL (réponse indépendante du TXA_2). Nous avons rapporté les valeurs d'agrégométrie photométrique du collagène 2 µg/mL (Col2) à

celles du collagène 10 µg/mL (Col10), pour obtenir un ratio (Col2/10), afin de s'affranchir des variations de mesure en laboratoire. Alors que les résultats pour l'AA montrent une inhibition plaquettaire pour l'ensemble des patients (fig 6), sans différence entre les 2 temps, Col2/10 montre une réactivité plaquettaire plus importante à H21-24 qu'à H1-4 pour 12 patients (fig 7). A la vue de ces résultats, il apparaît qu'à la phase aiguë de l'AVC ischémique, la réactivité plaquettaire résiduelle de patients ayant pris 300 mg d'aspirine per os est plus importante à H21-24 qu'à H1-4.

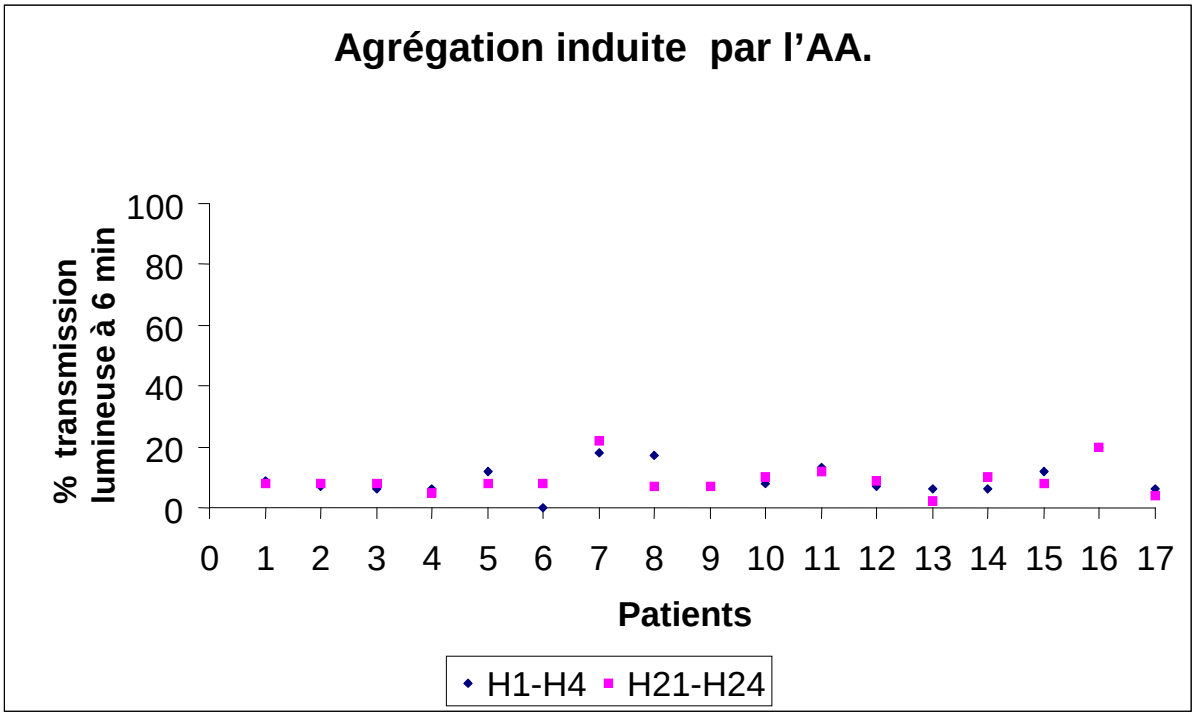


Figure 6 : Résultats d'agrégométrie photométrique, exprimés en % de transmission lumineuse à 6 minutes, avec pour réactif l'AA 1,39 mmol/L, à H1-H4 et H21-H24.

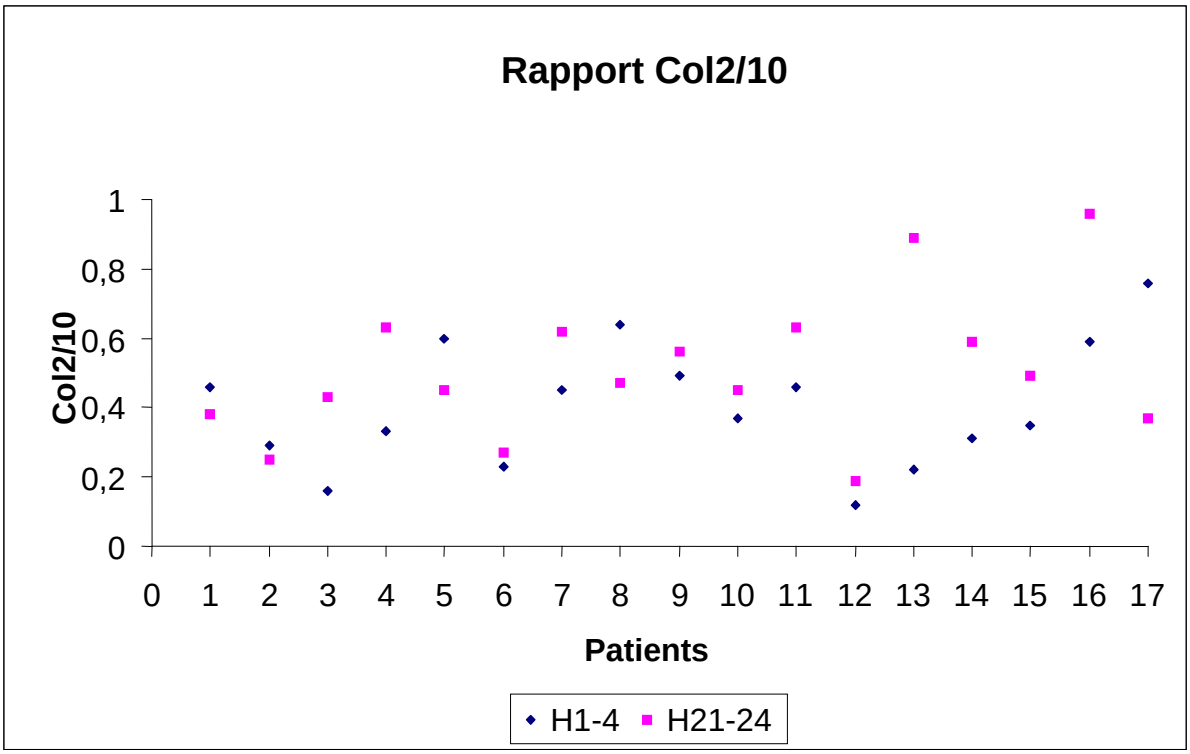


Figure 7 : Rapports des résultats d'agrégométrie photométrique à 6 minutes Col2/10 à H1-H4 et H21-H24.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié la réponse plaquettaire à l'aspirine à la phase aiguë de l'AVC ischémique à deux temps :

- entre H2 et H3 après l'administration de la première dose d'aspirine. L'effet anti-plaquettaire de l'aspirine est mesurable dans un délai de 1 heure (**22**). Afin d'observer un effet anti-plaquettaire maximal, et de s'affranchir des variations inter-individuelles d'absorption, nous avons choisi de faire le premier prélèvement entre 2 heures et 3 heures après la prise d'aspirine.
- entre H23 et H24 après l'administration de la première dose d'aspirine. Afin d'être le plus éloigné de la première prise d'aspirine, avant la deuxième dose habituellement donnée.

Le seul produit utilisé fut l'aspirine.

Il s'agit du médicament prescrit habituellement à la phase aiguë de l'AVC ischémique.

La dose per os habituelle à la phase aiguë est de 300 mg/j pendant 7 jours.

L'étude fut proposée aux patients suite au diagnostic d'AVC ischémique ou d'accident ischémique transitoire, (AIT), datant de moins de 48 heures, fait par un médecin neuro-vasculaire après tomodensitométrie cérébrale (TDMc) et/ou imagerie par résonance magnétique cérébrale (IRMc), nécessitant un traitement par aspirine comme décrit ci-dessus.

Aucun risque lié à l'étude n'était attendu. Les seules contraintes pour le patient furent celles liées aux prélèvements sanguins additionnels réalisés dans le cadre du protocole.

Cette étude devait nous permettre :

- De connaître pour chaque patient, à la phase aiguë de l'AVC ischémique, l'effet biologique de l'aspirine, ce qui n'a jamais été réalisé auparavant. Ceci étant évalué à deux instants : entre H2 et H3 après la première dose d'aspirine et entre H23 et H24 après cette dose, donc juste avant la deuxième dose qui est donnée, habituellement, à H24.
- De confirmer qu'il existe, pour certains patients, une réactivité plaquettaire plus importante à H23-24 qu'à H2-3.
- De confirmer que le collagène, en agrégométrie photométrique, est un indice sensible pour rechercher une moindre réponse à l'aspirine.

Grâce aux résultats, nous pourrions :

- Développer des tests avec le collagène, utilisables au lit du malade, pour évaluer facilement et de façon fiable la réponse plaquettaire à l'aspirine.
- Envisager les différents mécanismes de réascension de la réponse TXA_2 dépendante : récupération plus importante des capacités de synthèse de TXA_2

chez certains patients, rôle du turn over plaquettaire produisant des plaquettes réticulées capables de synthétiser COX1 après l'exposition à l'aspirine.

- Proposer des solutions thérapeutiques pour optimiser la protection de l'aspirine à la phase aiguë de l'AVC ischémique, ou de proposer l'utilisation d'anti-plaquettaires à mécanisme différent à cette phase.

Ce projet d'étude a reçu un financement suite à sa soumission à la Direction de la Recherche et de l'Innovation du CHU de Nancy en Août 2010. Il a reçu l'accord du Comité de Protection des Personnes Est III.

2. Objectifs de l'étude

a. Objectif principal

Notre **objectif principal** était de montrer une différence significative de réponse plaquettaire TXA_2 dépendante, après la prise de 300 mg d'aspirine, entre 2 temps, à la phase aiguë de l'AVC ischémique.

b. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires étaient :

- mesurer l'amplitude de récupération de synthèse de TXA_2 entre 2 temps après la prise de 300 mg d'aspirine per os.

- évaluer le turn over plaquettaire par mesure du pourcentage de plaquettes réticulées, encore capables de produire COX1, et qui représentent une source de TXA_2.

- comparer les réponses plaquettaires TXA_2 dépendantes avant et après la dose de 300 mg d'aspirine pour des patients déjà traités quotidiennement par aspirine (en faisant, pour ces patients, un autre prélèvement avant de donner le traitement).

3. Critères d'évaluation

a. Le critère d'évaluation principal

Il était fondé sur la mesure de la réponse plaquettaire à l'aspirine par **agrégométrie photométrique** réalisée avec du PRP, déclenchée par le collagène à 2 concentrations : l'une faible (2 µg/mL), provoquant l'agrégation via le TXA_2, et l'autre élevée (20 µg/mL). Nous avons choisi d'augmenter la concentration haute de collagène de 10 à 20 µg/l (Col20) pour obtenir une agrégation plaquettaire la plus indépendante possible du TXA_2. Les valeurs d'agrégométrie photométrique de Col2 ont été rapportées à celles de Col20, pour obtenir un ratio (Col2/20), afin de s'affranchir des variations de mesure. L'agrégométrie photométrique fut réalisée également avec l'AA (1,39 mmol/L), méthode de référence de l'exploration de la réponse TXA_2 dépendante. Afin de prendre en compte une moindre réponse d'ordre pharmacocinétique, l'agrégométrie fut réalisée pour chaque prélèvement, sans puis avec ajout de 100 µmol/L d'aspirine (**36**) dans le PRP (fig 8).

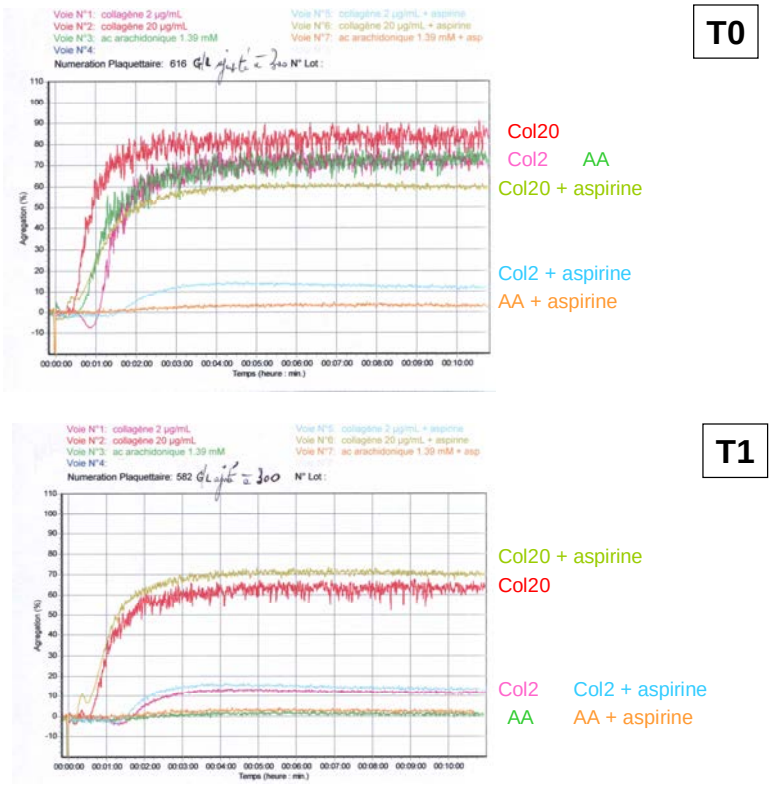


Figure 8 : Exemple de résultat d'agrégométrie photométrique. Patiente traitée, en principe, quotidiennement par 75 mg d'aspirine.
T0 : Aucun effet visible de l'aspirine ex vivo. L'agrégation induite par l'AA et Col2 n'est pas inhibée. Inhibition de l'agrégation induite par AA et Col2 après ajout d'aspirine in vitro.
T1 : La prise de 300 mg d'aspirine per os permet de voir que l'agrégation induite par AA et Col2 est autant inhibée sans et avec ajout d'aspirine in vitro.
Conclusion : réponse plaquettaire à l'aspirine per os visible à T1 sur l'agrégation induite par AA et Col2.

b. Les critères d'évaluation secondaires

- **la mesure de concentration de TXB_2 dans le sérum**. Le TXA_2 est un composé instable non dosable. Le TXB_2, son métabolite, fut mesuré, lors des différents prélèvements pour chercher une récupération plus importante des capacités de synthèse du TXA_2 chez certains patients.
- **la mesure du pourcentage de plaquettes réticulées** par cytométrie en flux (**83**), permettant d'incriminer ou pas le renouvellement plaquettaire dans le

mécanisme de moindre réponse par production de plaquettes immatures, capables de produire COX1 après l'exposition à l'aspirine.

4. Méthode

Il s'agit d'une recherche monocentrique prospective, contrôlée, en ouvert, non randomisée.

a. Inclusion des patients

Le recrutement de l'ensemble des patients a été réalisé au sein de l'UNV du service de Neurologie de l'hôpital central de Nancy.

L'étude fut proposée aux patients suite à l'établissement du diagnostic d'AVC ou d'AIT (datant de moins de 48 heures) posé par un médecin neuro-vasculaire après TDMc et/ou IRMc.

- **Critères d'inclusion :**
  - Homme ou femme majeur
  - AVC ischémique ou AIT datant de moins de 48 heures.
  - Consentement éclairé signé.

- **Critères de non inclusion :**
  - Toute contre-indication à l'emploi de l'aspirine : allergie, risque accru de gastro-toxicité, risque de transformation hémorragique de l'AVC ischémique.
  - AVC nécessitant un traitement anticoagulant en phase aiguë (l'injection d'une héparine de bas poids moléculaire en prévention des complications thrombo-embolique fut tolérée).

- Nécessité d'un traitement AINS pendant la durée de participation bloquant l'accès de la COX1 à l'aspirine.
- Trouble de la déglutition empêchant la prise d'aspirine per os.

Après vérification des critères d'inclusion, de non inclusion et recueil du consentement éclairé (annexe 1), l'administration per os de 300 mg d'aspirine (Kardegic®, Sanofi-Aventis, France) fut réalisée et surveillée par le personnel paramédical excluant tout problème de compliance. Deux prélèvements sanguins de 25 ml furent réalisés dans 4 tubes contenant du citrate et un tube sec (Vacutainer®, Becton Dickinson) : le premier entre H2 et H3 (T1) et le deuxième entre H23 et H24 (T2) après l'administration de l'aspirine (fig 9).

Pour les patients déjà traités quotidiennement par aspirine avant l'AVC ischémique, un autre prélèvement fut réalisé avant la première dose de 300 mg per os (T0).

Les prélèvements sanguins ont permis de réaliser les tests d'agrégométrie photométrique, le dosage du TXB_2 sérique et la mesure des pourcentages de plaquettes réticulées.

Les principales données recueillies furent :

- âge, sexe
- antécédents médicaux personnels et familiaux
- facteurs de risque cardio-vasculaires
- traitements habituels
- Descriptif clinique de l'AVC ou AIT, TDMc et/ou IRMc et examens complémentaires (echo-doppler des vaisseaux du cou, échographie cardiaque, ECG).
- Si prise d'aspirine quotidienne antérieure : dose, ancienneté, heure de prise, compliance (interrogatoire patient ou famille).

La durée de participation des patients était de 24 heures.

A cause des difficultés d'acheminement et d'analyse des prélèvements, les inclusions n'ont pas été consécutives. Cinquante patients ont pu être inclus entre le 20/12/2010 et le 31/03/2011.

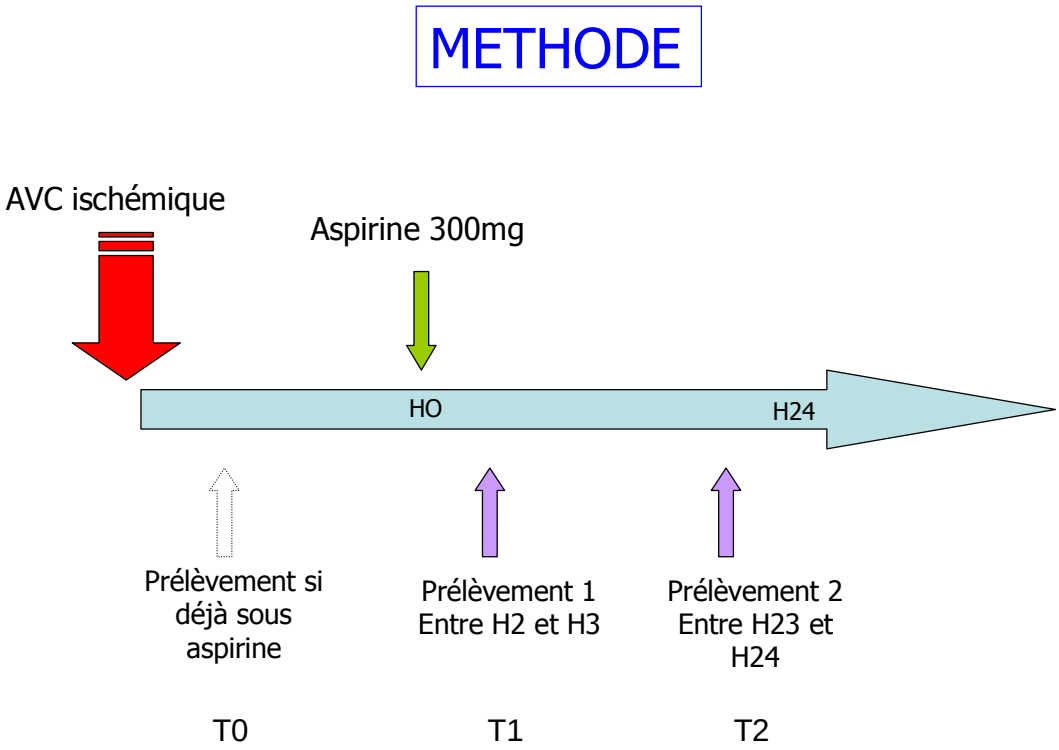


Figure 9 : Description des différents prélèvements.

b. Agregométrie photométrique

La réactivité plaquettaire fut mesurée par agrégométrie photométrique (Soderel Medical Aggregometer®, Nancy France). Cette méthode est considérée comme une référence dans l'étude des fonctions plaquettaires (**84,85**) et largement utilisée. L'agrégation des plaquettes dans le PRP est étudiée par la mesure continue, dans un agrégomètre, des changements de la transmission d'un faisceau lumineux au travers du PRP après addition d'un stimulus (ADP, collagène, ristocétine, thrombine, acide arachidonique, ionophore calcique). L'addition de collagène au PRP, entraîne l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène, puis après un

temps de latence, un changement de forme des plaquettes, puis agrégation avec production de TXA_2 (fig 10)

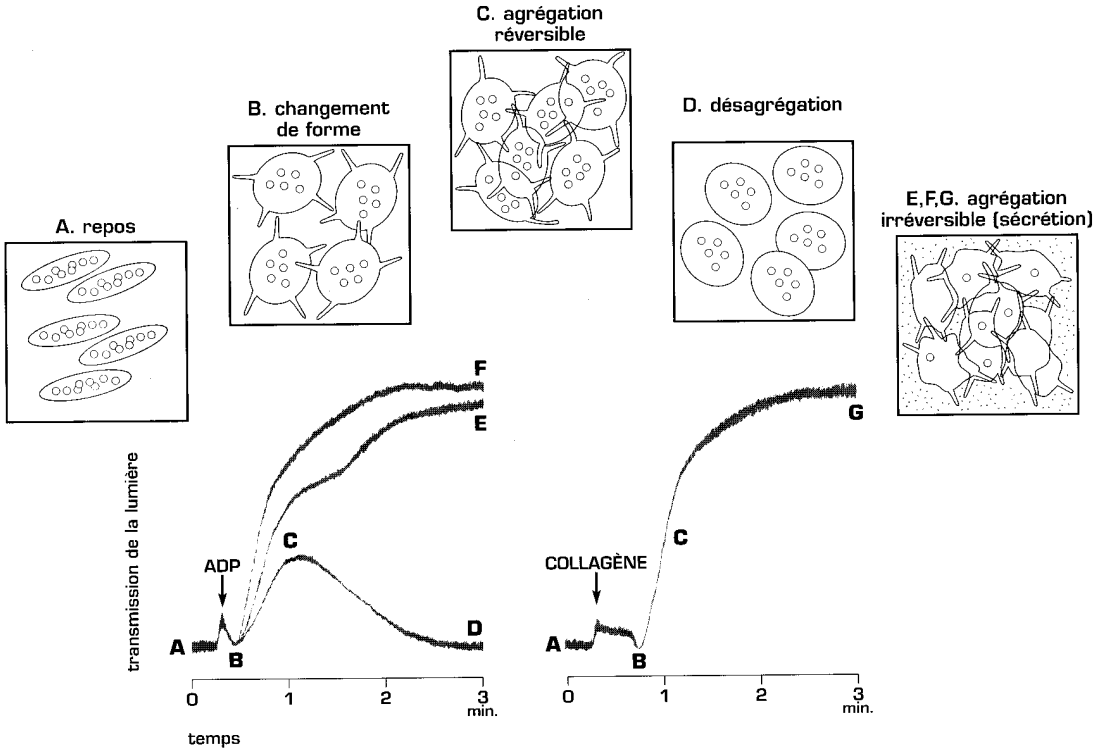


Figure 10 : Exemples de courbes d'agrégation plaquettaire mesurées par agrégométrie photométrique avec pour stimulus l'ADP (à 1,5 µM, 2,5 µM et 5 µM) et le collagène. Extraite de B Boneu, JP Cazenave « Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose » 2e édition (Boehringer Ingelheim France 1997).

Le PRP fut préparé par centrifugation des prélèvements sanguins à 170g pendant 10 minutes. La fraction sanguine restante fut centrifugée à température ambiante, pendant 10 minutes à 2500g pour obtenir le plasma pauvre en plaquettes (PPP). Le PRP fut stimulé par 1,39 mM d'AA (BioData Corporation Horsham USA) et par les 2 concentrations de collagène, Col2 et Col20, (Collagen Horm®, Nycomed Linz, Austria). L'agrégation fut exprimée en variation de pourcentage de transmission lumineuse à 6 minutes, en utilisant le PPP pour référence. Les résultats obtenus avec Col2 furent rapportés à Col20 (Col2/20) afin de limiter l'impact des

variations de condition d'analyse. Le même protocole fut répété après ajout de 100 mM dans le PRP.

c. Mesure des concentrations de TXB_2

Le TXA_2 est un composé instable. La mesure de la concentration étant impossible, elle fut estimée par la mesure de la concentration d'un de ses métabolites, le TXB_2. Les prélèvements sanguins ayant été incubés à 37°C pendant 2 heures, furent centrifugés à 2500g pendant 10 minutes à température ambiante, et congelés à -20°C jusqu'à analyse. Les mesures ont été réalisées par technique ELISA (TXB_2, EIA Kit®, Enzo Life sciences).

d. Comptage des plaquettes réticulées

Pour 36 patients Les plaquettes réticulées furent comptées par cytométrie de flux (**82**).

