

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le lundi 5 octobre 2015  
Par Mlle Mathilde Bovyn**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Comparaison des méthodes Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> dans l'évaluation  
de la résistance biologique à l'aspirine chez des patients atteints d'une  
thrombocytémie essentielle ou d'une polyglobulie de Vaquez.**

---

**Membres du jury :**

**Président :** **Madame le Professeur A. Dupont**, Professeur des  
Universités, Praticien Hospitalier, CHRU Lille.

**Assesseurs :** **Monsieur le Professeur J-L. Demory**, Professeur de  
l'Université Catholique de Lille, Praticien Hospitalier,  
GHICL.

**Madame le Docteur A. Bauters**, Praticien Hospitalier,  
CHRU Lille.

**Directeur de thèse :** **Madame le Docteur A. Charpentier**, Maître de  
conférence de l'Université Catholique de Lille, Praticien  
Hospitalier, GHICL.



**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le lundi 5 octobre 2015  
Par Mlle Mathilde Bovyn**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Comparaison des méthodes Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> dans l'évaluation  
de la résistance biologique à l'aspirine chez des patients atteints d'une  
thrombocytémie essentielle ou d'une polyglobulie de Vaquez.**

---

**Membres du jury :**

**Président :** **Madame le Professeur A. Dupont**, Professeur des  
Universités, Praticien Hospitalier, CHRU Lille.

**Assesseurs :** **Monsieur le Professeur J-L. Demory**, Professeur de  
l'Université Catholique de Lille, Praticien Hospitalier,  
GHICL.

**Madame le Docteur A. Bouters**, Praticien Hospitalier,  
CHRU Lille.

**Directeur de thèse :** **Madame le Docteur A. Charpentier**, Maître de  
conférence de l'Université Catholique de Lille, Praticien  
Hospitalier, GHICL.



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE  
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64



### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :  
Vice- présidents :

Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE  
Professeur Alain DUROCHER  
Professeur Régis BORDET  
Professeur Eric KERCKHOVE  
Professeur Eric BOULANGER  
Professeur Frédéric LOBEZ  
Professeur Damien CUNY  
Professeur Benoit DEPRez  
Professeur Murielle GARCIN  
Monsieur Pierre RAVAUx  
Monsieur Larbi AIT-HENNANI  
Monsieur Antoine HENRY

Directeur Général des Services :

Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :  
Vice-Doyen, 1<sup>er</sup> assesseur :  
Assesseur en charge de la pédagogie  
Assesseur en charge de la recherche  
Assesseur délégué à la scolarité  
Assesseur délégué en charge des  
relations internationales  
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante

Professeur Damien CUNY  
Professeur Bertrand DECAUDIN  
Dr. Annie Standaert  
Pr. Patricia Melnyk  
Dr. Christophe Bochu  
  
Pr. Philippe Chavatte  
M. Thomas Morgenroth

Chef des services administratifs :

Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

## Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M.	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

## Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

## Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire

Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme		Béatrice	Toxicologie
	<b>GRAVE</b>		
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1

M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

### Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



# *Remerciements*

---

À ma présidente de jury,

**Madame le Professeur Annabelle Dupont**

Professeur des Universités,  
Praticien Hospitalier, laboratoire d'hématologie hémostase, Centre Hospitalier  
Régional et Universitaire de Lille

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je souhaite ici vous témoigner ma reconnaissance pour votre aide dans ce travail ainsi que mon profond respect.

À mes juges,

**Monsieur le Professeur Jean-Loup Demory**

Professeur de l'Université Catholique de Lille,  
Praticien hospitalier, service d'hématologie clinique et laboratoire d'hématologie,  
Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille

Je vous remercie d'avoir proposé ce sujet pour mon travail de thèse et d'avoir grandement collaboré à la réalisation de cette étude. Je vous suis également très reconnaissante de m'avoir transmis votre savoir durant mon semestre au laboratoire de Saint-Philibert. Soyez assuré de mon profond respect et de ma sincère considération.

**Madame le Docteur Anne Bauters**

Praticien hospitalier, laboratoire d'hématologie hémostase, Centre Hospitalier  
Régional et Universitaire de Lille

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Sachez que je suis touchée de votre présence dans ce jury. Votre savoir et votre gentillesse, que j'ai pu apprécier lors de mon semestre au laboratoire, ont forgé chez moi une respectueuse considération.

À ma directrice de thèse,

**Madame le Docteur Agnès Charpentier**

Maître de Conférences de l'Université Catholique de Lille,  
Praticien Hospitalier, laboratoire d'hématologie, Groupe Hospitalier de l'Institut  
Catholique de Lille.

Je vous suis extrêmement reconnaissante d'avoir accepté encadrer mon travail de thèse. Votre confiance, votre gentillesse et votre prévenance à mon égard m'ont beaucoup touché et m'ont permis d'avancer tout au long de ce travail. L'apprentissage de l'hématologie à vos côtés durant mon semestre au laboratoire de Saint-Philibert a pour moi été très enrichissant et m'a donné l'envie de m'y attarder plus encore. Soyez assurée de ma grande considération et de ma reconnaissance infinie.

À l'équipe du laboratoire de Saint-Philibert,

Je remercie l'ensemble des biologistes, techniciens et secrétaires pour leur collaboration de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Je remercie notamment Stéphane Delplanque pour son aide précieuse dans la mise au point de la technique de dosage du TXB2 sérique.

J'ai une attention toute particulière pour Julie Vigneau : à mon départ du laboratoire, tu as pris en charge la réalisation technique d'une grande partie de ce travail. J'ai vite compris qu'avec toi, je pouvais dormir sur mes deux oreilles... Ta compétence, ta disponibilité et ton enthousiasme ont fait de nos échanges et de cette étude un travail de qualité. C'était un réel plaisir de travailler avec toi, et je te souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite.

Et enfin Judith Bruge : je te remercie pour ton aide précieuse dans ce travail. Ton soutien a beaucoup compté, en particulier dans les moments de doutes... Sache que j'ai énormément appris à ton contact durant mon semestre à Saint-Philibert, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain, et je t'en suis très reconnaissante.

À mes amis,

Mes co-internes dans un premier temps qui m'ont beaucoup apporté et aidé dans l'apprentissage de ma profession. Votre soutien, notamment le tien Marie dans la dernière ligne droite, m'a permis d'avancer sereinement dans mon travail de thèse.

Je remercie mes amis de Saint-Brieuc et de Rennes qui ont su agréementer ma vie estudiantine des plus beaux souvenirs. Malgré la distance, votre amitié est infaillible et je me sens riche de pouvoir vous compter à mes côtés. Je ne citerai pas ici tous vos prénoms mais vous vous reconnaîtrez sans problème...

Enfin, mes amis d'ici, Sandra, Caroline, Haciba, Anaïs, Etienne, Simon et Antoine : je vous dit mille mercis pour votre aide et votre précieux soutien au quotidien qui m'ont permis d'aboutir à ce travail. Je n'y serai pas arriver sans vous. Et surtout merci pour ces quatre superbes années dans cette belle ville de Lille qui resteront à jamais gravées dans ma mémoire. Je suis triste que nous soyons contraints de nous éloignés mais sûre de l'amitié qui nous lie. La Bretagne vous attend de pied ferme !

À ma famille,

À l'ensemble de ma famille pour leur soutien et leur aide au quotidien.

Mes grandes sœurs, Claire et Alice, pour vos précieux conseils et votre soutien sans faille. C'est en grande partie grâce à vous mes chères sœurs que j'en suis là aujourd'hui. J'espère ne jamais vous décevoir...

À mes parents, modèles d'érudition, de savoir-vivre et de simplicité. Au delà de l'aide financière que vous m'avez apportée pour suivre ces longues études, votre soutien, vos conseils avisés et votre jugement toujours très juste et bienveillant m'ont permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui. Vous avez quitté votre vie professionnelle il y a peu et le bilan de votre carrière est brillant. C'est donc non sans une petite appréhension que je m'apprête à entamer la mienne, qui, je le souhaite sera aussi belle et enrichissante que la vôtre. Je vous remercie donc, Papa et Maman, pour tout cela et plus encore...

À mon fiancé, Marc... Non je ne m'arrêterai pas ici à ces quatre mots ! Quelle bonne idée tu as eu de choisir cette spécialité, toi, médecin... Non seulement pour ton soutien indéfectible dans ce travail de thèse et durant ces années d'internat, mais surtout parce que te mettre sur mon chemin aura probablement été la plus belle chose qui me soit arrivée. Et il s'en est fallu de peu pour que cela n'arrive jamais, le destin ! Je nous souhaite une vie longue et belle à deux, mais elle a déjà merveilleusement commencée...

# Table des matières

---

Remerciements.....	7
Table des matières .....	14
Table des illustrations.....	18
Liste des Abréviations .....	21
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
<b>II. GENERALITES.....</b>	<b>25</b>
<b>II.1 Les plaquettes.....</b>	<b>25</b>
II.1.a La production plaquettaire .....	25
- La mégacaryocytopoïèse.....	25
- La thrombopoïèse ou plaquetto-genèse .....	26
- Régulation humorale de la mégacaryocytopoïèse .....	27
II.1.b Aspects morphologiques et ultrastructure des plaquettes.....	27
II.1.c Physiologie de l'hémostase primaire.....	29
- Adhésion au sous-endothélium .....	30
- Activation plaquettaire.....	30
- Etape de sécrétion .....	33
- Agrégation plaquettaire.....	34
II.1.d Synthèse des prostaglandines plaquettaires et rôle du thromboxane A2.....	34
- Métabolisme de l'acide arachidonique.....	35
- Biosynthèse et métabolisme du thromboxane A2 .....	37
- Mode d'action du thromboxane A2 .....	38
<b>II.2 L'aspirine .....</b>	<b>38</b>
II.2.a Le composé.....	38
II.2.b Propriétés pharmacologiques.....	39
II.2.c Pharmacocinétique.....	39
II.2.d Mode d'action.....	40
II.2.e Indications et posologies usuelles dans la prévention du risque thrombotique .	41
<b>II.3 Le concept de résistance à l'aspirine .....</b>	<b>43</b>
II.3.a Définitions .....	43
- La résistance clinique à l'aspirine .....	43
- L'hyperréactivité plaquettaire résiduelle (HPR) .....	43
- La résistance biologique « vraie » .....	44
II.3.b Causes d'hyperréactivité plaquettaire et de résistance biologique vraie à l'aspirine .....	44
- Les causes d'hyperréactivité plaquettaire.....	44
- Les causes de résistance biologique à l'aspirine .....	46
II.3.c Méthodes de dépistage au laboratoire.....	47
- Test non-spécifique de la voie de la COX dit « global » : le PFA-100®.....	47
- Tests spécifiques de la voie de la COX .....	48
II.3.d Implication clinique.....	50
<b>II.4 Les syndromes myéloprolifératifs Ph1 négatifs .....</b>	<b>50</b>
II.4.a Thrombocytémie essentielle.....	51
- Données épidémiologiques.....	51
- Aspects clinico-biologiques.....	51



- Critères diagnostiques .....	53
- Complications .....	54
- Traitement.....	55
II.4.b Maladie de Vaquez .....	56
- Données épidémiologiques.....	57
- Aspects clinico-biologiques.....	57
- Critères diagnostiques .....	58
- Complications .....	59
- Traitement.....	60
II.4.c Mécanismes physiopathologiques des thromboses dans la TE et la PV.....	60
II.4.d Gestion du risque thrombotique dans la TE et la PV .....	62
<b>III. OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>63</b>
<b>IV. MATERIEL ET METHODE .....</b>	<b>66</b>
<b>IV.1 Population étudiée .....</b>	<b>66</b>
<b>IV.2 Recueil des échantillons.....</b>	<b>67</b>
IV.2.a Population d'étude.....	67
IV.2.b Population témoin .....	67
<b>IV.3 Hémogramme .....</b>	<b>67</b>
<b>IV.4 Techniques de détection de la résistance à l'aspirine utilisées dans notre étude 69</b>	
IV.4.a La technique Multiplate® Aspirin .....	69
- Généralités.....	69
- Préparation de l'analyse .....	72
- Mesure .....	72
- Résultats .....	73
IV.4.b La technique VerifyNow® Aspirin Test .....	73
- Généralités.....	73
- Préparation de l'analyse .....	75
- Mesure .....	75
- Résultats .....	76
IV.4.c Le dosage sérique du Thromboxane B2 .....	77
- Généralités.....	77
- Préparation de l'analyse .....	78
- Préparation de la plaque.....	81
- Protocole de l'analyse.....	81
- Résultats de l'analyse.....	82
<b>IV.5 Etude statistique .....</b>	<b>84</b>
<b>V. RESULTATS.....</b>	<b>85</b>
<b>V.1 Caractéristiques de la population étudiée.....</b>	<b>85</b>
<b>V.2 Validation du cut-off pour le dosage du TXB2 sérique et le ratio TXB2/taux de plaquettes .....</b>	<b>86</b>
V.2.a Validation du cut-off du TXB2 sérique.....	86
V.2.b Détermination d'un cut-off pour le ratio TXB2/taux de plaquettes .....	87
<b>V.3 Prévalence de la résistance à l'aspirine dans les trois techniques : Multiplate®, VerifyNow® et TXB2 sérique .....</b>	<b>88</b>
<b>V.4 Evaluation de la corrélation et de la concordance entre les techniques étudiées.....</b>	<b>89</b>
V.4.a Comparaison des techniques Multiplate® vs VerifyNow® .....	89
- Corrélation numérique .....	89
- Concordance des résultats qualitatifs.....	90
V.4.b Comparaison de la technique Multiplate® avec le dosage sérique du TXB2 .....	91

- À partir des valeurs de TXB2 sérique brutes .....	91
- À partir du ratio de TXB2 sérique rapporté au taux de plaquettes .....	93
V.4.c Comparaison de la technique VerifyNow <sup>®</sup> avec le dosage sérique du TXB2.....	94
- À partir des valeurs de TXB2 sérique brutes .....	94
- À partir d'un ratio de TXB2 sérique rapporté au taux de plaquettes .....	95
V.4.d Récapitulatif des comparaisons entre les techniques Multiplate <sup>®</sup> , VerifyNow <sup>®</sup> , TXB2 sérique et ratio TXB2/taux de plaquettes .....	97
<b>V.5 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> .....</b>	<b>97</b>
<b>V.6 Etude de l'influence des paramètres de l'hémogramme dans le résultat rendu par les techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> .....</b>	<b>98</b>
V.6.a Technique Multiplate <sup>®</sup> .....	99
- Corrélations numériques.....	99
- Comparaison des valeurs médianes de chaque paramètre pour les groupes « Sensible » versus « Résistant » .....	99
V.6.b Technique VerifyNow <sup>®</sup> .....	101
- Corrélations numériques.....	101
- Comparaison du groupe « Resistant » versus « Sensible » pour chaque paramètre.....	101
<b>V.7 Impact de la posologie d'aspirine sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup> .....</b>	<b>103</b>
<b>V.8 Impact du risque thrombotique du patient sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup> .....</b>	<b>105</b>
V.8.a Vis-à-vis de l'existence d'antécédents de thromboses.....	105
V.8.b Vis-à-vis de la stratification consensuelle du risque thrombotique .....	106
V.8.c Vis-à-vis du score IPSET-thrombosis.....	108
<b>V.9 Impact du statut mutationnel sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup> 109</b>	
<b>VI. DISCUSSION.....</b>	<b>111</b>
<b>VI.1 Caractéristiques de la population étudiée.....</b>	<b>112</b>
<b>VI.2 Validation du cut-off pour le dosage du TXB2 sérique et du ratio TXB2/taux de plaquettes .....</b>	<b>113</b>
<b>VI.3 Prévalence de la résistance à l'aspirine dans chaque technique .....</b>	<b>114</b>
<b>VI.4 Evaluation de la corrélation et de la concordance entre le Multiplate<sup>®</sup> et le VerifyNow<sup>®</sup> .....</b>	<b>115</b>
VI.4.a Comparaison des techniques Multiplate <sup>®</sup> et VerifyNow <sup>®</sup> .....	116
VI.4.b Comparaison de chaque technique avec la technique de référence pour notre étude : le dosage du TXB2 sérique.....	116
<b>VI.5 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> vis-à-vis de la détermination de la résistance biologique à l'aspirine .</b>	<b>119</b>
<b>VI.6 Influence des paramètres de l'hémogramme sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup> .....</b>	<b>121</b>
VI.6.a Etude de l'influence de la thrombocytose .....	121
VI.6.b Etude de la viscosité sanguine : influence de l'hématocrite et du taux de globules rouges .....	123
VI.6.c Etude de l'influence du volume globulaire moyen (VGM).....	125
VI.6.d Etude de l'influence de la leucocytose.....	125
VI.6.e Interprétation des tests de détection de la résistance à l'aspirine par rapport à la physiopathologie des SMP Ph- : quelle méthode est la plus adaptée à cette population de patients ? .....	127
<b>VI.7 Impact de la posologie d'aspirine sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup> .....</b>	<b>128</b>

VI.8	Impact du risque thrombotique sur la résistance à l'aspirine déterminée par les techniques Multiplate® et VerifyNow® .....	131
VI.9	Impact du statut mutationnel sur les résultats du Multiplate® et du VerifyNow®	132
VII.	CONCLUSION .....	134
VIII.	BIBLIOGRAPHIE.....	136
IX.	ANNEXES.....	141
	Annexe 1 : Table SCORE pour l'Europe du Sud : risque cardiovasculaire fatal à 10 ans (%) en fonction du sexe, de l'âge, du tabagisme, de la pression artérielle systolique et de la cholestérolémie totale <sup>28</sup> .....	141
	Annexe 2 : Tableau des données cliniques des sujets de l'étude .....	142
	Annexe 3 : Tableau des données biologiques de l'hémogramme des sujets de l'étude .....	143
	Annexe 4 : Tableau des données concernant le traitement par aspirine et les tests d'évaluation de la résistance à l'aspirine.....	144

# Table des illustrations

---

## Table des figures

<b>Figure 1</b> : Schéma de l'organisation anatomique d'une plaquette normale <sup>9</sup> .....	29
<b>Figure 2</b> : Voies d'activations plaquettaires : réactivité avec les principaux stimuli environnants (A) ; conséquences sur les fonctions et amplification de la réponse par le TXA2 (B) <sup>7</sup> .....	33
<b>Figure 3</b> : Voies de biosynthèse et actions des prostaglandines et du thromboxane A2 <sup>18</sup> ...	36
<b>Figure 4</b> : Structure des métabolites du thromboxane A2 <sup>16</sup> .....	37
<b>Figure 5</b> : Mécanisme d'action moléculaire de l'aspirine <sup>25</sup> .....	41
<b>Figure 6</b> : Schéma du fonctionnement du PFA-100 <sup>®36</sup> .....	48
<b>Figure 7</b> : Schéma du fonctionnement de la technique LTA <sup>36</sup> .....	49
<b>Figure 8</b> : Automate Sysmex XN 3000 <sup>®</sup> ; de gauche à droite : l'étaleur colorateur SP-10 et les deux modules XN 10 <sup>®</sup> et XN 20 <sup>®</sup> .....	69
<b>Figure 9</b> : Système Multiplate <sup>®</sup> Analyzer (à gauche) et description d'une cellule de mesure (à droite) <sup>58</sup> .....	70
<b>Figure 10</b> : Courbes d'agrégation du Multiplate <sup>®</sup> : deux mesures sont réalisées pour chaque test (en rose et bleu sur le graphique) <sup>58</sup> .....	71
<b>Figure 11</b> : Résultat type d'un sujet correctement inhibé par l'aspirine : à gauche, agrégation normale avec le TRAPtest ; à droite l'absence d'agrégation avec l'ASPItest <sup>58</sup> .....	71
<b>Figure 12</b> : Système VerifyNow <sup>®</sup> (à gauche) et description d'une cartouche de dosage (à droite) <sup>62</sup> .....	74
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique de la réaction dans le système VerifyNow <sup>®</sup> avec et sans aspirine selon le fournisseur (Accumetrics <sup>®</sup> ) <sup>62</sup> .....	74
<b>Figure 14</b> : Schéma de la réaction du Thromboxane B2 Express EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemicals) <sup>63</sup> .....	77
<b>Figure 15</b> : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la trousse Thromboxane B2 Express EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemicals) <sup>63</sup> .....	80
<b>Figure 16</b> : Courbe d'étalonnage de type 4-parameter logistic fit (MyAssays <sup>®</sup> ) obtenue pour le dosage du TXB2 .....	83
<b>Figure 17</b> : Représentation graphique des dosages de TXB2 sérique chez les témoins sains (à gauche) et les patients traités par aspirine (à droite). En rouge, le témoin sain sous ibuprofène. ....	86
<b>Figure 18</b> : Corrélation entre les concentrations en TXB2 sériques et le ratio TXB2/Taux de plaquettes .....	87
<b>Figure 19</b> : Représentation graphique des valeurs de TXB2 sériques et du ratio TXB2/Taux de plaquettes chez les témoins sains sans aspirine (en rouge, le témoin sain sous ibuprofène) .....	88
<b>Figure 20</b> : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par les techniques Multiplate <sup>®</sup> et VerifyNow <sup>®</sup> .....	90
<b>Figure 21</b> : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique Multiplate <sup>®</sup> et par le dosage du TXB2 sérique .....	92
<b>Figure 22</b> : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique Multiplate <sup>®</sup> et par le ratio TXB2/plaquettes .....	93
<b>Figure 23</b> : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique VerifyNow <sup>®</sup> et le dosage du TXB2 sérique .....	95
<b>Figure 24</b> : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique VerifyNow <sup>®</sup> et le ratio TXB2/plaquettes .....	96