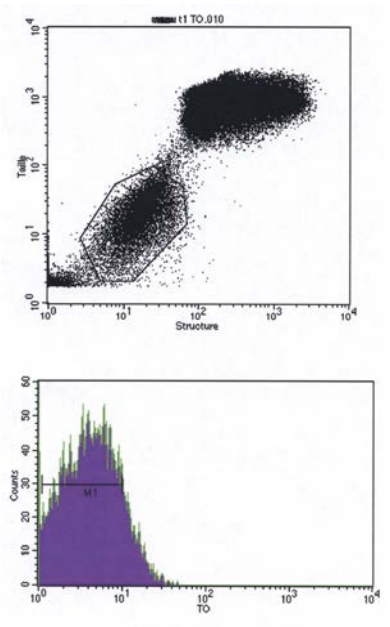
La cytométrie en flux est une technique d'analyse et de tri des cellules, dérivée des appareils de numérations et formules leucocytaires. Elle repose sur la mesure de paramètres physiques (taille, volume, granulation) et biologiques (présence de molécules de surface …) de cellules passant une à une à grande vitesse devant un faisceau lumineux (laser).

Un centrage hémodynamique est effectué par injection d'une suspension cellulaire dans une veine liquide de forte section. Les cellules sont entraînées par flux de liquide qui passe par une buse de faible diamètre. Or, le débit cellulaire restant constant, et le diamètre diminuant, la vitesse des cellules augmente. Ce mécanisme permet de focaliser de façon précise le flux de cellules devant le faisceau laser.

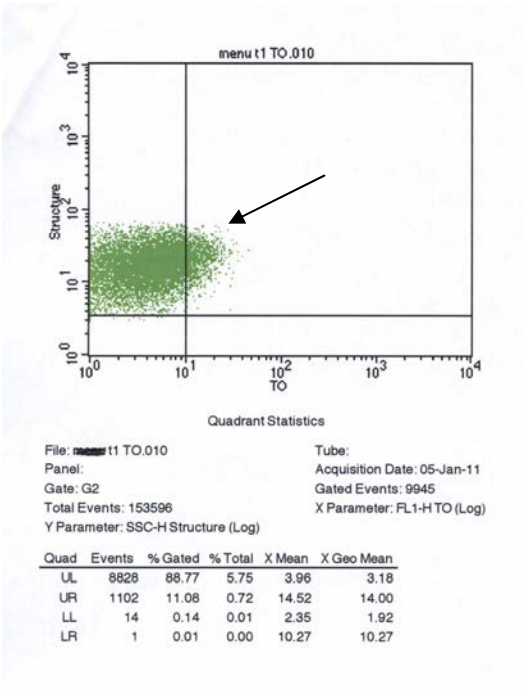
Pour l'acquisition des données, l'excitation lumineuse des cellules se fait par un faisceau laser. Lorsque une cellule le traverse, elle émet un certain nombre de signaux lumineux qui seront utilisés comme source de données par le cytomètre. Ces signaux sont représentatifs de propriétés physiques ou biologiques de la cellule. Il existe des signaux spécifiques de

propriétés physiques : la diffusion dans l'axe, essentiellement due à la diffraction de la lumière et liée à la taille des cellules, et la diffusion aux grands angles, fonction de l'hétérogénéité du contenu des cellules. Il existe des signaux spécifiques de fonctions biologiques : ces signaux sont liés au marquage des cellules par un ou plusieurs fluorochromes. L'intensité de la fluorescence émise est fonction du nombre de molécules de fluorochromes fixées sur la cellule.

Un mL de thiazole orange (Retict-Count® Benton Dickinson), dilué à 1/10 avec un tampon Cellwash® (Becton Dickinson) fut ajouté à 5 µL de sang. Un tube contenant 1 mL de Cellwash® fut utilisé comme contrôle. Après 30 minutes d'incubation dans le noir, les tubes furent centrifugés à 2500g pendant 2,5 minutes pour former un culot cellulaire. Après élimination du surnageant, le culot fut dilué dans 1 mL de Cellwash®. La cytométrie de flux fut réalisée sur un appareil quotidiennement calibré (FaCScalibur® Becton Dickinson). Chaque analyse fut réalisée sur 10 000 plaquettes. Un seuil de positivité fut déterminé à partir de la fluorescence émise par le tube contrôle. Le pourcentage de plaquettes réticulées fut déterminé par la mesure du pourcentage de cellules exprimant une fluorescence supérieure à ce seuil. (fig 11). Les résultats furent exprimés en pourcentage de plaquettes réticulées et en nombre absolu, déduit de la numération formule sanguine réalisée, contenant la numération plaquettaire.



Détermination de la population plaquettaire parmi les cellules sanguines.



Détermination du % plaquettes réticulées.

Figure 11 : Méthode de mesure des plaquettes réticulées par cytométrie de flux.

e. Analyse statistique.

Le calcul d'effectif a été réalisé à partir de notre série de 17 patients décrite ci-dessus. Le rapport d'agrégation Col2/10 a été trouvé à 0,40 ± 0,18 à H1-H4, et à 0,51 ± 0,21 à H21-H24, avec une différence de 0,11 ± 0,24. La corrélation entre les 2 prélèvements était r = 0,21.

Dans l'hypothèse d'une différence entre les 2 prélèvements de 0,11 ± 0,20, en prenant comme différence attendue 0,11 et comme écart type la valeur moyenne de 0,20, un effectif de 43 patients avait une puissance de 80% de trouver significative, avec un risque d'erreur alpha de 5%, cette différence. Pour tenir compte des probables observations non évaluables (décès avant la 23ème heure, techniques logistiques, ...), 50 sujets furent recrutés dans l'étude.

Toutes les analyses furent réalisées avec le logiciel SAS® Software V9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Le degré de signification choisi fut $p<0,05$. Les variables continues ont été présentées en médianes, valeurs interquartiles (entre le 1er et le 3ème) et valeurs extrêmes. Les

variables discontinues ont été présentées en fréquence et en pourcentage. La distribution des variables continues et de leur évolution aux différents temps ne peut être considérée comme normale : les comparaisons groupées (prophylaxie par aspirine OUI vs. NON), appariées (comparaisons T0-T1 et T1-T2) et les analyses de corrélation ont été respectivement effectuées à l'aide des tests de Mann-Whitney, de Wilcoxon et de Spearman. Les variables discontinues ont été comparées par le test du Chi-2 ou de Fisher lorsque les conditions de validité du premier n'étaient pas réunies.

5. Résultats

a. Caractéristiques de la population

	n (pourcentage)		
Hommes	26 (52%)		
Femmes	24 (48%)		
AIT	13 (26%)		
AVC	37 (74%)		
Hypertension	27 (54%)		
Tabagisme	21 (42%)		
Dyslipidémie	19 (38%)		
Diabète	7 (14%)		
Patients déjà traités par aspirine	18 (36%)		
	Mediane	Valeurs interquartiles	Valeurs extrêmes
Age	69	53-78	28-96
Numération plaquettaire (G/L)	222	183-283	51-565
Plaquettes réticulées (pourcentage)	14	10.5-22	5-38
Numération plaquettes réticulées (G/L)	34.7	21.5-46.3	2.5-82
Hémoglobine (g/dL)	13.7	12.7-15.3	9.8-16.7
Leucocytes (G/L)	8	6.4-9.5	5.2-16

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients (n=50).

Cinquante patients ont été inclus (tab 2), 26 hommes et 24 femmes, d'âge de 28 à 96 ans. Dix-huit patients étaient déjà traités, quotidiennement, par une dose de 75 à 160 mg d'aspirine au moment de l'évènement qualifiant. A noter qu'un seul patient présentait une thrombopénie à

51 G/l, l'hémogramme ayant été disponible après l'inclusion, tous les autres patient avaient une numération plaquettaire > à 120 G/L.

b. Résultats biologiques à T0, T1 et T2

	T0 (n=18)			T1 (n=50)			T2 (n=50)		
	Médiane	Interquartile	Valeurs extrêmes	Médiane	Interquartile	Valeurs extrêmes	Médiane	Interquartile	Valeurs extrêmes
AA (%T)	8	2 – 13	0 – 82	6	4 – 10	0 – 18	8	3 – 12	0 – 18
Col2 (%T)	47	30 – 58	3 – 90	37	21 – 48	4 – 63	38	29 – 46	5 – 62
Col20 (%T)	71	63– 78	30 – 85	72	64 – 78	36 – 105	73	64 – 80	50 – 94
Col2/20 (%)	61	40 – 79	6 – 100	48	32 – 64	9 – 94	54	41 – 61	8 – 88
Col2 (ms)	37	27 - 56	10 - 88	41	31 - 52	1 - 180	41	30 - 50	10 – 200
Col20 (ms)	18	15 - 21	9 - 29	13	9 - 17	1 - 38	12	9 - 16	3 - 33
TXB_2 (pg/mL)	700	320 - 2200	50 - 20000	255	110 - 540	0 - 1200	680	320 - 1400	85 - 5840

Tableau 3 : Résultats d'agrégométrie et de concentrations sériques de TXB_2 à T0, T1 et T2.

Pour l'agrégation induite par l'AA, il est noté aux 3 temps, des médianes basses, 8% à T0, 6% à T1 et 8% à T2. L'intervalle entre les valeurs extrêmes (0%-18%) est peu étendu à T1 et à T2, donc après la prise d'aspirine.

Pour l'agrégation induite par Col2, les médianes sont plus élevées, 47% à T0, 37% à T1 et 38% à T2 avec un intervalle plus important entre les valeurs extrêmes, entre 4 et 63% à T1 et 5 et 62% à T2. Cet intervalle est également important pour Col2/20, entre 9 et 94% à T1, 8 et 88% à T2 (tab 3).

c. Résultats biologiques à T0 avant et après ajout d'aspirine *in vitro* dans le PRP

	Avant aspirine dans PRP	Après aspirine dans PRP	Après-Avant	
	Médiane (interquartile)	Médiane (interquartile)	Médiane (interquartile)	p*
AA (%T)	8 (2 - 13)	9 (4 - 12)	1 (0 - 3)	0.47
Col2 latence (ms)	37 (27 - 56)	43 (30 - 51)	0 (-8 - 14)	0.46
Col2 (%T)	47 (30 - 58)	36 (20 - 42)	-3 (-14 - 5)	0.22
Col20 latence (ms)	18 (15 - 21)	16 (12 - 18)	-1 (-6 - 2)	0.22
Col20 (%T)	71 (63 - 78)	67 (61 - 72)	-1 (-6 - 2)	0.26
Col2/20 (%)	61 (40 - 79)	54 (32 - 66)	-2 (-17 - 7)	0.22

Tableau 4 : Résultats d'agrégométrie à T0 avant et après ajout d'aspirine in vitro dans le PRP.
** p : probabilité du test de Wilcoxon*

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative des résultats d'agrégation avant et après ajout d'aspirine dans le PRP à T0 (tab 4).

d. Résultats biologiques à T2 avant et après ajout d'aspirine *in vitro* dans le PRP

	Avant aspirine dans PRP	Après aspirine dans le PRP	Après-Avant	
	Médiane (interquartile)	Médiane (interquartile)	Médiane (interquartile)	p*
AA (%T)	8 (3 - 12)	9 (4 - 12)	1 (-1 - 2)	0.050
Col2 latences (ms)	41 (30 - 50)	35 (27 - 44)	-2 (-11 - 3)	0.094
Col2 (%T)	38 (29 - 46)	35 (31 - 41)	-1 (-5 - 3)	0.23
Col20 latences (ms)	12 (9 - 16)	11 (8 - 16)	0 (-4 - 2)	0.48
Col20 (%T)	73 (64 - 80)	73 (66 - 78)	-2 (-7 - 3)	0.25
Col2/20 (%)	54 (41 - 61)	49 (42 - 57)	2 (-7 - 6)	0.81

Tableau 5 : Résultats d'agrégométrie à T2 avant et après ajout d'aspirine in vitro dans le PRP.
** p : probabilité du test de Wilcoxon*

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative des résultats d'agrégation avant et après ajout d'aspirine dans le PRP à T2 (tab 5).

e. Evolution des paramètres biologiques entre T1 et T2

	T2-T1 Valeurs absolues		T2-T1 Valeurs relatives de T1	
	Médiane (interquartile)	p*	Médiane (interquartile)	p*
AA (%T)	0 (-3 - 3)	0,48	-11 (-33 - 50)	0,59
Col2: latence (ms)	-1 (-15 - 13)	0,64	-2 (-33 - 35)	0,90
Col2 (%T)	0 (-4 - 13)	0,37	0 (-13 - 40)	0,15
Col20: latence (ms)	-2 (-5 - 4)	0,87	-10 (-36 - 57)	0,45
Col20 (%T)	-2 (-9 - 12)	0,73	-3 (-10 - 18)	0,54
Col2/20 (%)	4 (-6 - 14)	0,17	9 (-13 - 46)	**0,037**
TXB_2 (pg/mL)	410 (30 - 1120)	**<0,001**	158 (12 - 711)	**<0,001**

Tableau 6 : Evolution des résultats d'agrégométrie et de concentrations sériques de TXB_2 entre T1 et T2.
** p : probabilité du test de Wilcoxon*

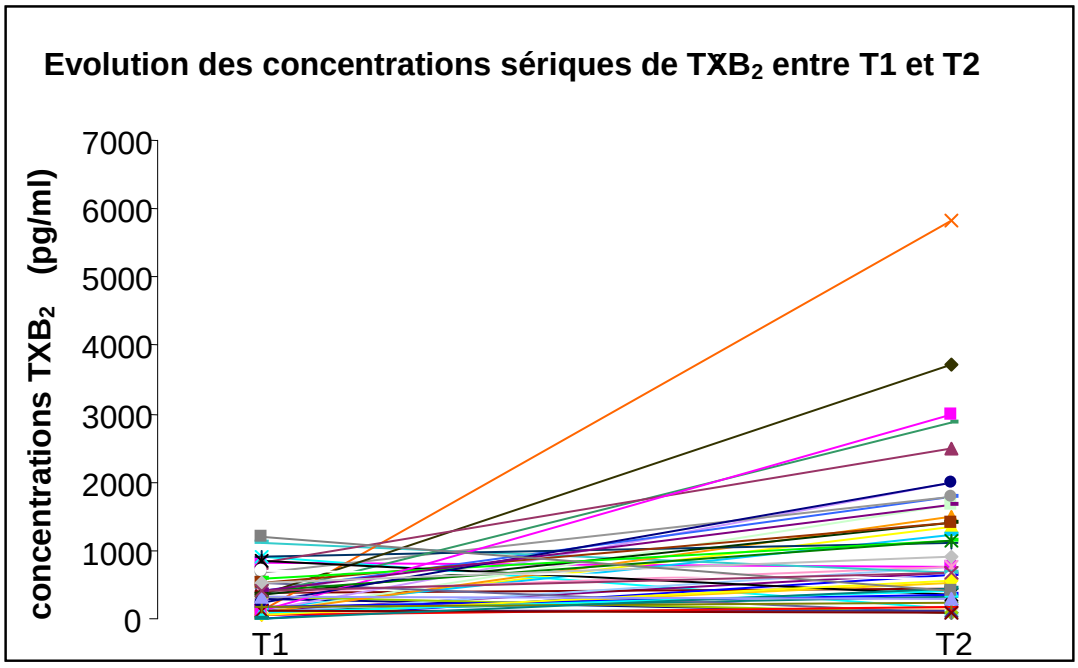


Figure 12 : Evolution des concentrations sériques de TXB_2 entre T1 et T2.

Une augmentation significative des concentrations sériques de TXB_2, en valeurs absolues et relatives a été mise en évidence à T2 en comparaison avec T1 (p<0,001) (tab 6, fig 12, 14).

Une augmentation significative de Col2/20, seulement en valeurs relatives, a été mise en évidence à T2 en comparaison avec T1 (p=0,037). Cette différence est toujours significative si les valeurs atypiques sont exclues (tab 6, fig 14). Les valeurs atypiques sont arbitrairement définies comme les valeurs inférieures à q1-1,5*(q3-q1), ou supérieures à q3+1,5*(q3-q1), où q1 et q3 sont respectivement le 1er et le 3ème quartile, et (q3-q1) l'intervalle interquartile. Elles correspondent à des valeurs que l'on ne s'attend pas à rencontrer dans une distribution régulière.

f. Evolution des paramètres biologiques entre T0 et T1

	T1-T0 Valeurs absolues		T1-T0 Valeurs relatives de T1	
	Médiane (interquartile)	p*	Médiane (interquartile)	p*
AA (%T)	1 (-2 - 5)	0,95	0 (-18 - 100)	0,19
Col2: latences (ms)	-7 (-23 - 25)	0,97	-11 (-41 - 81)	0,64
Col2 (%T)	-4 (-9 - 6)	0,26	-9 (-30 - 13)	0,42
Col20: latences (ms)	-4 (-11 - -2)	**0,0007**	-18 (-61 - -9)	**0,002**
Col20 (%T)	1 (-12 - 8)	0,81	2 (-17 - 11)	0,90
Col2/C20 (%)	-3 (-19 - 3)	*0,096*	-5 (-24 - 12)	0,41
TXB_2 (pg/ml)	-480(-1800 - -200)	**<0,001**	-79 (-94 - -68)	**0,0008**

Tableau 7 : Evolution des résultats d'agrégométrie et de concentrations sériques de TXB_2 entre T0 et T1.
** p : probabilité du test de Wilcoxon*

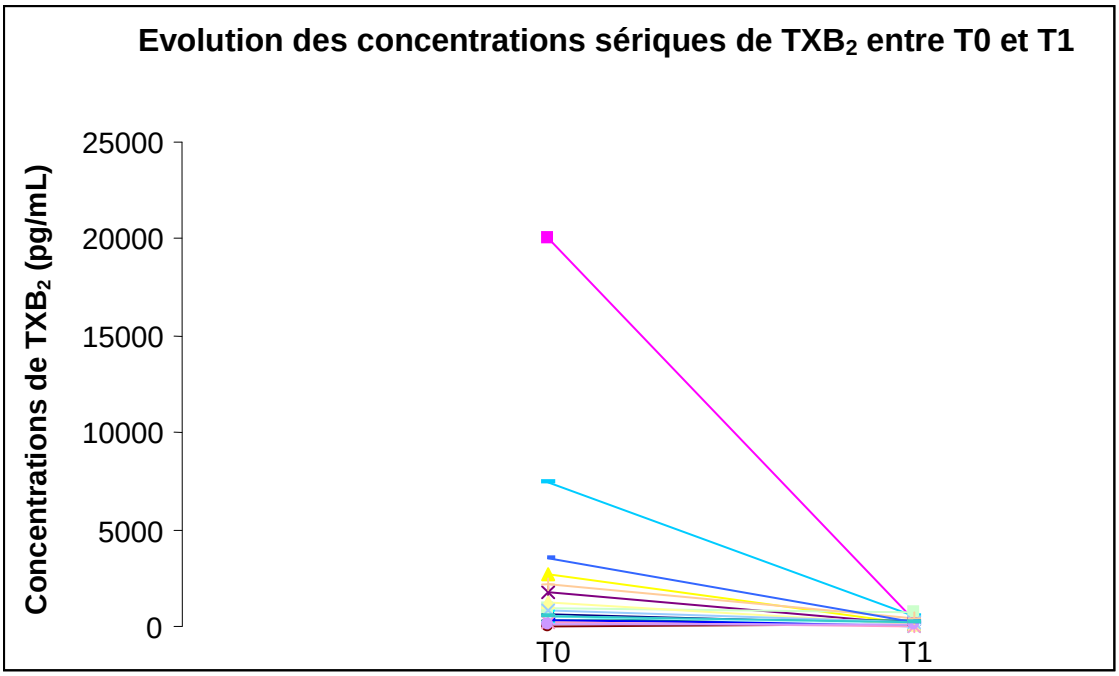


Figure 13 : Evolution des concentrations sériques de TXB_2 entre T0 et T1.

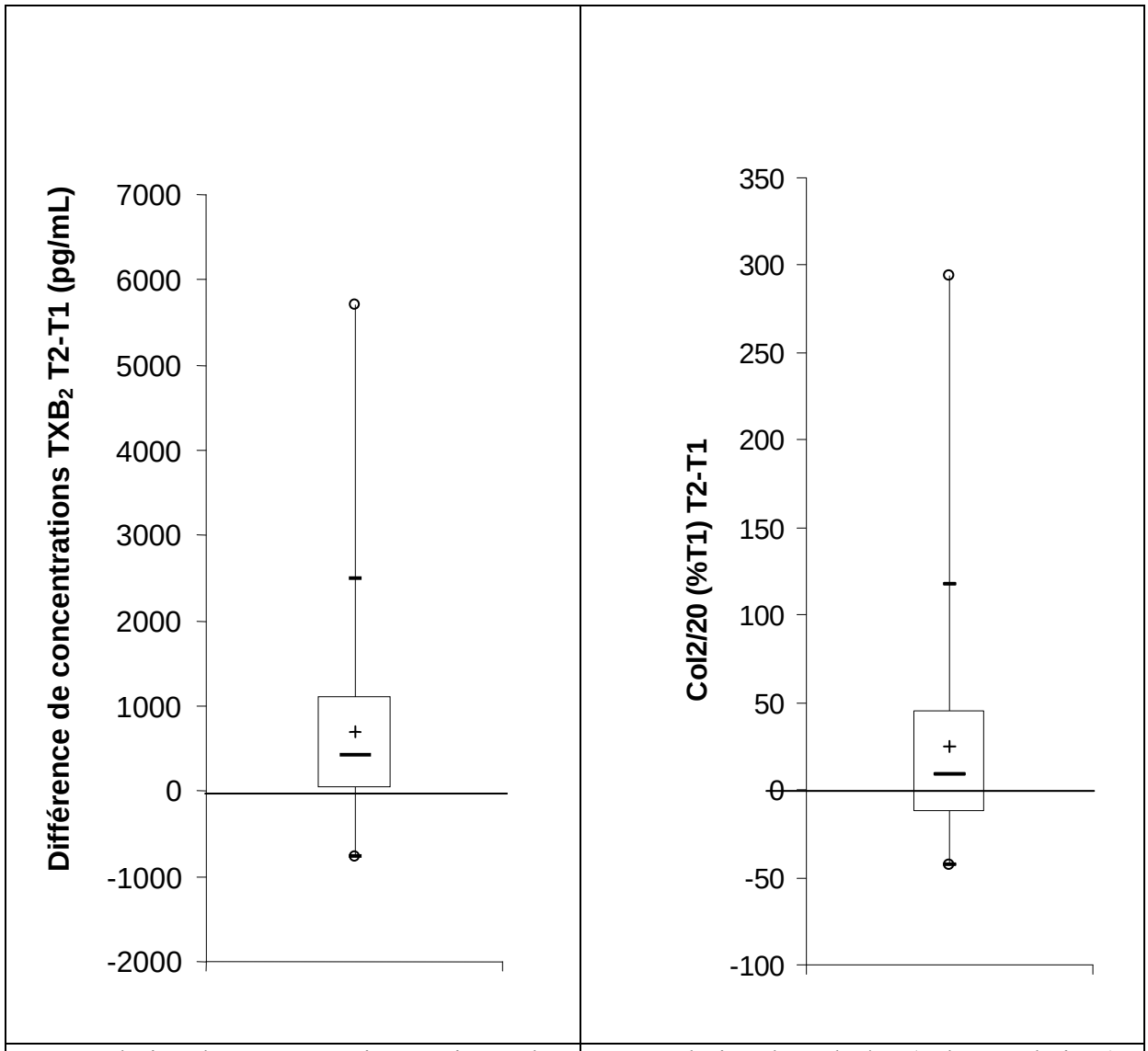
Une diminution significative des concentrations sériques de TXB_2, en valeurs absolues et relatives a été mise en évidence à T1 en comparaison à T0 ($p<0,001$) (tab 7, fig 13).