<b>Figure 25</b> : Représentation graphique des populations "sensibles" (< 300 AU*min ; n <sub>1</sub> = 27) et "résistantes" à l'aspirine (≥ 300 AU*min ; n <sub>2</sub> = 13) selon la technique Multiplate <sup>®</sup> pour cinq paramètres de l'hémogramme.....	100
<b>Figure 26</b> : Représentation graphique des populations "sensibles" (< 550 ARU ; n <sub>1</sub> = 25) et "résistantes" à l'aspirine (≥ 550 ARU ; n <sub>2</sub> = 6) selon la technique VerifyNow <sup>®</sup> pour cinq paramètres de l'hémogramme.....	102
<b>Figure 27</b> : Répartition des résultats des patients traités par aspirine rendus par le Multiplate <sup>®</sup> (à gauche) et le VerifyNow <sup>®</sup> (à droite) selon la dose quotidienne d'aspirine.....	103
<b>Figure 28</b> : Répartition des résultats des patients traités par aspirine rendus par le Multiplate <sup>®</sup> (à gauche) et le VerifyNow <sup>®</sup> (à droite) selon le nombre de prise d'aspirine par jour.....	104
<b>Figure 29</b> : Répartition des résultats du Multiplate <sup>®</sup> (à gauche) et du VerifyNow <sup>®</sup> (à droite) en fonction de l'histoire thrombotique (ATCD : antécédents).....	106
<b>Figure 30</b> : Répartitions des résultats des patients traités par aspirine du Multiplate <sup>®</sup> (à gauche) et du VerifyNow <sup>®</sup> (à droite) dans les population "bas risque" et "haut risque" de la stratification du risque thrombotique dans les TE et PV.....	107
<b>Figure 31</b> : Répartitions des résultats des patients TE traités par aspirine rendus par le Multiplate <sup>®</sup> (à gauche) et par le VerifyNow <sup>®</sup> (à droite) selon le score IPSET-thrombosis ...	108
<b>Figure 32</b> : Répartition des résultats des patients traités par aspirine rendus par le Multiplate <sup>®</sup> (à gauche) et par le VerifyNow <sup>®</sup> (à droite) dans les populations triple négatifs, JAK2 positifs et CALR positifs.....	110
<b>Figure 33</b> : Répartition graphique des résultats Multiplate <sup>®</sup> des patients traités par aspirine.....	120

### **Table des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Résumé des indications et posologies usuelles des agents antiplaquettaires dans le cadre de la prévention de la thrombose artérielle selon les recommandations de l'ANSM et de la HAS (Juin 2012) <sup>28</sup> .....	42
<b>Tableau 2</b> : Critères diagnostiques de la thrombocytémie essentielle selon l'OMS (2008) <sup>44</sup>	54
<b>Tableau 3</b> : Critères diagnostiques de la maladie de Vaquez selon l'OMS (2008) <sup>44</sup> .....	58
<b>Tableau 4</b> : Stratification du risque et adaptation thérapeutique dans la thrombocytémie essentielle et la Polyglobulie de Vaquez selon Tefferi A. et Barbui T. <sup>48</sup> .....	62
<b>Tableau 5</b> : Définitions des termes techniques de la trousse Thromboxane B2 Express EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemicals).....	78
<b>Tableau 6</b> : Schéma organisationnel de la plaque de dosage du TXB2 selon le fournisseur (Cayman Chemicals).....	81
<b>Tableau 7</b> : Récapitulatif du pipetage des différents puits.....	82
<b>Tableau 8</b> : Interprétation de la valeur du Kappa de Cohen.....	84
<b>Tableau 9</b> : Caractéristiques de la population étudiée.....	85
<b>Tableau 10</b> : Prévalence des patients résistants à l'aspirine dans chaque technique : pourcentage (n).....	88
<b>Tableau 11</b> : Répartition des concordances et discordances des résultats des patients traités par aspirine entre les techniques Multiplate <sup>®</sup> et VerifyNow <sup>®</sup> .....	90
<b>Tableau 12</b> : Répartition des concordances et discordances des résultats des patients traités par aspirine entre la technique Multiplate <sup>®</sup> et les concentrations en TXB2 sérique.....	92
<b>Tableau 13</b> : Répartition des concordances et discordances des résultats des patients traités par aspirine entre la technique Multiplate <sup>®</sup> et le ratio TXB2/plaquettes.....	93
<b>Tableau 14</b> : Répartition des concordances et discordances dans les résultats des patients traités par aspirine par la technique VerifyNow <sup>®</sup> et le dosage du TXB2 sérique.....	95

<b>Tableau 15</b> : Répartition des concordances et discordances dans les résultats des patients traités par aspirine par la technique VerifyNow® et le ratio TXB2/plaquettes .....	96
<b>Tableau 16</b> : Récapitulatif des paramètres de comparaison des différentes méthodes .....	97
<b>Tableau 17</b> : Sensibilité et spécificité vis à vis du dosage du TXB2 sérique dans les techniques Multiplate et VerifyNow.....	98
<b>Tableau 18</b> : Corrélation de Spearman entre les résultats numériques du Multiplate® des patients traités par aspirine et les paramètres de l'hémogramme .....	99
<b>Tableau 19</b> : Corrélation de Spearman entre les résultats du VerifyNow® des patients traités par aspirine et les paramètres de l'hémogramme .....	101
<b>Tableau 20</b> : Score IPSET-thrombosis pour la stratification du risque thrombotique chez les patients atteints d'une TE .....	108

# Liste des Abréviations

---

AA : acide arachidonique  
AChE : Acétylcholinestérase  
AS : acide salicylique  
AAS : acide acétylsalicylique  
ADP : Adénosine diphosphate  
AINS : Anti inflammatoire non stéroïdien  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé  
ARU : Aspirin reaction unit  
ATP : Adénosine triphosphate  
AU : Aggregation unit  
AUC : Area under the curve ou aire sous la courbe  
CALR : Calréticuline  
COX : cyclooxygénase  
CYP : Cytochrome P450  
DAG : Diacylglycérol  
EGF : Endothelial growth factor  
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay  
EPO : Erythropoïétine  
ERK : Extracellular signal regulated kinase  
FDRCV : Facteur de risque cardiovasculaire  
G-CSF : Granulocyte colony stimulatind factor  
GM-CSF : Granulocyte-monocyte colony stimulating factor  
GP : Glycoprotéines  
HAS : Haute autorité de santé  
HPR : Hyperréactivité plaquettaire résiduelle  
IC<sub>95%</sub> : Intervalle de confiance à 95%  
IP3 : Inositol triphosphate  
IFN- $\alpha$  : Interféron  $\alpha$   
IPF : Immature platelet fraction  
JAK2 : Janus kinase 2  
LTA : Light transmission aggregometry  
MAPK : mitogen activated proteine kinase

MFP : Myélofibrose primitive  
MGG : May-Grünwald-Giemsa  
MO : Moelle osseuse  
MPL : Myeloproliférative leukemia  
NO : Monoxyde d'azote  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
OR : Odds ratio  
PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor 1  
PAR : Protease activated receptor  
PDGF : Platelet-derived growth factor  
PF4 : Facteur 4 plaquettaire  
PGG2 : Prostaglandine G2  
PGH2 : Prostaglandine H2  
PLA2 : Phospholipase A2  
PLC : Phospholipase C  
PPP : Plasma pauvre en plaquettes  
PRP : Plasma riche en plaquettes  
PV : Polyglobulie de Vaquez  
PVSG : Polycythemia vera study group  
SAPL : Syndrome des antiphospholipides  
SCRS : Système Canaliculaire Relié à la Surface  
SMP : Syndrome myéloprolifératif  
SMP Ph- : Syndrome myéloprolifératif Philadelphie négatif  
STD : Système tubulaire dense  
TE : Thrombocytémie essentielle  
TFPI : Tissue factor pathway inhibitor  
TGF- $\beta$  : Transforming growth factor beta  
TPO : Thrombopoïétine  
TXA2 : Thromboxane A2  
TXB2 : Thromboxane B2  
VGM : Volume globulaire moyen  
vWF : facteur von Willebrand



# I. INTRODUCTION

---

L'aspirine représente la thérapeutique antiagrégante la plus répandue dans la prévention du risque thromboembolique. En bloquant la voie de la cyclooxygénase, elle inhibe rapidement et efficacement les fonctions plaquettaires par effondrement du taux sérique de thromboxane A<sub>2</sub>, agent pro-agrégant très puissant.

La résistance à l'aspirine est un phénomène biologique dont la pertinence clinique est difficile à établir. Elle correspond à un défaut d'activité de l'aspirine sur sa cible : la cyclooxygénase 1 préférentiellement. Elle peut être mise en évidence au laboratoire par des tests fonctionnels plaquettaires spécifiques de la voie de la cyclooxygénase par l'utilisation de l'agoniste adéquat : l'acide arachidonique. Les résultats fournis par ces tests permettent de catégoriser le patient traité par aspirine en « résistant » lorsque les valeurs se situent dans l'intervalle d'une population de référence dénuée de traitement et ayant donc des fonctions plaquettaires conservées. Le Multiplate<sup>®</sup> Analyzer et le VerifyNow<sup>®</sup> sont deux systèmes automatisés aux technologies différentes permettant une évaluation des fonctions plaquettaires sur sang total. Le Multiplate<sup>®</sup> mesure l'agrégation plaquettaire par impédance entre deux électrodes, tandis que le VerifyNow<sup>®</sup> utilise une technique optique par mesure de la turbidimétrie. L'emploi de l'agoniste spécifique de la voie de la cyclooxygénase (l'acide arachidonique) fait de ces deux méthodes des tests spécifiques de la résistance biologique à l'aspirine.

Les syndromes myéloprolifératifs Ph1 négatif de type thrombocytémie essentielle et polyglobulie de Vaquez ont pour cause majeure de morbimortalité les complications vasculaires. L'aspirine est le traitement de choix dans la prévention du risque de thrombose pour ces pathologies, et ce dès le diagnostic avant même qu'un traitement cytoréducteur n'ait été instauré. La surveillance de l'efficacité du traitement antiagrégant peut donc être intéressante en vue d'une adaptation thérapeutique éventuelle. Cette population est cependant sujette à des troubles hémostatiques particuliers qui peuvent conduire à une variabilité des résultats des tests fonctionnels sur sang total.

Notre étude s'inscrit donc dans ce contexte : parmi les deux tests fonctionnels plaquettaires sur sang total, lequel semble être le plus à même d'évaluer la

résistance biologique à l'aspirine chez ces patients ? Nous chercherons également à mettre en évidence sur ces deux méthodes une signification clinique à leurs résultats.

## II. GENERALITES

---

### II.1 Les plaquettes

C'est en 1840 qu'Alfred Donné, médecin à l'Hôtel-Dieu de Paris, découvre les plaquettes grâce à la mise au point de microscopes plus performants. Cette découverte est confirmée par le savant anglais Gulliver sans pour autant en élucider leur rôle. Ce n'est que bien des années plus tard que Georges Hayem à Paris et Giulio Bizzozero à Rome décrivent les fonctions des plaquettes, « gouvernant ainsi l'équilibre de la fluidité sanguine ».

#### II.1.a La production plaquettaire

La concentration plaquettaire chez un individu, quel que soit son âge, varie entre 150 et  $400 \cdot 10^9$  plaquettes par litre de sang. Les méthodes de marquage isotopique par le chrome 51 ou l'indium 111 ont permis d'évaluer leur durée de vie entre 8 et 10 jours. Par conséquent, on estime qu'environ  $10^{11}$  plaquettes doivent être produites chaque jour afin de maintenir le niveau circulant normal.

La mégacaryocytopoïèse et la thrombopoïèse sont les deux processus physiologiques successifs qui permettent d'aboutir à la libération, dans le torrent circulatoire, de plaquettes sanguines fonctionnelles essentielles à l'hémostase primaire.

##### - **La mégacaryocytopoïèse**

Les mégacaryocytes sont les précurseurs médullaires des plaquettes. Leur rareté au sein de la moelle osseuse (MO) est une caractéristique du lignage. Sur un frottis médullaire coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG), ils apparaissent comme des cellules de grande taille variable selon le stade de maturité (50 à 120  $\mu\text{m}$ ), comportant un noyau plurilobé.

Le processus de mégacaryocytopoïèse se déroule au sein de la moelle osseuse. La cellule souche hématopoïétique s'engage dans la lignée mégacaryocytaire sous l'influence de cytokines et de chimiokines. Elle passe successivement aux stades de progéniteur myéloïde commun (CFU-GEMM), progéniteur commun érythroblastique-

mégacaryocytaire (CFU-E/MK), progéniteur mégacaryocytaire précoce (BFU-MK) et enfin progéniteur mégacaryocytaire tardif (CFU-MK). La maturation de ce dernier progéniteur s'opère ensuite par un phénomène singulier, propre à la lignée : l'endomitose. La CFU-MK passe ainsi aux stades successifs de promégacaryoblaste, mégacaryoblaste, mégacaryocyte basophile, mégacaryocyte granuleux et mégacaryocyte mature. La première de ces cellules subit une succession de mitoses sans division cellulaire, conduisant à un noyau polyploïde d'une teneur contenant  $2^n$  fois celle des cellules haploïdes germinales, n pouvant aller jusqu'à 8. Ce phénomène s'explique par un défaut des phases tardives de la cytokinèse qui aboutit à un retour prématuré en phase S du cycle cellulaire sans qu'il y ait eu de division cytoplasmique. Les précurseurs augmentent alors de taille et leur chromatine se condense progressivement, ce qui les rend identifiables sur un frottis médullaire. Le rapport nucléocytoplasmique, élevé au départ, va progressivement diminuer de par l'extension du cytoplasme : celui-ci s'enrichit en organelles (granules sécrétoires, lysosomes, mitochondries,...) et apparaît plus granuleux et moins basophile au fil de la maturation. Le noyau se segmente, les lobes sont au départ étroitement rassemblés puis s'étendent avec l'âge du mégacaryocyte. Plus le mégacaryocyte est grand (ploïdie élevée), et plus le nombre de plaquettes produite sera important : un mégacaryocyte libère entre 1000 et 8000 plaquettes dans la circulation sanguine<sup>1,2</sup>.

#### - ***La thrombopoïèse ou plaquetto-genèse***

Ce phénomène aboutit à la libération de plaquettes fonctionnelles dans la circulation sanguine. Le mégacaryocyte mature donne naissance à plusieurs centaines de plaquettes. Sous l'effet d'attractants chimiotactiques, il migre jusqu'au lit capillaire médullaire. Les organelles se regroupent et la membrane plasmique se déforme lui conférant une forme allongée, ce qui facilite son accès aux sinusoides. Il émet ensuite de très longs pseudopodes cytoplasmiques jalonnés de renflements : ce sont les proplaquettes. Les organelles se meuvent le long du manche de la proplaquette en glissant le long des microtubules jusqu'à ce qu'elles soient emprisonnées dans l'extrémité distale. Chaque renflement correspond à une future plaquette qui se détache de l'extrémité distale pour rejoindre la circulation sanguine. Le corps résiduel du mégacaryocyte (noyau entouré d'une collerette cytoplasmique) reste quant à lui emprisonné dans les sinusoides et meurt par apoptose<sup>1,3</sup>.

## - **Régulation humorale de la mégacaryocytopoïèse**

Le développement des mégacaryocytes et la formation des plaquettes sont sous la dépendance de nombreuses cytokines dont une est spécifique de la lignée mégacaryocytaire : la thrombopoïétine ou TPO. Cette hormone, principalement produite par le foie, agit sur toutes les étapes de la mégacaryocytopoïèse et de la plaquetogenèse (depuis les CFU-MK jusqu'aux plaquettes) en se fixant sur son récepteur c-Mpl<sup>4</sup>. Elle favorise la différenciation cellulaire mais n'est pas indispensable à la maturation terminale de la lignée, notamment à la formation des proplaquettes et des plaquettes<sup>1</sup>. Cependant, elle semble malgré tout être nécessaire à l'obtention de plaquettes normales, aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif<sup>5</sup>.

D'autres cytokines non spécifiques de la lignée mégacaryocytaire et d'action plus modeste ont pu être mises en évidence, mais leur activité n'a pu être démontrée qu'*in vitro* pour certaines d'entre elles : IL-3, IL-6, IL-8, IL-11, CSF, érythropoïétine (EPO), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), G-CSF, oncostatine M, leukemia inhibiting factor (LIF) et le c-kit ligand<sup>6</sup>. L'IL-3, l'IL-8, l'IL-11, le GM-CSF et le LIF stimulent la différenciation des progéniteurs précoces vers les CFU-MK. Le GM-CSF, l'IL-8 et l'IL-11 viennent ensuite soutenir l'action de la TPO pour la maturation des précurseurs mégacaryocytaires<sup>1</sup>.

### **II.1.b Aspects morphologiques et ultrastructure des plaquettes**

Les plaquettes sont des cellules anucléées, de forme discoïde et biconvexe, d'un diamètre de 2 à 6 µm. En dehors de toute situation d'activation, leur volume moyen varie entre 7 et 11 fL, représentant ainsi les plus petites cellules du sang<sup>7</sup>.

Sur les frottis sanguins colorés au MGG, les plaquettes apparaissent comme des fragments de cytoplasme dans lesquels on observe deux zones distinctes : la partie centrale, le chromomère, dans laquelle abondent de fins grains azurophiles, et la partie périphérique, le hyalomère, faiblement basophile et dépourvue de grains<sup>1</sup>.

La membrane plasmique plaquettaire, semblable à celle des autres cellules, est composée d'une double-couche de phospholipides stabilisée par du cholestérol. Le feuillet externe est riche en phosphatidylcholine et sphingomyéline, tandis que le feuillet interne est essentiellement composé de phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et phosphatidylinositol, participant tous après externalisation aux phénomènes d'activation, d'agrégation plaquettaire et de coagulation. C'est dans

cette bicouche lipidique que viennent s'ancrer en surface de nombreuses glycoprotéines (GP) et récepteurs de nature protéique<sup>8</sup>.

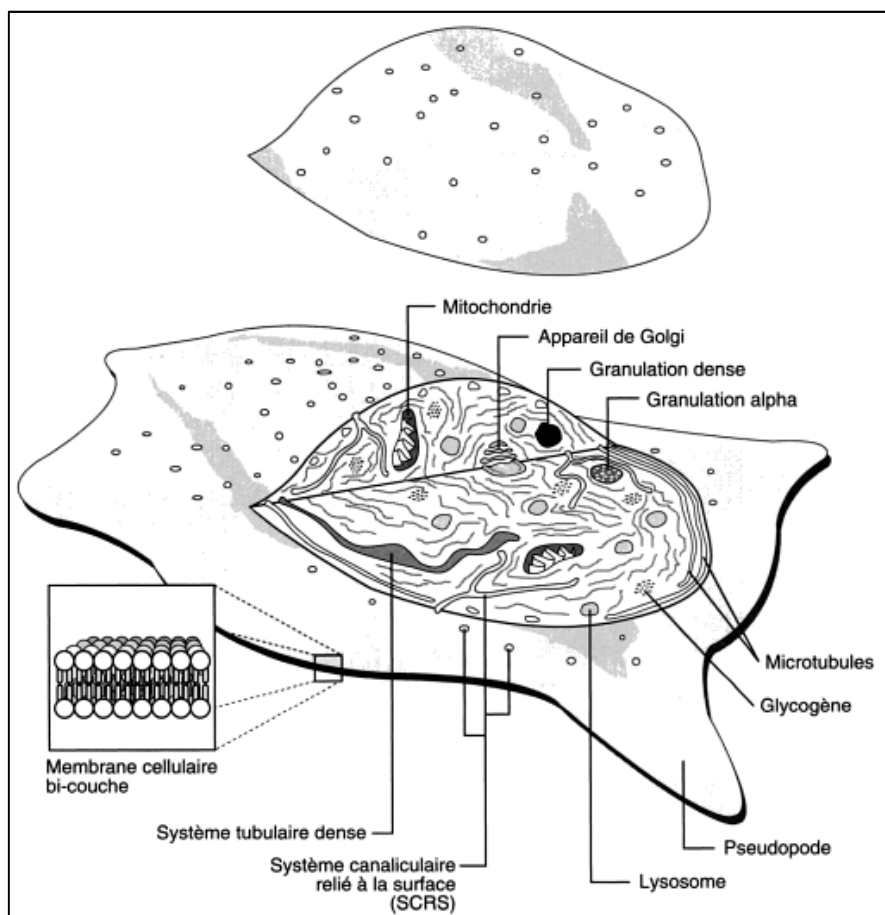
Cette structure tri laminaire s'invagine par endroit à l'intérieur du cytoplasme pour se connecter à un système de canaux très ramifiés permettant les échanges entre le cytosol et le milieu environnant : il s'agit du système canaliculaire relié à la surface (SCRS). Il existe d'autre part le système tubulaire dense (STD) situé au voisinage des microtubules : il ne communique pas directement avec l'extérieur et constitue le principal site de stockage du calcium<sup>7</sup>.

Au niveau cytoplasmique, les plaquettes renferment plusieurs types d'organelles différenciables en microscopie électronique : quelques mitochondries, des grains de glycogènes en quantité importante regroupés en amas, des granules  $\alpha$ , des granules denses et des lysosomes<sup>1,3,7</sup>.

- Les granules  $\alpha$  sont les plus abondants (une centaine par plaquette) et les plus volumineux. Ils renferment des facteurs de croissance (endothelial growth factor : EGF ; platelet-derived growth factor : PDGF ; transforming growth factor : TGF- $\beta$ ), des protéines adhésives (fibrinogène, thrombospondine, fibronectine), des protéines effectrices de la coagulation (facteurs V, XI, XIII, facteur von Willebrand : vWF, inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 : PAI-1, inhibiteur du facteur tissulaire : TFPI), des chimiokines (Facteur 4 Plaquettaire : PF4) et à leur surface des intégrines telles que la P-sélectine et le complexe GP IIb-IIIa.
- Les granules denses, en nombre de 3 à 12 par plaquette, contiennent le pool de nucléotides acide adénosine diphosphate (ADP) et acide adénosine triphosphate (ATP), ainsi qu'une importante concentration de sérotonine et de calcium ionisé ( $\text{Ca}^{2+}$ ).
- Les lysosomes contiennent l'arsenal enzymatique de la plaquette : phosphatases et hydrolases acides, protéases, glycosidases et protéines cationiques à activité bactéricides.

Un réseau de microtubules est localisé à la périphérie de la cellule et maintient la plaquette dans sa forme discoïde au repos. Des filaments d'actine relient la membrane plasmique au cytoplasme et à l'ensemble de ses granules. Ainsi, lors de l'activation, la contraction de la sangle microtubulaire et des filaments d'actine permet l'émission de pseudopodes, le changement conformationnel de la plaquette et la sécrétion du contenu des granules (*cf figure 1*). Lors de l'étape de sécrétion, les granules et les tubules du STD fusionnent avec les membranes du SCRS pour déverser leur contenu à l'extérieur de la plaquette.

Malgré l'absence de noyau, les plaquettes conservent une petite quantité d'ARN messagers et un petit arsenal de ribosomes permettant ainsi de les traduire en protéines effectrices.



*Figure 1 : Schéma de l'organisation anatomique d'une plaquette normale<sup>9</sup>*

### **II.1.c Physiologie de l'hémostase primaire**

L'hémostase primaire englobe l'ensemble des phénomènes qui aboutissent au colmatage initial d'une brèche vasculaire par formation d'un caillot essentiellement plaquettaire (ou « clou plaquettaire »). Elle met en jeu quatre acteurs principaux : les plaquettes, le facteur von Willebrand (vWF), le fibrinogène et la paroi vasculaire. Cette étape est suivie par le processus de coagulation visant à renforcer le caillot grâce à la formation d'une « colle » physiologique, la fibrine<sup>7</sup>.

Les étapes de l'hémostase primaire sont les suivantes :

### - **Adhésion au sous-endothélium**

Les cellules endothéliales, lorsqu'elles sont intactes, constituent une barrière antiagrégante grâce à la synthèse et la sécrétion d'agents antiagrégants très puissants tels que l'ADPase, la prostacycline et le monoxyde d'azote (NO)<sup>7</sup>. Après lésion de cet endothélium vasculaire, le sous-endothélium mis à nu expose à la circulation sanguine des éléments très thrombogènes : les fibres de collagène et les microfibrilles. Le vWF, libéré par les cellules endothéliales lésées avoisinantes, vient rapidement se fixer au collagène du sous-endothélium. Dans ces conditions hémorrhéologiques particulières (force de cisaillement élevée), les plaquettes présentes dans la circulation sanguine subissent un ralentissement en se fixant aux différents constituants du sous-endothélium par l'intermédiaire de ligands spécifiques : la GPIb $\alpha$  spécifique du vWF ; les GPIa/IIa, GPIV, GPVI, p65, p47 et TIIICBP toutes capables de se fixer aux différents types de fibres de collagène.

### - **Activation plaquettaire**

Cette étape est marquée par un changement morphologique des plaquettes et d'importantes modifications biochimiques.

Suite à l'action d'un stimulus sur les plaquettes, la concentration calcique intracytoplasmique augmente considérablement, soit par influx depuis le secteur extracellulaire, soit par libération du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire contenu dans les granules de stockage du STD. Ceci va avoir pour conséquences :

- l'activation de la mitogen activated protein kinase (MAPK) P38 intracytoplasmique capable d'activer la phospholipase A2 (PLA2) (enzyme majeure du métabolisme de l'acide arachidonique) ;
- la libération du contenu des granules sécrétoires dans le milieu extérieur environnant par la contraction des filaments d'actine et des microtubules ;
- et le changement conformationnel du complexe GP IIb/IIIa en molécule active capable de fixer le fibrinogène et donc d'engager la formation du clou plaquettaire<sup>7</sup>.

D'autre part, la plaquette subit un important changement structural passant d'une forme discoïde à une forme sphérique et volumineuse émettant de longs pseudopodes : les plaquettes peuvent ainsi augmenter leur surface de contact et s'enchevêtrer les unes avec les autres pour consolider l'agrégat.

Enfin, la membrane plasmique subit un réarrangement appelé « flip-flop membranaire » permettant l'externalisation des phospholipides pro-coagulants



chargés négativement sur le feuillet externe (essentiellement de type phosphatidylsérine).

Ces différentes transformations sont médiées par quatre stimuli principaux (*cf figure 2*):

- Le collagène :

L'activation des plaquettes par le collagène survient après leur adhésion au sous-endothélium par l'intermédiaire de la GPVI<sup>10</sup>. Cette glycoprotéine est liée de manière non-covalente à la chaîne  $\gamma$  d'un récepteur homodimérique, le FcR. La fixation du collagène à la GPVI induit une phosphorylation du FcR, qui vient phosphoryler la tyrosine kinase Syk, qui à son tour phosphoryle et active la phospholipase  $C_{\gamma 2}$  (PLC $_{\gamma 2}$ )<sup>11</sup>. Cette enzyme hydrolyse les phosphatidylinositides membranaires en deux médiateurs cellulaires importants : l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). Ce dernier composé va activer la protéine kinase C calmoduline-dépendante qui permet la phosphorylation au niveau des résidus sérine-thréonine de la chaîne légère de la myosine et de la pleckstrine. Ces réactions sont impliquées dans le changement conformationnel de la plaquette et dans la libération du contenu des granules sécrétoires. D'autre part, l'IP3 favorise l'efflux de  $Ca^{2+}$  hors des vésicules de stockage vers le cytoplasme.

- La thrombine :

L'hydrolyse de la prothrombine (facteur II) par le facteur X activé, au sein d'une micelle phospholipidique que constitue la membrane plaquettaire, aboutit à la formation de thrombine (ou facteur II activé). Celle-ci se fixe par l'intermédiaire d'une sérine à activité estérasique à un récepteur à sept domaines transmembranaires, le protease activated receptor (PAR-1)<sup>7</sup>. Après liaison, ce récepteur est clivé à son extrémité N-terminale, ce qui démasque un site cryptique responsable de la transduction du signal. Le récepteur PAR-4 peut également intervenir dans un second temps de manière prolongée lorsque la concentration calcique intracytoplasmique est plus importante : il agit en coopération avec PAR-1 et permet une amplification du signal. Les récepteurs PAR sont couplés à une protéine G de type Gq dont l'activation entraîne la phosphorylation des PLC $_{\beta 2/\beta 3}$ <sup>12</sup>. Comme toutes les PLC, leur activation engendre la libération des deux messagers IP3 et DAG, d'où découlent les cascades d'amplification du signal détaillées plus haut pour le collagène. La protéine Gq

activée a également une action directe sur la MAP kinase P38 permettant l'activation de la PLA2. Le rôle de la PLA2 sera détaillé plus loin dans cet exposé (cf II.1.d, métabolisme de l'acide arachidonique).

- L'ADP et l'ATP :

L'ADP est un inducteur faible de l'agrégation plaquettaire car il provoque une agrégation réversible au départ, qui devient irréversible par amplification du phénomène et grâce à la coopération du thromboxane A2. L'ADP et l'ATP, relargués des granules dans le milieu environnant, ont la possibilité de se fixer sur trois types de récepteurs différents, tous de la famille des récepteurs purinergiques P2 : les récepteurs de l'ADP de type P2Y sont des protéines à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G, Gq pour le P2Y<sub>1</sub> et Gi pour le P2Y<sub>12</sub> ; le récepteur P2X<sub>1</sub> quant à lui est un récepteur canal à deux domaines transmembranaires activé par l'ATP. L'activation du P2Y<sub>1</sub> stimule la PLC<sub>β2/β3</sub>, entraînant la formation de l'IP3 et du DAG comme détaillé plus haut. La fixation de l'ADP au P2Y<sub>12</sub> est responsable de l'inactivation de l'adénylate cyclase provoquant une diminution de la concentration en adénosine monophosphate cyclique (AMPc), molécule permettant le maintien au repos des plaquettes. Le P2Y<sub>1</sub> semble avoir un rôle dans l'initiation de l'activation par l'ADP tandis que le P2Y<sub>12</sub> serait impliqué dans une réactivité durable rendant l'activation irréversible<sup>13</sup>. Enfin, la fixation de l'ATP au P2X<sub>1</sub> provoque un influx rapide de calcium au travers de la membrane plasmique. Seul, P2X<sub>1</sub> ne pourrait provoquer l'activation des plaquettes : son rôle est de potentialiser la transduction des signaux des autres stimuli<sup>14</sup>.

- Le thromboxane A2 :

La synthèse des prostaglandines, que nous détaillerons par la suite, engendre la formation d'un des agents pro-agrégants les plus puissants : le thromboxane A2. Il est libéré par les plaquettes activées et se fixe au récepteur membranaire TP (pour TXA2 Prostanoïde) à sept domaines transmembranaires, couplé à une protéine G dont il existe deux isoformes : TPα et TPβ, toutes deux issues d'un seul et même gène subissant un épissage alternatif lors de sa transcription<sup>15</sup>. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la transduction du signal sont multiples car plusieurs types de protéine G sont concernés. Le mode de signalisation majeur est l'activation de la PLC<sub>β2/β3</sub> par l'intermédiaire d'une protéine Gq<sup>16</sup>. Le récepteur TP est un récepteur de très haute affinité pour le TXA2, il est

responsable d'une amplification majeure de l'activation plaquettaire dans le microenvironnement local.

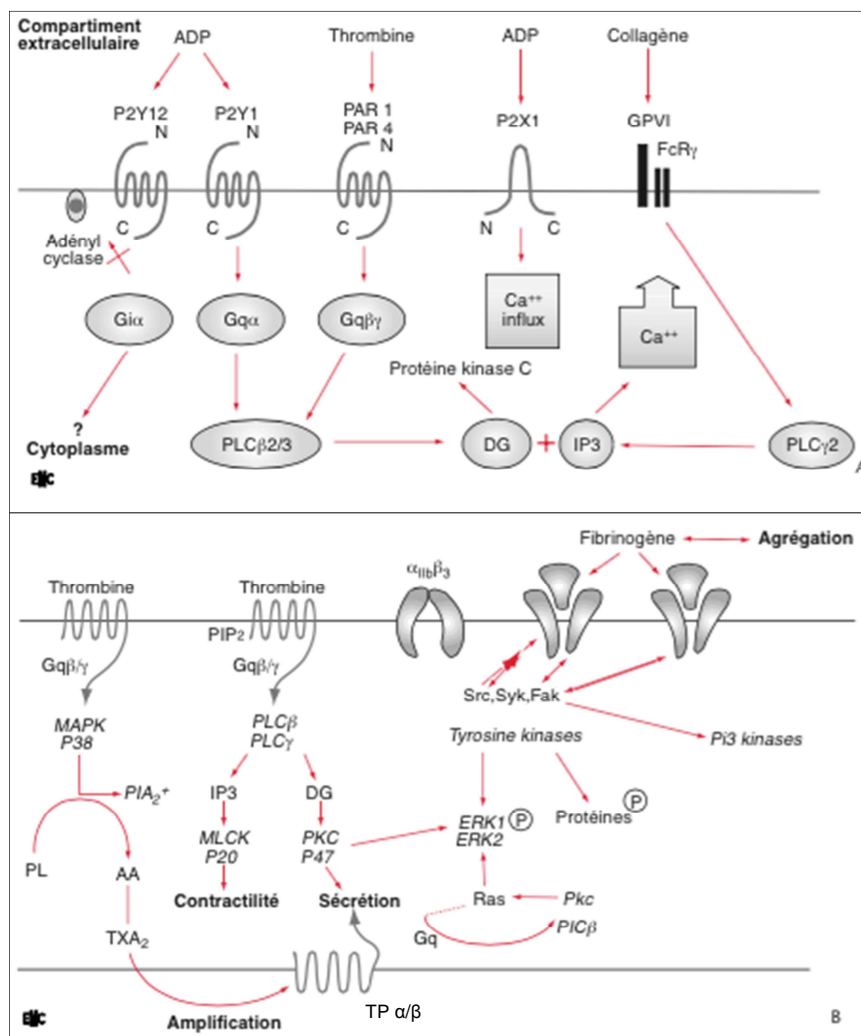


Figure 2 : Voies d'activations plaquettaire : réactivité avec les principaux stimuli environnementaux (A) ; conséquences sur les fonctions et amplification de la réponse par le TXA<sub>2</sub> (B)<sup>7</sup>

### - Etape de sécrétion

Grâce à la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, l'influx de Ca<sup>2+</sup> du milieu extérieur et la contraction du cytosquelette, les granules vont se mobiliser et se centraliser pour rentrer en contact avec la membrane du SCRS. La fusion des membranes granulaires et des membranes plasmique du SCRS est permise grâce à l'interaction de récepteurs granulaires (v-SNARES) avec des récepteurs situés au niveau des membranes plasmiques (t-SNARES), avec l'aide de protéines cytosoliques solubles telles que les NSF (pour *N-éthylmaléimide sensitive fusion protein*) et les SNAP (pour *soluble NSF attachment protein*)<sup>7</sup>. Les protéines NSF mises en jeu dans cette interaction fournissent, de par leur activité ATPase, l'énergie nécessaire pour fusionner les membranes et déverser le contenu des vésicules granulaires (α,

denses et lysosomes) dans le SCRS et donc vers l'extérieur. Notons ici que certains constituants intragranulaires vont s'ancrer à la surface de la membrane plasmique plaquettaire tels que la thrombospondine, la P-sélectine, le complexe GPIIb-IIIa et la GPIV.

#### - **Agrégation plaquettaire**

Le complexe d'intégrines  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , autrement nommé GP IIb-IIIa, est majoritaire à la surface plaquettaire avec environ 50000 copies par plaquette, auxquelles s'ajoutent environ 30000 copies contenues dans les granules  $\alpha^8$ . A l'état quiescent, ce complexe est dans une conformation structurale le rendant inaccessible à son ligand. Après activation plaquettaire, la phosphorylation des résidus sérine/thréonine du domaine  $\beta\text{3}$  du complexe induit un changement conformationnel de la protéine, permettant l'exposition de son site de fixation *ligand binding pocket*. Le ligand principal du complexe GP IIb/IIIa est le fibrinogène : synthétisée par le foie, cette protéine est formée de six chaînes polypeptidiques  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , identiques deux à deux et reliées par des ponts disulfures. Grâce aux motifs de type RDG (*arginine – acide aspartique – glycine*) au niveau de la chaîne  $\alpha$ , le fibrinogène va pouvoir reconnaître le complexe  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . La présence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est ici indispensable pour assurer la fixation du ligand à son récepteur. Outre le fibrinogène et avec une affinité moindre,  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  peut reconnaître des motifs RDG d'autres protéines comme le vWF et la fibronectine.

La liaison du fibrinogène à son récepteur permet de ponter les plaquettes les unes aux autres : c'est le phénomène d'agrégation. Par ailleurs, cette interaction fait intervenir de nouveau une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à l'activation de protéines, la libération de calcium et la réorganisation du squelette d'actine. Tout ceci vise à renforcer les propriétés adhésives des plaquettes.

#### **II.1.d Synthèse des prostaglandines plaquettaires et rôle du thromboxane A2**

Les prostaglandines ou eicosanoïdes sont des médiateurs cellulaires puissants d'action autocrine (sur la cellule qui les synthétise) et paracrine (sur les cellules environnantes). Il en existe de nombreux types dont les rôles diffèrent, mais leurs

actions principales résident dans la médiation de l'inflammation, l'allergie et l'activation plaquettaire.

Les prostaglandines sont le résultat de l'action enzymatique d'une isomérase sur le produit du métabolisme de l'acide arachidonique (AA). Certaines isomérases sont plus spécifiques à des types cellulaires, ce qui leur confère un rôle différent en fonction de la prostaglandine produite. Ainsi, au sein des plaquettes, c'est la voie de la thromboxane synthase qui prédomine, avec une production plaquettaire quasi exclusive de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Comme précédemment cité, le TXA<sub>2</sub> est un agent pro-agrégant très puissant qui amplifie la réponse aux stimuli initiaux (thrombine, collagène, ADP) pour former rapidement un clou plaquettaire dans l'environnement local. Nous allons donc détailler dans cette partie les étapes de synthèse, le métabolisme et le mode d'action du TXA<sub>2</sub>.

#### - ***Métabolisme de l'acide arachidonique***

Le métabolisme de l'acide arachidonique est la première étape conduisant à la synthèse des prostaglandines.

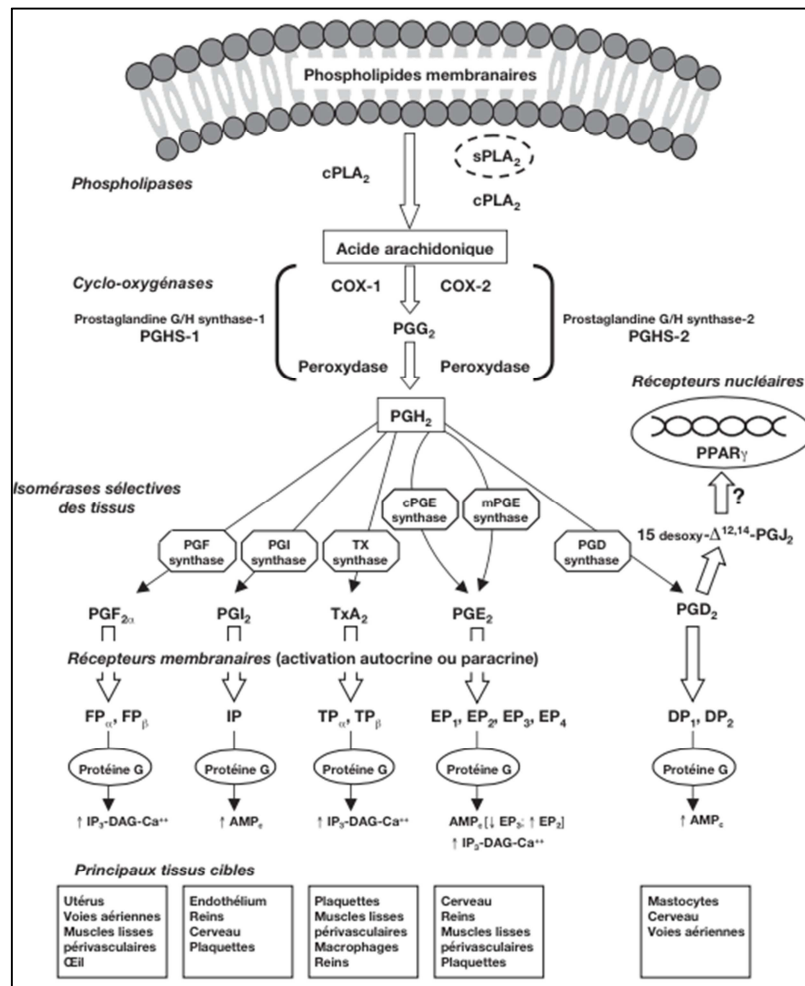
L'acide arachidonique (AA) ou eicosa-5,8,11,14-tétranoïque est un acide gras à vingt atomes de carbone issu de l'hydrolyse enzymatique des phospholipides membranaires par une enzyme ubiquitaire : la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Il en existe deux types, la PLA<sub>2</sub> cytosolique (cPLA<sub>2</sub>) de 85 kDa et la PLA<sub>2</sub> sécrétée (sPLA<sub>2</sub>) de 14 kDa. La cPLA<sub>2</sub> est synthétisée de manière constitutive dans le cytosol et peut être activée par différents stimuli intracellulaires. La sPLA<sub>2</sub> est présente dans les situations d'inflammation et de défense pour accentuer la réponse immunitaire innée et adaptative<sup>17</sup>. Comme nous l'avons vu précédemment, lors de l'activation plaquettaire par des stimuli extérieurs, la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire augmente de manière importante. Ceci va avoir pour conséquence une synthèse accrue de la sPLA<sub>2</sub> et l'activation biologique de ces deux formes de PLA<sub>2</sub> : la concentration en AA se retrouve ainsi très augmentée dans le cytoplasme plaquettaire.

L'AA à taux élevé va accroître l'activité des enzymes cytosoliques qui lui sont spécifiques. Il va ainsi subir des biotransformations conduisant à de nombreux métabolites oxydés dont les deux voies principales sont :

- les cyclooxygénases (COX), aboutissant à la synthèse des prostaglandines,
- les lipooxygénases, engageant la synthèse des leucotriènes que nous ne détaillerons pas ici.

Les COX sont présentes dans toutes les cellules. Il en existe deux isotypes, la COX-1 et la COX-2. La COX-1, exprimée de manière constitutionnelle, assure la production basale d'eicosanoïdes, tandis que la COX-2 est inductible, stimulée par des médiateurs pro-inflammatoires et agissant essentiellement dans les situations pathologiques. La COX assure la biotransformation de l'AA en prostaglandine G2 (PGG2), qui subira une peroxydation en prostaglandine H2 (PGH2). Cette synthèse a lieu sur la face luminale du réticulum endoplasmique. Le PGH2 constitue le substrat de nombreuses réactions enzymatiques qui diffèrent fonction du tissu dans lequel il se trouve : il existe donc une spécialisation tissulaire de la synthèse des prostaglandines<sup>18</sup> (cf figure 3).

Ainsi, pour les plaquettes, l'isomérase de la PGH2 majoritaire et quasi spécifique est la thromboxane synthase.



**Figure 3 : Voies de biosynthèse et actions des prostaglandines et du thromboxane A<sub>2</sub><sup>18</sup>**

*cPLA2* : phospholipase A2 cytosolique ; *sPLA2* : phospholipase A2 sécrétée ; *COX* : cyclooxygénase ; *PGHS* : prostaglandine H synthase ; *PG* : prostaglandine ; *TX* : thromboxane ; *cPGE* : prostaglandine E synthase cytosolique ; *mPGE* : prostaglandine E synthase membranaire ; *FP* : récepteur de la prostaglandine F ; *IP* : récepteur de la prostacycline ; *TP* : récepteur du thromboxane ; *EP* : récepteur de la prostaglandine E ; *DP* : récepteur de la prostaglandine D ; *PPAR* : récepteur activé par les proliférateurs de peroxydome ; *IP3* : inositoltriphosphate ; *DAG* : diacylglycérol ; *AMPc* : adénosine monophosphate cyclique.

## - Biosynthèse et métabolisme du thromboxane A<sub>2</sub>

Le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) est issu de l'action enzymatique de la thromboxane synthase sur un endoperoxyde instable, la PGH<sub>2</sub>. La thromboxane synthase appartient à la famille des cytochromes P450 (CYP) et est aussi appelée CYP5A1. Elle est située au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. En plus de son tropisme plaquettaire, on l'a retrouvée également plus modestement dans d'autres types cellulaires comme les macrophages, les reins et le muscle lisse périvasculaire. Son action sur la PGH<sub>2</sub> libère trois composés : l'acide 12-hydroxy-5,8,10-heptadécatriénoïque (12-HHT), le malondialdéhyde (MDA) et TXA<sub>2</sub>. Seule l'activité biologique du TXA<sub>2</sub> a été démontrée à ce jour<sup>19</sup>.