Col2/20 tend à diminuer à T1 en comparaison à T0 ($p=0,096$) (tab 7).

g. Ensemble des comparaisons des paramètres biologiques : T1-T2 et T0-T1

	p* (T1-T0 absolute values)	p* (T2-T1 absolute values)	p* (T2-T1 relative values)
AA (%T)	0,95	0,48	0,59
Col2 (%T)	0,26	0,37	0,15
Col20 (%T)	0,81	0,73	0,54
Col2/20 (%)	0,096	0,17	**0,037**
TXB_2 (pg/mL)	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**

Tableau 8 : Evolution des résultats d'agrégométrie et de concentrations sériques de TXB_2 à T1-T2 et T0-T1.
** p : probabilité du test de Wilcoxon*



A. Evolution des concentrations sériques de TXB_2 entre T1 et T2 (pg/mL).	B. Evolution de Col 2/20 (valeurs relatives) entre T1 et T2.

Figure 14 : Représentations graphiques des comparaisons T2-T1 pour les concentrations, en valeurs absolues, de TXB_2 sérique(A) et Col2/20, en valeur relative (B).
+ : moyenne
trait horizontal : médiane
limites de la boîte : premier et troisième quartiles
traits horizontaux étroits : moustaches = limites inférieures et supérieures des valeurs atypiques (3 pour TXB_2, 1 pour Col2/20)
petits cercles : valeurs extrêmes.

h. Corrélations entre variations des concentrations sériques de TXB_2 et de l'agrégation

- Evolution T1-T2

	Valeurs absolues		Valeurs relatives	
	r	p*	r	p*
AA (%T)	-0,04	0,81	-0,20	0,16
Col2 latence (ms)	0,14	0,35	0,28	0,053
Col2 (%T)	-0,25	0,075	-0,23	0,12
Col2/20 (%)	-0,15	0,31	-0,11	0,45

Tableau 9 : Comparaison des variations des concentrations sériques de TXB_2 et d'agrégations induites au collagène entre T1 et T2.
r_s : coefficient de corrélation de Spearman
** p : probabilité du test de Wilcoxon*

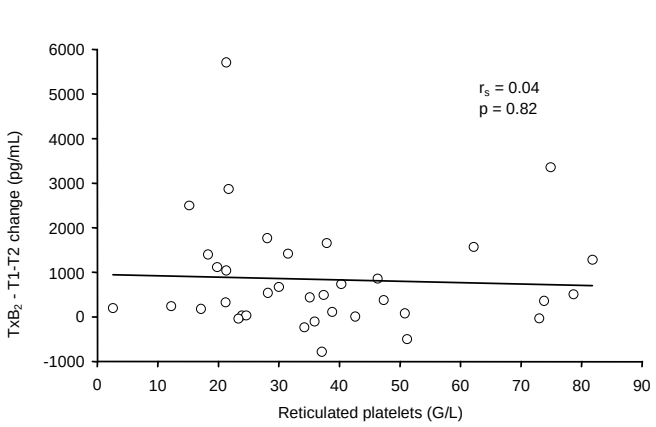
- Evolution T0-T1

	Valeurs absolues		Valeurs relatives	
	r	p*	r	p*
AA (%T)	0,01	0,96	0,02	0,93
Col2 latence (ms)	-0,07	0,80	-0,01	0,97
Col2 (%T)	-0,26	0,30	-0,28	0,26
Col2/20 (%)	-0,11	0,67	-0,14	0,59

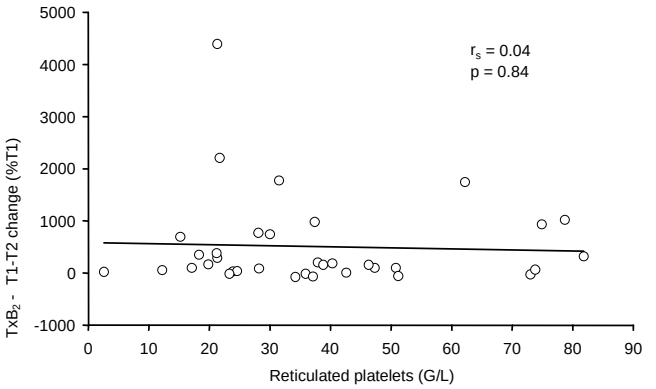
Tableau 10 : Comparaison des variations des concentrations sériques de TXB_2 et d'agrégations induites au collagène entre T0 et T1.
r_s : coefficient de corrélation de Spearman
** p : probabilité du test de Wilcoxon*

Il n'a pas été trouvé de corrélation entre les variations des paramètres d'agrégométrie et du TXB_2 (tab 9, 10).

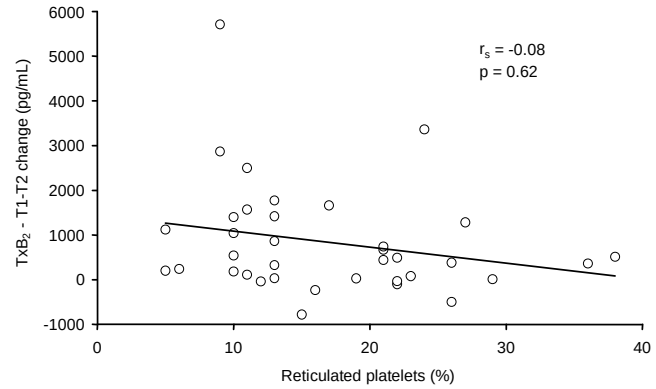
i. Corrélations entre plaquettes réticulées et concentrations sériques de TXB_2



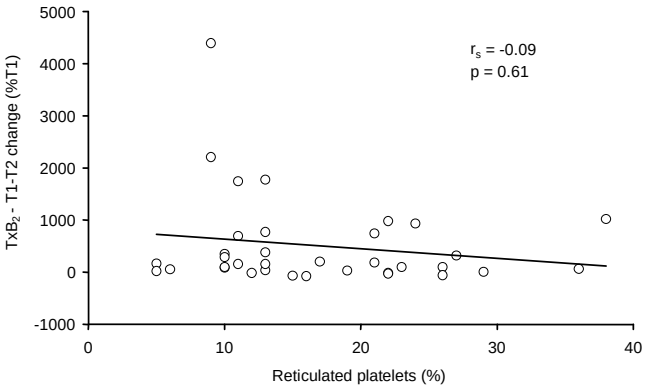
Corrélation entre variation absolue du TXB_2 et plaquettes réticulées exprimées en G/L



Corrélation entre variation relative du TXB_2 et plaquettes réticulées exprimées en G/L



Corrélation entre variation absolue du TX B_2 et plaquettes réticulées exprimées en %



Corrélation entre variation relative du TXB_2 et plaquettes réticulées exprimées en %

Figure 15 : Recherche d'une corrélation entre les variations de concentrations sériques de TXB_2 et le pourcentage, et la numération de plaquettes réticulées.

La mesure du pourcentage de plaquettes réticulées a pu être réalisée pour 36 patients.

Il n'a pas été trouvé de corrélation entre le pourcentage, ou le nombre de plaquettes réticulées, et les variations de l'agrégation et du TXB_2 sérique entre T1 et T2 (fig 15). Il n'y a pas, non plus, de corrélation entre le pourcentage, ou le nombre de plaquettes réticulées et les concentrations sériques de TXB_2 à T2.

j. Relation entre évolution du TXB_2 et facteurs de risque

- **Tabac**

	Tabac				
	Non		Oui		
	n	Médiane (interquartile)	n	Médiane (interquartile)	p*
Evolution T1-T2					
TXB_2 (pg/mL)	29	360 (30 - 1090)	21	510 (50 - 1120)	0.83
TXB_2 (% T1)	28	100 (12 - 757)	20	175 (11 - 520)	0.96
Evolution T0-T1					
TXB_2 (pg/mL)	10	-530 (-2550 - 0)	8	-480 (-1465 - -310)	0.76
TXB_2 (% T1)	10	-79 (-93 - 0)	8	-80 (-97 - -72)	0.51

Tableau 11 : Recherche d'une corrélation entre tabagisme et les variations des concentrations sériques de TXB_2.
** p : probabilité du test non paramétrique de Mann-Whitney.*

- **Hypertension artérielle**

	Hypertension artérielle				
	Non		Oui		
	n	Médiane (interquartile)	n	Médiane (interquartile)	p*
Evolution T1-T2					
TXB_2 (pg/mL)	23	560 (60 - 1280)	27	210 (10 - 740)	0.20
TXB_2 (% T1)	23	165 (16 - 657)	25	100 (8 - 744)	0.90
Evolution T0-T1					
TXB_2 (pg/mL)	4	-350 (-3660 - -120)	14	-560 (-1800 - -200)	0.75
TXB_2 (% T1)	4	-52 (-85 - -13)	14	-81 (-95 - -71)	0.28

Tableau 12 : Recherche d'une corrélation entre hypertension artérielle et les variations des concentrations sériques de TXB_2.
** p : probabilité du test non paramétrique de Mann-Whitney.*

- **Diabète**

	Diabète				
	Non		Oui		
	n	Médiane (interquartile)	n	Médiane (interquartile)	p*
Evolution T1-T2					
TXB_2 (pg/mL)	43	380 (-35 - 1090)	7	640 (50 - 1770)	0.33
TXB_2 (% T1)	42	130 (-7 - 657)	6	464 (28 - 1744)	0.27
Evolution T0-T1					
TXB_2 (pg/mL)	13	-460 (-1800 - -150)	5	-500 (-1130 - -440)	0.63
TXB_2 (% T1)	13	-77 (-93 - -26)	5	-93 (-94 - -79)	0.27

Tableau 13 : Recherche d'une corrélation entre le diabète et les variations des concentrations sériques de TXB_2.
** p : probabilité du test non paramétrique de Mann-Whitney.*

- **Dyslipidémie**

	Dyslipidémie				
	Non		Oui		
	n	Médiane (interquartile)	n	Médiane (interquartile)	p*
Evolution T1-T2					
TXB_2 (pg/mL)	31	380 (-40 - 1280)	19	440 (50 - 920)	0.98
TXB_2 (% T1)	31	100 (-13 - 467)	17	185 (37 - 744)	0.23
Evolution T0-T1					
TXB_2 (pg/mL)	5	-2550 (-3290 - 0)	13	-460 (-1130 - -240)	0.63
TXB_2 (% T1)	5	-93 (-93 - 0)	13	-78 (-94 - -71)	0.92

Tableau 14 : Recherche corrélation entre dyslipidémie et les variations des concentrations sériques de TXB_2.
** p : probabilité du test non paramétrique de Mann-Whitney.*

Aucun des facteurs de risque étudiés n'influe significativement sur les variations des concentrations sériques de TXB_2 entre T2 et T1, T1 et T0 (tab 11-14).

VI. Discussion

Cette étude est la première décrivant l'effet biologique de la première dose orale d'aspirine donnée à la phase aiguë de l'AVC ischémique.

En se plaçant à T1, pour tous les patients, cette dose est capable d'inhiber l'agrégation induite par l'AA, et les concentrations sériques mesurées de TXB_2 sont basses. Chaque patient a donc une réponse plaquettaire à l'aspirine. Il n'y a donc pas de « résistance à l'aspirine », notée par ces tests à T1.

Fontana et al (**45**) ont étudié l'effet d'une dose quotidienne de 100 mg d'aspirine, chez 96 volontaires sains, en mesurant les concentrations sériques de TXB_2 et l'agrégation plaquettaire induite par l'AA, le collagène et l'ADP. Ainsi, ils définirent une « vraie résistance » à

l'aspirine par un défaut d'inhibition d'agrégation plaquettaire avec une concentration élevée de TXB_2. L'aspirine, dans ce cas, ne semble pas agir sur sa cible : la COX1. Cette « résistance » fut décrite seulement chez un seul sujet. Dans ce cas, il n'a pas été mis en évidence de mutation de la COX1 ; la présence d'un facteur sanguin extra-plaquettaire, empêchant l'action de l'aspirine, a été suggérée. Ils définirent une « pseudo-résistance » à l'aspirine par un défaut d'inhibition plaquettaire mais avec une concentration abaissée de TXB_2. Cette situation concerna 28 sujets.

Une « vraie résistance » ne peut, en fait, se définir que par l'absence totale d'action de l'aspirine sur la COX1 (fig 16), donc n'affectant absolument pas la concentration de TXA_2. En conditions expérimentales *in vitro*, la réponse plaquettaire à l'aspirine est nulle. Cela pourrait être donné, par exemple, pour des mutations du site d'acétylation de COX1. Cependant, pour le sujet décrit par Fontana et al, l'augmentation des doses d'aspirine réussit à vaincre « la résistance ». L'insensibilité de la COX1 n'est pas totale, et il n'y a donc pas de « vraie résistance » du sujet. Par contre, en cas d'hyperactivité plaquettaire, l'aspirine peut diminuer des concentrations basales élevées de TXA_2, mais de façon insuffisante pour inhiber efficacement l'agrégation. Dans ce cas, l'aspirine agit bien sur la COX1 mais d'autres voies, comme la COX2, peuvent assurer une production de TXA_2, ou une activation plaquettaire TXA_2 indépendante (fig 17). Ces deux types de moindre réponse sont donc très différents de par leurs mécanismes, leur fréquence et certainement de par les solutions qui pourront être proposées.

Résistance vraie à l'aspirine.

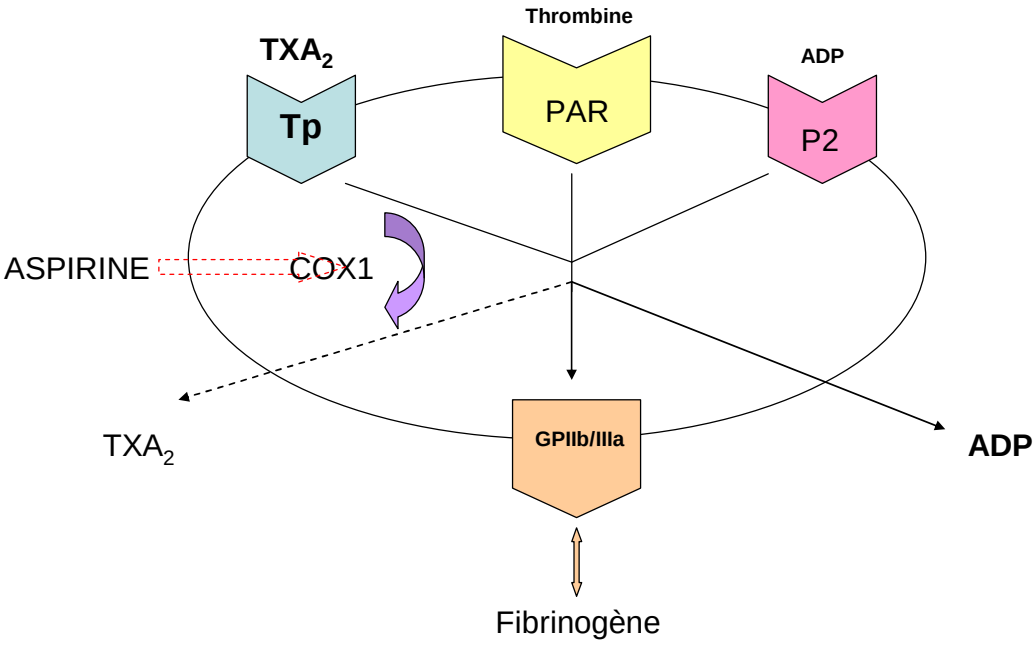


Figure 16 : vraie « résistance » à l'aspirine
L'aspirine serait incapable d'inhiber la COX1 et de diminuer, suffisamment ou pas du tout, la synthèse de TXA_2.

Pseudo-résistance à l'aspirine.

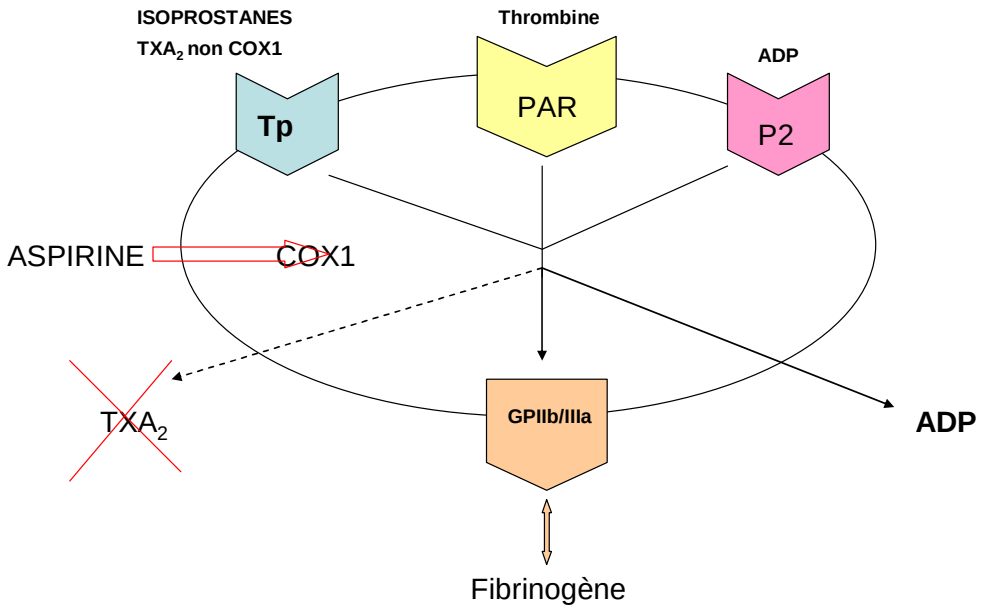


Figure 17 : « pseudo-résistance » à l'aspirine.
L'aspirine inhibe bien la COX1 mais la stimulation par d'autres agonistes est suffisamment forte pour que l'activation plaquettaire ne soit pas affectée par l'inhibition de la synthèse de TXA_2.

Si les résultats d'agrégométrie obtenus avec l'AA sont homogènes, ce n'est pas le cas avec ceux concernant Col2. A T1, les valeurs d'agrégométrie varient de 0 à 18% pour l'AA contre 4 à 63% pour Col2. Cela montre que si l'aspirine, dans ce contexte, est capable d'une inhibition quasi-totale de l'agrégation à l'AA pour tous les patients, elle est partielle et variable pour le collagène (fig 18). Plusieurs raisons nous ont amenés à étudier l'agrégation induite par le collagène. Cette molécule joue un rôle important dans les mécanismes thrombotiques artériels au cours de la rupture d'une plaque athéromateuse (**86**). Les plaquettes expriment plusieurs récepteurs au collagène, qui contribuent à leur activation et à l'adhésion. La rupture de la plaque athéromateuse met à nu la matrice sous-endothéliale contenant du collagène, capable d'activer les plaquettes, et donc de former un thrombus, source potentielle d'emboles. L'aspirine est capable d'inhiber partiellement l'agrégation

plaquettaire produite par le collagène (**87**). Cette agrégation mesurée par photométrie a été suggérée comme étant un meilleur indicateur que celle induite par l'AA (**88**). Les différentes valeurs d'agrégation induite par le collagène, à 6 minutes, à T1 et à T2, seraient donc le témoin d'une variabilité de réponse plaquettaire à l'aspirine. Cela pourrait être le témoin d'une variabilité inter-individuelle. Si l'agrégation à l'AA est un bon témoin de la compliance du patient, l'agrégation au collagène serait un indicateur sensible de la réponse plaquettaire à l'aspirine. Ces résultats, accompagnés de ceux de l'étude menée par Fontana et al montrent que le terme « variabilité de réponse à l'aspirine » devrait être préféré au terme beaucoup plus réducteur de « résistance ».

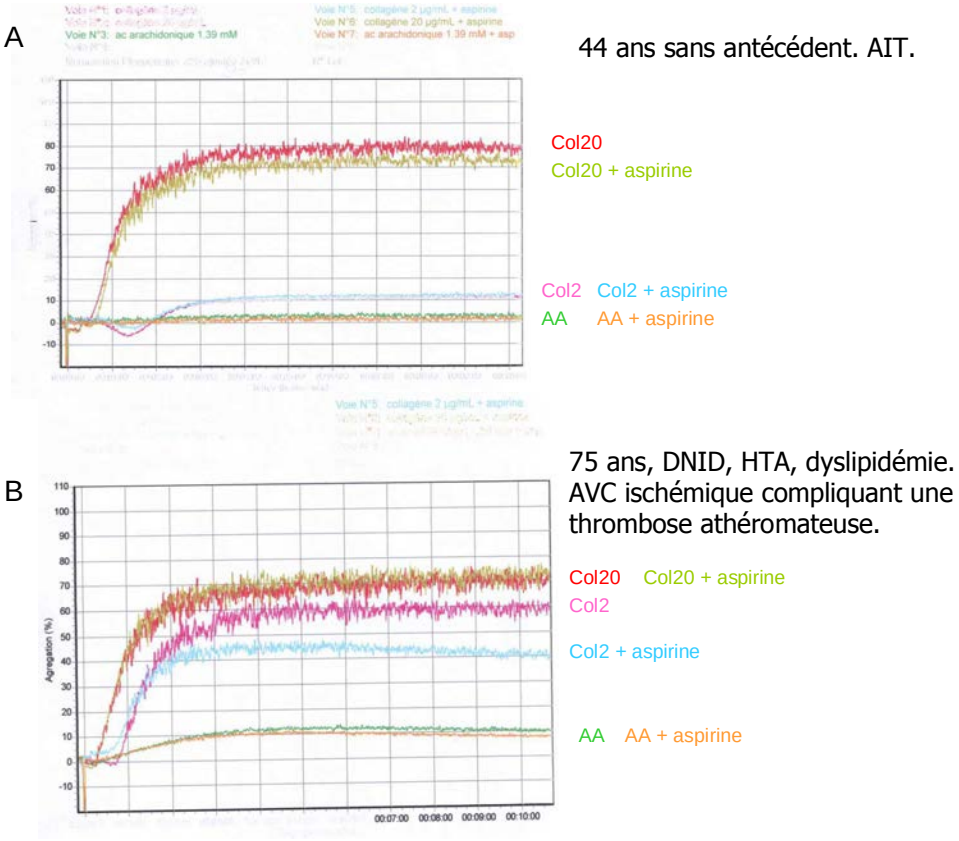


Figure 18 : Agrégométries photométriques réalisées à 2 patients dans les mêmes conditions montrant une variabilité de l'agrégation induite par Col2.
A. Patient répondeur. L'aspirine inhibe fortement l'agrégation induite par Col2.
B. Patient avec mauvaise inhibition par l'aspirine de l'agrégation induite par Col2, partiellement améliorée par l'ajout in vitro d'aspirine dans le PRP.

La série observationnelle à partir de 17 patients, intégrant l'agrégation induite par le collagène, nous amenait à penser que l'inhibition des plaquettes par une dose quotidienne d'aspirine, varie au cours des 24 heures, avec récupération partielle de l'activité plaquettaire entre 2 prises. Cela vient d'être récemment confirmé, pour des patients traités quotidiennement par aspirine, en prévention secondaire de la maladie coronarienne, avec mesure des concentrations sériques de TXB_2 et agrégométrie photométrique avec AA (**89**) C'est pourquoi, nous avons décidé de réaliser nos mesures à 2 temps : au moment de l'inhibition plaquettaire maximale, puis au plus éloigné de la prise d'aspirine. L'augmentation, hautement significative, des concentrations sériques de TXB_2, à T2 en comparaison à T1, montre, clairement, qu'il y'a une récupération de la synthèse de TXA_2, principale cible de l'aspirine. Or, puisque l'inhibition de la COX1 par l'aspirine est irréversible, le TXA_2 ne peut provenir que soit d'enzymes nouvellement synthétisées après la disparition de l'aspirine ou d'une production de TXA_2 indépendante de COX1.

Les plaquettes les plus jeunes, appelées également plaquettes réticulées, contiennent encore de l'ARNm permettant la synthèse de COX1 (**82**). Après le passage de l'aspirine dans le flux sanguin, et son action sur les plaquettes, elle est rapidement éliminée. Les plaquettes réticulées seraient capables de synthétiser de nouvelles enzymes COX1 et même COX2 qui ne seront donc pas soumises à l'action de l'aspirine, et permettre une récupération de l'activité plaquettaire par production de TXA_2. De plus, le renouvellement plaquettaire pourrait être favorisé par les états inflammatoires et par une maladie athéromateuse marquée (**90**), conditions souvent trouvées à la phase aiguë de l'AVC ischémique. Nous n'avons pas réussi à montrer de corrélation entre les variations des concentrations sériques de TXB_2 et le nombre ou le pourcentage de plaquettes réticulées. Cependant, nous n'avons déterminé ce paramètre que pour 36 patients, et presque tous les sujets de notre population présentaient une récupération de l'activité plaquettaire. Il serait intéressant de déterminer la numération de

plaquettes réticulées pour une population avec un plus grand effectif, et de comparer 2 groupes de sujets, avec et sans récupération de l'activité plaquettaire. Un défaut d'inhibition de COX1 par l'aspirine peut, aussi, survenir. L'accès de COX1 peut-être limité par la prise d'AINS qui se fixent, mais de façon réversible dans le canal hydrophobe, site d'action de l'aspirine, rapidement éliminée du flux sanguin. C'est pourquoi, les patients qui avaient pris des AINS, dans un délai inférieur à 24 heures à la prescription de l'aspirine, ne pouvaient être inclus dans notre étude. Le diabète favoriserait la glycation des protéines du canal hydrophobe, diminuant l'affinité de l'aspirine pour COX1 (**78**).

Il existe d'autres sources de TXA2 que la COX1. La COX2, beaucoup moins sensible à l'aspirine que COX1, est également capable d'en synthétiser. Il s'agit d'une enzyme ubiquitaire, présente non seulement dans les plaquettes mais également dans des cellules nucléées : les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales. Elle est capable de produire la prostaglandine H2, précurseur du TXA_2, dont la synthèse est rendue possible malgré l'inhibition de COX1 par l'aspirine. L'expression neuronale de COX2 pourrait aggraver l'ischémie cérébrale (**52**).

La restauration d'une activité plaquettaire est, également, démontrée dans notre étude par l'agrégation induite par le collagène (fig 19) avec Col2/20. L'augmentation significative de Col2/20 à T2 en comparaison avec T1 montre, en regard d'une récupération plaquettaire démontrée par les variations de concentrations sériques de TXB_2, qu'il s'agit d'un indice de la sensibilité plaquettaire à l'aspirine. Cependant, plusieurs points nous amènent à penser que l'augmentation de Col2/20 n'a pas la même signification que celle des concentrations sériques de TXB_2. Tout d'abord, le degré de significativité est plus faible pour Col2/20 que pour le TXB_2, et n'est valable que pour les valeurs relatives. Ensuite, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les variations des concentrations sériques de TXB_2 et celles de l'agrégation. Enfin, l'ajout d'aspirine directement dans le PRP ne diminue significativement pas

l'agrégation induite par le collagène, montrant que d'autres voies, que celle TXA2 dépendante, interviennent dans cette agrégation.

Pulcinelli et al (**37**) ont pu montrer une corrélation positive entre les concentrations sériques de TXB_2 et l'agrégation induite par le collagène en utilisant une méthode différente de la nôtre. La concentration de TXB_2 était mesurée directement dans le surnageant du PRP après photométrie. Pour notre étude, les prélèvements sanguins destinés à cette mesure étaient réalisés, certes, en même temps que ceux destinés à l'agrégométrie mais traités et analysés de façon différente. L'analyse statistique globale ne nous a donc pas permis de montrer une influence de l'ajout d'aspirine, directement dans le PRP, sur l'agrégation induite par le collagène à T0 et à T2. Cependant, certains patients avec une courbe d'agrégation élevée au collagène montrent bien une décroissance de celle-ci par prise d'aspirine per os, ou par ajout direct *in vitro* dans le PRP (fig 20). Nous pourrions émettre l'hypothèse que Col2/20 pourrait impliquer la voie TXA_2 dépendante, mais également d'autres mécanismes non TXA_2 dépendants. Par exemple, les isoprostanes sont des composés, synthétisés par oxydation de l'AA, induisant la vasoconstriction et l'activation plaquettaire, par liaison avec le récepteur du TXA_2. Ces résultats suggèrent que l'agrégation induite par le collagène, et en particulier Col2/20, est un bon indicateur de la sensibilité individuelle des plaquettes à l'aspirine, mais qu'il n'est pas spécifique de la voie TXA_2 dépendante.

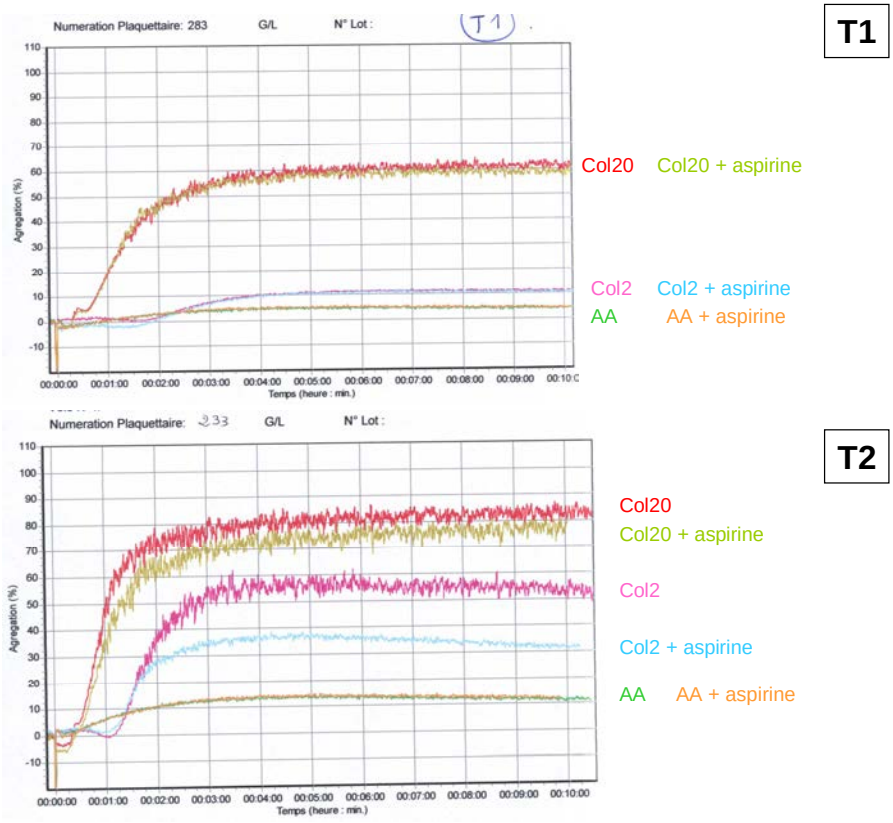


Figure 19 : Agrégométrie photométrique à T1 et T2 montrant une récupération de l'activité plaquettaire par diminution de l'inhibition de l'agrégation induite par Col2.
T1 : Inhibition forte de l'agrégation induite par l'AA et Col2.
T2 : Inhibition forte de l'agrégation induite par l'AA. Inhibition modérée de l'agrégation induite par Col2, améliorée par l'ajout d'aspirine in vitro.
Conclusion : A T2, il est observé une récupération de l'activité plaquettaire avec ascension de la courbe d'agrégation induite par Col2, alors qu'il n'y a pas de modification de l'agrégation induite par l'AA.

L'aspirine étant actuellement l'anti-plaquettaire le plus largement prescrit à la phase aiguë de l'AVC ischémique, la question quant à son utilité chez des patients recevant déjà une dose quotidienne est souvent posée par le clinicien. Halawani et al (**91**) ont montré dans les conditions de la phase aiguë de l'AVC ischémique, pour des patients déjà traités par une dose quotidienne d'aspirine, qu'une dose de 75 à 150 mg n'inhibait pas, pour tous les patients, complètement la voie TXA_2 dépendante. Dix-huit de nos patients étaient déjà traités par une dose quotidienne de 75 à 160 mg au moment de l'évènement qualifiant (fig 18). Au regard des résultats d'agrégométrie photométrique, 2 d'entre eux conservaient une agrégation induite

par l'AA, nous faisant douter de leur observance thérapeutique (fig 19). L'interrogatoire fut repris, les 2 sujets assurant qu'ils avaient bien pris leur dose habituelle d'aspirine. Notre étude ne comportait pas de mesure de l'aspirine dans le sang, ce qui ne nous a pas permis d'être sûrs que cette prescription avait été respectée. Même si l'effectif est réduit, la diminution des concentrations sériques de TXB_2 est hautement significative à T1 en comparaison à T0 ($p<0,001$). Col2/20 tend également à décroître, mais de façon non significative ($p=0,096$), en raison certainement du peu de patients inclus avec cette condition. Ces résultats démontrent que la dose orale de 300 mg d'aspirine donnée à la phase aiguë de l'AVC ischémique, est capable de compléter l'inhibition, produite par une dose inférieure, de la voie TXA_2 dépendante (fig 20,21), sans que nous n'ayons trouvé un seul malade non sensible.

.

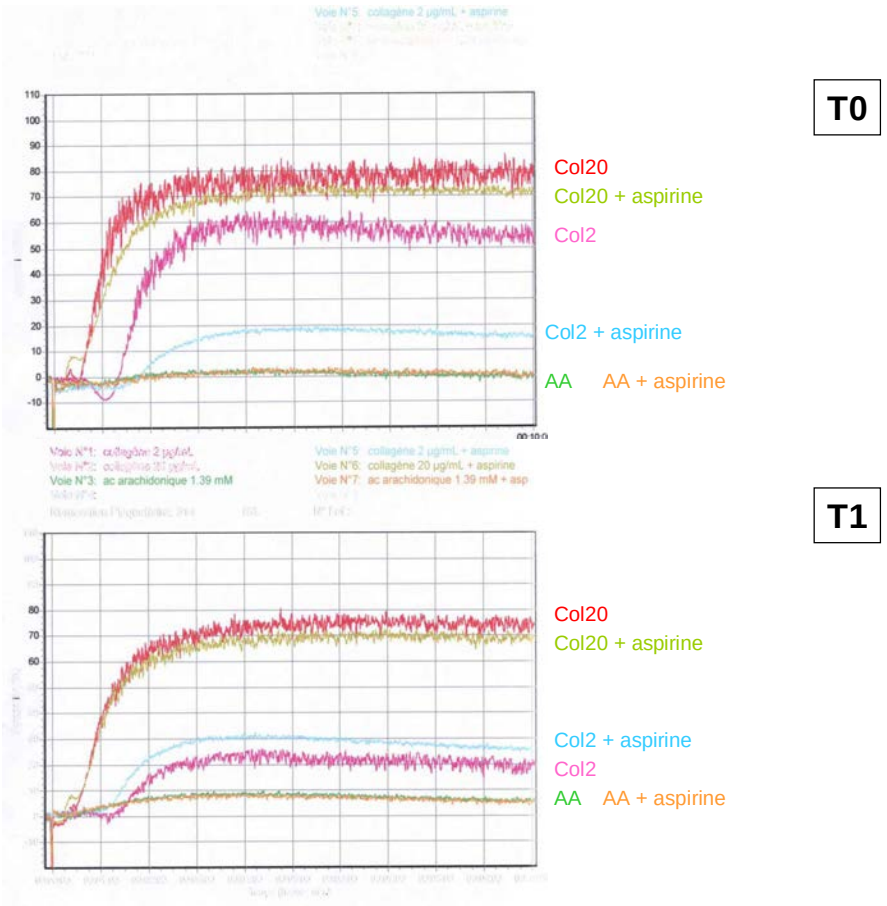


Figure 20 : Agrégométries à T0 et à T1 chez un même patient traité par une dose quotidienne de 75 mg d'aspirine montrant :

- à T0 : une agrégation induite par Col2 peu inhibée par la prise quotidienne orale d'aspirine, inhibée ensuite fortement par l'ajout d'aspirine, in vitro, directement dans le PRP. L'observance au traitement est prouvée par une agrégation induite par l'AA inhibée.
- à T1 : après la dose de 300 mg d'aspirine per os, la courbe rose rejoint la bleue, l'inhibition de l'agrégation induite par Col2 est équivalente à celle produite par l'ajout direct d'aspirine dans le PRP.
Conclusion : la dose orale de 300mg d'aspirine est capable de compléter l'inhibition plaquettaire produite par une dose inférieure quotidienne.

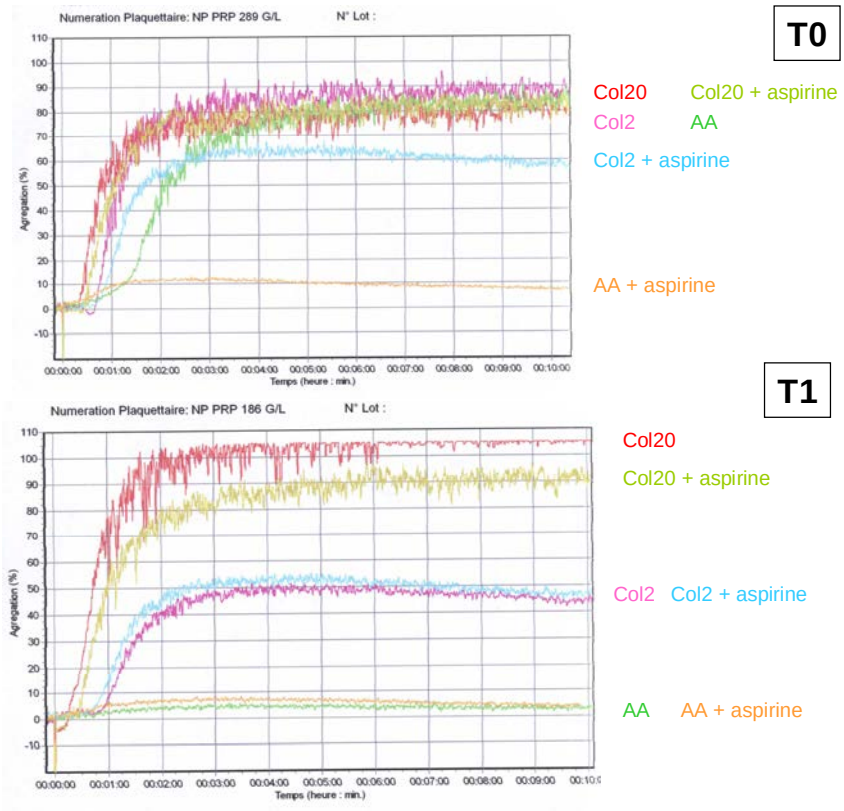


Figure 21 : Patiente traitée quotidiennement par 75 mg d'aspirine au moment de la survenue d'un AIT.
T0 : Pas d'effet de l'aspirine. L'ajout in vitro d'aspirine inhibe fortement l'agrégation induite par l'AA et modérément celle induite par Col2.
T1 : La prise de 300 mg d'aspirine per os inhibe fortement l'agrégation induite par l'AA et modérément celle induite par Col2.
Conclusion : Même si l'observance, à domicile, n'est pas certaine, l'ajout d'aspirine in vivo et in vitro n'entraîne qu'une inhibition modérée de l'agrégation induite par Col2. Ceci serait le témoin d'une moindre sensibilité plaquettaire à l'aspirine

Ces observations permettent de proposer des solutions thérapeutiques afin d'améliorer la protection par les anti-plaquettaires à la phase aiguë de l'AVC ischémique.

Si l'on veut agir sur la voie TXA_2 dépendante, il pourrait être proposé d'augmenter la fréquence d'administration de l'aspirine au moins pendant les 24 premières heures. Ainsi, les jeunes plaquettes pourraient être plus souvent exposées à l'aspirine. L'une des solutions envisagées aux productions de TXA_2 autres que celles de COX1 était l'emploi d'un antagoniste spécifique des récepteurs du TXA_2, appelé S18886 ou terutroban. Malheureusement, celui-ci n'a pas montré de supériorité par rapport à l'aspirine, en prévention secondaire des AVC ischémiques dans l'étude PERFORM (**92**). Cependant l'étude ne s'intéressait pas à la phase aiguë, et l'analyse des sous-groupes montrait que la survenue d'évènements ischémiques artériels était significativement moins fréquente pour des patients, ayant présenté l'évènement qualifiant sous aspirine, dans le groupe terutroban, que dans le groupe aspirine. Cette molécule semblait donc utile pour des patients en « échec clinique de l'aspirine ».

Si l'on veut agir sur les autres voies d'activation plaquettaire (non TXA_2 dépendantes), l'emploi d'autres anti-plaquettaires parait indispensable (fig 22). Cependant, peu sont utilisés en Neurologie et n'ont jamais été utilisés dans des études avec des effectifs aussi importants que CAST ou IST à la phase aiguë de l'AVC.

L'activation des récepteurs P2 par l'ADP joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire (**93**). Les thiénopyridines ont été développées pour bloquer le récepteur $P2Y_{12}$ de façon irréversible. Ticlopidine est actuellement très peu prescrite en France, à cause d'une toxicité hématologique accrue. Elle a été remplacée par clopidogrel qui est utilisé dans la prévention secondaire des complications ischémiques artérielles de l'athérome, avec une légère supériorité à l'aspirine dans l'étude CAPRIE (**12**). Clopidogrel est aujourd'hui fréquemment prescrit dans la prévention secondaire de l'AVC ischémique, mais encore une fois, des études manquent pour connaître son effet à la phase aiguë. Cependant, il existe également avec clopidogrel des variabilités de réponse de l'agrégabilité plaquettaire (**94,95**).

Clopidogrel doit être converti en métabolite actif, notamment par le cytochrome P450 3A4. De nombreux médicaments empruntent la même voie et peuvent interférer avec son métabolisme. Le polymorphisme des récepteurs $P2Y_{12,}$ des cytochromes et les variabilités pharmacocinétiques sont également incriminés (**96**). En dehors du domaine neurologique, prasugrel a été comparé à clopidogrel par des tests plaquettaires (**97**), et en prévention des phénomènes thrombotiques après pose de stents coronariens (**98**). Les résultats montrent une diminution des complications thrombotiques artérielles, mais au prix d'une augmentation des complications hémorragiques. Son efficacité serait due à une meilleure conversion, et moins dépendante du cytochrome P450, du précurseur en métabolite actif. D'autres molécules avec une inhibition réversible des récepteurs $P2Y_{12}$, comme cangrelor, ticragelor ou elinogrel sont en cours d'évaluation dans le domaine de la Cardiologie (**99**).

Dipyridamole inhibe une phosphodiestérase plaquettaire et la captation de l'adénosine. L'European Stroke Prevention Study (**13**) et l'étude ESPRIT (**100**) ont suggéré que l'association d'aspirine à faible dose (2 x 25 mg/j) et de Dipyridamole à action prolongée (2 x 200 mg/j) était plus efficace que l'aspirine seule en prévention secondaire de l'AVC ischémique. Cette association représente donc avec l'aspirine et clopidogrel, les seuls anti-plaquettaires prescrits en prévention secondaire de l'AVC ischémique.

Les récepteurs PARs peuvent être activés par la thrombine et interviennent dans l'agrégation plaquettaire et, plus largement, dans la thrombose artérielle athéromateuse (**101**). Des inhibiteurs de ces récepteurs sont donc en cours d'évaluation. Pour l'instant, aucune application n'existe dans le domaine de la Neurologie.

Les glycoprotéines (GP) IIb/IIIa jouent un rôle important dans la formation du thrombus plaquettaire en liant le fibrinogène aux plaquettes activées (**81**). Des inhibiteurs des GPIIb/IIIa, abciximab et eptifibatide, sont actuellements utilisés pour encadrer les angioplasties coronaires. Tirofiban est actuellement étudié, pour ce même geste, en cas de

résistance à l'aspirine et/ou à clopidogrel (**102**). L'emploi de ces molécules à la phase aiguë de l'AVC ischémique, pour favoriser la reperméabilisation précoce du vaisseau, a donné lieu à des études de phases I et II, mais pas de phase III (**103**). Des observations sont rapportées dans la littérature pour traitement de thromboses du tronc basilaire ou d'embolies distales secondaires à une thrombolyse intra artérielle d'un vaisseau cérébral (**104**).

L'association de l'aspirine à clopidogrel est utilisée en prévention secondaire des complications thrombotiques des angioplasties coronaires (**105**). Cependant, l'étude MATCH (**14**) ne montre pas de bénéfice significatif, en Neurologie, en prévention secondaire des épisodes thrombotiques artériels au long cours, de cette association comparée à clopidogrel seul, avec de plus, une augmentation des complications hémorragiques. Si l'association entre deux anti-plaquettaires avec des mécanismes d'action différents, comme l'aspirine et clopidogrel, pourrait être envisagée, il existe pourtant des phénomènes de résistance pouvant intéresser ces 2 molécules. Lev et al (**106**) ont montré que 47% de patients avec une mauvaise réponse plaquettaire à l'aspirine avaient également une mauvaise réponse à clopidogrel. Les mécanismes incriminés sont le diabète, avec une augmentation des P-sélectines et des GPIIb/IIIa, et le renouvellement plaquettaire plus important chez les sujets jeunes. Une telle association pourrait cependant être utilisée, pendant un temps limité, à la phase aiguë de l'AVC ischémique. Elle diminuerait la survenue d'embols distaux en comparaison avec une monothérapie par aspirine (**107**).

La mesure, en pratique clinique, de façon systématique, de la sensibilité des plaquettes à l'aspirine à la phase aiguë de l'AVC ischémique est à discuter. Elle ne paraît pas faisable, de manière courante, au lit du malade, par l'agrégation photométrique, et par le dosage du TXB_2, même si ce dernier serait le plus sensible. Un test simple comme le Verify Now®, employant le collagène serait à développer et à étudier.

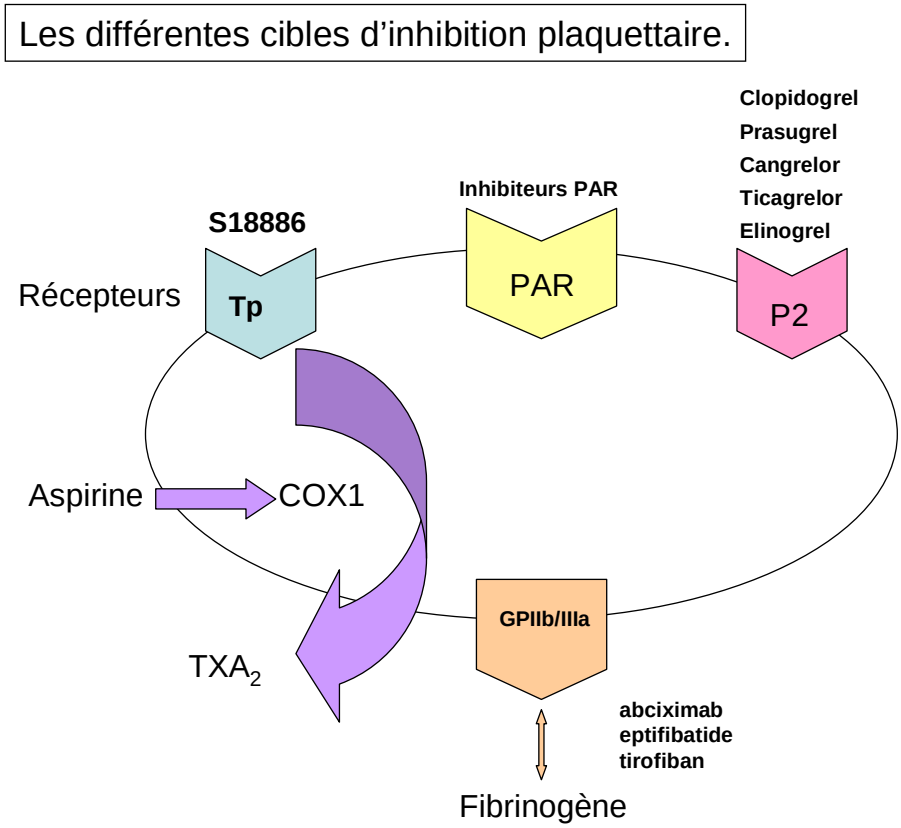


Figure 22 : Chaque récepteur entraînant une activation plaquettaire (récepteurs pour le TXA_2, la thrombine, l'ADP) via sa liaison avec un agoniste, représente une cible thérapeutique d'inhibition de l'activation plaquettaire. Les inhibiteurs des GP IIb/IIIa empêchent la liaison des plaquettes avec le fibrinogène.

Limites de notre étude

Les variations de condition d'expérience ont pu influencer les résultats de notre étude. Les inclusions dans l'étude n'ont pas été consécutives, les analyses n'étant pas possibles le samedi et le dimanche. Les prélèvements et les analyses n'étant pas été réalisés sur le même site, un temps de transport, inférieur à 4 heures, mais non constant, doit être pris en compte. Les inclusions se sont déroulées du 20/12/2010 au 31/03/2011, exposant les prélèvements à des températures ambiantes différentes pendant le transport et l'analyse. Les agrégométries photométriques n'ont pas été réalisées à chaque fois par la même personne. Afin de diminuer

l'effet de ses variations sur nos résultats, nous avons rapporté les résultats d'agrégation induite par Col2 à ceux induits par Col20, en considérant que ces derniers sont indépendants de la voie TXA_2 dépendante. Or, nous avons pu observer, chez certains patients, des modifications de l'agrégation induite par Col20 après ajout d'aspirine *in vitro* dans le PRP, témoignant d'une agrégation pouvant être influencée par le TXA_2. Des doses plus élevées de collagène devraient être employées lors de nos prochaines expériences. La mesure du pourcentage de plaquettes réticulées n'a été possible que pour 36 patients et nous n'avons pas comparé les résultats à un groupe contrôle, ce qui aurait permis de savoir si les patients victimes d'AVC ischémique en ont un pourcentage plus élevé. Le dosage sérique de l'aspirine pour s'assurer de l'observance thérapeutique des patients déjà traités au moment de l'inclusion, n'a pas été réalisé. Enfin, aucun patient de notre groupe n'a présenté de récidive ischémique, ce qui ne permet pas de savoir avec certitude si la récupération plaquettaire expose aux évènements cliniques. D'autres études, multicentriques, avec des effectifs plus élevés seraient nécessaires.