Le TXA<sub>2</sub> est un composé très instable (demi-vie de 30 secondes à 37°C) et est rapidement dégradé de façon non enzymatique en thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) : composé circulant stable, à demi-vie plus longue et dépourvu d'activité biologique propre<sup>16</sup>. Ainsi le phénomène d'activation de grande ampleur qu'entreprend le TXA<sub>2</sub> peut facilement être contenu et maîtrisé. Par la suite, le TXB<sub>2</sub> va lui-même subir une dégradation enzymatique en métabolites également inactifs : 2,3-dinor TXB<sub>2</sub>, 11-déhydro TXB<sub>2</sub> et 11-déhydro 2,3-dinor TXB<sub>2</sub> (cf figure 4). Ces différents composés sont éliminés en majorité par voie urinaire.

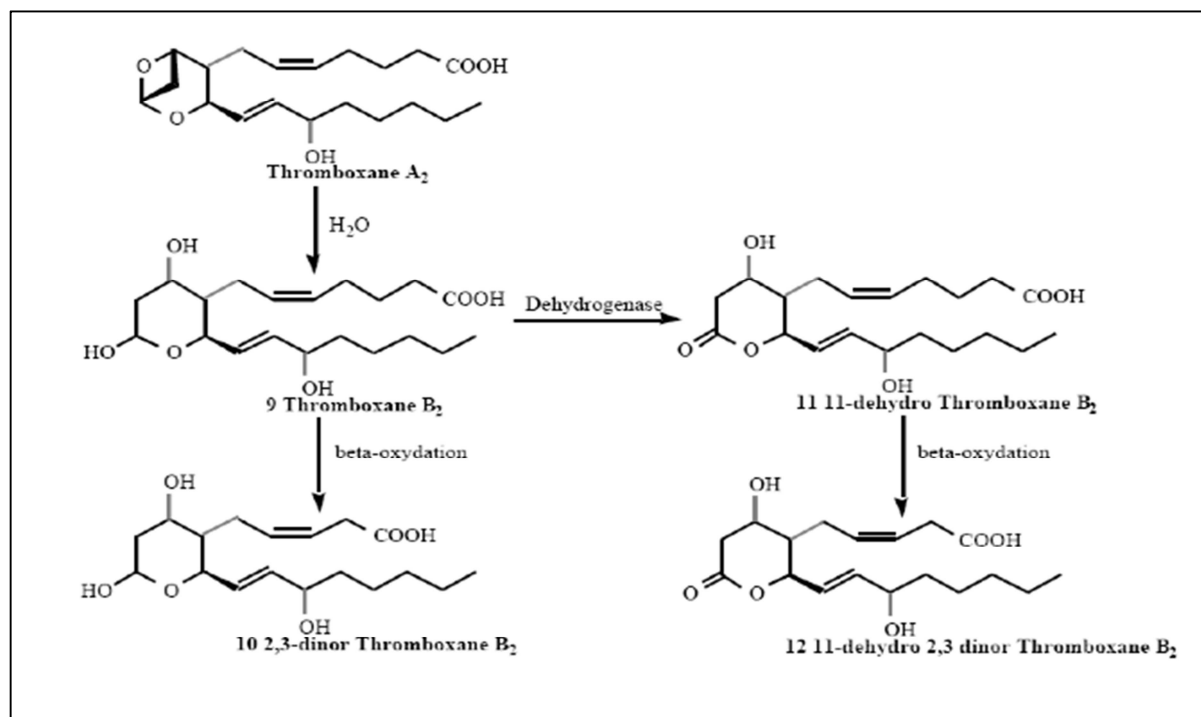


Figure 4 : Structure des métabolites du thromboxane A<sub>2</sub><sup>16</sup>

### - **Mode d'action du thromboxane A2**

Le TXA2 est responsable d'une activation majeure des plaquettes : il vient amplifier le phénomène d'activation initié par le collagène, la thrombine et l'ADP. Il se fixe à un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G, le récepteur TP, dont la stimulation induit une augmentation du calcium intracellulaire, une activation de la PLC avec production des médiateurs cellulaires IP3 et DAG et une activation de la protéine kinase C<sup>16</sup>. Le récepteur TP existe sous deux isoformes, TP $\alpha$  et TP $\beta$ , toutes deux issues d'un seul et même gène subissant un épissage alternatif lors de sa transcription. Leur rôle respectif dans l'activation plaquettaire n'a pour le moment pas été élucidé. Ce récepteur est présent au sein de plusieurs types cellulaires, avec cependant une nette prédominance au sein des plaquettes<sup>15</sup>.

## **II.2 L'aspirine**

L'acide salicylique (AS), duquel dérive l'aspirine, est un composé utilisé depuis plus de 25 siècles. Les feuilles de saule blanc (*Salix alba*) infusées, contenant une très forte concentration en AS, étaient déjà utilisées pour soulager la fièvre et les douleurs. Le XIXème siècle verra ensuite se talonner tour à tour plusieurs chimistes s'essayant à l'élaboration d'un composé stable, commercialisable et capable de masquer le goût très amer de l'AS. C'est alors qu'en 1897, le jeune chimiste Félix Hoffmann de la société Bayer réussit à élaborer une méthode simple de production industrielle d'acide acétylsalicylique (AAS). Ce dérivé avait une saveur acidulée, plus agréable que l'AS, et paraissait moins agressif sur la muqueuse gastrique. La société allemande Bayer la commercialisa sous le nom d' « Aspirin® » : « A » pour acétyl, « spir » pour *Spiersäure* (nom donné au premier composé cristallisé qui n'est autre que l'AS), et « in » suffixe classique en pharmacopée.

### **II.2.a Le composé**

L'AAS, ou acide 2-acétyloxybenzoïque, est un composé soluble dans l'eau, à saveur acidulée se présentant sous forme de fins cristaux incolores. Associé à des excipients adaptés, on le retrouve aujourd'hui commercialisé sous des formes multiples et à des concentrations variées : comprimé simple, comprimé effervescent, poudre et injectable.



Compte tenu des nombreuses propriétés pharmacologiques qui lui incombent selon la posologie, l'AAS existe sous des noms commerciaux différents en fonction de l'indication souhaitée. Ainsi, dans la prévention du risque athéromateux, l'AAS est administrée à posologie anti-agrégante (faible dose) sous plusieurs dénominations telles que Kardégic<sup>®</sup> ou Aspepic<sup>®</sup>.

### **II.2.b Propriétés pharmacologiques**

L'aspirine fait partie de la grande famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) dont elle est le chef de file. Elle possède plusieurs propriétés pharmacologiques qui diffèrent selon la posologie administrée :

- A faible dose (inférieure à 325 mg par jour) l'aspirine a uniquement une action antiagrégante par diminution du taux de TXA<sub>2</sub>.
- A une dose supérieure à 500 mg par prise, s'ajoutent les propriétés antalgique et antipyrétique par diminution de la PGE<sub>2</sub>, médiateur hyperalgésiant et thermogène.
- A la dose supérieure à 3 g par jour, l'aspirine a en plus une action anti-inflammatoire par diminution de la production de l'ensemble des PG.
- Enfin, à forte dose (entre 3 et 6 g par jour), s'ajoute une action uricosurique par un phénomène de compétition de la réabsorption tubulaire de l'acide urique.

Dans notre étude, seule l'aspirine à faible dose est étudiée dans le cadre de son activité antiagrégante. Les indications de l'aspirine exploitant les autres propriétés pharmacologiques à des posologies plus élevées ne seront pas détaillées dans le reste de ce travail.

### **II.2.c Pharmacocinétique**

L'absorption de la molécule par voie orale est rapide et complète en 30 minutes. Elle se fait à 65% au niveau de la muqueuse gastrique et à 35% au niveau de la muqueuse duodénale. Elle est sensible à la prise alimentaire (majoration de l'absorption duodénale en cas de prise pendant le repas) et se trouve diminuée par la prise concomitante d'antiacides. L'AAS est rapidement hydrolysé au niveau de l'estomac et du plasma par des estérases en métabolite actif : l'AS.

L'AAS et l'AS diffusent rapidement dans tous les tissus. L'AS, moins hydrosoluble, est en grande partie liée aux protéines plasmatiques.

Une métabolisation en dérivés inactifs se réalise ensuite au niveau du foie par un mécanisme enzymatique saturable : conjugués glucuronides, acide salicylurique et acide gentésique.

L'aspirine est enfin éliminée lentement par voie urinaire sous forme d'AS et métabolites inactifs précédemment cités. La demi-vie plasmatique de l'AAS est de 15 à 20 minutes car rapidement hydrolysé, tandis que celle de l'AS s'étend de 2 à 4 heures.

### **II.2.d Mode d'action**

L'effet principal de l'aspirine est d'inhiber les cyclooxygénases (COX). Son activité est dite « non sélective » car elle est capable de se fixer aux deux isotypes, mais elle possède cependant une affinité plus importante pour la COX-1<sup>20</sup>. Bien que la demi-vie de l'aspirine soit courte, le blocage de ces iso-enzymes est rapide et irréversible.

La molécule s'ancre dans la poche du site actif de la COX au niveau d'un résidu arginine, en position 120 et 106 respectivement pour la COX-1 et la COX-2. S'ensuit une acétylation d'un résidu sérine en position 529 (COX-1) ou 516 (COX-2) qui rend alors l'enzyme totalement inactive, incapable de réceptionner l'acide arachidonique (AA) dans son site catalytique<sup>21</sup> (*cf figure 5*). Le métabolisme de l'AA étant bloqué, la synthèse des prostaglandines n'est plus possible : au sein des plaquettes, le taux de TXA2 se retrouve effondré, et l'agrégabilité plaquettaire altérée.

Seulement 10% du pool plaquettaire étant renouvelé chaque jour, l'administration quotidienne d'une faible dose d'aspirine est suffisante pour maintenir une inhibition quasi complète de la production de TXA2 : on observe une diminution des taux de TXB2 sérique à plus de 98%<sup>22,23</sup>. En effet, les plaquettes étant dépourvues de noyau et donc de matériel génétique, elles sont incapables de régénérer la quantité de COX qu'elles ont perdue. Seuls les thrombocytes nouvellement produits seront à même de reconstituer le pool de COX plaquettaires initial. Ainsi, 8 à 10 jours sont nécessaires pour retrouver un taux de TXA2 sérique normal<sup>24</sup>.

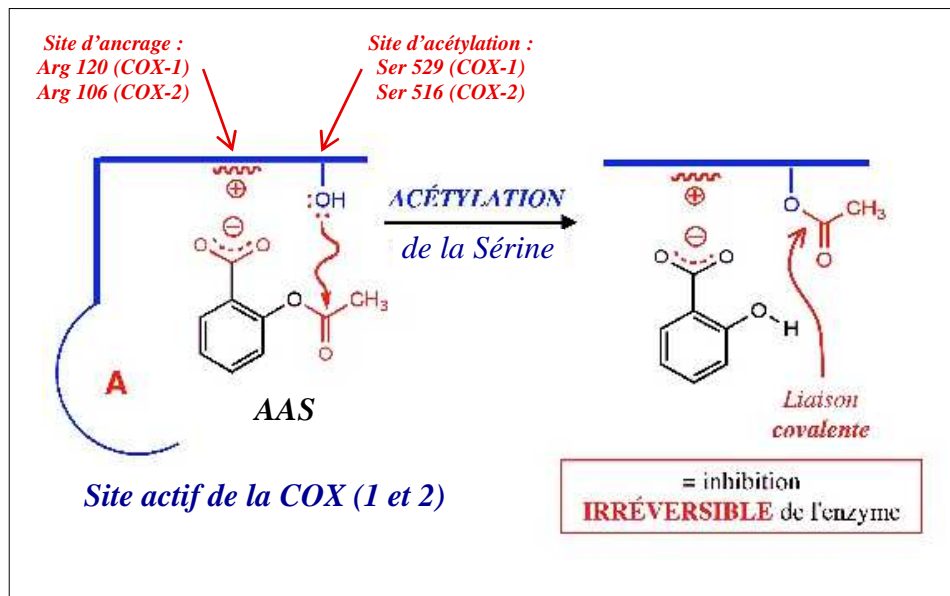


Figure 5 : Mécanisme d'action moléculaire de l'aspirine<sup>25</sup>

A faible dose, l'aspirine est également capable d'inhiber les COX d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales par exemple (diminution de la PGI<sub>2</sub> et vasodilatation). Cependant, cet effet reste plus modeste car, contrairement aux plaquettes, les autres types cellulaires sont capables de synthétiser de novo des COX, et ainsi de contrer rapidement l'inhibition irréversible due à l'aspirine.

## **II.2.e Indications et posologies usuelles dans la prévention du risque thrombotique**

L'aspirine est le médicament antithrombotique le plus prescrit. Elle est administrée à faible dose dans le cadre de la prévention du risque de thrombose artérielle. Son efficacité a été démontrée par de nombreuses études dans la prévention primaire (sujet à risque sans antécédent de thrombose) et secondaire (sujet à risque avec antécédent de thrombose) du risque cardiovasculaire<sup>26,27</sup>. Cependant, tandis que la balance bénéfices (diminution du nombre d'évènements thrombotiques) *versus* risques (survenue d'accidents hémorragiques) est clairement positive dans la prévention secondaire<sup>26</sup>, elle semble plus controversée dans la prévention primaire<sup>27</sup>.

Selon les recommandations de la HAS et de l'ANSM parues en juin 2012, sa prescription dans le cadre de la thrombose artérielle repose sur l'existence d'une indication démontrée ou admise (*cf tableau 1*) :

- en prévention primaire lorsque le risque cardio-vasculaire est élevé,
- en prévention secondaire après la survenue d'une symptomatologie athéromateuse ou d'une maladie exposant au risque de thrombose.

Pour la mise en place du traitement antiagrégant, il convient d'estimer chez le patient athéromateux le taux de facteurs de risque cardiovasculaire (FDRCV) à l'aide de la table SCORE pour l'Europe du Sud qui évalue le risque cardiovasculaire fatal à 10 ans (en %) en fonction du sexe, de l'âge, du tabagisme, de la pression artérielle systolique et de la cholestérolémie totale (cf Annexe 1)<sup>28</sup>.

Notons qu'à ce jour, les recommandations ne prévoient pas la prévention de la maladie thromboembolique veineuse par des inhibiteurs du fonctionnement plaquettaire, mais par un traitement anticoagulant adapté de type antivitamines K par exemple (à l'exception du syndrome des antiphospholipides en cas de récurrences).

**Tableau 1 : Résumé des indications et posologies usuelles des agents antiplaquettaires dans le cadre de la prévention de la thrombose artérielle selon les recommandations de l'ANSM et de la HAS (Juin 2012)<sup>28</sup>**

Prévention primaire	
Patient non diabétique avec FDRCV (risque > 5% selon la table SCORE)	Aspirine 75-160 mg/j
Patient diabétique avec FDRCV élevé et absence de risque hémorragique	Aspirine 75-160 mg/j
SAPL (taux d'anticorps significatif en l'absence d'événements symptomatiques)	Aspirine 75-160 mg/j
Prévention secondaire	
Maladie coronarienne stable	Aspirine 75-160 mg/j
post-infarctus du myocarde	Aspirine 75-160 mg/j + Clopidogrel (75 mg/j) ou autre inhibiteur de la voie de l'ADP
Evénements cérébrovasculaires ischémiques	Aspirine 50 à 325 mg/j <b>ou</b> , Aspirine 25 mg + Dipyridamole 200 mg (LP) x2/j <b>ou</b> , Clopidogrel 75 mg/j
Arthériopathie oblitérante des membres inférieurs	Aspirine 75-325 mg/j
Autres localisations symptomatiques de la maladie athéroscléreuse	Aspirine 75-160 mg/j
Troubles du rythme supraventriculaires (en présence d'une contre-indication formelle aux anticoagulants)	Aspirine 75-325 mg/j
Prothèse valvulaire si risque thromboembolique élevé en plus du traitement AVK	Aspirine 75 mg/j
Vascularites (maladies de Behcet et de Kawasaki)	Aspirine 75-160 mg/j
Thrombocytémie essentielle et maladie de Vaquez	Aspirine 75-160 mg/j

FDRCV : facteur de risque cardiovasculaire ; SAPL : syndrome des antiphospholipides

## **II.3 Le concept de résistance à l'aspirine**

En dépit d'un effet bénéfique considérable de l'aspirine sur la prévention du risque thrombotique dans la population concernée, il a pu être observé chez certains patients la survenue d'accidents thromboemboliques malgré une bonne observance du traitement. C'est dans ce contexte qu'a émergé il y a vingt ans le concept de « résistance » à l'aspirine définissant un défaut d'inhibition des fonctions plaquettaires par celle-ci. Ce concept souffre néanmoins d'une controverse certaine quant à sa réelle implication clinique. La multiplicité des définitions entendues et l'éventail des techniques de détection disponibles nous laisseront entrevoir la difficulté à objectiver ce phénomène.

### **II.3.a Définitions**

Afin de mieux appréhender le principe de résistance à l'aspirine, il convient de définir les différentes entités auxquelles il fait allusion. En effet, depuis l'apparition du concept, plusieurs idées sont venues s'englober sous ce même terme mais ne se réfèrent pourtant pas à la même chose. Au cours de ses nombreux travaux sur le sujet, M. Cattaneo a tenté de redéfinir ces différentes entités<sup>21,29,30</sup>:

#### ***- La résistance clinique à l'aspirine***

Elle s'apparente à un échec thérapeutique de l'aspirine vis-à-vis de son activité antithrombotique : le patient thrombose malgré le traitement. Cependant, l'aspirine visant à contrôler l'un des paramètres d'une maladie multifactorielle comme l'athérosclérose, elle ne peut être à elle seule incriminée dans cet échec. La prise en charge du risque cardiovasculaire dans la maladie athéromateuse s'échelonne sur de nombreux points comme le tabagisme, l'alimentation ou encore la sédentarité. Le terme de « résistance à l'aspirine » est donc ici impropre, et doit être réservé à une entité purement biologique.

#### ***- L'hyperréactivité plaquettaire résiduelle (HPR)***

Cette entité biologique correspond à une hyperréactivité plaquettaire basale insuffisamment inhibée par l'aspirine. Il convient de juger cette réactivité plaquettaire de manière globale comme une combinaison entre les différentes voies d'activation plaquettaire. Ainsi, dans cette définition, malgré une inhibition efficace de la voie de

la COX, les autres stimuli (collagène, ADP, thrombine) sont toujours à même d'activer la plaquette et contrebalancent de manière plus ou moins équilibrée cette inhibition. En théorie, cette HPR pathologique devrait être comparée avant et après instauration du traitement pour être clairement mise en évidence. Cependant, la mesure de cette réactivité plaquettaire basale est impossible dans la majorité des cas où l'instauration du traitement est une urgence. Elle se mesure grâce à des tests globaux de l'agrégation plaquettaire, non-spécifiques de la voie de la COX tels que le PFA-100®.

- ***La résistance biologique « vraie »***

Le terme de résistance biologique à l'aspirine devrait, en toute rigueur, être réservé au cas de figure où l'aspirine ne peut atteindre sa cible pharmacologique, la COX-1, et est donc incapable de l'inhiber. Ce phénomène s'explique soit par un défaut de la concentration en aspirine sur son site d'action, soit par une anomalie qualitative ou quantitative de la COX-1. Elle se mesure à l'aide de tests spécifiques de la voie de la COX-1 tels que l'agrégométrie à l'acide arachidonique sur un plasma riche en plaquettes, le Multiplate® ASPItest, le VerifyNow® Aspirin Test, ou le dosage du TXB2 sérique ou urinaire.

### **II.3.b Causes d'hyperréactivité plaquettaire et de résistance biologique vraie à l'aspirine**

Les données sur ces deux entités étant récentes, il a été formulé des causes potentielles d'HPR ou de résistance à l'aspirine qui ne sont pour certaines qu'à l'état d'hypothèse non vérifiée.

- ***Les causes d'hyperréactivité plaquettaire***

➤ **Polymorphisme génétique de gènes impliqués dans les autres voies que celle du TXA2**

Une étude réalisée sur 1880 sujets avec des antécédents familiaux de coronaropathie précoce a été réalisée par Faraday *et al*<sup>1</sup> afin d'approfondir les causes de non réponse au traitement par aspirine. L'activité plaquettaire est mesurée par des tests spécifiques et non-spécifiques de la COX-1 avant et après l'instauration d'un traitement par aspirine. Elle met ainsi en évidence chez une grande partie des

participants une hyperréactivité plaquettaire malgré une inhibition quasi totale de la production de TXB2 : cela met en exergue des facteurs génétiques, héréditaires qui influenceraient la réponse à l'aspirine malgré une inhibition correcte de la COX-1. De plus, la fonction plaquettaire basale (avant aspirine) de ces sujets semble significativement augmentée, ce qui impliquerait la possibilité de détecter a priori chez ces patients une prédisposition à moins bien répondre à l'aspirine.

➤ Production d'isoprostanes

Les isoprostanes sont dérivés de l'acide arachidonique par une voie radicalaire non enzymatique indépendante des COX, dont la production ne sera donc pas affectée par la prise d'aspirine. Ils sont produits lors de la formation du thrombus en quantité anormalement élevée lors d'un déséquilibre biochimique ou stress oxydant conduisant à un surplus d'espèces oxygénées activées (EOA). Le 15-F<sub>2t</sub>-IsoP, isoprostane le plus abondant, possède une homologie structurale avec les PG et peut ainsi se fixer au récepteur TP du TXA<sub>2</sub> et activer les plaquettes<sup>32</sup>. Ces conditions pathologiques sont fortement liées au tabagisme, l'obésité, l'alcoolisme, l'alimentation, ou encore une activité physique intense.

➤ Hyperproduction de TXB2 par des cellules annexes

L'étude de Faraday *et al*<sup>31</sup> a également mis en évidence une production extraplaquettaire du TXA<sub>2</sub>. Pour de nombreux sujets, la mesure avant et après la prise d'aspirine de la production *ex vivo* du TXB2 après activation plaquettaire par l'AA est totalement inhibée, tandis que le dosage du 11-déhydro TXB2 directement dans les urines montre une inhibition à 75% seulement. Ceci suggère qu'une production de TXB2 indépendante de la voie des COX par des entités autres que les cellules sanguines est envisageable.

➤ Réaction inflammatoire

Les situations inflammatoires intenses créent un environnement favorable à l'activation plaquettaire par la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. Les voies d'activation mises en jeu sont ici multiples et peuvent shunter la voie des COX inhibée par l'aspirine.

## - **Les causes de résistance biologique à l'aspirine**

### ➤ Inobservance thérapeutique

La non observance est la cause la plus fréquente et doit en premier lieu être évoquée devant une résistance biologique à l'aspirine. L'absence d'ingestion du traitement aura en effet pour conséquence d'étiqueter le patient biologiquement résistant car aucune inhibition de la COX ne sera observée sur les tests spécifiques.

### ➤ Diminution de la biodisponibilité de l'aspirine

L'absorption digestive de l'aspirine est sujette à de nombreuses variations interindividuelles. Comme nous l'avons vu précédemment, celle-ci est influencée par la prise alimentaire et le pH gastrique. Nous pouvons ainsi identifier plusieurs causes d'interférences sur l'absorption :

- Une forme galénique non adaptée,
- Un défaut d'absorption par interaction médicamenteuse (avec les antiacides principalement),
- Un défaut d'absorption par augmentation du pH gastrique.

### ➤ Interférence médicamenteuse

Les AINS autres que l'aspirine comme l'ibuprofène ou le ketoprofène sont les principaux responsables des interactions médicamenteuses au niveau du site d'action. Ils sont des inhibiteurs de COX-1 et 2 et sont utilisés pour leurs propriétés antalgiques et antipyrétiques. Une ingestion concomitante d'aspirine et d'un autre AINS diminue l'effet inhibiteur sur la production de TXB2 par inhibition compétitrice sur le site de fixation de la COX<sup>33</sup>.

### ➤ Turnover plaquettaire

Une production intensifiée de plaquettes rétablit un pool de COX-1 opérationnelles par la mise en circulation de jeunes plaquettes n'ayant pas été en contact préalable avec l'aspirine<sup>30</sup>. La concentration en cible (la COX) est donc supérieure à la concentration en aspirine, ce qui diminue son activité.

### ➤ Production de COX de novo

Une étude a montré la capacité des plaquettes mises en contact avec l'aspirine à synthétiser des COX de novo et à retrouver une production de TXA2 consécutive<sup>34</sup>.



Si cette synthèse est accrue, il est possible d'envisager une diminution significative d'activité de l'aspirine entre deux prises à mesure que l'on s'éloigne de l'heure d'ingestion.

➤ Polymorphisme génétique de la COX

Certains haplotypes du gène de la COX-1 (comme le A842G/C50T) ont beaucoup été étudiés et pourraient, selon certaines publications controversées, être impliqués dans une diminution de la réponse biologique à l'aspirine<sup>35</sup>.

### **II.3.c Méthodes de dépistage au laboratoire**

Les tests utilisés au laboratoire sont nombreux et ne sont pas tous spécifiques de la voie de la COX-1. Les tests les plus adaptés à la détection de la résistance à l'aspirine « vraie » sont les méthodes analysant uniquement cette voie, soit par l'ajout du substrat (AA) soit par l'étude du produit (TXA2).

- ***Test non-spécifique de la voie de la COX dit « global » : le PFA-100®***

Le Platelet Function Analyser-100® ou PFA-100® (Siemens Helthcare Diagnostics, Marburg, Germany) est une technique polyvalente généralement utilisée dans l'étude qualitative des fonctions plaquettaires. Ce test mime une brèche vasculaire en reproduisant *in vitro* les conditions hémorhéologiques observées *in vivo*. Le résultat est donné par mesure du temps d'occlusion du capillaire en présence de deux activateurs : l'épinéphrine et le collagène (*cf figure 6*).

Dans le cadre de la prise d'aspirine, le temps d'occlusion mesuré sur la cartouche épinéphrine est allongé (> 300 secondes). Cette technique se retrouve affectée aussi bien en cas de résistance « vraie » à l'aspirine (aspirine n'atteignant pas sa cible) qu'en cas d'HPR (hyperréactivité plaquettaire basale) : le temps d'occlusion de la cartouche épinéphrine est alors anormalement abaissé (< 170 secondes)<sup>36,37</sup>. De par le manque de spécificité de la technique PFA-100®, il n'est pas possible de différencier les deux phénomènes et ainsi d'incriminer soit la réactivité globale des plaquettes (HPR), soit le traitement (résistance à l'aspirine).

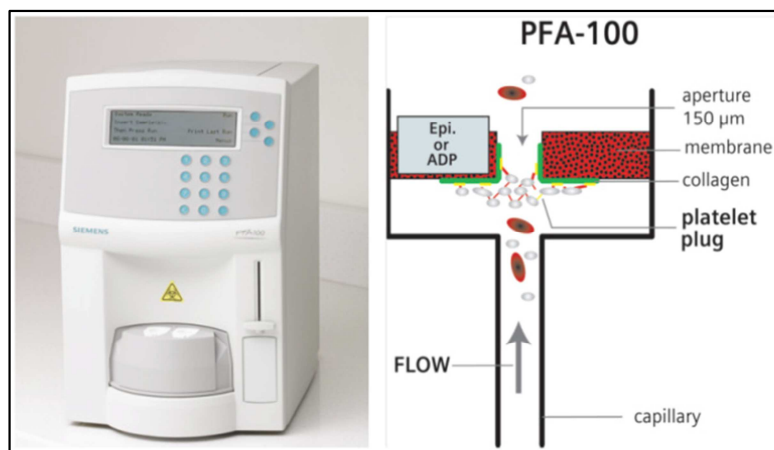


Figure 6 : Schéma du fonctionnement du PFA-100<sup>®36</sup>

### - Tests spécifiques de la voie de la COX

Ces tests sont capables de mettre en évidence la résistance à l'aspirine « vraie » autrement dit quand l'aspirine est incapable d'atteindre sa cible.

#### ➤ Agrégométrie ou *light transmission aggregometry* (LTA)

Cette méthode a longtemps été considérée comme le gold standard des tests fonctionnels plaquettaires sous aspirine de par son utilisation largement répandue. Cette technique turbidimétrique s'effectue sur un plasma riche en plaquettes (PRP) : il est obtenu par une double centrifugation et éventuellement ajusté avec le plasma pauvre en plaquettes (PPP) afin d'obtenir une concentration plaquettaire entre 250 et 450 G/L. Elle mesure une augmentation de la transmission lumineuse provoquée par l'agrégation plaquettaire après l'ajout d'un agoniste, ici l'AA (*cf figure 7*). Les patients sont considérés comme mauvais répondeurs si l'agrégation plaquettaire dépasse 20%<sup>36</sup>. Il n'existe à ce jour aucun consensus sur la concentration optimale d'AA à utiliser afin d'obtenir les résultats les plus reproductibles avec une variabilité interindividuelle minimale. Selon les auteurs, cette concentration pourrait se situer à 1,0 mM<sup>36</sup> ou 1,6 mM<sup>38</sup>.

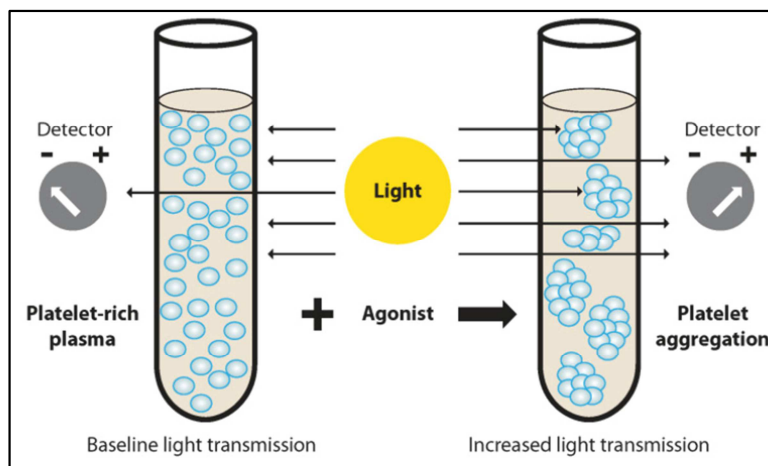


Figure 7 : Schéma du fonctionnement de la technique LTA<sup>36</sup>

➤ Tests fonctionnels sur sang total : VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin test et Multiple electrode aggregometry (Multiplate<sup>®</sup>)

Ces tests présentent un intérêt pratique notable car ils s'effectuent directement sur l'échantillon de sang total recueilli sur tube citraté. Ils permettent de juger du comportement plaquettaire au sein de leur environnement natif.

La technique VerifyNow<sup>®</sup> (Accumetrics, San Diego, CA, USA) utilise une méthode optique par mesure turbidimétrique tandis que le Multiplate<sup>®</sup> Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) effectue sa mesure par impédance.

Ces techniques seront détaillées plus tard dans notre étude (*cf III. Matériel et Méthode*).

➤ Dosage du TXA2 et des métabolites du TXA2 : dosage sérique du TXB2 et dosage urinaire des métabolites du TXB2

Les dosages de ces différents composés représentent les tests les plus spécifiques de la résistance biologique à l'aspirine : ils reflètent directement l'activité enzymatique de la COX-1. Ils se font par technique immunoenzymatique, selon un principe qui varie selon la trousse utilisée.

Le TXA2 ayant une demi-vie très courte, son dosage sérique en devient donc délicat. Le TXB2 sérique représente ainsi une bonne alternative : avec sa demi-vie longue et sa stabilité biochimique, il est un bon reflet de la production de TXA2 et donc de l'activité de la COX-1. Une inhibition correcte des plaquettes par l'aspirine engendre une chute du taux de TXA2 et a fortiori de TXB2 sériques à plus de 98%<sup>39,40</sup>.

Les métabolites urinaires du TXB2 sont intéressants dans le but d'éviter le recueil sanguin mais souffrent d'un inconvénient notable dans l'étude de l'inhibition

plaquettaire par l'aspirine : en effet, environ 30% des métabolites urinaires auraient une origine extraplaquettaire<sup>21</sup>.

### **II.3.d Implication clinique**

La pertinence clinique de la résistance à l'aspirine est largement controversée dans la communauté médicale. Deux méta-analyses réalisées par Snoep *et al*<sup>41</sup> et Krasopoulos *et al*<sup>42</sup> mettent en évidence un sur-risque d'évènements ischémiques associé à une résistance biologique à l'aspirine avec respectivement des odds ratio (OR) à 3,8 % et 3,9 %. Elles ont été critiquées de par l'hétérogénéité des tests utilisés pour déterminer la résistance à l'aspirine dans les différentes études analysées. En effet, comme nous l'avons expliqué auparavant, une grande disparité de prévalence est observée en fonction de la méthode employée. D'autre part, notons que ces études sont réalisées chez des patients ayant une maladie cardiovasculaire tout juste diagnostiquée et dont l'instauration du traitement antithrombotique est récente.

*A contrario*, une récente analyse réalisée sur 771 patients ayant une maladie athérombotique stabilisée ne montre pas de relevance clinique significative à la résistance biologique à l'aspirine<sup>43</sup>.

## **II.4 Les syndromes myéloprolifératifs Ph1 négatifs**

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) constituent l'une des cinq catégories des maladies hématologiques malignes définies par l'organisation mondiale de la santé (OMS) dans la classification 2008 des tumeurs hématopoïétiques<sup>44</sup>. Les SMP « BCR-ABL-1 négatifs » ou « Philadelphie négatifs » (SMP Ph-) représentent un sous-groupe de SMP et sont composés de trois entités pathologiques : la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP). Ces pathologies sont caractérisées par la prolifération clonale d'une cellule souche présentant classiquement une des trois mutations théoriquement mutuellement exclusives des gènes codant la janus kinase 2 (JAK2), la calréticuline (CALR) ou la myeloproliférative leukemia (MPL). Néanmoins, une petite proportion des patients est à ce jour dénuée de mutation.

La TE et la PV sont les deux pathologies les plus fréquentes parmi les SMP Ph-. Elles présentent toutes deux une complication commune grave que constituent les thromboses artérielles et/ou veineuses. Ainsi, la prise en charge de ces pathologies s'articule en tout premier lieu autour de la gestion du risque thrombotique. Un traitement inhibiteur des fonctions plaquettaires associé si besoin à un traitement cytoréducteur contrôlant la prolifération clonale permet de diminuer efficacement le risque de survenue d'un accident thromboembolique.

#### **II.4.a Thrombocytémie essentielle**

La TE est caractérisée par une prolifération clonale mature de la lignée mégacaryocytaire avec pour conséquence une thrombocytose périphérique supérieure à 450 G/L, le plus souvent isolée.

##### ***- Données épidémiologiques***

La TE est une maladie rare, son incidence annuelle est estimée à 1,5/100000 habitants/an<sup>45</sup>. L'âge médian de diagnostic de la maladie est de l'ordre de 50 à 60 ans. La découverte de la pathologie est souvent fortuite (dans deux tiers des cas) alors qu'un événement thrombotique est révélateur dans 20% des cas. Plus rarement, une manifestation hémorragique sans trouble de la coagulation associée à un taux de plaquettes très élevé est à l'origine du diagnostic de TE<sup>45</sup>. Il semble exister par ailleurs une composante héréditaire à la pathologie car une augmentation du risque de TE a été observée chez les parents au premier degré d'un patient atteint d'un SMP (RR = 7,4 ; IC 3,7-14,8)<sup>46</sup>.

##### ***- Aspects clinico-biologiques***

Comme mentionné précédemment, l'affection est asymptomatique dans deux tiers des cas et est révélée à l'occasion d'un examen systématique par un hémogramme anormal. Lorsque la pathologie est symptomatique, elle se caractérise la plupart du temps par des événements thrombotiques de localisation plus volontiers artérielle (myocardique, cérébrale, rétinienne) que veineuse (hépatique, porte, pulmonaire, membres inférieurs). Ces manifestations sont d'ampleur variable : du symptôme lié aux troubles de la microcirculation par formation de microthrombi (érythromélgie, céphalées, paresthésies) aux événements thrombotiques graves (accident vasculaire

cérébral, infarctus du myocarde). Les hémorragies cutanéomuqueuses sont plus rares mais peuvent également faire suspecter la maladie ; elles sont accompagnées d'une thrombocytose majeure, supérieure à 1000 G/L. Enfin, une splénomégalie modérée est rencontrée dans un tiers des cas de TE symptomatique<sup>45,47</sup>.

La découverte de la pathologie est le plus souvent fortuite, au décours d'un bilan de routine. L'hémogramme révèle une thrombocytose supérieure à 450 G/L, un hémocrite normal et éventuellement une leucocytose modérée ne dépassant pas 20 G/L, sans myélémie significative (< 5%) et sans basophilie (< 3%). L'examen du frottis sanguin ne comporte pas d'anomalies spécifiques à la TE, mais une anisocytose plaquettaire, la présence de macrothrombocytes ainsi que des amas de plaquettes sont fréquemment observés<sup>45</sup>.

Le myélogramme n'est pas recommandé pour le diagnostic de la TE car trop affecté par la qualité du prélèvement et du frottis. Il peut cependant rapporter une moelle de richesse normale à augmentée, comportant un nombre important de mégacaryocytes dont quelques uns au moins ont une taille anormalement grande et un noyau hypersegmenté<sup>47</sup>.

La biopsie ostéo-médullaire (BOM) est, quant à elle, plus informative que le myélogramme et fait partie des critères diagnostiques de l'OMS<sup>44</sup>. Une analyse approfondie de la BOM doit être effectuée par un opérateur expérimenté, et montre dans les cas de TE<sup>47</sup> :

- une richesse médullaire normale ou très modérément augmentée,
- une lignée mégacaryocytaire fortement représentée avec des amas lâches de mégacaryocytes,
- des anomalies morphologiques typiques des mégacaryocytes avec une hypersegmentation du noyau donnant un aspect dit « en bois de cerf », un cytoplasme abondant et mature sans modification du rapport nucléocytoplasmique,
- l'absence d'anomalies affectant les autres lignées cellulaires,
- l'absence de modification du stroma médullaire (pas de fibrose collagène et pas de densification réticulinique).
- un pool ferrique médullaire conservé.

La BOM permet d'avancer un certain nombre de critères positifs pour le diagnostic des formes précoces de la maladie. Elle peut ainsi, lors d'une symptomatologie frustrée et d'un bilan biologique peu concluant, apporter un argument de poids en faveur de la TE. D'autre part, elle permet de distinguer les TE des formes préfibrotiques de MFP.

La biologie moléculaire permet d'affirmer le caractère néoplasique de la thrombocytose et oriente le diagnostic. Les anomalies moléculaires suivantes peuvent être observées dans la TE<sup>48</sup> :

- Mutation du gène JAK2 V617F : présente dans 55 % des cas de TE, affecte uniquement l'exon 14 (contrairement à la PV),
- Mutation du gène CALR : présente dans 15 à 24 % des TE,
- Mutation du gène MPL W515K/L : présente dans 4 % des cas de TE,
- Absence de réarrangement BCR-ABL.

Notons que ces trois mutations sont mutuellement exclusives, autrement dit la présence de l'une d'entre elles exclut l'existence des deux autres. Par ailleurs, environ 15 % des TE répondent aux critères de l'OMS sans porter de marqueur moléculaire.

#### - ***Critères diagnostiques***

La TE, du fait de l'absence de marqueurs spécifiques, a longtemps été un diagnostic d'exclusion après élimination de toutes les causes de thrombocytose secondaire selon les critères du Polycythemia Vera Study Group (PVSG) de 1997<sup>47</sup>. Aujourd'hui, la découverte de la mutation V617F du gène JAK2 a bouleversé les critères diagnostiques car elle permet d'emblée de considérer la thrombocytose dans le cadre d'un SMP lorsqu'elle est présente. C'est dans ce contexte d'évolution des moyens diagnostiques que l'OMS a publié en 2008 de nouveaux critères diagnostiques de la TE<sup>44</sup> (*cf tableau 2*). Les quatre critères décrits doivent tous être présents pour affirmer le diagnostic.

**Tableau 2 : Critères diagnostiques de la thrombocythémie essentielle selon l'OMS (2008)<sup>44</sup>**

<b>Critère 1</b>	Taux de plaquettes > 450 G/L.
<b>Critère 2</b>	Prolifération prédominante de la lignée mégacaryocytaire avec une morphologie mature et des mégacaryocytes de taille augmentée. Et absence d'augmentation des lignées érythrocytaire et granuleuse (ni globale, ni des éléments immatures).
<b>Critère 3</b>	Absence de critères OMS en faveur d'une PV, d'une MFP, d'une LMC, d'un SMD ou toutes autres néoplasies myéloïdes.
<b>Critère 4</b>	Mise en évidence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur de clonalité. Si non présent, absence de causes secondaires de thrombocytose.

*PV : polyglobulie de Vaquez ; MFP : myélofibrose primitive ; LMC : leucémie myéloïde chronique ; SMD : syndrome myélodysplasique.*

### - **Complications**

La médiane de survie est peu modifiée en comparaison à la population normale, estimée à environ 20 ans pour les diagnostics réalisés après 60 ans et 33 ans pour les moins de 60 ans<sup>48</sup>. L'espérance de vie est davantage entachée par le risque de thromboses et d'hémorragies que par le risque de transformation leucémique ou fibrotique de la moelle.

- **Evolution leucémique ou fibrotique**

La transformation leucémique est relativement rare car selon l'étude multicentrique de Barbui *et al*<sup>49</sup> réalisée sur 891 TE, seulement 0,7% des patients à 10 ans et 2,1% des patients à 15 ans évoluent en leucémie aiguë.

Selon la même étude, l'évolution fibrotique de la moelle osseuse est substantiellement plus élevée, en particulier à distance du diagnostic, avec un risque de 0,8% à 10 ans et 9,3% à 15 ans. Elle se caractérise par une augmentation de la splénomégalie et l'apparition d'anomalies caractéristiques sur le frottis sanguin telle que l'érythromyélie et les dacryocytes.

- **Thromboses**

Il s'agit de la complication principale de la TE. L'espérance de vie peu modifiée suggère que, bien que potentiellement très invalidants, ces événements thrombotiques sont rarement létaux. La localisation des thromboses est préférentiellement artérielle mais peut également s'opérer sur le terrain veineux. L'étude de Barbui *et al*<sup>49</sup> suggère que le risque de thrombose est de 16,2% à 10 ans et 21,5% à 20 ans.



De nombreux facteurs de risque associés au risque de thrombose ont été identifiés dont les deux principaux sont l'âge supérieur à 60 ans et l'antécédent de thrombose. Ont également été mentionnés les FDRCV (tels que le diabète, l'hypertension artérielle ou le tabagisme actif), la leucocytose et la présence de la mutation JAK2 V617F. La thrombocytose ne semble pas, quant à elle, être un facteur prédictif de thrombose<sup>45</sup> : au contraire, un taux de plaquettes supérieur à 1000 G/L est associé à un risque hémorragique accru.

- Hémorragies

Les complications hémorragiques sont rares. Elles sont souvent corrélées à un taux de plaquettes très élevé (supérieure à 1000 G/L). Ces hémorragies sont souvent superficielles (cutanéomuqueuses) et sont liées à un syndrome de Willebrand de type 2 acquis. Le mécanisme évoqué est une protéolyse anormale des multimères de haut poids moléculaire du vWF, conduisant à un défaut d'activité cofacteur de la ristocétine tout en ayant un taux d'antigène conservé<sup>45</sup>. Sans pour autant que ce test soit considéré comme prédictif de la maladie hémorragique, il doit être pris en compte dans l'instauration d'un traitement antithrombotique si la thrombocytose est extrême<sup>48</sup>.

### - **Traitement**

Cette pathologie n'engageant que très rarement le pronostic vital, le traitement vise ici davantage à contrôler les risques thrombotique et hémorragique. Les traitements cytoréducteurs présentent une toxicité potentielle qui rend leur maniement délicat. Ils ne sont donc pas nécessairement mis en œuvre immédiatement à la découverte de la maladie.