Laboratory effect on platelet activity within 24 hours of the first 300 mg oral dose of aspirin given at hospital during the acute phase of ischemic cerebral events

Richard S, Toussaint-Hacquard M, Fay R, Lacour JC, Ducrocq X, Lecompte T.

Running title: Laboratory effect of first dose of aspirin after stroke

(UNDER REVIEW)

Abstract

Background and purpose: Aspirin is the most commonly used anti-platelet treatment during the acute phase of cerebral ischemic events. However, despite this protection, early ischemic recurrences are frequent and considered as clinical failures of this therapy.

Method: We studied laboratory parameters of the first 300 mg oral dose of aspirin given within 48 hours after an ischemic cerebral event. Two blood samples were taken from all the patients: the first during the third hour following aspirin intake (T1) and the second during the twenty-fourth hour (T2). For patients already treated with a daily dose of aspirin, a supplementary sample was taken before aspirin intake (T0). Platelet reactivity was studied on the basis of serum thromboxane (TX) B_2 levels and light transmission aggregometry after stimulation of platelet-rich plasma by acid arachidonic and collagen 2µg/mL in relation to collagen 20 µg/mL (Col2/20 ratio).

Results: Fifty patients were included. TXB_2 values ($p<0.001$) and relative values of the Col2/20 ratio ($p=0.037$) were significantly higher at T2 compared to T1. For patients already treated with aspirin, TXB_2 levels ($p<0.001$) were significantly lower at T1 compared to T0.

Conclusion: Platelet reactivity recovers within 24 hours following the first 300 mg oral dose of aspirin during the acute phase of a cerebral ischemic event as demonstrated by TXB_2 levels and Col2/20 ratio. This would favour early ischemic recurrences. However, this dose is able to complete the inhibition of the TXA_2 pathway for patients already treated with aspirin.

(ClinicalTrials.gov NCT01375400)

Introduction

Aspirin is widely prescribed after ischemic stroke to reduce thrombotic recurrences (1,2). It preferentially and irreversibly inactivates the cyclo-oxygenase (COX) 1 (3) thus inhibiting production of thromboxane (TX) A_2, a powerful platelet activator. However, although numerous studies describe protection against thrombotic recurrences, failures or laboratory aspects of low dose of aspirin in the long term (4) and the effects of the first dose given during the acute phase of ischemic stroke are less known. Only a few trials have focused on this period (5), the most important being IST (6) and CAST (7). These randomised trials studied the effects of 160 to 300 mg once daily aspirin initiated in patients within 48h after ischemic stroke. They concluded in a reduction of about seven recurrent ischemic strokes for every 1000 patients treated with a maximum follow-up of 6 months. This moderate benefit is offset by the immediate high risk of recurrences: 7% of patients present another cerebrovascular event within a week of the first one (8) and 11% within a month (9). The term "aspirin resistance" has emerged following a description of cerebral ischemic events in patients taking aspirin. It represents both clinical and laboratory failure with an inability to inhibit platelet TXA_2 synthesis and dependent functions (10,11). Some studies (12-15) have attempted to demonstrate a link between these two aspects, and to show that patients with poor response to aspirin are more prone to recurrent ischemic events. However, in contrast to clinical resistance, defined by an ischemic event despite aspirin treatment, there is no clear definition of laboratory resistance. This might be because laboratory resistance is assessed by different tests and not only does the percentage of patients with poor response depend on the type of test used, but the correlation between tests is poor (16). A description of the laboratory effects of aspirin during the acute phase of stroke may help to understand the mechanisms of recurrence and design new therapeutic strategies (17). This study is all the more important as patients already treated by a 75 to 160 mg daily dose of aspirin were also included to observe

effects of a higher dose given during the acute phase of stroke. Variations in platelet inhibition during the 24 hours following aspirin intake have also been reported (18): recovery of platelet activity could be due, in part, to reticulated platelets able to synthesize TXA_2 despite aspirin exposition (19).

The aim of this study was to describe the laboratory effect of the first 300 mg oral dose of aspirin, given at hospital, after an ischemic cerebrovascular event. The effect was measured at the third and twenty-fourth hour after aspirin intake to follow platelet function recovery. The laboratory tests employed were: light transmission aggregometry (LTA) on platelet-rich plasma (PRP) stimulated with arachidonic acid (AA) and collagen, serum TXB_2 levels, and reticulated platelet count and percentage.

Materials and methods

This was a single centre, prospective study approved by the local institutional ethics committee. Each patient gave written informed consent.

Patient inclusion

Fifty patients hospitalized at the stroke unit of Nancy, department of Neurology (France) were enrolled during a period of 3 months (December 2010-March 2011). Eligible patients had presented symptoms of ischemic cerebral events within 48 hours, with the diagnosis confirmed by CT or MRI brain scan and a neurologist's exam. They could have been treated with a daily dose of aspirin. Exclusion criteria were: patients under 18 years old, pregnancy, patients at high risk of bleeding, hemorrhagic stroke, treatment by anticoagulants or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). Age, sex, vascular risk factors, hemoglobin, platelet, and leukocyte counts were noted. Patients received an oral 300 mg dose of aspirin (Kardegic®, Sanofi-Aventis, France), witnessed by the nurse or the neurologist. Two blood

samples were taken by venipuncture into citrated (0.105M) tubes (Vacutainer®, Becton Dickinson) for LTA, and to measure the percentage of reticulated platelets, and into a tube with no anticoagulant to measure serum TXB_2 levels. The first sampling (T1) was performed during the third hour after aspirin intake, as peak plasma levels occur 30 to 40 min after aspirin ingestion, and platelet inhibition is evident by one hour (20). The second sampling (T2) was performed during the twenty-fourth hour, just before the usual second aspirin intake. An additional sampling (T0) was performed before the 300 mg oral dose if the patient was already treated by a daily dose (75 to 160 mg) of aspirin.

LTA

Platelet reactivity was measured by LTA (Soderel Medical Aggregometer, Nancy France). This method is considered as a "gold standard" of platelet function testing and is widely used for identifying and diagnosing platelet function defects (16). The blood samples were centrifuged at 170g for 10 minutes to prepare the PRP. The remaining blood fraction was centrifuged at 2500g for 10 minutes at room temperature to separate platelet-poor plasma (PPP). The PRP was stimulated by 1.39 mmol/l of AA (BioData Corporation Horsham USA) and by two concentrations of collagen (Collagen Horm®, Nycomed Linz, Austria) 2 µg/mL (Col2) and 20 µg/mL (Col20). Col20 induces an aggregation almost independent of the TXA_2 pathway. Aggregation was expressed as the percent change in light transmission from baseline at 6 min using PPP as a reference. For collagen-induced platelet aggregation, results with Col2 were related to results with Col20 (Col 2/20 ratio) to limit the impact of variations induced by the effects of pre-analytical conditions. LTA was repeated after addition of aspirin (100mmol/L) to the PRP.

TXB_2

As TXA_2 is an unstable component that cannot be directly measured, we estimated the levels by measuring the concentration of its metabolite, TXB_2, by immunoassay. Blood samples were incubated for 2 hours at 37°C and centrifuged at 2500g for 10 min at room temperature. The serum was kept frozen at -20°C until analysis. TXB_2 levels were measured by TXB_2 EIA Kit® (Enzo Life Sciences).

Reticulated platelets

Reticulated platelets were measured by flow cytometry assay for 36 patients (19). Five microliters of whole blood were added to a tube containing 1 mL of thiazole orange (Reti-Count® Becton Dickinson) prediluted 1/10 in Cellwash® (Becton Dickinson), and another 5 µL into a tube with 1 mL of Cellwash® as control. After incubation for 30 min in the dark the tubes were centrifugated at 1200g for 2.5 min to form a cellular pellet. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 mL of Cellwash. Flow cytometry was performed on a daily calibrated cytometer (FaCSCalibur® Becton Dickinson). Each analysis was performed on 10 000 stained platelets counted within the platelet gate. Platelets demonstrating an increase in mean fluorescence intensity beyond a threshold margin set at <1% of all platelets at baseline were counted as reticulated platelets, and expressed as a percentage of total platelets counted.

Statistical analysis

All analyses were performed using SAS® Software V9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC USA). The two-tailed significance level was set at $p < 0.05$. Owing to the small sample size, no adjustment for multiple testing was attempted.

Continuous variables were presented as median, interquartile range and overall range, categorical variables as frequency and percent. Within-subject comparisons and correlation analyses were carried out using respectively the non-parametric paired Wilcoxon and Spearman tests.

Results

Fifty patients were included over a 3-month period. Clinical and laboratory data are shown in table 1 and 2.

AA-induced platelet aggregation showed a low median – 6% at T1 and 8% at T2 – with a small interval in extreme values, 0%-18% at T1 and T2. Col2-induced platelet aggregation gave a higher median – 37% at T1 and 38% at T2 – with a larger interval between extreme values, 4%-63% at T1 and 5%-62% at T2 (table 2).

At T2, the increase in TXB_2 serum levels as compared to T1 values in absolute (figure 1A, table 3) and relative values was found highly significant ($p<0.001$). The increase in the Col2/20 ratio was found significant only in relative values ($p=0.037$) (figure 1B, table 3). No correlation was demonstrated between variations in TXB_2 and Col2/20 ratio values.

Before inclusion in this study, 18 patients were already prescribed a daily dose of aspirin. At T1, TXB_2 serum levels in absolute and relative values showed a significant decrease as compared to T0 values ($p<0.001$). Absolute Col2/20 ratio values were non-significantly lower ($p=0.096$) (table 3).

There was no significant change in AA- and collagen-induced platelet aggregation after addition of aspirin to PRP at T1 and T2.

No correlation was found between reticulated platelets (count and percentage) and variation of TXB_2 levels.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to describe the effect of an initial oral dose of 300 mg of aspirin, administered in hospital, after an acute ischemic cerebral event.

The first observation of our results is that the first oral intake of 300 mg aspirin inhibits AA-induced platelet aggregation as measured by LTA in all patients. This test seems to be reliable to detect the action of aspirin on the production of TXA_2. Serum TXB_2 levels measured at T1 were low for all the patients. Thus, there was no "aspirin resistance" observed in this study. In 96 healthy subjects with a one-week course of aspirin 100 mg per day (21), only one subject was qualified as "true aspirin resistant" defined as a poor inhibition of serum TXB_2 production. This was confirmed by a conservative aggregation of PRP, measured by LTA and stimulated by AA, collagen and ADP. However, increasing the aspirin dose (300 and 500 mg) lowered TXB_2 production in this patient, which contradicted the term of "true resistance".

On the other hand, Col2-induced platelet aggregation showed a large variability of response in our study. Collagen plays a pivotal role in arterial thrombosis following atherosclerotic plaque rupture (22) and it is an important *in vivo* primary activator of platelets. Aspirin inhibits collagen-induced platelet activation (23). Therefore, collagen-induced platelet aggregation, measured by LTA, would be more sensitive to qualify response to aspirin than AA-induced platelet aggregation (24). The very different values of collagen-induced platelet aggregation found in our study could reflect an interindividual variability. This would suggest that the term "variable platelet response to aspirin" should be preferred over "aspirin resistance". AA-induced platelet aggregation is a good witness of aspirin taking, but collagen-induced platelet aggregation would be a better indicator of this variable responsiveness.

In patients with coronary disease, it has been demonstrated that platelet inhibition is not constant during 24 hours after a daily dose of aspirin (18), possibly due to a partial recovery of the platelet TX pathway. We also observed this in our study: there was a significant increase in TXB_2 levels at T2 compared with T1 values. This suggests that platelets are able to recover and synthesize new TXA_2 over time after aspirin intake. Nevertheless, although COX1 inhibition by aspirin is considered as irreversible, residual TXA_2 production could be dependent on newly-formed platelets, also called reticulated platelets, associated with diminished antiplatelet effects of aspirin. They could synthesize COX1 and COX2 after aspirin exposition due to the presence of mRNA. As aspirin is quickly eliminated after intake, these newly produced enzymes would not be inhibited and would generate TXA_2 (19). Furthermore, platelet turnover is accelerated in inflammatory states and with extensive atherosclerosis (25), which is a common condition during acute ischemic stroke. We failed to demonstrate any correlation between increase in TXB_2 values and reticulated platelet count or percentage. However, this could be due to the small sample size (36 patients).

There are other sources of TXA_2. COX2 is an inducible enzyme present in platelets but also found in nucleated cells, monocytes, macrophages and endothelial cells. It is responsible for the generation of prostaglandin H2, a precursor of TXA_2 (26,27). Platelets could produce TXA_2 by this pathway even if COX1 is inhibited by aspirin. COX2 is induced by inflammation and could worsen cerebral ischemia (28). Some mechanisms might prevent access of aspirin to COX 1: diabetes mellitus by increasing protein glycation (29) and NSAID by a reversible binding to COX 1 (3). The role of polymorphism of COX1 gene in aspirin effect is still under debate. This variation would lead to a defect of irreversible binding, acetylation and inhibition of COX1 (30-32).

The recovery of platelet function over time was also shown by analysis of collagen-induced platelet aggregation. The significant increase in the Col2/20 ratio would suggest that collagen-

induced platelet aggregation would be a good parameter of platelet sensitivity to aspirin. It has been demonstrated that collagen-induced TXA_2 production and collagen-induced platelet aggregation are correlated by measuring TXB_2 levels in the PRP supernatant after LTA (33). We failed to establish a correlation between variations in TXB_2 and the Col2/20 ratio but our method differed in that it measured serum TXB_2 levels by blood sample. Addition of aspirin to PRP did not significantly change the results of collagen-induced platelet aggregation. This could be explained by other factors than TXA_2 pathway participating in platelet response to collagen. Isoprostans are generated from the free radical-catalyzed oxidation of AA, independently of COX 1 (34). These compounds are able to activate TXA_2 receptors inducing vasoconstriction and aggregation (35). Catecholamines could also exacerbate platelet activity (36).

Our results would suggest that collagen-induced platelet aggregation, and particularly the Col2/20 ratio, is an indicator of individual platelet sensitivity to aspirin, but is not specific to the TXA_2 pathway.

Many clinicians prescribe the first 300 mg oral dose of aspirin during the acute phase of ischemic stroke even if the patient is already taking a lower daily dose. The usefulness of this approach has never been evaluated. Comparison of serum TXB_2 levels and platelet-induced aggregation at T0 and T1 (Table 3) in the 18 patients already taking daily aspirin showed that serum TXB_2 levels are significantly decreased at T1, as compared to T0. The Col2/20 ratio is also decreased though not significantly probably due to the small number of patients. We conclude that the first oral 300 mg dose of aspirin would be able to complete TXA_2 pathway inhibition in patients with lower daily dose of aspirin.

Alternative anti-platelet treatment, during the acute phase of ischemic stroke should be proposed (37,38). For example, increasing the frequency of aspirin administration, during first days following cerebral ischemic events, could prevent platelet recovery and clinical

recurrences. Terutroban, a selective TXA_2 receptor antagonist, could have been a solution to inhibit the effect of residual TXA2 synthesis but no significant difference was found in secondary prevention of ischemic events when compared with aspirin,. However, a significant decrease was noted for patients assigned to terutroban after ischemic stroke despite aspirin treatment (39).

Conclusion

The first oral dose of 300 mg of aspirin administered in hospital after acute cerebral ischemic event was sufficient to inhibit platelets, but recovery of platelet activity during the 24 hours following the treatment was observed. Serum TXB_2 levels appear to be a more sensitive and specific indicator of platelet recovery than collagen-induced platelet aggregation, even if the latter reflects other mechanisms than the TXA_2 pathway. This recovery could be responsible for early ischemic recurrences. Easier and faster tests using collagen should thus be developed to evaluate platelet sensitivity to aspirin for every patient in this situation. New therapeutic strategies, during this phase, should be proposed and evaluated.

References

1 Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest. 2008;133:199-233.

2. O'Donnell MJ, Hankey GJ, Eikelboom JW. Antiplatelet therapy for secondary prevention of noncardioembolic ischemic stroke: a critical review. Stroke. 2008;39:1638-1646.

3. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. N Engl J Med. 2001;345:1809-1817.

4. Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. Stroke. 2006;37:2153-2158.

5. Sandercock PA, Counsell C, Gubitz GJ, Tseng MC. Antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke. Cochrane Database Syst Rev. 2008.

6. International Stroke Trial Collaborative Group. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. Lancet. 1997;349:1569-1581.

7. CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaborative Group. CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke. Lancet. 1997;349:1641-1649.

8. Petty GW, Brown RD Jr, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Survival and recurrence after first cerebral infarction: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1975 through 1989. Neurology. 1998;50:208-216.

9. Coull AJ, Lovett JK, Rothwell PM, Oxford Vascular Study. Population based study of early risk of stroke after transient ischaemic attack or minor stroke: implications for public education and organisation of services. BMJ. 2004;328:326.

10. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL et al. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. Stroke. 1994;25:2331-2336.

11. Alberts MJ, Bergman DL, Molner E, Jovanovic BD, Ushiwata I, Teruya J. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. Stroke. 2004;35:175-178.

12. 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.

13. Gengo FM, Rainka M, Robson M, Gengo MF, Forrest A, Hourihane M et al. Prevalence of platelet nonresponsiveness to aspirin in patients treated for secondary stroke prophylaxis and in patients with recurrent ischemic events. J Clin Pharmacol. 2008;48:335-343.

14. Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. Thromb Res. 1993;71:397-403.

15. Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, Dichgans J, Topka H. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. J Neurol. 2003;250:63-66.

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**.** Kennedy J, Hill MD, Ryckborst KJ, Eliasziw M, Demchuk AM, Buchan AM, FASTER Investigators. Fast assessment of stroke and transient ischaemic attack to prevent early recurrence (FASTER): a randomised controlled pilot trial. Lancet Neurol. 2007;6:961-969.

18. Henry P, Vermillet A, Boval B, Guyetand C, Petroni T, Dillinger JG et al. 24-hour time-dependent aspirin efficacy in patients with stable coronary artery disease. Thromb Haemost. 2011;105:336-344.

19. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, Delao T, Bergeron AL, Dong JF et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. J Throm Haemost. 2007;5:490-496.

20. Patrono C, Coller 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;126:234-264.

21. Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P. Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. J Thromb Haemost. 2006;4:813-819.

22. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. Nat Med. 2002;8:1227-1234.

23. Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. J Thromb Haemost. 2004;2:969-977.

24. DiChiara J, Bliden KP, Tantry US, Hamed MS, Antonino MJ, Suarez TA. The effect of aspirin dosing on platelet function in diabetic and nondiabetic patients: an analysis from the aspirin-induced platelet effect (ASPECT) study. Diabetes. 2007;56:3014-3019.

25. Lucas AR, Korol R, Pepine CJ. Inflammation in atherosclerosis: some thoughts about acute coronary syndromes. Circulation. 2006;113:728-732.

26. Patrignani P. Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. Thromb Res. 2003;110:281-286.

27. Cipollone F, Rocca B, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:246-255.

28. Dore S, Otsuka T, Mito T, Sugo N, Hand T, Wu L et al. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. Ann Neurol. 2003;54:155-162.

29. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. Thromb Res. 2004;113:101-113.

30. Lepantalo A, Mikkelsson J, Resendiz JC, Viiri L, Backman JT, Kankuri E et al. Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. Thromb Haemost. 2006;95:253-259.

31. Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. J Thromb Haemost. 2005;3:2340-2345.

32. Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. Thromb Res. 2003;112:275-283.

33. Pulcinelli FM, Riondino S, Celestini A, Pignatelli P, Trifiro E, Di Renzo L et al. Persistent production of platelet thromboxane A2 in patients chronically treated with aspirin. J Thromb Haemost. 2005;3:2784-2789.

34. 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.

35. Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. Stroke. 1997;28:844-849.

36. Li N, Wallen NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. Circulation. 1999;100:1374-1379.

37. King A, Bath PM, Markus HS. Clopidogrel versus dipyridamole in addition to aspirin in reducing embolization detected with ambulatory transcranial Doppler: a randomized trial. Stroke. 2011;42:650-655.

38. Serebruany VL, Malinin AI, Ziai W, Pokov AN, Bhatt DL, Alberts MJ. Effects of clopidogrel and aspirin in combination versus aspirin alone on platelet activation and major receptor expression in patients after recent ischemic stroke: for the Plavix Use for Treatment of Stroke (PLUTO-Stroke) trial. Stroke. 2005;36:2289-2292.

39. Bousser MG, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox KM et al. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. Lancet. 2011

Table 1: Baseline characteristics of patients

	n (percent)		
Male	26 (52%)		
Female	24 (48%)		
TIA	13(26%)		
Stroke	37(74%)		
Hypertension	27 (54%)		
Smoking	21 (42%)		
Dyslipidemia	19 (38%)		
Diabetes mellitus	7 (14%)		
Previous aspirin treatment	18 (36%)		
	Median	Interquartile range	Extreme values
Age	69	53-78	28-96
Platelet count (G/L)	222	183-283	51-565
Reticulated platelets (percent)	14	10.5-22	5-38
Reticulated platelets count (G/L)	34.7	21.5-46.3	2.5-82
Hémoglobin (g/dL)	13.7	12.7-15.3	9.8-16.7
Leucocytes (G/l)	8	6.4-9.5	5.2-16

Table 2: Laboratory characteristics at T0, T1 and T2

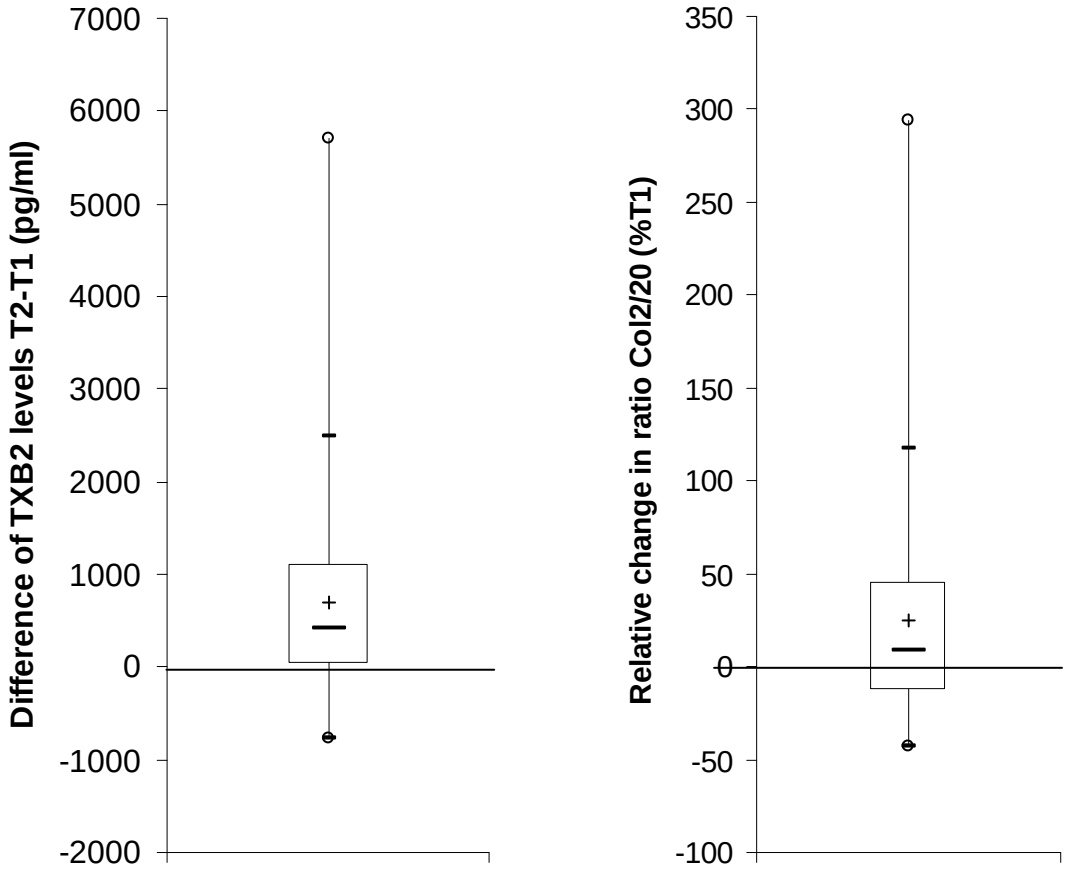
	T0			T1			T2		
	Median	Interquartile range	Extreme values	Median	Interquartile range	Extreme values	Median	Interquartile range	Extreme values
AA (%T)	8	2 – 13	0 – 82	6	4 – 10	0 – 18	8	3 – 12	0 – 18
C2 (%T)	47	30 – 58	3 – 90	37	21 – 48	4 – 63	38	29 – 46	5 – 62
C20 (%T)	71	63– 78	30 – 85	72	64 – 78	36 – 105	73	64 – 80	50 – 94
C2/C20 (%)	61	40 – 79	6 – 100	48	32 – 64	9 – 94	54	41 – 61	8 – 88
TXB2 (pg/mL)	700	320 - 2200	50 - 20000	255	110 - 540	0 - 1200	680	320 - 1400	85 - 5840

Table 3: Statistical comparison, Wilcoxon paired test, between T0, T1 and T2 values

	p (T1-T0 absolute values)	p (T2-T1 absolute values)	p (T2-T1 relative values)
AA (%T)	0.95	0.48	0.59
C2 (%T)	0.26	0.37	0.15
C20 (%T)	0.81	0.73	0.54
C2/C20 (%)	0.096	0.17	**0.037**
TXB2 (pg/mL)	**<0.001**	**<0.001**	**<0.001**

Wilcoxon paired test with significance level set to **$p < 0.05$**.

Figure 1: Change in TXB2 levels (pg/mL) (A) and in Col2/20 ratio (B) between T2-T1



A B

Figure legend 1:

+: mean

Large horizontal line: median

Box limits: interquartile range

Small horizontal lines: limits of atypical values (3 for TXB_2 levels and 1 for Col2/20 ratio)

Circles: extreme values

VII. Une autre situation de défaut d'inhibition de l'activité plaquettaire au décours de l'AVC ischémique : la thrombocytémie essentielle

La TE est une maladie monoclonale, faisant partie des syndromes myéloprolifératifs, avec anomalie acquise d'une cellule souche pluripotente, entraînant des anomalies morphologiques et fonctionnelles des plaquettes. Les critères diagnostiques sont donnés par le tableau 15.

Critères majeurs	**Critères mineurs**
A1. Plaquettes > 600 000/mm^3 pendant au moins 2 mois.	B1. Pas de cause de thrombocytose réactionnnelle.
A2. Mutation JAK2+.	B2. Pas de déficit en fer.
	B3. Pas de maladie de Vaquez.
	B4. Pas de leucémie myeloïde chronique.
	B5. Pas de myelofibrose.
	B6. Pas de syndrome myelodysplasique.

Tableau 15 : Critères diagnostiques de thrombocytémie essentielle (ASH 2005)
Diagnostic de thrombocytémie essentielle si :
A1+A2+B3 à B6 (TE JAK2+)
A1+ B1 à B6 (TE JAK2 -)

La TE une cause rare d'AVC ischémique (**108**) mais grave car elle expose à un risque élevé de thromboses récurrentes, qu'elles soient artérielles ou veineuses. Nous avons étudié, rétrospectivement, 14 patients présentant un AVC ischémique dans un contexte de TE. L'étude (**109**) comprenait 8 femmes et 6 hommes âgés de 40 à 87 ans, dont 3 patients de moins de 45 ans. Seulement 2 patients n'avaient pas de facteurs de risque vasculaire. La TE a été diagnostiquée suite à l'AVC, sauf pour 2 patients où la pathologie était déjà connue auparavant. Au moment de l'AVC, un patient était déjà traité par aspirine, un autre par anti-vitamine K et un autre par les 2. Les numérations plaquettaires allaient de 407 à 1931 G/L, et 5 patients avaient moins de 600 G/L. La mutation JAK2V617F a été trouvée chez 8 patients.

Il existait une pousse spontanée des progéniteurs hématopoeitiques pour 9 patients. Treize patients furent traités par l'association d'un anti-plaquettaire avec un cytoréducteur. La durée moyenne de suivi fut de 2,8 ans sans récidive thrombotique.

Dans la TE, la survenue de la thrombose ne peut pas être seulement expliquée par la thrombocytose (**110**). D'autres facteurs physiopathologiques interviennent avec anomalies du contenu comme des modifications morphologiques et d'activité des plaquettes, des leucocytes et défaut d'inhibition de la coagulation et des anomalies du contenant avec activation endothéliale (**111**). La présence de plaques athéromateuses facilite l'agrégation de plaquettes très réactives. Ces différents mécanismes expliquent pourquoi la numération plaquettaire n'est pas forcément très élevée au moment de la thrombose. Cependant, le diagnostic doit être fait le plus tôt possible, car sans traitement, le patient est exposé à des récidives thrombotiques. Le risque est réduit par les anti-plaquettaires, mais l'association à un cytoréducteur permet de mieux protéger le patient, diminuant de moitié les récidives thrombotiques (**112,113**). En effet, l'augmentation du turn-over plaquettaire est responsable d'une synthèse accrue de COX1 et de COX2, et donc, d'une production de TXA_2. Le traitement cytoréducteur vise à freiner ce turn-over pour éviter la récupération de l'activité plaquettaire entre 2 prises d'aspirine. L'étude de l'agrégation plaquettaire par photométrie donne des résultats très diverses (**114**). Il serait intéressant, pour des patients atteints de TE, de connaître l'effet biologique de l'aspirine avec et sans adjonction du traitement cytoréducteur.

Dans le cas de patients traités par héparine, pour une thrombose dans un contexte de TE, le diagnostic de thrombopénie induite à l'héparine (TIH) peut-être retardé du fait de numérations plaquettaires restant élevées. Le clinicien peut alors méconnaître une diminution d'une numération plaquettaire basale très élevée. Pour la surveillance de survenue d'une TIH, la chute de plus de 30 % de la numération plaquettaire est un critère à préférer à la définition classique de la thrombopénie, inférieure à 150 G/L (**115,116**).

European Journal of Neurology 2011, 18: 995–998 doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03188.x

SHORT COMMUNICATION

Ischaemic stroke and essential thrombocythemia: a series of 14 cases

S. Richard[a], J. Perrin[b], P. -A. Baillot[a], J. -C. Lacour[a] and X. Ducrocq[a]

[a]CHU Nancy, service de Neurologie, Hopital Central, 29 avenue du Marechal de Lattre de Tassigny-CO, Nancy Cedex; [b]CHU Nancy, service d'Hématologie Biologique-Hémostase Médicale, hôpitaux de Brabois, rue du Morvan, Vandoeuvre Les Nancy Cedex, France

Keywords:
antiplatelet agent, cytoreductive treatment, essential thrombocythemia, ischaemic stroke

Received 29 April 2010
Accepted 6 July 2010

Background: Essential thrombocythemia (ET) is considered as a rare cause of stroke, partially because of difficulties to identify it when platelet count is not greatly elevated. However, early detection of ET is important because, without adapted treatment, recurrent thromboses are frequent.

Method: We collected, retrospectively, data from 14 cases of stroke patients with ET. Clinical characteristics, ischaemic stroke, laboratory data (platelet and leucocyte count, haemoglobin, JAK2 V617F mutation, culture of haematopoietic progenitors) and treatment were reviewed. Every patient has been interviewed by phone to evaluate outcome.

Results: The population consisted of nine women and five men with ages ranging from 40 to 87 years. Most of the patients (12) had atherosclerotic risk factors and two presented a thrombus in the internal carotid. ET was diagnosed early after the onset of stroke except in two patients. The platelet count was under $600*10^9$/L for five patients. Mutation JAK2 V617F was found for eight patients. Thirteen patients were treated with an association between antiplatelet and cytoreductive treatment and did not present further thrombosis. Median follow-up is 2.8 years.

Conclusion: These cases emphasize the problems of diagnosing ET at the onset of the stroke. Complete blood count has to be carefully read and ET can be suspected even if platelet count is not greatly increased. Diagnosis must be confirmed by haematologist to initiate appropriate treatment.

Introduction

Essential thrombocythemia (ET) is a rare cause, less than 1%, of ischaemic stroke [1]. However, if left undiagnosed and untreated, the patient runs an elevated risk of recurrent thromboses [2]. We reviewed 14 cases of patients with ET and ischaemic strokes.

Data from patients who presented ischaemic stroke with ET between 2001 and 2009 at the Department of Neurology at the hospital of Nancy were retrospectively collected. Clinical characteristics (sex, age and vascular risk factors), ischaemic stroke, laboratory data (platelet and leucocyte count, haemoglobin, JAK2 V617F mutation, culture of haematopoietic progenitors) and treatment were reviewed. Every patient has been interviewed by phone to evaluate outcome. No approval of ethic committee was needed for this study.

Observation

Data from 14 cases – nine women and five men – were collected (Table 1). This series represents 0.2% of total number of strokes and 0.25% of ischaemic brain infarction treated at our department. Patient age ranged from 40 to 87 years with only three patients under 45 years. Only two patients had no vascular risk factors. ET was already known for two patients and diagnosed for the others following the onset of the stroke. Diagnosis of ET was confirmed by a haematologist. At the time of the stroke, one patient was being treated with an antiplatelet drug, one with vitamin K antagonist and one with both. Two patients presented a thrombus in the internal carotid and one patient a vertebral dissection. Platelet count ranged from 407–$1931*10^9$/L. The number of platelets was under $600*10^9$/L for five patients. JAK2 V617F mutation was

Correspondence: S. Richard, CHU Nancy, service de Neurologie, Hopital Central, 29 avenue du Marechal de Lattre de Tassigny-CO n 34 54035 Nancy Cedex, France (tel.: +03 83 85 16 56; fax: +03 83 85 11 59; e-mail: s.richard@chu-nancy.fr).

© 2010 The Author(s)
European Journal of Neurology © 2010 EFNS

Table 1 Collected data about cases

Case/ Age/Sex	Vascular risk factors	Treatment before stroke	Strokes	Platelet (10^9/L)	Haemoglobin (g/dL)	Leucocyte (10^9/L)	JAK2 V617F mutation	*In vitro* culture of haematopoietic progenitors	Outcome	Treatment after stroke
1/40/F	Hypercholesterolemia	None	Right MCA haemorrhagic ischaemic stroke Left MCA ischaemic stroke Thrombus in the left intracranial IC	479	Data not available	Data not available	Yes	+	Right sensitive deficit	Aspirin Hydroxyurea
2/71/M	Hypertension Hypercholesterolemia Tobacco consumption	None	Vertebro-basilar transient ischaemic attacks	407	14.6	7.2	Yes	+	Complete recovery	Aspirin Hydroxyurea
3/60/M	Tobacco consumption Atrial septum aneurysm	None	Left lacunar ischaemic stroke	618	15.9	20.4	Yes	+	Complete recovery	Aspirin Hydroxyurea
4/58/F	Tobacco consumption	None	Left MCA ischaemic stroke	532	13	9.2	Yes	ND	Complete recovery	Aspirin Interferon
5/71/F	ET already known Hypertension	None	Right lacunar ischaemic strokes	1431	13	14.7	No	ND	Complete recovery	Aspirin Hydroxyurea as first-line Anagrelide as second-line
6/34/F	ET already known Tobacco consumption Coronary artery disease	Aspirin VKA	Left IC ischaemic stroke	907	14.2	15.6	Yes	+	Right hemiparesis Aphasia	Aspirin VKA Hydroxyurea
7/76/F	Atrial fibrillation Antiphospholipid antibody	Aspirin Iopidogrel	Left MCA ischaemic stroke	1080	15	9.9	No	+	Complete recovery	Aspirin VKA Hydoxyurea
8/58/M	Hypercholesterolemia	None	Left IC ischaemic stroke Thrombus in the left intracranial IC	579	14.9	9.3	Yes	ND	Right hemiparesis Aphasia	Aspirin Hydroxyurea
9/79/F	None	None	Transient ischaemic attack	642	14	9	ND	+	None	Aspirin as first-line Clopidogrel as second-line
10/47/M	Tobacco consumption	None	Left vertebral artery dissection Transient ischaemic attack	750	10.8	11.6	No	+	None	VKA as first-line Aspirin as second-line Hydroxyurea as first-line Interferon as second-line Anagrelide as third-line
11/58/F	None	None	Right MCA ischaemic stroke	753	18.2	Data not available	Yes	ND	Motor and sensitive deficit of the left arm	Aspirin Hydroxyurea

found in eight patients. *In vitro* culture was performed and showed expansion of haematopoietic progenitors in nine patients. Thirteen patients were treated with a combination of cytoreductive and antiplatelet agents after the stroke. There was no thrombotic recurrence in this series. Median follow-up is 2.8 years.

Discussion

ET is a myeloproliferative disorder with thrombosis as a major complication. Platelet count is not well correlated with vascular complications occurrence [3]. Many factors can contribute to the hypercoagulability state: platelet activation (increased levels in sP-selectin and sCD40L) and increased turnover, alterations of coagulation inhibition (acquired protein C resistance and decrease in protein S), endothelial activation (increase in soluble thrombomodulin) [4], or leucocytes activation [5,6]. JAK2 mutation could promote thrombotic state [4]. Most of our patients presented vascular risk factors, and two of them had a thrombus in the internal carotid [7]. Thrombus could be because of endothelial lesions, such as atherosclerotic plaques. They exacerbate shear stress and platelet aggregability [8]. Lacunar brain infarcts may be caused by haematological disorders [9] but only two patients in our series, presented this type of stroke with other vascular risk factors like hypertension. One of our patients presented vertebral artery dissection, suggesting endothelial damage because of ET [10]. A reported case of Moyamoya syndrome in an adolescent with ET [11] postulates that ET, mediated vasa vasorum occlusion and fibromuscular proliferation, could be related to this syndrome. This physiopathology could explain why the platelet count is not always greatly elevated at the time of stroke rendering ET diagnosis difficult. However, despite these difficulties, early diagnosis of ET is important because of the high risk of recurrent thromboses. This risk is reduced by antiplatelet treatment, usually prescribed in secondary prevention of stroke, but combination with a cytoreductive treatment seems to be more effective and halves the incidence of re-thrombosis [2,12]. Accelerated platelet regeneration has been shown in aspirin-treated ET patients with thromboxane A_2 production through cyclooxygenase 2 and unacetylated cyclooxygenase 1 [13]. Cytoreductive treatment may moderate this regeneration and helps action of aspirin.

Conclusion

ET as a cause of ischaemic stroke [14] might be underdetected because of difficulties to diagnose ET at the time of stroke: platelet count is not always elevated. Complete blood count should be carefully read at this

Table 1 (Continued)

Case/ Age/Sex	Vascular risk factors	Treatment before stroke	Stroke	Platelet (10^9/L)	Haemoglobin (g/dL)	Leucocyte (10^9/L)	JAK2 V617F mutation	*In vitro* culture of haematopoietic progenitors	Outcome	Treatment after stroke
12/87/F	Hypertension Hypercholesterolemia Type 2 diabetes	VKA for phlebitis	Right MCA ischaemic stroke	597	15	9.3	Yes	ND	Left hemiparesis	Aspirin and VKA Hydroxyurea
13/74/F	Hypertension Hypercholesterolemia	None	Left MCA ischaemic stroke	608	13.6	8.7	No	+	None	Aspirin Hydroxyurea
14/41/M	Hypertension Hypercholesterolemia	None	Cerebellar ischaemic stroke	608	14.6	7.1	No	+	Aphasia	Aspirin hydroxyurea

M, male; F, female; ET, essential thrombocythemia; MCA, middle cerebral artery; IC, internal carotid; VKA, vitamin K antagonist; ND, not done.

© 2010 The Author(s)

time and during consultation several weeks later. Suspected diagnosis of ET should be confirmed by a haematologist and cytoreductive treatment discussed.

References

1. Gonthier A, Bogousslavsky J. Cerebral infarction of arterial origin and haematological causation: the Lausanne experience and a review of the literature. *Revue Neurologique (Paris)* 2004; **160**: 1029–1039.
2. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, *et al*. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1132–1136.
3. Austin SK, Lambert JR. The mutation JAK2 V617F mutation and thrombosis. *Br J Haematol* 2008; **143**: 307–320.
4. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, *et al*. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol* 2009; **84**: 102–108.
5. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, *et al*. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000; **96**: 4261–4266.
6. Passamonti F, Rumi E, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Increase in leucocyte count over time predicts thrombosis in patients with low-risk essential thrombocythemia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009; **7**: 1587–1589.
7. Vemmos KN, Spengos K, Tsivgoulis G, Manios E. Progressive stroke due to essential thrombocythemia. *European Journal of Internal Medicine* 2004; **15**: 390–392.
8. Ogata J, Yonemura K, Kimura K, Yutani C, Minematsu K. Cerebral infarction associated with essential thrombocythemia: an autopsy case study. *Cerebrovascular Diseases* 2005; **19**: 201–205.
9. Arboix A, Martí-Vilalta JL. Lacunar stroke. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2009; **9**: 179–196.
10. D'Ambrosio D, Della-Morte D, Gargiulo G, *et al*. Intrapetrous internal carotid artery dissection and essential thrombocythemia: what relationship? A case report. *Cases Journal* 2008; **1**: 354.
11. Kornblihtt LI, Cocorullo S, Miranda C, Lylyk P, Heller PG, Molinas FC. Moyamoya syndrome in an adolescent with essential thrombocythemia: successful intracranial carotid stent placement. *Stroke* 2005; **36**: 71–73.
12. De Stefano V, Za T, Rossi E, *et al*. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica* 2008; **93**: 372–380.
13. Dragani A, Pascale S, Recchiuti A, *et al*. The contribution of cyclooxygenase-1 and -2 to persistent thromboxane biosynthesis in aspirin-treated essential thrombocythemia: implications for antiplatelet therapy. *Blood* 2010; **115**: 1054–1061.
14. Arboix A, Besses C, Acin P, *et al*. Ischemic stroke as first manifestation of essential thrombocythemia. Report of six cases. *Stroke* 1995; **26**: 1463–1466.

© 2010 The Author(s)

Platelets, March 2011; 22(2): 157–159
Copyright © 2011 Informa UK Ltd.
ISSN: 0953-7104 print/1369-1635 online
DOI: 10.3109/09537104.2010.527399

Informa
healthcare

CASE REPORT

Cerebral venous thrombosis due to essential thrombocythemia and worsened by heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis

SEBASTIEN RICHARD[1], JULIEN PERRIN[2], KARINE LAVANDIER[3], JEAN-CHRISTOPHE LACOUR[1], & XAVIER DUCROCQ[1]

[1]*CHU Nancy, Service de Neurologie, Hopital Central, 29 Avenue du Marechal de Lattre de Tassigny-CO n° 34 54035 Nancy, Cedex, France,* [2]*CHU Nancy, Service d'Hématologie Biologique-Hémostase Médicale, Hôpitaux de Brabois, Rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre les Nancy, Cedex, France, and* [3]*CHG Bar le Duc, Unité Neuro-Vasculaire, 1 Boulevard d'Argonne 55012 Bar le Duc Cedex, France*

Abstract
This case describes the medical history of a 61-year-old woman treated for cerebral venous thrombosis (CVT) leading to diagnosis of essential thrombocythemia (ET). During treatment with unfractionated heparin, after initial improvement of clinical state, signs of cerebral hypertension reappeared. Although the platelet count decreased, heparin-induced thrombocytopenia (HIT) was only suspected 2 days later when it dropped below the standard $150 \times 10^9 L^{-1}$ threshold. HIT diagnosis was confirmed by the presence of anti-PF4/heparin IgG. This late finding was the cause of the extension of CVT with worsening of cerebral hypertension necessitating decompressive craniectomy. Elevated basal platelet count due to ET can delay diagnosis and treatment of HIT. In this case, physicians should be more attentive to platelet count variations rather than thrombocytopenia threshold.

Keywords: *Cerebral venous thrombosis, essential thrombocythemia, heparin-induced thrombocytopenia*

Case report

A 61-year-old woman, with a past history of retinal transient ischemic attack, treated with aspirin, and deep venous thrombosis of the leg, was admitted because of aphasia preceded by several days of progressive headache. Computerized tomography (CT) scan (Figure 1A) and Magnetic resonance imaging (MRI) were performed and showed a left temporal ischemic stroke with oedema and haemorrhagic transformation due to a left lateral sinus thrombosis. Platelet count was elevated ($517 \times 10^9 L^{-1}$) and a Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation was found leading to diagnosis of essential thrombocythemia (ET). An intravenous treatment by unfractionated heparin was initiated with improvement of headaches and the clinical state. However, on treatment day 8, signs of intracranial hypertension reappeared with headaches and vomiting. CT scan (Figure 1B) showed progression of haematoma and oedema. The platelet count decreased to $373 \times 10^9 L^{-1}$ but was considered normal. Two days later, the platelet count dropped to $69 \times 10^9 L^{-1}$ and heparin-induced thrombocytopenia (HIT) was suspected. Heparin was discontinued and the patient treated by danaparoid. A nadir of $42 \times 10^9 L^{-1}$ was reached on day 13. HIT was confirmed by anti-PF4/heparin IgG (Asserachrom HPIA, Diagnostica Stago, Asnières, France) and the platelet count rose after heparin withdrawal (Figure 1). The patient developed consciousness impairment due to progression of intracranial hypertension. Consequently, decompressive craniectomy was performed and danaparoid discontinued for 2 days. After surgery, the patient presented oxygen desaturation due to a left proximal pulmonary embolism. The clinical state improved and extubation was possible on day 29. On day 50, the platelet count was $489 \times 10^9 L^{-1}$ and overlap to warfarin was started with cytoreductive treatment by hydroxyurea. Three months later, the neurological

Correspondence: Sébastien Richard, MD, CHU Nancy, Service de Neurologie, Hopital Central, 29 Avenue du Marechal de Lattre de Tassigny-CO n° 34 54035 Nancy, Cedex, France, . Tel: 03 8385 1656. Fax: 03 8385 1159. E-mail: s.richard@chu-nancy.fr

(received 23 September 2010; accepted 23 September 2010)

RIGHTSL

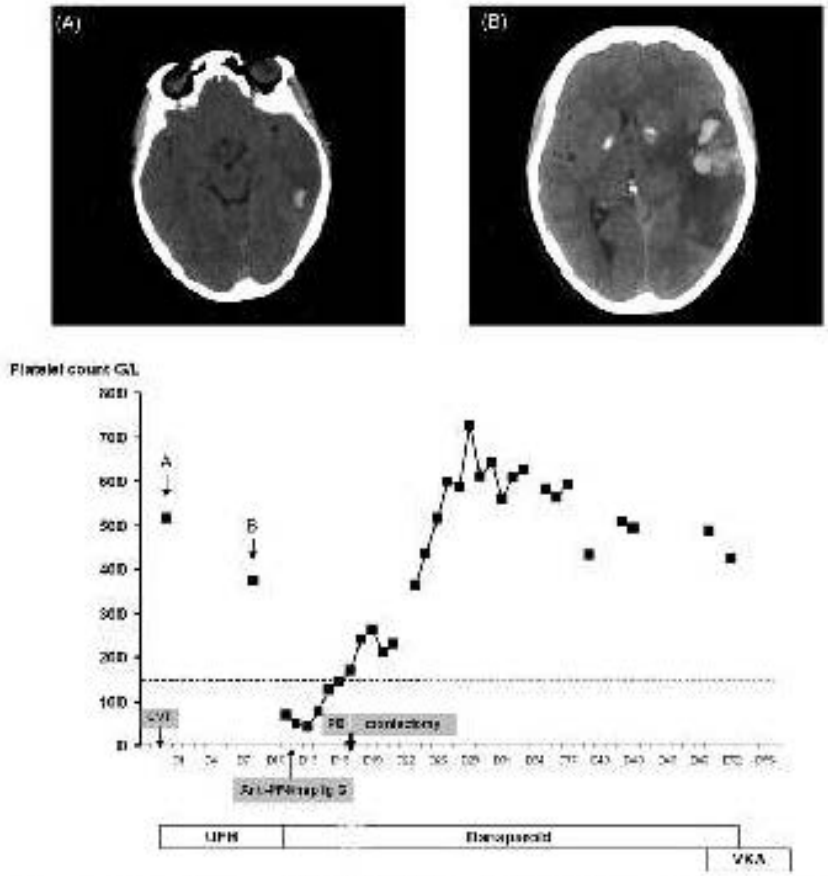


Figure 1. Changes in platelet count over time with associated treatment. 1A. CT scan at cerebral venous thrombosis (CVT) diagnosis. 1B. CT scan showing progression of cerebral hypertension attributed to HIT.
UFH, unfractionated heparin; VKA, vitamin K antagonist; PE, pulmonary embolism.

sequelae were regressive right hemiparesis and aphasia.