Les principaux agents utilisés pour normaliser le taux de plaquettes sont l'hydroxyurée, l'anagrélide, l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) et plus rarement des agents alkylants tels que le busulfan. En l'absence de contre-indications, l'aspirine est très rapidement intégrée au traitement : elle permet de juguler le risque de thrombose grave, mais également d'améliorer les symptômes liés aux troubles de la microvascularisation.

L'hydroxyurée et l'anagrélide sont des molécules myélosuppressives non spécifiques d'une lignée hématopoïétique. Elles présentent toutes deux une efficacité démontrée

dans le contrôle du taux plaquettaire dans les TE<sup>45</sup>. Néanmoins, selon l'étude randomisée de Harrison *et al*<sup>50</sup> qui compare « hydroxyurée + aspirine » versus « anagrélide + aspirine », l'hydroxyurée semble supplanter l'anagrélide dans la prévention du risque thrombotique artériel et dans l'éviction d'une évolution myélofibrotique. L'anagrélide quant à elle présentait une discrète supériorité dans la prévention du risque de thrombose veineuse. Fort de cela, les recommandations s'orientent aujourd'hui plus volontiers vers l'utilisation de l'hydroxyurée.

L'IFN- $\alpha$  est une cytokine ayant la propriété d'inhiber la prolifération des précurseurs hématopoïétiques. Cette molécule est donc capable de juguler la thrombocytose chez des patients réfractaires au traitement par hydroxyurée. Cependant, la fréquence des injections et les problèmes de tolérance en font une thérapeutique de seconde ligne, même si elle bénéficie ces dernières années d'un regain d'intérêt avec l'apparition de l'IFN- $\alpha$  pégylé.

Les agents alkylants présentent une bonne efficacité dans la réduction de la numération plaquettaire mais ont une toxicité plus importante et un risque leucémogène accru.

Enfin, depuis 2013, une nouvelle thérapie dite « ciblée » est apparue sur le marché. Le ruxolitinib (ou Jakavi<sup>®</sup>) est un anti-JAK2 efficace dans les SMP Philadelphie négatif. Le manque de recul n'en fait pas aujourd'hui la molécule de première intention, mais selon le rapport de la HAS du 9 janvier 2013, le service médical rendu semble être intéressant<sup>51</sup>. Il possède à ce jour l'AMM pour la MFP et les myélofibroses secondaires, ainsi que pour la PV depuis mars 2015.

#### **II.4.b Maladie de Vaquez**

La PV est caractérisée par une prolifération clonale mature de la lignée érythroïde avec pour conséquence une production excessive de globules rouges. Tout en restant au premier plan, cette polyglobulie est souvent associée à une hyperleucocytose et une thrombocytose.

### - **Données épidémiologiques**

La PV est également une maladie rare, son incidence annuelle est de l'ordre de 1/100000 habitants/an. L'âge médian de diagnostic se situe aux alentours de 60 ans et il existe une petite prévalence masculine. La découverte de la pathologie est le plus souvent fortuite au décours d'un hémogramme de routine. Parfois, des signes fonctionnels d'hyperviscosité sanguine peuvent conduire au diagnostic. Comme pour la TE, il semble également exister une composante héréditaire à la pathologie avec cette fois-ci un risque relatif évalué à 5,7 (IC 3,5-9,1)<sup>46</sup>.

### - **Aspects clinico-biologiques**

Bien que la pathologie soit souvent silencieuse au moment du diagnostic, des signes fonctionnels liés à l'excès d'hématies peuvent alerter le clinicien. L'érythrose est le symptôme le plus fréquent, elle prédomine sur les parties découvertes du corps (le visage et les mains principalement). Le prurit aquagénique est un autre signe régulièrement rencontré : il survient au contact d'une eau chaude et il diffuse sur tout le corps. Enfin de nombreux symptômes liés à l'hyperviscosité sanguine et la formation de microthrombi peuvent survenir : les érythromélgies définissant des douleurs intenses au niveau des doigts et des orteils qui apparaissent alors rouges et chauds, des céphalées, des vertiges ou encore des bourdonnements d'oreille. L'examen clinique révélera dans 60% des cas environ une splénomégalie modérée<sup>52</sup>.

L'hémogramme permet souvent de révéler la maladie. Il rapporte une augmentation du taux de globules rouges, de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine au dessus des valeurs normales (*cf tableau 3*). Ces anomalies définissant la polyglobulie sont régulièrement accompagnées d'une élévation du taux de polynucléaires (> 10 G/L) et du taux de plaquettes (> 450 G/L). Par ailleurs, il n'existe pas d'anomalies caractéristiques sur les frottis sanguins<sup>52</sup>.

Bien que n'étant pas réalisée en pratique courante, la mesure isotopique de la masse globulaire totale au chrome 51 permet d'apprécier l'hypervolémie globulaire de manière plus précise que l'hématocrite, et de s'affranchir d'une fausse polyglobulie liée à une réduction du volume plasmatique. Une valeur supérieure à 125% de la normale fera suspecter une PV<sup>52</sup>.

Le dosage de l'EPO sérique est intéressant afin de déterminer le caractère primaire ou secondaire de la polyglobulie : il est typiquement très abaissé dans la PV<sup>52</sup>.

Le myélogramme et la biopsie ostéo-médullaire n'apportent pas d'arguments francs en faveur d'une PV mais il est possible d'y observer une hypercellularité prédominant sur les lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire<sup>52</sup>.

La biologie moléculaire représente la clé de voute du diagnostic de la maladie. La mutation du gène JAK2 (9p24) est présente dans 99% des PV, affectant l'exon 14 (V617F) dans 96% des cas et l'exon 12 dans 3% des cas. Les mutations CALR et MPL ne sont qu'exceptionnellement retrouvées<sup>48</sup>.

Plus rarement réalisée, et en cas de présentations clinico-biologiques atypiques, la culture des progéniteurs érythroïdes en l'absence d'EPO peut s'avérer utile. Elle montre une croissance spontanée des colonies érythroïdes<sup>52</sup>.

#### - **Critères diagnostiques**

Comme pour la TE, la découverte de la mutation JAK2 en 2005 a engendré une évolution des critères diagnostiques avec la publication en 2008 des critères de l'OMS<sup>44</sup> (cf tableau 3).

Pour affirmer le diagnostic, il est nécessaire de rassembler :

- les deux critères majeurs associés à un critère mineur,
- ou l'un des deux critères majeurs associé à deux critères mineurs.

**Tableau 3 : Critères diagnostiques de la maladie de Vaquez selon l'OMS (2008)<sup>44</sup>**

<b>Critères majeurs (A)</b>	<b>A1</b>	VGT $\geq$ 125% de la normale ou Hb > 18,5 g/dL chez l'homme, > 16,5 g/dL chez la femme ou Hte > 54% chez l'homme, > 47% chez la femme.
	<b>A2</b>	Présence de la mutation JAK2.
<b>Critères mineurs (B)</b>	<b>B1</b>	Prolifération des trois lignées hématopoïétiques sur la BOM.
	<b>B2</b>	EPO sérique basse.
	<b>B3</b>	Colonies érythroïdes endogènes spontanées à la culture.

*VGT : volume globulaire total ; Hb : hémoglobine ; Hte : hématocrite ; EPO : érythropoïétine ; BOM : biopsie ostéomédullaire.*

## - **Complications**

Contrairement à la TE, la médiane de survie chez les patients atteints de PV est légèrement abaissée par rapport à la population normale et elle est d'autant plus entachée que le patient est jeune. Selon l'étude récente de Tefferi *et al*<sup>53</sup> réalisée sur une cohorte de 1545 patients, elle a été évaluée à 18,9 ans.

Les principales complications rencontrées sont les événements thrombotiques et la transformation hématologique de la pathologie en myélofibrose ou en leucémie aiguë.

- Evolution leucémique ou fibrotique

Selon les travaux de Tefferi *et al*<sup>53</sup>, l'évolution en leucémie aiguë a une incidence plus élevée que la TE (estimée à 3% au cours de l'étude) et survient à une médiane de 10,8 ans après le diagnostic. L'analyse des incidences cumulées montre que 2,3% des patients à 10 ans et 5,5% des patients à 15 ans acutisent leur PV. La leucémisation peut être brutale, ou faire suite à des cytopénies progressives.

Quant à l'évolution fibrotique de la moelle, son incidence a été évaluée à 9% au cours de la même étude avec une prévalence masculine (11% chez les hommes contre 7% chez les femmes).

- Thromboses

Selon la même étude, les événements thrombotiques constituent la complication la plus fréquente avec une incidence évaluée à 21%. Comme pour la TE, la localisation est le plus souvent artérielle, même si les thromboses veineuses représentent malgré tout 43% des événements thrombotiques rencontrés<sup>53</sup>. L'hyperviscosité sanguine est en grande partie responsable de ces événements en plus de la thrombocytose. Du fait du ralentissement du flux circulatoire, la circulation des plaquettes est entravée, ce qui est probablement à l'origine d'une activation accrue des plaquettes<sup>52</sup>.

- Hémorragies

Les complications hémorragiques sont également très rares dans la PV, mais peuvent survenir chez certains patients avec une thrombocytose extrême (supérieure à 1000 G/L)<sup>48</sup>, avec un mécanisme d'action similaire à celui décrit pour la TE. Il est donc primordial, chez ces patients, de vérifier que l'activité

cofacteur de la ristocétine du vWF est supérieure à 30% avant l'instauration d'un traitement par aspirine, sous peine de complications hémorragiques graves.

#### - **Traitement**

Le contrôle de l'expansion globulaire et l'inhibition des fonctions plaquettaires sont les deux éléments importants de la stratégie thérapeutique. La réduction de la masse globulaire peut se faire par la répétition de saignées régulières et/ou par l'administration d'un traitement myélosuppresseur. L'aspirine à faible dose est, quant à elle, la thérapeutique antiagrégante de choix pour contrôler l'activation plaquettaire : elle permet une diminution du risque de thrombose grave et une réduction des symptômes liés à l'hyperviscosité sanguine<sup>48</sup>.

Les saignées sont le moyen le plus efficace et le plus rapide pour abaisser rapidement l'hématocrite et réduire l'hyperviscosité sanguine. Des déplétions de 300 à 400 mL permettent d'atteindre un hématocrite autour des valeurs attendues. Le maintien des saignées régulières, préférentiellement chez le sujet jeune, conduit à une carence martiale permettant d'inhiber la production globulaire au niveau central. Elles sont effectuées toutes les 48 heures en début de traitement afin d'atteindre rapidement un hématocrite dans les valeurs cibles, puis de manière plus ou moins régulière selon les besoins du patient<sup>52</sup>. Elles ont l'avantage d'être dénuées de toxicité, mais peuvent conduire plus facilement, selon certains auteurs, à une myélofibrose.

Tout comme pour la TE, les traitements myélosuppresseurs utilisés dans la PV sont l'hydroxyurée en première intention, l'anagrélide, les agents alkylants et l'IFN- $\alpha$  en cas d'intolérance ou d'inefficacité du traitement.

Par ailleurs, la thérapie anti-JAK2 (ruxolitinib ou Jakavi<sup>®</sup>) a depuis mars 2015 obtenu l'AMM pour le traitement des PV réfractaires ou intolérantes à l'hydroxyurée.

#### **II.4.c Mécanismes physiopathologiques des thromboses dans la TE et la PV**

La pathogénicité du phénomène thrombotique est très complexe pour les SMP Ph-. Elle relève d'éléments cliniques (âge > 60 ans, antécédents de thrombose, obésité, hypertension, hyperlipémie) et d'éléments biologiques (leucocytose, thrombocytose, érythrocytose)<sup>54</sup>. Les cellules sanguines sont non seulement en quantité anormale de

par la prolifération clonale, mais elles présentent également des anomalies qualitatives qui en font des acteurs pro-coagulants.

Chez ces patients, les plaquettes semblent présenter un état d'activation anormalement élevé : des marqueurs biologiques d'activité plaquettaire tels que la P-selectine, le facteur tissulaire ou les métabolites du thromboxane A<sub>2</sub> sont significativement plus élevés dans cette population de patients. Les plaquettes sont ainsi plus sensibles à leur environnement et donc susceptibles de s'activer plus facilement que dans une population normale. De plus, la production accrue de plaquettes entraîne une augmentation du taux de plaquettes immatures dans le sang qui sont plus réactives que les plaquettes anciennes ce qui accroît le risque de thrombose<sup>54</sup>.

L'augmentation du taux d'hématies et donc de l'hématocrite a pour conséquence une augmentation de la viscosité sanguine. Ceci est responsable d'une élévation des forces de cisaillement sur le terrain artériel et d'une augmentation des interactions entre les plaquettes, à l'origine d'une réactivité accrue des plaquettes. Par ailleurs, il a été rapporté des modifications biochimiques au niveau de la membrane des érythrocytes qui les rendent plus à même de former des agrégats et perturber la fluidité sanguine<sup>54,55</sup>.

Les leucocytes, principalement représentés par les polynucléaires neutrophiles, jouent également un rôle important dans le phénomène de thrombose par relargage d'enzymes protéolytiques ou d'espèces réactives de l'oxygène qui entraînent des dommages sur les plaquettes et sur les cellules endothéliales. La présence d'agrégats de plaquettes et leucocytes dans la circulation sanguine est le témoin des importantes interactions qu'il existe entre ces acteurs<sup>54,56</sup>.

Enfin, l'endothélium vasculaire subit une agression par l'élévation des forces de cisaillement et par le relargage d'espèces réactives. Il en devient donc un terrain sensible, à risque de devenir thrombogène même en l'absence de brèche vasculaire<sup>54</sup>.

Plus récemment, plusieurs arguments suggèrent l'implication des microparticules plasmatiques dans les phénomènes procoagulants du plasma des patients atteints de SMP Ph-<sup>54,57,58</sup>.

## II.4.d Gestion du risque thrombotique dans la TE et la PV

L'instauration d'une thérapeutique adaptée dans la TE et la PV découle d'une évaluation du risque thrombotique et hémorragique (*cf tableau 4*) et d'une adaptation éventuelle d'un traitement mal toléré. L'aspirine à faible dose constitue ici la thérapeutique antiagrégante de choix afin de contrôler le risque de thrombose.

A. Tefferi et T. Barbui ont proposé une stratégie thérapeutique pour ces deux pathologies désormais adoptée dans les conférences de consensus<sup>48</sup>. Une stratification du risque thrombotique permet ainsi d'orienter le choix d'un traitement optimal : elle catégorise les patients en fonction de leur âge (inférieur ou supérieur à 60 ans), l'existence ou non d'antécédents de thrombose, et l'ampleur de la thrombocytose (inférieure ou supérieure à 1000 G/L). Les patients bénéficient ainsi d'un traitement adapté au risque thrombotique qu'ils présentent.

Notons ici que l'aspirine à faible dose est au cœur du traitement de la TE et de la PV, excepté en cas de Maladie de Willebrand acquise où elle induirait une élévation du risque hémorragique.

**Tableau 4 : Stratification du risque et adaptation thérapeutique dans la thrombocytémie essentielle et la Polyglobulie de Vaquez selon Tefferi A. et Barbui T.<sup>48</sup>**

Catégories de risque	THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE	POLYGLOBULIE DE VAQUEZ
<b>Bas risque</b> : âge < 60 ans <u>et</u> absence d'antécédents de thrombose		
Sans thrombocytose extrême (taux plaquettes < 1000 G/L)	Aspirine à faible dose <u>ou</u> Surveillance seule si absence de JAK2V617F et de FDRCV	Aspirine à faible dose + Saignées
Avec thrombocytose extrême (taux plaquettes > 1000 G/L)	Aspirine à faible dose si vWF activité cofacteur de la ristocétine > 30% <u>ou</u> Surveillance seule si absence de JAK2V617F et de FDRCV	Aspirine à faible dose si vWF activité cofacteur de la ristocétine > 30% + Saignées
<b>Haut risque</b> : âge ≥ 60 ans <u>et/ou</u> présence d'antécédents thrombotiques		
En première intention	Aspirine à faible dose + Hydroxyurée	Aspirine à faible dose + Saignées + Hydroxyurée
Réfractaire ou intolérant à l'Hydroxyurée	Aspirine à faible dose + IFN α (âge < 65 ans) ou + Busulfan (âge ≥ 65 ans)	Aspirine à faible dose + Saignées + IFN α (âge < 65 ans) ou + Busulfan (âge ≥ 65 ans)

FDRCV : facteurs de risques cardiovasculaires ; vWF : facteur von Willebrand ; IFN α : interféron α.



### *III. OBJECTIFS DU TRAVAIL*

---

Le laboratoire du GHICL est équipé de l'automate Multiplate® Analyzer depuis novembre 2011. Il y est utilisé dans la qualification de la réponse aux antiagrégants plaquettaires (aspirine et clopidogrel) ainsi que dans le cadre de la thrombopénie induite par l'héparine.

Le point de départ de notre étude s'est basé sur un constat préalablement réalisé au sein du laboratoire : un recueil des données de résistance à l'aspirine déterminée par le Multiplate® de 148 patients, réalisé entre décembre 2011 et juin 2014, avait montré une nette discordance entre deux populations de patients :

- ceux ayant de l'aspirine dans le cadre d'un SMP Ph- (n = 80), avec un taux de résistance à l'aspirine à 48,8%,
- et ceux ayant de l'aspirine pour une cause vasculaire autre (n = 68), avec un taux de résistance à l'aspirine à 11,7%.

Les patients SMP Ph- souffrent en effet d'un risque thrombotique accru. Malgré la mise en œuvre d'un traitement adapté par aspirine éventuellement associé à une chimiothérapie myélofreinatrice, il n'est pas rare d'observer chez certains de ces patients des accidents thromboemboliques. La résistance biologique à l'aspirine pourrait peut être expliquer ce phénomène.

Cependant, avant de conclure à une réelle prévalence de la résistance à l'aspirine chez cette population de patients, nous avons émis l'hypothèse d'une éventuelle limite de notre technique. Les conditions pathologiques que ces patients réunissent (thrombocytose, macrocytose, hyperviscosité sanguine) pourraient en effet être à l'origine d'une surestimation par le Multiplate® ASPItest de la résistance biologique à l'aspirine. Pour y répondre, nous nous sommes intéressés à une population de sujet atteints d'un SMP Ph- de type TE et PV au diagnostic ou en suivi. Nous avons abordé la question sous deux angles :

Dans un premier temps, nous chercherons à déterminer quelle technique est la plus adaptée dans la détection de la résistance à l'aspirine pour notre population d'étude. Pour cela, nous vérifierons si le Multiplate® donne des résultats comparables aux autres méthodes considérées comme spécifiques dans la détection de la vraie

résistance biologique à l'aspirine. Une comparaison des résultats sera ainsi réalisée avec ceux d'un autre test fonctionnel plaquettaire sur sang total : le VerifyNow®.

Le VerifyNow® Aspirin Test est spécifique de la voie de la COX-1 de par l'utilisation du même agoniste que le Multiplate® ASPItest : l'acide arachidonique (AA). Cette technique constitue une méthode de comparaison intéressante car, au même titre que le Multiplate®, il s'agit d'un test d'agrégation plaquettaire sur sang total mais avec un principe de mesure différent.

L'analyse biochimique d'un métabolite stable de la voie de la COX-1 (TXB2) nous permettra de trancher sur d'éventuels résultats discordants entre les deux méthodes. En effet, le dosage du TXB2 sérique représente à ce jour le test le plus spécifique de la résistance à l'aspirine. Des plaquettes suffisamment inhibées par l'aspirine engendrent un effondrement du taux sérique de TXB2 à plus de 98%<sup>39,40</sup>. Les métabolites urinaires présentant l'inconvénient d'être moins spécifique (30% sont d'origine extraplaquettaire)<sup>21</sup>, le recueil des urines en vue de ce dosage a été écarté. Après avoir déterminé le seuil de TXB2 décisionnel pour l'interprétation de la résistance à l'aspirine, nous considérerons donc cette analyse comme la référence au cours de notre étude. Par ailleurs, la production de TXB2 sérique étant quasi exclusivement plaquettaire, nous avons élaboré un ratio du taux de TXB2 sérique rapporté au taux plaquettaire afin de s'affranchir de la variabilité des thrombocytoses entre chaque sujet. Nous déterminerons également pour ce ratio un seuil décisionnel permettant de qualifier la réponse à l'aspirine.

Après avoir estimé le lien entre les résultats du Multiplate® et ceux du VerifyNow®, chaque méthode sera comparée à notre critère de jugement principal pour notre travail : le taux de TXB2 sérique et le ratio TXB2/plaquettes. Les études comparatives entre ces quatre paramètres se feront par une corrélation numérique dans un premier temps, puis par une analyse des concordances d'interprétation entre les techniques.

Dans un second temps, nous étudierons l'influence des paramètres de l'hémogramme sur les résultats du Multiplate® et ceux du VerifyNow®. Le taux de plaquettes, l'hématocrite, le VGM, le taux de globules rouges et le taux de leucocytes ont ainsi été analysés vis à vis des résultats des deux méthodes. L'étude statistique s'organisera de deux manières : une corrélation numérique, et une comparaison pour chaque paramètre des groupes classés sensibles et résistants à l'aspirine par les deux techniques. A travers l'analyse de ces paramètres, nous chercherons ainsi à savoir si la thrombocytose, la viscosité sanguine, la macrocytose ou encore la

leucocytose peuvent avoir un impact sur les résultats rendus par chacune des deux techniques.

Enfin, pour pousser les investigations de notre travail, nous chercherons d'éventuelles associations entre des paramètres intrinsèques à nos sujets et la résistance à l'aspirine évaluée par nos deux techniques. Ainsi, la posologie d'aspirine, le risque thrombotique du patient et le statut mutationnel seront étudiés vis-à-vis de la réponse à l'aspirine.

# IV. MATERIEL ET METHODE

---

## IV.1 Population étudiée

Notre étude s'est intéressée à des patients atteints d'un SMP Ph- de type TE et PV. Ces deux pathologies présentent un risque thrombotique élevé, impliquant un traitement par aspirine à faible dose.

L'étude a été réalisée entre septembre 2014 et juin 2015. Les sujets de notre population d'étude proviennent de la patientèle du Pr Demory, hématologue clinicien et biologiste spécialisé dans les SMP.

La population est composée de 31 TE et 9 PV, d'âge moyen 67,2 ans et représentée par 14 hommes et 25 femmes. Les sujets inclus dans notre étude avaient tous un traitement par aspirine en monothérapie et à faible dose : de 75 mg à 160 mg par jour. Les patients présentant une bithérapie aspirine et clopidogrel ont été exclus de l'étude. Certains des sujets avaient en plus un traitement cytoréducteur par hydroxyurée majoritairement mais aussi anagrélide, pipobroman ou IFN- $\alpha$  (*cf Annexe 2*). L'analyse a été effectuée sur des patients SMP Ph- tout venant : certains étaient en suivi depuis plusieurs années, tandis que d'autres étaient au stade du diagnostic.

Une population témoin a également été constituée afin de vérifier le cut-off du dosage du TXB2 pour la détermination de la résistance à l'aspirine. Le recueil des échantillons s'est fait sur la base du volontariat au sein du laboratoire du GHICL. Cette population est composée de 19 sujets d'âge moyen 33,3 ans et représentée par 9 hommes et 10 femmes. Le critère majeur d'exclusion était la prise d'aspirine ou d'autres AINS dans les 10 jours précédant la prise de sang. Par mesure de précaution, tout traitement antiagrégant et/ou anticoagulant empêchait également l'inclusion du sujet dans notre population témoin.

## **IV.2 Recueil des échantillons**

### **IV.2.a Population d'étude**

Les tubes ont été prélevés en consultation d'hématologie sur le site de l'hôpital Saint-Vincent, puis acheminé au laboratoire de l'hôpital Saint-Philibert en moins de deux heures. Quatre tubes ont été prélevés pour chaque patient :

- Un tube EDTA-K2 type Vacuette<sup>®</sup> (Greiner Bio-One, France) pour la réalisation d'une numération formule sanguine,
- Un tube sec de type Vacutainer<sup>®</sup> SST II Advance avec séparateur acrylique (BD Diagnostics, USA) pour le dosage du TXB2 sérique : une centrifugation à 2000 G (20°C) pendant 10 min a été réalisée et le sérum a été congelé à moins 80°C dans des cryotubes jusqu'au dosage.
- Deux tubes citrate de sodium 3.2% 2mL de type Vacuette<sup>®</sup> (Greiner Bio-One, France) pour la réalisation des tests fonctionnels plaquettaires Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup>.

### **IV.2.b Population témoin**

Les tubes ont été prélevés au sein du laboratoire de l'hôpital Saint-Philibert. Deux tubes ont été prélevés pour chaque témoin :

- Un tube EDTA-K2 type Vacuette<sup>®</sup> (Greiner Bio-One, France) pour la réalisation d'une numération formule sanguine,
- Un tube sec de type Vacutainer<sup>®</sup> SST II Advance avec séparateur acrylique (BD Diagnostics, USA) pour le dosage du TXB2 sérique : après un délai d'une heure, une centrifugation à 2000 G (20°C) pendant 10 min a été réalisée et le sérum a été congelé à moins 80°C dans des cryotubes jusqu'au dosage.

## **IV.3 Hémogramme**

La numération formule sanguine a été réalisée sur un automate Sysmex XN 3000<sup>®</sup> composé de deux modules XN 10<sup>®</sup> et XN 20<sup>®</sup>, et d'une étaleur colorateur SP 10 (*cf figure 8*).

Les modules sont composés de deux canaux d'étude pour la numération plaquettaire et l'ensemble des paramètres érythrocytaires :

- Le canal spectrophotométrie qui effectue une lyse des leucocytes et des globules rouges par le Sulfolyser<sup>®</sup> et dose le taux d'hémoglobine par méthode spectrophotométrique,
- Le canal impédance qui effectue, après lyse des leucocytes, la mesure du taux de plaquettes et de globules rouges par la variation de courant électrique entre deux électrodes,

Et quatre canaux d'étude des cellules nucléées et des plaquettes basés sur le principe de cytométrie en flux :

- Le canal *White cell Nucleated Channel* (WNR), qui permet un décompte des leucocytes, des polynucléaires basophiles et des érythroblastes,
- Le canal *White cell Differential channel* (WDF), qui permet une séparation des polynucléaires neutrophiles, des polynucléaires éosinophiles, des lymphocytes et des monocytes,
- Le canal *White cell Precursor Channel* (WPC), actuellement au stade de recherche, il est utilisé en cas de détection d'anomalie qualitative des leucocytes où il aide à discriminer les blastes des lymphocytes atypiques et à éliminer certains faux positifs,
- Le canal *Fluorescent Platelet channel* (PLT-F), qui mesure un signal fluorescent après ajout d'un marqueur spécifique de l'ARN plaquettaire ; il est déclenché en cas d'anomalie qualitative ou quantitative de l'histogramme des plaquettes.

La numération plaquettaire peut ainsi être réalisée de deux manières : la mesure par impédance qui présente l'inconvénient d'être moins bonne sur les valeurs basses (thrombopénies), et le canal PLT-F qui utilise un volume sanguin plus important et permet donc un comptage plus précis.



Figure 8 : Automate Sysmex XN 3000<sup>®</sup> ; de gauche à droite : l'étaleur colorateur SP-10 et les deux modules XN 10<sup>®</sup> et XN 20<sup>®</sup>

## **IV.4 Techniques de détection de la résistance à l'aspirine utilisées dans notre étude**

### **IV.4.a La technique Multiplate<sup>®</sup> Aspirin**

#### **- Généralités**

L'appareil de mesure Multiplate<sup>®</sup> Analyzer est fourni par la société Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) (cf figure 9). Son nom dérive de « multiple platelet function analyzer ». Ce système compact entièrement informatisé utilise un principe de mesure par impédance : grâce à deux paires d'électrodes immergées dans l'échantillon de sang total, il mesure une variation du signal électrique lors de la formation des agrégats plaquettaires sur les électrodes. L'appareil effectue deux mesures indépendantes sur chaque paire d'électrode : il peut ainsi assurer un contrôle interne de sa mesure en vérifiant la répétabilité de ses résultats.

Cet appareil est utilisable directement au bloc opératoire en système « point-of-care » en particulier dans le cadre des urgences chirurgicales cardiovasculaires. Pour une manipulation aisée par l'utilisateur, le système dispose d'une pipette électronique directement reliée au système informatique. Chaque étape est donc entièrement gérée et contrôlée par le logiciel, en particulier le déclenchement de l'analyse directement après à l'ajout de l'agoniste.



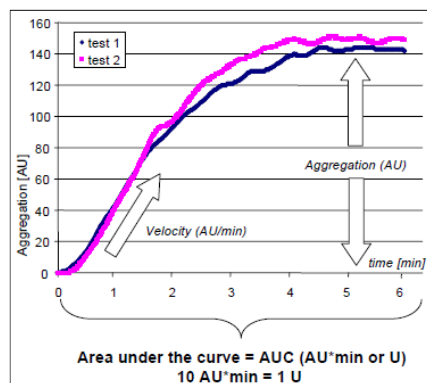
Figure 9 : Système Multiplate<sup>®</sup> Analyzer (à gauche) et description d'une cellule de mesure (à droite)<sup>59</sup>

Le Multiplate<sup>®</sup> ASPItest mesure l'agrégation plaquettaire après l'ajout d'AA à 0,5 mM<sup>59</sup>. Celui-ci provoque alors la libération de TXA<sub>2</sub>, puissant activateur plaquettaire, qui induit l'agrégation des plaquettes autour des électrodes. La mesure s'effectue dans des cupules en plastique où sont situées les deux paires d'électrodes (cf figure 9). Les cellules de mesure sont placées dans un bloc thermostaté à 37°C et reliées au système informatique par des canaux électriques. Elles sont munies d'un barreau aimanté permettant l'homogénéisation du milieu réactionnel. Cinq canaux de mesure sont disponibles et indépendants les uns des autres.

Afin de réduire la déplétion calcique induite par le citrate, il peut être nécessaire de recalifier le milieu à l'aide de NaCl-CaCl<sub>2</sub>. Cette opération est indispensable au bon déroulement de la réaction pour la majorité des tests fonctionnels sur le Multiplate<sup>®</sup> Analyzer (TRAPtest et ADPtest notamment), mais pas pour l'ASPItest qui souffre de phénomènes de désagrégation avec la recalification : le diluant utilisé est donc du NaCl à 0,9%<sup>59</sup>.

Après un délai d'incubation du sang total et du diluant à 37°C (NaCl ou NaCl-CaCl<sub>2</sub>), la mesure du signal électrique est effectuée pendant 6 minutes juste après l'ajout de l'agoniste (AA). Le signal électrique est converti en une unité arbitraire appelée aggregation unit (AU). À la fin de l'analyse trois informations sont fournies par le logiciel : la vitesse (en AU/min), le taux d'agrégation maximal (AU) et l'aire sous la courbe AUC (AU\*min) (cf figure 10).



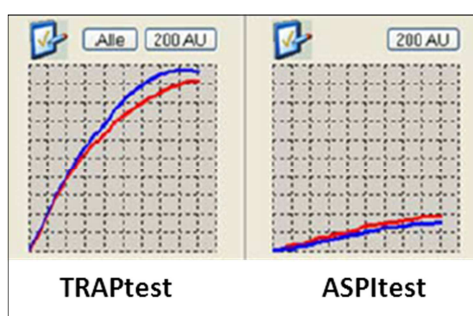


**Figure 10 : Courbes d'agrégation du Multiplate® : deux mesures sont réalisées pour chaque test (en rose et bleu sur le graphique)<sup>59</sup>**

La donnée la plus intéressante est l'AUC car elle est la plus complète : elle est la combinaison de la vitesse et du taux d'agrégation maximal.

En présence de plaquettes inhibées par l'aspirine, l'AA n'aura aucun effet sur l'agrégation plaquettaire et la résistance entre les électrodes restera très faible (cf figure 11). En revanche, si les plaquettes ne sont pas ou insuffisamment inhibées par l'aspirine, l'ajout de l'agoniste provoquera l'agrégation des plaquettes et donc une augmentation exponentielle de la résistance entre les deux électrodes.

Afin de vérifier la capacité des plaquettes à agréger entre elles, nous avons effectué un contrôle positif dans une autre cellule de mesure. Le TRAPtest utilise un autre agoniste (TRAP-6) qui mime l'action de la thrombine en se fixant aux récepteurs PAR. Ceux-ci ne sont en effet pas affectés par l'action de l'aspirine et leur activation engendre donc une agrégation plaquettaire normale (cf figure 11). Si les conditions d'analyses n'étaient pas adéquates ou les plaquettes anormales, le TRAPtest montrerait une non ou une mauvaise agrégation.



**Figure 11 : Résultat type d'un sujet correctement inhibé par l'aspirine : à gauche, agrégation normale avec le TRAPtest ; à droite l'absence d'agrégation avec l'ASPItest<sup>59</sup>**

### - **Préparation de l'analyse**

L'allumage de l'automate s'effectue simplement au moyen d'un commutateur situé à l'arrière de l'appareil. Le système nécessite un temps de préchauffage du bloc thermostaté pendant 30 minutes. À chaque allumage de l'automate, il est nécessaire de réaliser un test électronique pour vérifier l'intégrité des 5 canaux de mesures : celui-ci est entièrement géré par le logiciel de l'appareil.

Il est ensuite nécessaire de mettre à incuber les diluants (NaCl et NaCl-CaCl<sub>2</sub>) dans une des cuves de préchauffages afin qu'il atteigne la température de 37°C.

### - **Mesure**

L'analyse est gérée par l'automate : chaque étape de pipetage est décrite sur le logiciel et contrôlée par le système. Un bouton unique sur la pipette permet la réalisation de l'ensemble des tâches : déclenchement de l'aspiration et du relargage de chaque constituant de la réaction dans la cupule de mesure. Les étapes de l'analyse se déroulent comme suit<sup>59</sup> :

- 1) Le nom et le prénom du patient sont préalablement enregistrés dans le logiciel au niveau du canal concerné et le type de test est choisi pour chaque canal (ASPItest, TRAPtest).
- 2) Disposer deux cupules de réaction dans deux canaux en vérifiant bien la présence de la barre aimantée indispensable au bon déroulement de la réaction : l'une correspond à l'ASPItest, l'autre correspond au TRAPtest.
- 3) Brancher les canaux sur les cupules de réaction.
- 4) Cliquer sur démarrer l'auto-pipette : les étapes défilent alors les unes après les autres sur le logiciel de l'automate.
  - a. Disposer le diluant adéquat dans chaque cupule : NaCl pour l'ASPItest et NaCl-CaCl<sub>2</sub> pour le TRAPtest.
  - b. Déposer la quantité d'échantillon de sang total (300 µL) dans chaque cupule.
  - c. Une incubation de 3 minutes s'effectue. Un signal sonore annonce la fin de l'incubation : il faut alors passer à l'étape suivante.
  - d. Incorporation de l'agoniste adéquat dans chaque cupule (AA pour l'ASPItest et TRAP-6 pour le TRAPtest) et démarrage instantané du chronomètre : le temps de mesure est de 6 minutes. Les courbes s'affichent en temps réel pendant toute la durée de l'analyse.

5) Une fois l'analyse terminée, le résultat est disponible sur le logiciel sous forme de deux courbes (deux paires d'électrodes) accompagné des résultats chiffrés : AUC, taux d'agrégation maximal et vitesse d'agrégation. Une impression des résultats est possible et une sauvegarde automatique des résultats s'effectue.

#### - **Résultats**

Comme énoncé précédemment, seule l'AUC est utilisée pour l'interprétation du résultat : elle est exprimée en AU\*min.

Selon les recommandations du fournisseur, le cut-off permettant de déterminer les mauvais et les bons répondeurs est estimé à 300 AU\*min<sup>59</sup>. Cette valeur a été établie par l'étude de Von Pape *et al*<sup>60</sup> réalisée sur 133 sujets (76 patients sous aspirine et 57 donneurs sains). Elle a d'ailleurs été repris dans d'autres publications<sup>36,61,62</sup>. Bien que d'autres auteurs aient pu réévaluer ce cut-off à une valeur différente, nous avons décidé pour notre étude de suivre les recommandations du fournisseur.

Ainsi, les sujets présentant une AUC strictement inférieure à 300 AU\*min sont qualifiés de bon-répondeurs (ou sensibles), tandis que ceux ayant une AUC supérieure ou égale à 300 AU\*min ne présentent pas une inhibition suffisante de la COX-1 et sont donc catégorisés en mauvais répondeur (ou résistant).

#### **IV.4.b La technique VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin Test**

##### - **Généralités**

Le VerifyNow<sup>®</sup> est un système fourni par Accumetrics<sup>®</sup> (San Diego, CA, USA) qui détecte par méthode turbidimétrique l'agrégation plaquettaire après l'ajout d'un agoniste. Cette technique est réalisée sur du sang total au moyen de l'instrument de mesure, de cartouches à usage unique renfermant l'ensemble des réactifs, et de matériaux de contrôles de qualité assurant la performance de la méthode (*cf figure 12*). Le dispositif de mesure étant totalement fermé, la manipulation par l'utilisateur est limitée au maximum.

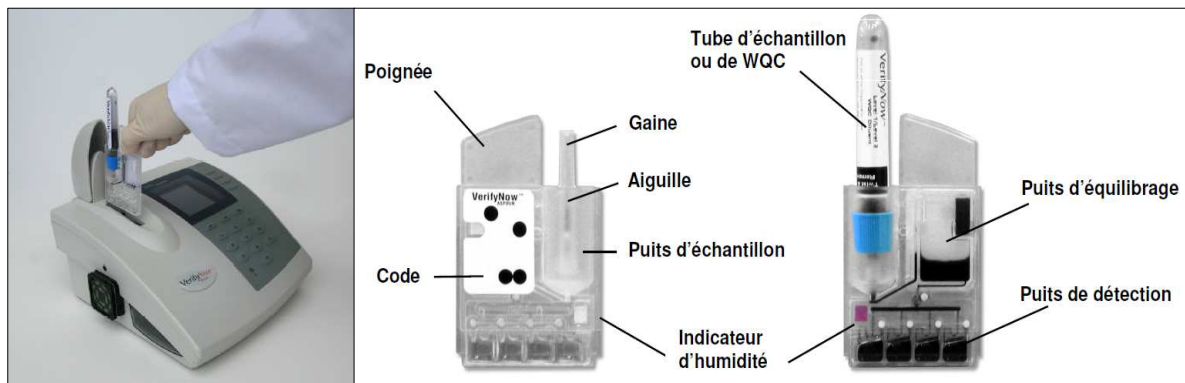


Figure 12 : Système VerifyNow® (à gauche) et description d'une cartouche de dosage (à droite)<sup>63</sup>

L'agoniste utilisé ici pour la détection de la résistance à l'aspirine est l'acide arachidonique (AA) dont la concentration n'est pas indiquée par le fournisseur. Le dispositif renferme une préparation lyophilisée de billes revêtues de fibrinogène humain, d'AA et d'un tampon. L'échantillon de sang total est automatiquement distribué depuis le tube de prélèvement vers le puits d'équilibrage et déversé dans les galeries d'incubation. Ces galeries contiennent l'agoniste, les billes revêtues de fibrinogène, des stabilisants (tampon, serum albumine bovine) ainsi que des billes magnétiques assurant une homogénéisation parfaite du mélange dans chaque galerie. La transmission lumineuse est mesurée par un détecteur pendant toute la durée de l'analyse (5 minutes)<sup>63</sup>.

Au contact de l'agoniste, les plaquettes insuffisamment ou non inhibées par l'aspirine s'activent par l'intermédiaire du TXA2 et génèrent une concentration importante de GPIIb/IIIa de conformation active à leur surface. Ainsi, l'ensemble des plaquettes s'agrègent aux billes coatées de fibrinogène, ce qui provoque une élévation de la lumière transmise. *A contrario*, des plaquettes correctement inhibées par l'aspirine ne s'activeront pas au contact de l'AA, ce qui révélera une turbidité du milieu plus importante et donc un abaissement de la lumière transmise (cf figure 13).

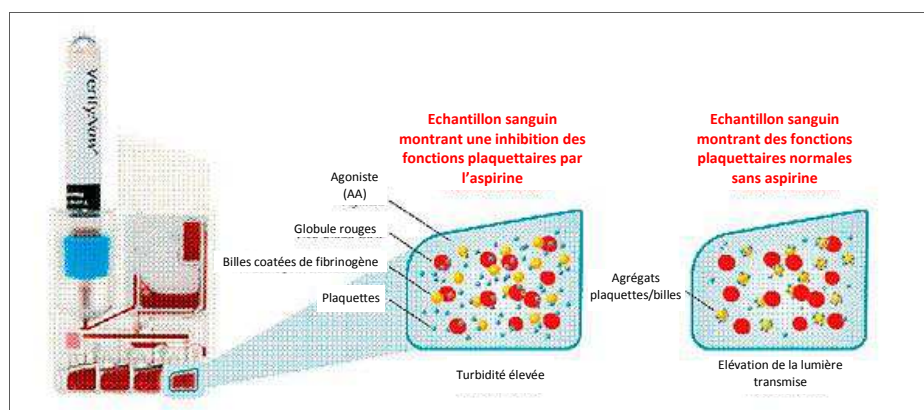


Figure 13 : Représentation schématique de la réaction dans le système VerifyNow® avec et sans aspirine selon le fournisseur (Accumetrics®)<sup>63</sup>

Les cartouches sont conservées individuellement dans un blister. Elles se conservent à température ambiante jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur le coffret et sur les blisters.

#### - **Préparation de l'analyse**

L'allumage de l'automate s'effectue simplement par un interrupteur situé à l'arrière de l'automate. Après un auto-contrôle réalisé automatiquement par l'instrument, l'appareil est en service. Cependant, les recommandations fournisseurs indiquent un délai de préchauffage de 15 minutes avant de réaliser les analyses.

Afin d'assurer la qualité de la mesure, il est nécessaire de passer deux types de contrôles<sup>63</sup> :

- ✓ Un contrôle de qualité électronique assurant la bonne qualité de la mesure optique : il se réalise avant chaque série d'analyse au moyen d'une « carte test » rangée sur le côté de l'appareil. La mention « REUSSI » de ce contrôle est indispensable à la poursuite des analyses.
- ✓ Un contrôle de qualité liquide composé de deux niveaux différents (inférieur et supérieur au cut-off) assurant la bonne qualité des cartouches : selon les recommandations du fournisseur, seul un niveau (niveau 2 : haut) est testé à l'ouverture d'un nouveau lot de cartouches. La reconstitution du niveau 2 se réalise à partir du niveau 1 (sang stabilisé) dans lequel est ajoutée une petite bille. Après une bonne homogénéisation, le tube peut être passé sur l'automate comme un échantillon patient.

Une fois le prélèvement effectué au lit du patient, il est préférable de respecter un délai minimum de 30 minutes avant de réaliser l'analyse et de ne pas dépasser 4 heures.

#### - **Mesure**

La mesure d'un échantillon patient se fait rapidement (en 5 minutes) et ne renferme pas d'étapes complexes<sup>63</sup> :

- 1) Le numéro de dossier est entré manuellement dans l'appareil.

- 2) Récupérer une nouvelle cartouche d'un lot connu par l'automate et la retirer de son emballage par la poignée : il est impératif de ne pas toucher le reste du dispositif.
- 3) Il est alors possible de retirer la gaine de protection de l'aiguille en tirant dessus et en prenant soin de ne pas la désaxer ni de la dévisser pour éviter de tordre ou de retirer l'aiguille.
- 4) La cartouche est insérée jusqu'au signal sonore.
- 5) Retourner délicatement le tube patient 5 fois afin d'assurer une bonne homogénéisation du prélèvement avant analyse.
- 6) Insérer le tube, bouchon vers le bas, dans le puits de la cartouche jusqu'au signal sonore.
- 7) Refermer le couvercle. Le résultat s'affiche sur l'écran de l'appareil en 5 minutes. Il est ensuite sauvegardé automatiquement sur l'appareil.