ET is a myeloproliferative disorder, possibly responsible for cerebral venous thrombosis (CVT) [1]. Many factors can contribute to the hypercoagulability state: platelet activation with increased turnover; alterations of coagulation inhibition; and endothelial and leukocyte activation. The JAK2 V617F mutation, found in 50% of ET, could promote a thrombotic state [2]. It is now well established that anticoagulation is necessary to treat CVT [3]. Platelet count must be monitored to diagnose early HIT, which is responsible for arterial and venous thrombotic complications. HIT is usually considered when platelet count drops below $150 \times 10^9 L^{-1}$ [4]. However, the diagnosis is more difficult in the case of ET, as platelet count is less likely to fall below the thrombocytopenia threshold because of an elevated basal platelet count before heparin treatment. As a consequence, first platelet counts could be interpreted as normal, even if a decrease is observed and by the time thrombocytopenia is detected, HIT might have been present for several days [5, 6]. A percentage decrease in platelet count is therefore a better indicator of HIT than thrombocytopenia during heparin treatment, especially in patients with ET. Late diagnosis of HIT can lead to major thrombotic complications, as in our patient who developed aggravated intracranial hypertension from extension of CVT due to HIT.

During treatment of CVT with heparin, deterioration of the patient's neurological state, despite well conducted anticoagulation, with a decrease in platelet count should lead the physician to suspect HIT even if thrombocytopenia is not yet present and particularly in the case of an ET patient. Physicians should be more attentive to platelet count variations rather than the classic threshold of $150 \times 10^9 L^{-1}$ in these patients. Early diagnosis of HIT during CVT is all the more important to prevent the extension of thrombosis which can cause dramatic cerebral complications and neurological sequelae.

RIGHTSL

References

1. Godeneche G, Gaillard N, Roy L, Mania A, Tondeur S, Chomel JC, Lavabre T, Arquizan C, Nesu JP. JAK2 V617F mutation associated with cerebral venous thrombosis: A report of five cases. Cerebrovasc Dis 2010;29:206–209.
2. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N, Bellosillo B, Cervantes F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. Am J Hematol 2009;84:102–108.
3. Birkhäupl KM, Villringer A, Meister W, Mehraein S, Garner C, Pelikofer M, Haberl RL, Pfister HW, Schmiedek P. Heparin treatment in sinus venous thrombosis. Lancet 1991;7:597–600.
4. Greinacher A, Warkentin TE. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Review and update. Thromb Res 2006;118:165–176.
5. Houston DS. Heparin-induced thrombocytopenia without thrombocytopenia in a patient with essential thrombocythemia. Am J Hematol 2000;65:331–332.
6. Spectre G, Kalish Y, Schliamser L, Varon D. Heparin-induced thrombocytopenia in myeloproliferative disorders: A rare or under-diagnosed complication? Am J Hematol 2008;83: 420–423.

RIGHTSL

VIII. Conclusion

L'étude des fonctions plaquettaires soumises à l'aspirine, à la phase aiguë de l'AVC ischémique, nous a permis de tirer plusieurs conclusions :

- Chaque patient prenant une dose de 300 mg d'aspirine per os, à l'hôpital, sous couvert d'une surveillance médicale assurant la compliance, présente une réponse par inhibition de l'activité plaquettaire. Cela est montré par une inhibition de l'agrégation induite par l'AA, et une diminution des concentrations sériques de TXB_2.
- L'inhibition plaquettaire est variable suivant les individus. Cette variabilité interindividuelle est mise en évidence par l'agrégation induite par le collagène.
- L'inhibition plaquettaire n'est pas constante au cours des 24 heures qui suivent la prise d'aspirine, il existe une récupération de l'activité plaquettaire. Cela est mis en évidence par la mesure des concentrations sériques de TXB_2 et par l'agrégation induite par le collagène.
- La première dose de 300 mg d'aspirine donnée à la phase aiguë de l'AVC ischémique est capable de compléter l'inhibition plaquettaire pour des patients déjà traités par une dose d'aspirine quotidienne de 75 à 160 mg. Cela est montré par la mesure des concentrations sériques de TXB_2 et, pourrait l'être par l'agrégation induite par le collagène.

L'étude des effets biologiques induits par cette prescription courante peut aider à guider le clinicien, et améliorer la prise en charge de l'AVC ischémique en phase aiguë. D'autres stratégies thérapeutiques durant cette phase, visant à rendre moins variable l'inhibition plaquettaire, pourraient être proposées et étudiées. La variabilité interindividuelle étant démontrée, d'autres outils, utilisables au lit du patient, pour mesurer la réponse plaquettaire, devront être développés afin de pouvoir adapter au mieux le traitement pour chaque cas. Les UNV ne sont pas seulement des unités de soins spécialisées, elles peuvent intégrer une part de recherche fondamentale qui vise à élaborer, évaluer et améliorer les pratiques cliniques.

IX. Références

1. Bejot Y, Caillier M, Rouaud O, Benatru I, Maugras C, Osseby GV, Giroud M. Epidemiology of strokes. Impact on the treatment decision. *Presse Med*. 2007;36:117-127.

2. Lemesle-Martin M, Benatru I, Rouaud O, Contegal F, Maugras C, Fromont A, Moreau T, Giroud M. Epidemiologie des accidents vasculaires cérébraux : son impact sur la pratique médicale. *Encycl Méd Chir, Neurologie*. 2006;17-046-A-10:16p.

3. Niclot P, Crassard I, Cohen A, Bousser MG. Prévention des accidents vasculaires cérébraux. *Encycl Méd Chir, Neurologie*. 2003;17-046-A-60:20p.

4. Strand T, Asplund K, Eriksson S, Hägg E, Lithner F, Wester PO. Stroke unit care--who benefits? Comparisons with general medical care in relation to prognostic indicators on admission. *Stroke.* 1986;17:377-381.

5. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359:1317-1329.

6. Broderick JP. Endovascular therapy for acute ischemic stroke. *Stroke.* 2009;40:103-106.

7. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008;133:199-233.

8. Patrono C, Rocca B. Aspirin: promise and resistance in the new millennium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:25-32.

9. 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.

10. Bousser MG. Antithrombotic agents in the prevention of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27:12-19.

11. Bousser MG. Les antithrombotiques dans la prévention des accidents ischémiques cérébraux. *J Mal Vasc*. 2005;30:267-279.

12. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet.* 1996;348:1329-1339.

13. Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neurol Sci*. 1996;143:1-13.

14. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ; MATCH investigators. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-

risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364:331-337.

15. International Stroke Trial Collaborative Group. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet*. 1997;349:1569-1581.

16. CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaborative Group. CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet.* 1997;349:1641-1649.

17. Multicentre Acute Stroke Trial--Italy (MAST-I) Group. Randomised controlled trial of streptokinase, aspirin, and combination of both in treatment of acute ischaemic stroke. *Lancet*. 1995;346:1509-1514.

18. Coull AJ, Lovett JK, Rothwell PM, Oxford Vascular Study. Population based study of early risk of stroke after transient ischaemic attack or minor stroke: implications for public education and organisation of services. *BMJ*. 2004;328:326.

19. Bousser MG. L'aspirine, pour ou contre ? Editions Le Pommier. 2006.

20. Miner J, Hoffhines A. The discovery of aspirin's antithrombotic effects. *Tex Heart Inst J*. 2007;34:179-186.

21. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72:3073-3076.

22. Sztriha LK, Sas K, Vecsei L. Aspirin resistance in stroke: 2004. *J Neurol Sci.* 2005;229-230:163-169.

23. Patrono C, Rocca B. Drug insight: aspirin resistance--fact or fashion? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4:42-50.

24. 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.

25. Lecompte T. Antiplatelet agents and their therapeutic use. *Rev Prat.* 1999;49:1627-1633.

26. Malinin AI, Atar D, Callahan KP, McKenzie ME, Serebruany VL. Effect of a single dose aspirin on platelets in humans with multiple risk factors for coronary artery disease. *Eur J Pharmacol.* 2003;462:139-143.

27. Nielsen HL, Kristensen SD, Thygesen SS, Mortensen J, Pedersen SB, Grove EL, Hvas AM. Aspirin response evaluated by the VerifyNowtrade mark Aspirin System and Light Transmission Aggregometry. *Thromb Res*. 2008;123:267-273.

28. Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuler JJ, McClelland TJ, Brace LD. Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke.* 1993;24:345-350.

29. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke.* 1994;25:2331-2336.

30. Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res.* 1993;71:397-403.

31. 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.

32. 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.

33. Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, Dichgans J, Topka H. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol.* 2003;250:63-66.

34. Gengo FM, Rainka M, Robson M, Gengo MF, Forrest A, Hourihane M, Bates V. Prevalence of platelet nonresponsiveness to aspirin in patients treated for secondary stroke prophylaxis and in patients with recurrent ischemic events. *J Clin Pharmacol.* 2008;48:335-343.

35. 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.

36. Hohlfeld T, Weber AA, Junghans U, Schumacher M, Boucher M, Schror K, Siebler M. Variable platelet response to aspirin in patients with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24:43-50.

37. Pulcinelli FM, Riondino S, Celestini A, Pignatelli P, Trifiro E, Di Renzo L, Violi F. Persistent production of platelet thromboxane A2 in patients chronically treated with aspirin. J *Thromb Haemost*. 2005;3:2784-2789.

38. Lepantalo A, Mikkelsson J, Resendiz JC, Viiri L, Backman JT, Kankuri E, Karhunen PJ, Lassila R. Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost.* 2006;95:253-259.

39. Alberts MJ, Bergman DL, Molner E, Jovanovic BD, Ushiwata I, Teruya J. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. *Stroke.* 2004;35:175-178.

40. Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke.* 2006;37:2153-2158.

41. Perneby C, Wallen NH, Rooney C, Fitzgerald D, Hjemdahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thromb Haemost.* 2006;95:652-658.

42. 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.

43. Hudson M, Baron M, Rahme E, Pilote L. Ibuprofen may abrogate the benefits of aspirin when used for secondary prevention of myocardial infarction. *J Rheumatol*. 2005;32:1589-1593.

44. Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. *Thromb Res*. 2003;112:275-283.

45. Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P. Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. *J Thromb Haemost*. 2006;4:813-819.

46. Faraday N, Yanek LR, Mathias R, Herrera-Galeano JE, Vaidya D, Moy TF, Fallin MD, Wilson AF, Bray PF, Becker LC, Becker DM. Heritability of platelet responsiveness to aspirin in activation pathways directly and indirectly related to cyclooxygenase-1. *Circulation.* 2007;115:2490-2496.

47. 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.

48. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73:122-130.

49. Camacho M, Vila L. Transcellular formation of thromboxane A(2) in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I-synthase activity. *Thromb Res*. 2000;99:155-164.

50. Patrignani P. Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. *Thromb Res*. 2003;110:281-286.

51. Cipollone F, Rocca B, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:246-255.

52. Dore S, Otsuka T, Mito T, Sugo N, Hand T, Wu L, Hurn PD, Traystman RJ, Andreasson K. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Ann Neurol*. 2003;54:155-162.

53. Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis*. 2002;14:51-58.

54. Larsson PT, Wallen NH, Hjemdahl P. Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. *Circulation.* 1994;89:1951-1957.

55. Li N, Wallen NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation.* 1999;100:1374-1379.

56. Hurlen M, Seljeflot I, Arnesen H. Increased platelet aggregability during exercise in patients with previous myocardial infarction. Lack of inhibition by aspirin. *Thromb Res*. 2000;99:487-494.

57. Ting HJ, Khasawneh FT. Platelet function and isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the Orphan-ligand family? *J Biomed Sci.* 2010;17:24.

58. Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke*. 1997;28:844-849.

59. 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.

60. Cipollone F, Ganci A, Greco A, Panara MR, Pasquale M, Di Gregorio D, Porreca E, Mezzetti A, Cuccurullo F, Patrignani P. Modulation of aspirin-insensitive eicosanoid biosynthesis by 6-methylprednisolone in unstable angina. *Circulation*. 2003;107:55-61.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

64. Valles J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martinez-Sales V, Portoles M, Broekman MJ, Safier LB. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood*. 1991;78:154-162.

65. Valles J, Santos MT, Aznar J, Martinez M, Moscardo A, Pinon M, Broekman MJ, Marcus AJ. Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood.* 2002;99:3978-3984.

66. McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, Lawrie AS, Watt H, Brown MM, Machin SJ. Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol.* 2004;125:777-787.

67. Freedman JE. CD40-CD40L and platelet function: beyond hemostasis. *Circ Res*. 2003;92:944-946.

68. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res*. 2003;92:1041-1048.

69. Faraday N, Becker DM, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Segal JB, Moy TF, Bray PF, Becker LC. Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *Am J Cardiol*. 2006;98:774-779.

70. Macchi L, Petit E, Brizard A, Gil R, Neau JP. Aspirin resistance in vitro and hypertension in stroke patients. *J Thromb Haemost*. 2004;2:2051-2053.

71. Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation*. 1995;92:2432-2436.

72. Ikonomidis I, Lekakis J, Vamvakou G, Andreotti F, Nihoyannopoulos P. Cigarette smoking is associated with increased circulating proinflammatory and procoagulant markers in patients with chronic coronary artery disease: effects of aspirin treatment. *Am Heart J*. 2005;149:832-839.

73. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Swadzba J, Gora PF, Piwowarska W, Duplaga M. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:948-954.

74. Markuszewski L, Rosiak M, Golanski J, Rysz J, Spychalska M, Watala C. Reduced blood platelet sensitivity to aspirin in coronary artery disease: are dyslipidaemia and inflammatory states possible factors predisposing to sub-optimal platelet response to aspirin? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98:503-509.

75. Friend M, Vucenik I, Miller M. Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *Bmj*. 2003;326:82-83.

76. Becker DM, Segal J, Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Bray PF, Moy TF, Becker LC, Faraday N. Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. *Jama.* 2006;295:1420-1427.

77. Fateh-Moghadam S, Plockinger U, Cabeza N, Htun P, Reuter T, Ersel S, Gawaz M, Dietz R, Bocksch W. Prevalence of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2005;42:99-103.

78. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, Kropiwnicka A, Drzewoski J. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. *Thromb Res*. 2004;113:101-113.

79. 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.

80. Sacco M, Pellegrini F, Roncaglioni MC, Avanzini F, Tognoni G, Nicolucci A. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. *Diabetes Care*. 2003;26:3264-3272.

81. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008;451:914-918.

82. 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 Throm Haemost.* 2007;5:490-496.

83. 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.

84. 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.

85. Boneu B, Cazenave JP. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. Deuxième édition. Boehringer Ingelheim France 1997.

86. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227-1234.

87. Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *J Thromb Haemost.* 2004;2:969-977.

88. DiChiara J, Bliden KP, Tantry US, Hamed MS, Antonino MJ, Suarez TA, Bailon O, Singla A, Gurbel PA. The effect of aspirin dosing on platelet function in diabetic and nondiabetic patients: an analysis from the aspirin-induced platelet effect (ASPECT) study. *Diabetes*. 2007;56:3014-3019.

89. Henry P, Vermillet A, Boval B, Guyetand C, Petroni T, Dillinger JG, Sideris G, Sollier CB, Drouet L. 24-hour time-dependent aspirin efficacy in patients with stable coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2011;105:336-344.

90. Lucas AR, Korol R, Pepine CJ. Inflammation in atherosclerosis: some thoughts about acute coronary syndromes. *Circulation.* 2006;113:728-732.

91. Halawani SH, Williams DJ, Webster J, Greaves M, Ford I. Aspirin failure in patients presenting with acute cerebral ischaemia. *J Thromb Haemost*. 2011;106:240-247.

92. Bousser MG, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox KM, Hennerici MG, Mattle HP, Rothwell PM, de Cordoüe A, Fratacci MD; on behalf of the PERFORM Study Investigators. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet.* 2011

93. Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007;5:45-55.

94. Hacquard M, Angioi M, Lecompte T, Vigneron C. Interindividual variability in the laboratory response to the aspirin-clopidogrel combination: are patients with stent occlusion "resistant" to treatment? *Ann Pharm Fr*. 2007;65:169-173.

95. De Miguel A, Ibanez B, Badimon JJ. Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost*. 2008;100:196-203.

96. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Influence of aspirin resistance on platelet function profiles in patients on long-term aspirin and clopidogrel after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2006;97:38-43.

97. Serebruany VL, Midei MG, Meilman H, Malinin AI, Lowry DR. Platelet inhibition with prasugrel (CS-747) compared with clopidogrel in patients undergoing coronary stenting: the subset from the JUMBO study. *Postgrad Med J*. 2006;82:404-410.

98. Antman EM, Wiviott SD, Murphy SA, Voitk J, Hasin Y, Widimsky P, Chandna H, Macias W, McCabe CH, Braunwald E. Early and late benefits of prasugrel in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: a TRITON-TIMI 38 (TRial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet InhibitioN with Prasugrel-Thrombolysis In Myocardial Infarction) analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:2028-2033.

99. Storey RF. Pharmacology and clinical trials of reversibly-binding P2Y12 inhibitors. *Thromb Haemost.* 2011;105:75-81.

100. Halkes PH, van Gijn J, Kappelle LJ, Koudstaal PJ, Algra A. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367:1665-1673.

101. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2008;99:305-315.

102. Valgimigli M, Campo G, de Cesare N, Vranckx P, Hamon M, Angiolillo DJ, Sabatè M, Ferrari F, Furgieri A, Tumscitz C, Repetto A, Colangelo S, Meliga E, Kubbajeh M, Parrinello G, Percoco G, Ferrari R. Tailoring Treatment with Tirofiban in Patients Showing Resistance to Aspirin and/or Resistance to Clopidogrel (3T/2R). Rationale for the Study and Protocol Design. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2008;22:313-320.

103. Mandava P, Thiagarajan P, Kent TA. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists in acute ischaemic stroke: current status and future directions. *Drugs.* 2008;68:1019-1028.

104. Barlinn K, Becker U, Puetz V, Dzialowski I, Kunz A, Kepplinger J, von Kummer R, Gahn G. Combined Treatment with Intravenous Abciximab and Intraarterial tPA Yields

High Recanalization Rate in Patients with Acute Basilar Artery Occlusion. *J Neuroimaging.* 2011.

105. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ; CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation.Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288:2411-2420.

106. 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.

107. King A, Bath PM, Markus HS. Clopidogrel versus dipyridamole in addition to aspirin in reducing embolization detected with ambulatory transcranial Doppler: a randomized trial. *Stroke.* 2011;42:650-655.

108. Gonthier A, Bogousslavsky J. Cerebral infarction of arterial origin and haematological causation: the Lausanne experience and a review of the literature. *Rev Neurol (Paris).* 2004;160:1029-1039.

109. Richard S, Perrin J, Baillot PA, Lacour JC, Ducrocq X. Ischaemic stroke and essential thrombocythemia: a series of 14 cases. *Eur J Neurol*. 2011;18:995-998.

110. Austin SK, Lambert JR. The mutation JAK2 V617F mutation and thrombosis. *Br J Haematol.* 2008;143:307-320.

111. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N, Bellosillo B, Cervantes F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol.* 2009; 84:102-108.

112. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, Barbui T. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med.* 1995;332:1132-1136.

113. Dragani A, Pascale S, Recchiuti A, Mattoscio D, Lattanzio S, Petrucci G, Mucci L, Ferrante E, Habib A, Ranelletti FO, Ciabattoni G, Davì 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.* 2010;115:1054-1061.

114. Tsantes AE, Mantzios G, Giannopoulou V, Tsirigotis P, Bonovas S, Rapti E, Mygiaki E, Kartasis Z, Sitaras NM, Dervenoulas J, Travlou A. Monitoring aspirin treatment in patients with thrombocytosis: comparison of the platelet function analyzer (PFA)-100 with optical aggregometry. *Thromb Res*. 2008;123:100-107.

115. Greinacher A, Warkentin TE. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: review and update. *Thrombosis Res.* 2006;118:165-176.

116. Richard S, Perrin J, Lavandier K, Lacour JC, Ducrocq X. Cerebral venous thrombosis due to essential thrombocythemia and worsened by heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Platelets*. 2011;22:157-159.

ANNEXE 1 : LETTRES D'INFORMATION ET FORMULAIRES DE CONSENTEMENT DES PATIENTS ET DE LEURS REPRESENTANTS

LETTRE D'INFORMATION POUR LE PATIENT

Lisez attentivement cette notice et posez toutes les questions qui vous sembleront utiles. Vous pourrez alors décider si vous voulez participer à cette recherche ou non.

ETUDE DE LA REPONSE PLAQUETTAIRE A L'ASPIRINE A LA PHASE AIGUE DE L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL ISCHEMIQUE

Nom et adresse du Promoteur :

CHU de Nancy
29, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny - 54035 NANCY cedex

Monsieur, Madame, Mademoiselle

Vous venez de présenter un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique. Cette maladie est due à un défaut d'apport de sang à votre cerveau en raison de l'obstruction d'un vaisseau. Afin de prévenir une récidive thrombotique artérielle, l'aspirine est actuellement considérée comme un traitement de choix et administrée au plus tôt après la survenue de l'AVC. Cependant, certaines de ces récidives peuvent survenir malgré la prescription d'aspirine.

Le docteur (Nom et prénom)……
Adresse……..
Téléphone……..
médecin investigateur, vous propose de participer à l'« Etude de la réponse plaquettaire à l'aspirine à la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral ischémique ».
L'objectif principal est d'étudier la réponse des plaquettes (= éléments du sang permettant la coagulation) à l'aspirine pour des patients qui, comme vous, viennent de présenter un AVC ischémique.
Cette étude devrait nous permettre de connaître l'effet biologique du traitement donné en prévention d'une récidive d'accident thrombotique artériel, de le mesurer au cours du temps, d'en déterminer les limites et de proposer d'autres stratégies thérapeutiques pour améliorer la protection à la phase aiguë de l'AVC ischémique.

Cette recherche est menée par le service de Neurologie du CHU de Nancy.
L'étude se déroulera de la façon suivante :

Après une lecture attentive de cette note d'information, si vous acceptez de participer vous signerez le formulaire de consentement éclairé (en 3 exemplaires dont 1 vous sera remis).
Dans le cadre de la prise en charge habituelle de l'AVC, vous recevrez la dose d'aspirine habituellement prescrite à la phase aiguë de l'AVC ischémique (300 mg per os).
Spécifiquement pour l'étude, nous souhaitons :

- vous faire 2 prélèvements sanguins après la dose d'aspirine : le premier entre 2h et 3h après la dose et le deuxième entre 23h et 24h après la dose.
- si vous preniez déjà de l'aspirine avant l'AVC, vous faire un prélèvement sanguin avant la dose d'aspirine.

Nous voulons effectuer ces bilans sanguins pour évaluer l'efficacité de l'aspirine dans votre cas.

Votre participation à cette étude sera de 24 heures.

Contraintes liée au protocole

Les seules contraintes sont les désagréments liés aux ponctions veineuses réalisées.

Votre participation sera enregistrée sur le fichier national des personnes se prêtant à des recherches biomédicales. Vous aurez la possibilité de vérifier l'exactitude et de rectifier les données informatisées vous concernant dans ce fichier auprès du Dr/Pr……(*nom et coordonnées)* ou du Ministre chargé de la santé. La destruction de ces données s'effectuera au terme du délai prévu par le Code de la santé publique.

Si vous participez déjà à une étude clinique ou si vous êtes en période d'exclusion d'une étude clinique, vous ne pourrez pas participer à notre recherche.

Le Dr…… vérifiera que vous êtes bien affilié(e) à un régime de sécurité sociale.
Votre participation à cette étude est entièrement volontaire.

Votre refus de participer n'aura aucune conséquence sur le type et la qualité de votre prise en charge, ainsi que sur les relations avec le médecin investigateur. Si vous acceptez, vous

pouvez à tout moment quitter cette étude sans conséquences sur votre futur traitement. Vous pouvez également sortir de l'étude si votre médecin pense que c'est mieux pour vous.

Toute nouvelle information devenant disponible au cours de l'étude et pouvant avoir des implications sur votre personne vous sera fournie par le Dr……

Le Promoteur prend en charge les frais supplémentaires liés à d'éventuels fournitures ou examens spécifiquement requis pour cette recherche.

Conformément à la réglementation en vigueur, un contrat d'assurance a été souscrit par le Promoteur.
À l'issue de la recherche, vous serez informé des résultats globaux de la recherche par un courrier de l'investigateur coordonnateur, le Docteur Sébastien RICHARD.
Le Comité Protection des Personnes Est III a émis un avis favorable à la réalisation de cette étude le ……
La DGS a donné son autorisation pour la réalisation de cette étude le ……..

En application de la loi « informatique, fichiers et liberté » du 06 janvier 1978 modifiée, le fichier informatique utilisé pour réaliser la présente recherche a fait l'objet d'une autorisation de la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés). Seules les données nécessaires à la recherche seront recueillies. Vous avez néanmoins le droit de vous opposer à ce que les données vous concernant fassent l'objet d'un traitement automatisé. Si vous acceptez, vous aurez à tout moment le droit d'accéder aux données vous concernant. Vous aurez également le droit de demander à ce que les données inexactes ou devenues inexactes soient rectifiées. Vous pourrez à tout moment exercer ces droits auprès du Dr. …….. (n° de téléphone)……..
Pour toutes les informations de nature médicale, ces droits pourront être exercés directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix.
Toutes les données et informations vous concernant resteront strictement confidentielles.
Les données vous concernant ne seront accessibles qu'aux personnes participant à cette recherche et aux personnes chargées par le promoteur de contrôler la qualité de l'étude ; le cas échéant elles pourront également être transmises aux autorités sanitaires habilitées. Dans tous les cas, elles seront exploitées dans les conditions garantissant leurs confidentialités.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT POUR LE PATIENT

Les détails concernant cette étude sont fournis dans la lettre d'information spécifique qui vous a été remise. Lisez attentivement cette notice et posez toutes les questions qui vous sembleront utiles.
Si vous acceptez de participer à cette étude, veuillez compléter le formulaire ci-dessous.

ETUDE DE LA REPONSE BIOLOGIQUE PLAQUETTAIRE A L'ASPIRINE A LA PHASE AIGUE DE L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL ISCHEMIQUE

Nom et adresse du Promoteur :

CHU de Nancy
29, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny – 54035 NANCY cedex

Je soussigné (e), M…… (*nom complet en lettres capitales)* déclare avoir compris le but et les modalités de cette étude, qui m'ont été pleinement expliqués par le Docteur ……..

J'ai reçu le formulaire d'information spécifique que j'ai eu la possibilité d'étudier avec attention.

Des réponses ont été apportées à toutes mes questions. J'ai disposé d'un délai de réflexion avant de prendre ma décision.

Si j'accepte de participer à cette étude, ma participation sera enregistrée sur le fichier national des personnes se prêtant à des recherches biomédicales. J'aurai la possibilité de vérifier auprès du Dr/Pr ……(*nom et coordonnées)* ou du Ministère chargé de la santé l'exactitude des données me concernant dans le fichier et la destruction de ces données au terme du délai prévu par le Code de la santé publique.

J'accepte de participer à cette recherche dans les conditions précisées dans le formulaire d'information ci-joint. Je demeure libre de quitter l'étude à tout moment sans que cela n'affecte la prise en charge médicale ultérieure. J'en informerai alors le Docteur ……..

Le fait de ne plus participer à cette recherche ne portera pas atteinte à mes relations avec mon médecin et ne remettra pas en cause la qualité des soins ultérieurs.

J'ai été informé(e) que conformément à la réglementation sur les études cliniques, le Comité de Protection des Personnes Est III a rendu un avis favorable pour la réalisation de cette étude en date du …… et la DGS a donné son autorisation pour la réalisation de cette étude en date du ……..

J'ai également été informé que conformément à la loi en vigueur, un contrat d'assurance a été souscrit par le promoteur de la recherche.
Toutes les données me concernant, y compris mon dossier médical, resteront confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par les personnes qui collaborent à la recherche, aux personnes chargées par le promoteur de contrôler la qualité de l'étude ainsi que par un représentant des autorités de santé.

J'accepte que les données nécessaires à la recherche soient recueillies durant ma participation à l'étude et fassent l'objet d'un traitement informatisé autorisé par la Commission Nationale Informatique et Liberté. J'ai bien été informé de la finalité du traitement (on m'a expliqué à quoi serviraient ces données) ainsi que des destinataires de ces données.

J'ai bien noté qu'en application de la loi « Informatique et Libertés » du 6 janvier 1978 modifiée, je dispose d'un droit d'accès aux données me concernant ainsi qu'un droit de rectification. Je peux exercer ces droits à tout moment auprès du Dr. ……(*nom et coordonnées du responsable de la recherche*).

Je donne mon consentement pour participer à cette recherche.

Je pourrai à tout moment demander toute information complémentaire au Dr. …….
N° de téléphone ……

Mon consentement ne décharge en rien l'investigateur et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

A l'issue de la recherche, je serai informé(e) des résultats globaux de cette recherche.

A REMPLIR PAR LE PATIENT
Nom, prénom :…… Date : …… Signature du patient

A REMPLIR PAR L'INVESTIGATEUR	
Je soussigné Docteur ……. (nom en lettres capitales) confirme avoir pleinement expliqué au patient le but et les modalités de cette étude ainsi que ses risques potentiels. Je m'engage à faire respecter les termes de ce formulaire de consentement, conciliant le respect des droits et des libertés individuelles et les exigences d'un travail scientifique. N° de téléphone de l'investigateur : ……..	
Signature de l'investigateur :	Date : ……..

Fait en trois exemplaires dont un sera conservé par l'investigateur, un autre remis au patient et un conservé par le promoteur.

LETTRE D'INFORMATION POUR LE REPRESENTANT D'UN PATIENT DANS L'INCAPACITE D'EXPRIMER SON CONSENTEMENT.

Lisez attentivement cette notice et posez toutes les questions qui vous sembleront utiles. Vous pourrez alors décider si vous acceptez que votre proche participe à cette recherche ou non.

ETUDE DE LA REPONSE BIOLOGIQUE PLAQUETTAIRE A L'ASPIRINE A LA PHASE AIGUE DE L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL ISCHEMIQUE

Nom et adresse du Promoteur :

CHU de Nancy
29, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny - 54035 NANCY cedex

Monsieur, Madame, Mademoiselle

Votre proche a été hospitalisé dans le service de neurologie pour la prise en charge de son accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique. Cette maladie est due à un défaut d'apport de sang du cerveau en raison de l'obstruction d'un vaisseau. Afin de prévenir une récidive thrombotique artérielle, l'aspirine est actuellement considérée comme un traitement de choix et administrée au plus tôt après la survenue de l'AVC. Cependant, certaines de ces récidives peuvent survenir malgré la prescription d'aspirine.

Le docteur (Nom et prénom)……

Adresse……..

Téléphone……..

médecin investigateur, propose que votre proche participe à l'« Etude de la réponse plaquettaire à l'aspirine à la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral ischémique »

L'objectif principal est d'étudier la réponse des plaquettes (= éléments du sang permettant la coagulation) à l'aspirine pour des patients qui viennent de présenter un AVC ischémique.

Cette étude devrait nous permettre de connaître l'effet biologique du traitement donné en prévention d'une récidive d'accident thrombotique artériel, de le mesurer au cours du temps, d'en déterminer les limites et de proposer d'autres stratégies thérapeutiques pour améliorer la protection à la phase aiguë de l'AVC ischémique.

Cette recherche est menée par le service de Neurologie du centre hospitalier universitaire de Nancy.

L'étude se déroulera de la façon suivante :

Après une lecture attentive de cette note d'information, si vous acceptez que votre proche participe, vous signerez le formulaire de consentement éclairé (en 3 exemplaires dont 1 vous

sera remis). Le consentement de votre proche pour la poursuite de l'étude sera sollicité après une information complète quand son état le permettra.
Dans le cadre de la prise en charge habituelle de l'AVC, votre proche recevra une dose orale de 300 mg d'aspirine au plus tôt après l'accident.

Spécifiquement pour l'étude, nous souhaitons :

- faire 2 prélèvements sanguins après la dose d'aspirine : le premier entre 2h et 3h après la dose et le deuxième entre 23h et 24h après la dose.
- si votre proche prenait déjà de l'aspirine avant l'AVC, faire un prélèvement sanguin avant la dose d'aspirine.

La participation de votre proche à cette étude sera de 24h.

<u>Contrainte liée au protocole</u>
Les seules contraintes sont les désagréments liés aux ponctions veineuses réalisées.

La participation de votre proche sera enregistrée sur le fichier national des personnes se prêtant à des recherches biomédicales. Il aura la possibilité de vérifier l'exactitude et de rectifier les données informatisées le concernant dans ce fichier auprès du Dr/Pr……(*nom et coordonnées)* ou du Ministre chargé de la santé. La destruction de ces données s'effectuera au terme du délai prévu par le code de santé publique.

S'il participe déjà à une étude clinique ou s'il est en période d'exclusion d'une étude clinique, il ne peut pas participer à notre recherche. Il ne pourra pas participer à une autre recherche durant toute la période de suivi de cette étude.

Vous êtes en droit d'accepter ou de refuser la participation de votre proche à cette recherche. Si vous vous opposez à la participation de votre proche, cela n'aura aucune conséquence sur le type et la qualité de sa prise en charge, ainsi que sur les relations avec le médecin investigateur. S'il accepte de continuer, il pourra néanmoins quitter cette étude à tout moment sans conséquences sur sa future prise en charge. Il pourra également sortir de l'étude si son médecin pense que c'est mieux pour lui.

Toute nouvelle information devenant disponible au cours de l'étude et pouvant avoir des implications sur votre proche, vous sera fournie par le Dr……

Le Promoteur prend en charge les frais supplémentaires liés à d'éventuels fournitures ou examens spécifiquement requis pour cette recherche. Néanmoins, pour pouvoir participer à cette recherche, votre proche doit être affilié ou bénéficier d'un régime de sécurité sociale. Le Dr ……. vérifiera son affiliation à un régime de sécurité sociale.

Conformément à la réglementation en vigueur, un contrat d'assurance a été souscrit par le promoteur.

À l'issue de la recherche, vous et votre proche serez informés des résultats globaux de la recherche par un courrier de l'investigateur coordonnateur, le Docteur Sébastien RICHARD.

Le Comité de Protection des Personnes Est III a émis un avis favorable à la réalisation de cette étude le ……
La DGS a donné son autorisation pour la réalisation de cette étude le ……..

En application de la loi « informatique, fichiers et liberté » du 06 janvier 1978 modifiée, le fichier informatique utilisé pour réaliser la présente recherche a fait l'objet d'une autorisation de la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés). Seules les données nécessaires à la recherche seront recueillies. Seul votre proche aura le droit de s'opposer à ce que les données le concernant fassent l'objet d'un traitement automatisé. Il aura à tout moment le droit d'accéder aux données le concernant. Il aura également le droit de demander à ce que les données inexactes ou devenues inexactes soient rectifiées. Il pourra à tout moment exercer ces droits auprès du Dr. …….. (n° de téléphone)……..
Pour toutes les informations de nature médicale, ces droits pourront être exercés directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix.

Toutes les données et informations concernant votre proche resteront strictement confidentielles. Les données le concernant ne seront accessibles qu'aux personnes participant à cette recherche et aux personnes chargées par le promoteur de contrôler la qualité de l'étude; le cas échéant, elles pourront également être transmises aux autorités sanitaires habilitées.

Dans tous les cas, elles seront exploitées dans les conditions garantissant leurs confidentialités.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT POUR LE REPRESENTANT D'UN PATIENT DANS L'INCAPACITE D'EXPRIMER SON CONSENTEMENT

Les détails concernant cette étude sont fournis dans la lettre d'information spécifique qui vous a été remise. Lisez attentivement cette notice et posez toutes les questions qui vous sembleront utiles. Si vous acceptez que votre proche participe à cette étude, veuillez compléter le formulaire ci-dessous.

ETUDE DE LA REPONSE BIOLOGIQUE PLAQUETTAIRE A L'ASPIRINE A LA PHASE AIGUE DE L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL ISCHEMIQUE

Nom et adresse du Promoteur :

CHU de Nancy
29, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny – 54035 NANCY cedex

Je soussigné (e), M…… (*nom complet en lettres capitales)* agissant en qualité de parent ou de proche *(rayer la mention inutile)* de M…….. (*nom complet en lettres capitales)* déclare avoir compris le but et les modalités de cette étude, qui m'ont été pleinement expliqués par le Docteur ……..
J'ai reçu le formulaire d'information spécifique que j'ai eu la possibilité d'étudier avec attention.
Des réponses ont été apportées à toutes mes questions. J'ai disposé d'un délai de réflexion avant de prendre ma décision.

Si j'accepte que mon proche participe à cette étude, sa participation sera enregistrée sur le fichier national des personnes se prêtant à des recherches biomédicales. Il aura la possibilité de vérifier auprès du Dr/Pr ……(*nom et coordonnées)* ou du Ministère chargé de la santé l'exactitude des données le concernant dans le fichier et la destruction de ces données au terme du délai prévu par le code de santé publique. Il ne pourra pas participer à une autre recherche pendant toute la période de suivi de cette étude.

J'accepte librement et volontairement que mon proche participe à cette recherche dans les conditions précisées dans le formulaire d'information ci-joint. Le consentement de mon proche pour la poursuite de l'étude sera recherché après une information complète quand son état le permettra. S'il accepte de continuer, il demeure libre de quitter l'étude à tout moment sans que cela n'affecte sa prise en charge médicale ultérieure. Il en informera alors le Docteur ……..

Le fait de ne plus participer à cette recherche ne portera pas atteinte à ses relations avec son médecin et ne remettra pas en cause la qualité des soins ultérieurs.

J'ai été informé(e) que conformément à la réglementation sur les études cliniques, le Comité de Protection des Personnes Est III a rendu un avis favorable pour la réalisation de cette étude en date du …… et la DGS a donné son autorisation pour la réalisation de cette étude en date du ……..

J'ai également été informé que conformément à la loi en vigueur, un contrat d'assurance a été souscrit par le promoteur de la recherche.

Toutes les données concernant mon proche, y compris son dossier médical, resteront confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par les personnes qui collaborent à la recherche, aux personnes chargées par le promoteur de contrôler la qualité de l'étude ainsi que par un représentant des autorités de santé.

J'accepte que les données nécessaires à la recherche soient recueillies durant la participation de mon proche à l'étude et fassent l'objet d'un traitement informatisé autorisé par la Commission Nationale Informatique et Liberté. J'ai bien été informé de la finalité du traitement (on m'a expliqué à quoi serviraient ces données) ainsi que des destinataires de ces données.
J'ai bien noté qu'en application de la loi « Informatique et Libertés » du 6 janvier 1978 modifiée, je dispose d'un droit d'accès aux données le concernant ainsi qu'un droit de rectification. Je peux exercer ces droits à tout moment auprès du Dr. ……(*nom et coordonnées du responsable de la recherche*).

Je donne mon consentement pour la participation de mon proche à cette recherche.

Je pourrai à tout moment demander toute information complémentaire au Dr. …….
N° de téléphone ……

Mon consentement ne décharge en rien l'investigateur et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

A l'issue de la recherche, nous serons informés des résultats globaux de cette recherche par un courrier de l'investigateur principal.

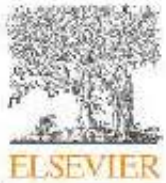
A REMPLIR PAR LE REPRESENTANT (parent ou proche)
Date : …… Lien avec l'interessé(e) : …….. Signature du représentant :

A REMPLIR PAR L'INVESTIGATEUR	
Je soussigné Docteur ……. (nom en lettres capitales) confirme avoir pleinement expliqué au représentant du patient le but et les modalités de cette étude ainsi que ses risques potentiels. Je m'engage à faire respecter les termes de ce formulaire de consentement, conciliant le respect des droits et des libertés individuelles et les exigences d'un travail scientifique. N° de téléphone de l'investigateur : ……..	
Signature de l'investigateur :	Date : ……..

Fait en trois exemplaires dont un sera conservé par l'investigateur, un autre remis à la personne donnant son consentement et un conservé par le promoteur.

ANNEXE 2 : AUTRE TRAVAIL PUBLIE SUR LE SUJET

Epilepsy Research (2009) 86, 94–96



journal homepage: www.elsevier.com/locate/epilepsyres



SHORT COMMUNICATION

Levetiracetam-induced platelet dysfunction

Marie Hacquard[a,c,*], **Sébastien Richard**[b,c], **Jean-Christophe Lacour**[b], **Thomas Lecompte**[a,c], **Hervé Vespignani**[b]

[a] *Hématologie Biologique, CHU Nancy, allée du Morvan, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France*
[b] *Neurologie, CHU Nancy, Nancy, France*
[c] *Nancy Université, France*

Received 5 March 2009; received in revised form 1 April 2009; accepted 16 April 2009
Available online 15 May 2009

KEYWORDS
Levetiracetam;
Antiepileptic drug;
Antiplatelet effect;
Haemostasis;
Clopidogrel

Summary Levetiracetam is an antiepileptic drug widely prescribed. We report here for the first time, an alteration of platelet function attributable to this drug. This effect has never been reported before. The responsibility of levetiracetam seems to be probable: restoration of platelet functionality was observed after withholding this treatment and this effect has been described for a structurally related molecule, piracetam.
© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Levetiracetam is an antiepileptic drug widely prescribed. We report here for the first time, an alteration of platelet function likely to be attributable to this drug.

Case report

A 75-year-old man was admitted with repeated left facio-brachial focal motor seizures. He had a history of hypertension, smoking, coronary and severe peripheral arterial obstructive diseases. He was on a daily dose of 75 mg of clopidogrel. He had not received aspirin for the last year.

Brain MRI showed right parietal subarachnoid haemorrhage. Cerebral angiography did not reveal arteriovenous malformation or aneurysm. Rapid introduction of levetiracetam up to 1 g/day led to a reduction of seizure frequency. Clopidogrel was stopped and haemostasis was studied.

No abnormalities of coagulation were detected [aPTT = patient 38 s/mean normal time 37 s, PT = 100%, fibrinogen = 3.4 g/L]. In order to understand the aetiology of this unusual bleeding, primary haemostasis was investigated. Platelet count (379×10^9/L) and morphology were normal, and there was no alteration in von Willebrand factor activity [(vWF ristocetin cofactor activity) = 119%, FVIII = 126%]. Bleeding time (Ivy, horizontal incision) was not prolonged (6 min). Aggregation tests (photometric method, Soderel Medical aggregometer, Helllecourt, France) were performed 4 days after stopping clopidogrel and showed an alteration of aggregation profile in response to arachidonic acid, ADP and collagen at low concentration. This profile was consistent with a defect of thromboxane-dependent platelet activation and aggregation rather than a persistent effect of clopidogrel therapy. The absence of intake of non-steroidal anti-inflammatory drugs (including aspirin) was checked and aggregation testing was repeated 4 days later. A similar pattern was found (Fig. 1a). Before concluding on

* Corresponding author. Tel.: +33 83 15 49 13; fax: +33 83 15 37 96.
E-mail address: m.toussaint-hacquard@chu-nancy.fr (M. Hacquard).

0920-1211/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.eplepsyres.2009.04.003

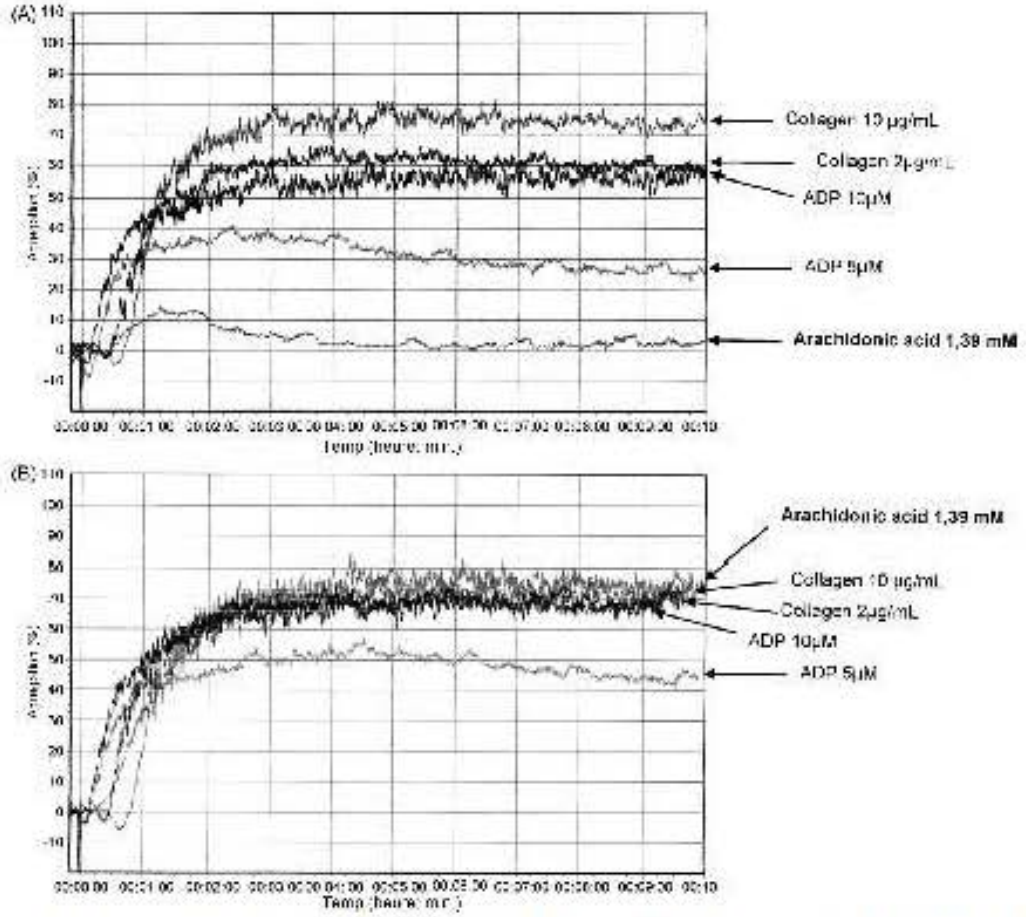


Figure 1 Platelet aggregation profiles measured 10 days after clopidogrel withholding and the beginning of treatment by levetiracetam 1 g/day (A) and 21 days after levetiracetam stopping (B).

an inherited thrombopathy, we checked a possible drug-induced effect. The patient was not taking any medication known to alter platelet functions. However, we suspected an effect of levetiracetam because of its recent introduction, antiplatelet effect described with other antiepileptic drugs and with piracetam, a structurally related molecule. We replaced levetiracetam by lamotrigin. The aggregation profile had normalized 3 weeks later (Fig. 1b). Subarachnoid haemorrhage resolved spontaneously but the patient presented another cerebral bleeding 5 months later suggesting cerebral amyloid angiopathy. The case was reported to the regional pharmacovigilance centre.

Discussion

It has already been described that some antiepileptic drugs, especially valproic acid and its derivatives, may impair platelet functions (Kis et al., 1999). However, this adverse effect has not been reported with new molecules such as levetiracetam: the only haematological side-effect reported so far with this drug is thrombocytopenia (Kimland et al., 2004; Meschede et al., 2008; Rüegg et al., 2008). Here, levetiracetam seemed to inhibit thromboxane-dependent platelet activation and aggregation. This effect has already been reported for a structurally related molecule, the nootropic drug piracetam (Moriau et al., 1993; De Smedt et al., 2007). Total recovery of platelet function was observed 3 weeks after treatment substitution with another molecule. No bleeding disorder has yet been reported with levetiracetam from clinical use data (Rüegg et al., 2008) nor in a study focusing on the effect of levetiracetam on bleeding time (Boon et al., 2007). Of note, in our case, the platelet defect was identified by platelet aggregometry and not on the basis of bleeding time, which was normal.

In conclusion, although no bleeding has been reported with levetiracetam in clinical studies, this case report suggests that caution should be exercised when levetiracetam is used concomitantly with antithrombotic drugs, taking into account their possible effects on platelet function. This caution should be applied in particular with antiplatelet agents such as clopidogrel, which do not target the thromboxane A_2 pathway, because of an expected additive effect.

References

Boon, P., Hulhoven, R., Offner, F., 2007. Levetiracetam and bleeding disorders. Acta Neurol. Belg. 107, 97–102.

De Smedt, T., Raedt, R., Vonck, K., et al., 2007. Levetiracetam: the profile of a novel anticonvulsant drug. Part I. Preclinical data. CNS Drug Rev. 13, 43–56.

Kimland, E., Höjeberg, B., von Euler, M., 2004. Levetiracetam-induced thrombocytopenia. Epilepsia 45, 877–878.

Kis, B., Szupera, Z., Mezei, Z., et al., 1999. Valproate treatment and platelet function: the role of arachidonate metabolites. Epilepsia 40, 186–189.

Meschede, A., Runge, U., Sabolek, M., 2008. Thrombocytopenia during levetiracetam therapy. Epilepsy Res. 80, 91–92.

Moriau, M., Crasborn, L., Lavenne-Pardonge, E., et al., 1993. Platelet anti-aggregant and rheological properties of piracetam. A pharmacodynamic study in normal subjects. Arzneimittelforschung 43, 110–118.

Rüegg, S., Naegelin, Y., Hardmeier, M., et al., 2008. Intravenous levetiracetam: treatment experience with the first 50 critically ill patients. Epilepsy Behav. 12, 477–480.