Pour extraire le dispositif de mesure de l'instrument, il faut, après avoir soulevé le couvercle, retirer l'ensemble cartouche/tube en même temps en tirant sur la poignée de la cartouche, puis refermer le couvercle.

Afin de limiter au maximum le risque d'accident de l'utilisateur, il n'est pas nécessaire de désolidariser l'ensemble tube/cartouche : il peut être jeté tel quel.

### - **Résultats**

Les résultats du dosage sont des données chiffrées indiquées en unités de réaction à l'aspirine ou *aspirin reaction unit* (ARU). Ils sont proportionnels au taux de lumière transmise et donc à l'agrégation plaquettaire dans les chambres d'incubation.

L'interprétation des résultats se fait de manière qualitative à l'aide d'un cut-off établi par le fournisseur à 550 ARU<sup>63</sup>. Un résultat inférieur à 550 ARU témoigne d'une inhibition satisfaisante par l'aspirine, tandis qu'un résultat supérieur 550 ARU classe les patients en résistants à l'aspirine.

Selon le fournisseur, avec un cut-off à 550 ARU, le VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin Test annonce des performances intéressantes. Il est très spécifique de l'inhibition des fonctions plaquettaires causée par l'aspirine (spécificité à 100%), ce qui signifie que l'ensemble des patients dénués de traitement par aspirine a théoriquement un résultat supérieur à 550 ARU. En d'autres termes, avec une valeur prédictive positive annoncée à 100%, les patients testés inférieur à 550 ARU sont nécessairement sous aspirine.

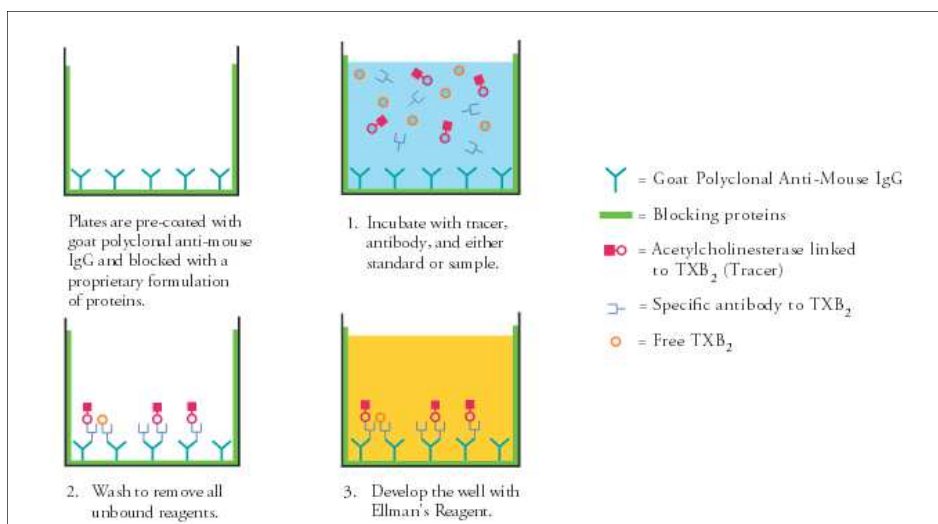
#### IV.4.c Le dosage sérique du Thromboxane B2

##### - **Généralités**

Le dosage du TXB<sub>2</sub> se fait par méthode “enzyme-linked immunosorbent assay” ou ELISA qui se base sur le principe de détection sur un support solide d’un antigène par un anticorps spécifique, révélée par une réaction colorée par l’action d’une enzyme sur son substrat. La trousse utilisée ici pour l’étude est la “Thromboxane B2 Express EIA Kit – Monoclonal” (Ref. 10004023, Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, MI, USA).

Le principe de ce dosage est une variante des techniques par immuno-analyse : il repose sur la compétition de liaison entre le TXB<sub>2</sub> contenu dans l’échantillon et une quantité connue (en excès) de TXB<sub>2</sub> conjugué à une enzyme (l’acétylcholinestérase) sur des anticorps monoclonaux anti-TXB<sub>2</sub>.

Les puits sont recouverts d’anticorps murins anti-IgG, dirigés contre la fraction Fc des anticorps monoclonaux. Le sérum du patient est incubé dans les puits en présence des anticorps monoclonaux anti-TXB<sub>2</sub> et du Tracer (ou TXB<sub>2</sub> conjugué). Les anticorps monoclonaux se fixent sur les IgG par la fraction Fc, tandis que la fraction Fab reconnaît et lie le TXB<sub>2</sub> de l’échantillon ou du Tracer<sup>64</sup> (cf figure 14).



**Figure 14 :Schéma de la réaction du Thromboxane B2 Express EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemicals)<sup>64</sup>**

Après une succession de lavages, la liaison antigène-anticorps est révélée par l’ajout du substrat (réactif d’Ellman), qui, au contact de l’enzyme, se métabolise en substance colorée dont la densité optique (DO) sera proportionnelle au taux de TXB<sub>2</sub>

sérique. Etant donné qu'il s'agit d'une méthode par compétition : plus la quantité de TXB2 sérique sera importante, moins le TXB2 conjugué se fixera aux anticorps, et donc moins la DO sera élevée.

Le *tableau 5* résume les termes techniques utilisés dans la trousse fournie par Cayman Chemicals.

**Tableau 5 : Définitions des termes techniques de la trousse Thromboxane B2 Express EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemicals)**

<b>Goat Polyclonal Anti-Mouse IgG</b>	Anticorps murin polyclonal anti IgG (dirigé contre la fraction Fc)
<b>Tracer</b>	TXB2 conjugué à son enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE)
<b>Réactif d'Ellman</b>	Acétylthiocholine + 5,5'-dithio-bis-(2-acide nitrobenzoïque) <i>Une hydrolyse par l'AChE libère l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque ayant un pic d'absorption à 412nm</i>
<b>Blank</b>	Blanc : bruit de fond du réactif d'Elleman <i>L'absorbance du blanc est soustraite de chaque lecture de DO</i>
<b>Total Activity</b>	Activité enzymatique totale du Tracer <i>Il sert de contrôle positif de la réaction. Si <math>B_0 \ll TA</math>, cela révèle une anomalie des réactifs ou lors du protocole d'analyse</i>
<b>NSB (Non Specific Binding)</b>	Liaison non-spécifique du Tracer dans le puits de réaction
<b>B</b>	Valeur de la DO des puits contenant les échantillons
<b>B<sub>0</sub></b>	Liaison maximale du Tracer à l'anticorps quand le TXB2 libre est inexistant <i>Toutes les DO sont rapportées à cette valeur maximale : le résultat obtenu est donc un pourcentage de <math>B/B_0</math></i>
<b>Standard Curve</b>	Gamme d'étalonnage établie au moyen de huit concentrations différentes (puits S1 à S8)

#### - **Préparation de l'analyse**

Dans un premier temps, l'analyse se prépare par la reconstitution des réactifs. Certains peuvent être préparés à l'avance, en tenant compte de leurs modalités de conservation, et d'autres sont à préparer extemporanément comme la gamme d'étalonnage<sup>64</sup>.

##### o Reconstitution des tampons :

Une fois reconstitués, ils se conservent à 4°C pendant 2 mois maximum. Ils peuvent donc être préparés plusieurs semaines en amont de l'analyse.



✓ EIA Buffer

La totalité d'un flacon (soit 10 mL) du « EIA Buffer Concentrate (10X) » est diluée dans 90 mL d'eau désionisée.

✓ Wash Buffer

La moitié du flacon (soit 2,5 mL) du « Wash Buffer Concentrate (400X) » est diluée dans 1L d'eau désionisée, puis additionnée de 0,5 mL de « Polysorbate 20 ».

○ Reconstitution des réactifs avant analyse

Une fois reconstitués, les flacons de Tracer et d'Anticorps monoclonaux peuvent être conservés à 4°C pendant 4 semaines.

1) Tracer (TXB2-AChE)

Le « TXB2 Express AChE Tracer 100 dtn » initialement sous forme de poudre est reconstitué avec 6 mL d' « EIA Buffer ». Sont ajoutés 60 µL de « EIA Tracer Dye » : substance colorée rouge et inerte permettant de mieux visualiser le Tracer dans les puits.

2) Anticorps Monoclonaux

Le « TXB2 Express EIA Monoclonal Antibody 100 dtn » initialement sous forme de poudre est reconstitué avec 6 ml d' « EIA Buffer ». Sont ajoutés 60 µL d' « EIA Antiserum Dye » : substance colorée bleue et inerte permettant de mieux visualiser le dépôt de l'anticorps dans les puits.

○ Reconstitution des réactifs extemporanément

La gamme d'étalonnage et le réactif d'Ellman peuvent se dégrader rapidement. C'est pourquoi il est préférable de les reconstituer au moment de la réalisation de l'analyse.

1) Gamme d'étalonnage

100 µL de « TXB2 Express EIA Standard » préalablement homogénéisé sont dilués dans 900 µL d'eau désionisée : la solution reconstituée est ainsi titrée à 20 ng/mL.

À partir de cette dilution, la gamme d'étalonnage de S1 à S8 est réalisée grâce à des dilutions en cascade (cf figure 15) dans l'EIA Buffer.

Nous obtenons ainsi pour cette gamme huit concentrations en TXB2 connues : 15,6 pg/mL ; 31,3 pg/mL ; 62,5 pg/mL ; 125 pg/mL ; 250 pg/mL ; 500 pg/mL ; 1000 pg/mL et 2000 pg/mL.

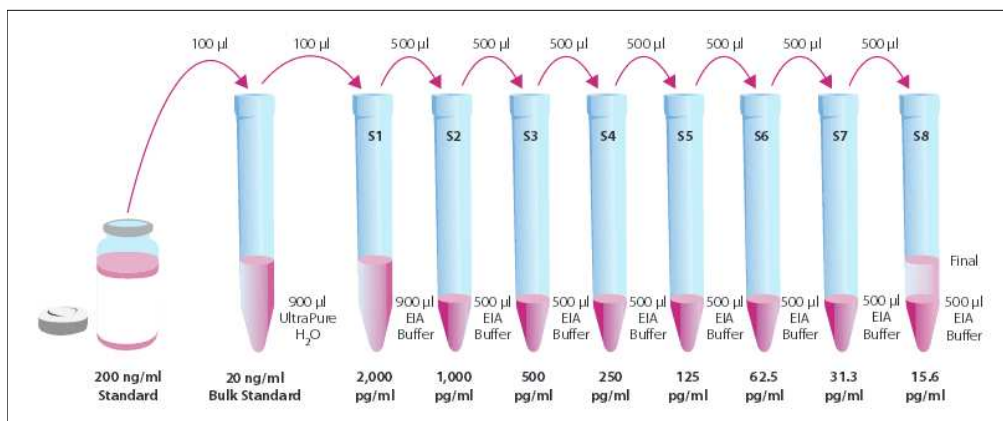


Figure 15 : Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la trousse Thromboxane B2 Express EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemicals)<sup>64</sup>

## 2) Réactif d'Ellman

Un flacon de 100 dtn initialement sous forme de poudre est reconstitué avec 20 mL d'eau désionisée. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

### o Préparation des échantillons patients

Les échantillons de sang ont été recueillis sur tube sec. Ils ont été centrifugés à 2000 G à 20°C pendant 10 minutes.

Le sérum a été aliquoté dans des cryotubes : dans les conditions idéales, trois aliquots ont été réalisés.

Les cryotubes ont été placés à -80°C. Le fournisseur annonce une stabilité des échantillons à environ 1 à 2 mois.

La décongélation des échantillons s'est faite à température ambiante, et ils ont été vortexés afin de bien réhomogénéiser le prélèvement avant analyse.

La gamme de dosage proposée par le kit étant basse, les échantillons ont été dilués comme suit :

- *Contrôles sains sans Aspirine* : dilution au 50<sup>ème</sup>

Réalisation au moyen d'une dilution en cascade : 100 µL de l'échantillon ont été dilués dans 400 µL d'EIA Buffer, puis 100 µL de cette dilution ont été de nouveau dilués dans 900 µL d'EIA Buffer.

- *Patients sous Aspirine* : dilution au 5<sup>ème</sup>

200 µL de l'échantillon patient ont été dilués dans 800 µL d'EIA Buffer.

- **Préparation de la plaque**

Chaque échantillon a été réalisé en triplicate. Ainsi, chaque plaque a pu recevoir 24 patients (cf tableau 6).

**Tableau 6 : Schéma organisationnel de la plaque de dosage du TXB2 selon le fournisseur (Cayman Chemicals)<sup>64</sup>**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blc	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blc	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B0	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B0	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B0	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blc : blanc ; NSB : Non Binding Specific ; B<sub>0</sub> : DO maximale ; TA : total activity ; S1 à S8 : gamme d'étalonnage ; 1 à 24 : échantillons patient

- **Protocole de l'analyse**

o Distribution des réactifs et échantillons<sup>64</sup> (cf tableau 7)

1) Distribution de l'EIA Buffer :

Ajouter 100 µL d'EIA Buffer dans les puits NSB.

Ajouter 50 µL d'EIA Buffer dans les puits B<sub>0</sub>.

2) Distribution de la gamme d'étalonnage en duplicate

Distribuer 50 µL de chaque dilution de la gamme (S1 à S8) dans chaque puits correspondant (2 puits pour chaque dilution).

3) Distribution des échantillons

Distribuer 50 µL de chaque échantillon dans les puits correspondant (2 puits pour chaque échantillon).

4) Distribution du Thromboxane B2 Express AChE Tracer

Ajouter 50 µL du Tracer dans tous les puits excepté le puits « TA » et les puits « Blanc ».

5) Distribution du Thromboxane B2 Express EIA Monoclonal Antibody

Ajouter 50 µL de l'Anticorps monoclonal à tous les puits excepté le puits « TA », les puits « NSB » et les puits « Blanc ».

o Incubation de la plaque

Couvrir la plaque d'un film plastique et incuber 2 heures à température ambiante sur un agitateur rotatif.

- Révélation de la plaque
  - 1) Lavage des puits  
Vider les puits et rincer 5 fois avec le Wash Buffer.
  - 2) Distribution du Réactif d'Ellman  
Distribuer 200 µL du réactif dans tous les puits.
  - 3) Réalisation du puits TA  
Ajouter 5 µL de Tracer au puits TA.
  - 4) Incubation pour la révélation  
Couvrir la plaque d'un film plastique et l'incuber pendant 60 minutes à température ambiante sur un agitateur rotatif dans un placard fermé pour la maintenir à l'abri de la lumière.

**Tableau 7 : Récapitulatif du pipetage des différents puits de la technique Thromboxane B2 Express EIA Kit – Monoclonal (Cayman Chemicals)<sup>64</sup>**

Puits	Réactifs	EIA Buffer	Gamme/ Echantillon	Tracer	Anticorps	Réactif d'Ellman
Blanc		-	-	-	-	200 µL
TA		-	-	5 µL (à l'étape de la révélation)	-	200 µL
NSB		100 µL	-	50 µL	-	200 µL
B <sub>0</sub>		50 µL	-	50 µL	50 µL	200 µL
Gamme/Echantillons		-	50 µL	50 µL	50 µL	200 µL

- Lecture de la plaque  
Retrait du film plastique et lecture de la plaque à une longueur d'onde de 420 nm (recommandation fournisseur : λ de 405 à 420 nm)<sup>64</sup>.

- **Résultats de l'analyse**

- Préparation des données<sup>64</sup>

Dans un premier temps, les résultats de DO de l'ensemble des puits sont retranchés de la moyenne des deux résultats de DO du Blanc.

Il est ensuite possible d'établir la moyenne des puits NSB et la moyenne des puits B<sub>0</sub> qui permettent de calculer le B<sub>0</sub> corrigé :

$$\mathbf{B_0 \text{ corrigé} = B_0 - NSB}$$

Ainsi, nous pouvons calculer le  $B/B_0\%$  de chaque puits (gamme et échantillons) en utilisant la formule qui suit :

$$B/B_0\% = (B - NSB) / B_0 \text{ corrigé} \times 100$$

o Réalisation de la courbe d'étalonnage

Les résultats des concentrations connues en TXB2 de S1 à S8 nous permettent d'établir la courbe d'étalonnage :

$$B/B_0\% = f(\text{concentration en TXB2})$$

Nous obtenons ainsi une courbe de type 4-parameter logistic fit (cf figure 16).

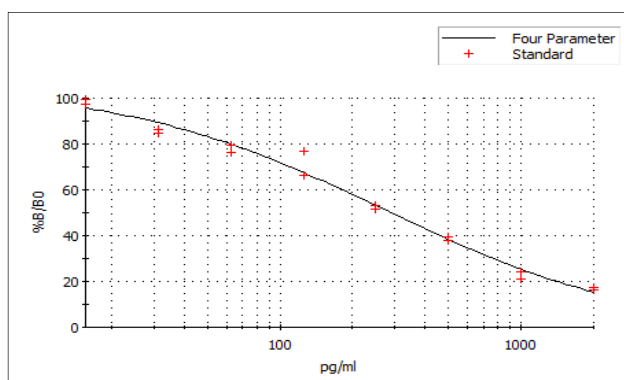


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de type 4-parameter logistic fit (MyAssays®) obtenue pour le dosage du TXB2

o Calcul des résultats des échantillons

Après avoir calculé le  $B/B_0\%$  de chaque puits, la moyenne des trois valeurs de chaque triplicate est réalisée et peut être reportée sur la courbe d'étalonnage afin d'établir la concentration en TXB2 de l'échantillon.

Dans un souci de facilité et de précision, le traitement des données a été réalisé sur l'application MyAssays® disponible sur internet qui fournit, après renseignements des résultats bruts, l'équation de la courbe ainsi que l'ensemble des résultats des échantillons d'ores et déjà affectés de leur facteur de dilution.

Lorsque les résultats obtenus dans la série étaient hors gamme et se situaient dans la zone décisionnelle (autour de 3,5 ng/mL), ils ont été redosés dans une deuxième série avec une dilution adaptée afin d'obtenir le résultat le plus précis possible.

## **IV.5 Etude statistique**

Tous les tests statistiques utilisés dans ce travail sont des tests non paramétriques. Ils ont été réalisés avec l'aide de l'Unité de Biostatistiques du Pr Duhamel (CHRU de Lille).

Les corrélations numériques ont été analysées par un test de Spearman. L'étude des concordances s'est faite au moyen du coefficient Kappa de Cohen, accompagné d'un test de McNemar qui évalue l'équilibre des discordances. La comparaison des différents paramètres de l'hémogramme dans les sous-groupes de population a été réalisée par un test de Mann-Whitney. Enfin, les répartitions des populations de patients ont pu être analysées par un test de Kruskal Wallis.

Le seuil de significativité du p utilisé pour l'ensemble de nos tests est à 0,05. Ainsi, un p inférieur à 0,05 signifiera :

- dans la corrélation de Spearman : que les deux paramètres sont significativement liés,
- Dans le test de McNemar : que les discordances seront déséquilibrées et donc que les deux méthodes rendent des interprétations significativement différentes,
- Dans le test de Kruskal Wallis : que la répartition des groupes est significativement différente dans les populations étudiées,
- Dans le test de Mann-Whitney : que les médianes du paramètre sont significativement différentes dans les deux groupes.

La valeur du Kappa de Cohen qui évalue l'accord entre deux techniques s'interprète consensuellement comme suit (*cf tableau 8*):

**Tableau 8 : Interprétation de la valeur du Kappa de Cohen**

≥ 0.81	très bon accord
0.61 - 0.80	bon accord
0.41 - 0.60	accord moyen
0.21 - 0.40	accord médiocre
0 - 0.20	mauvais accord
< 0	accord exécrable

# V. RESULTATS

## V.1 Caractéristiques de la population étudiée

L'ensemble des caractéristiques de la population de notre étude est rassemblé dans le *tableau 9*. Les données clinico-biologiques détaillées sont disponibles en *annexes 2, 3 et 4*.

**Tableau 9 : Caractéristiques de la population étudiée**

	<b>Tous</b>
Nombre de patients étudiés	40
Pathologies	
TE (n / %)	31 / 77,5
PV (n / %)	9 / 22,5
Sexe	
Homme (n / %)	15 / 37,5
Femme (n / %)	25 / 62,5
Âge (années)	72,5 [62,8 – 78]
Dose quotidienne d'aspirine (n / %)	
75 mg/j	20 / 50
100 mg/j	2 / 5
150-160 mg/j	16 / 45
Nombre de prise(s) par jour d'aspirine (n / %)	
1	32 / 80
2	6 / 15
Traitement cytoréducteur (n / %)	36 / 90
Hydroxyurée (Hydréa®)	28 / 70
Anagrélide (Xagrid®)	4 / 10
Pipobroman (Vercyte®)	3 / 7,5
IFN-α pégylé (Pegasys®)	1 / 2,5
Antécédents de thromboses (n / %)	10 / 25
1 événement (n / %)	5 / 12,5
≥ 2 événements (n / %)	5 / 12,5
FDRCV (hypertension, diabète, tabagisme actif) (n / %)	12 / 30
Statut mutationnel	
JAK2 V617F (n / %)	23 / 57,5
CALR mutés (n / %)	10 / 25
MPL mutés (n / %)	0 / 0
Triple négatifs (n / %)	7 / 17,5

	<b>Tous</b>	<b>TE</b>	<b>PV</b>
Plaquettes (Giga/L)	395,5 [355,5 – 589,3]	388 [338,5 – 540,0]	755 [388,0 – 798,0]
Globules rouges (Téra/L)	4,20 [3,61 – 4,63]	4,00 [3,53 – 4,49]	4,89 [4,43 – 5,46]
Hémoglobine (g/dL)	13,3 [12,1 – 14,3]	12,9 [12,1 – 14,0]	14,5 [14,3 – 16,1]
Hématocrite (%)	40,9 [38,2 – 43,0]	40,0 [37,2 – 41,7]	46 [44,5 – 49,9]
Volume globulaire moyen (fL)	98,1 [89,6 – 107,9]	98,1 [89,5 – 111,7]	97,2 [91,8 – 103,8]
Leucocytes (Giga/L)	6,49 [5,50 – 8,12]	6,18 [5,16 – 7,35]	8,85 [6,68 – 10,43]

Les résultats numériques sont exprimés par la médiane [interquartiles].

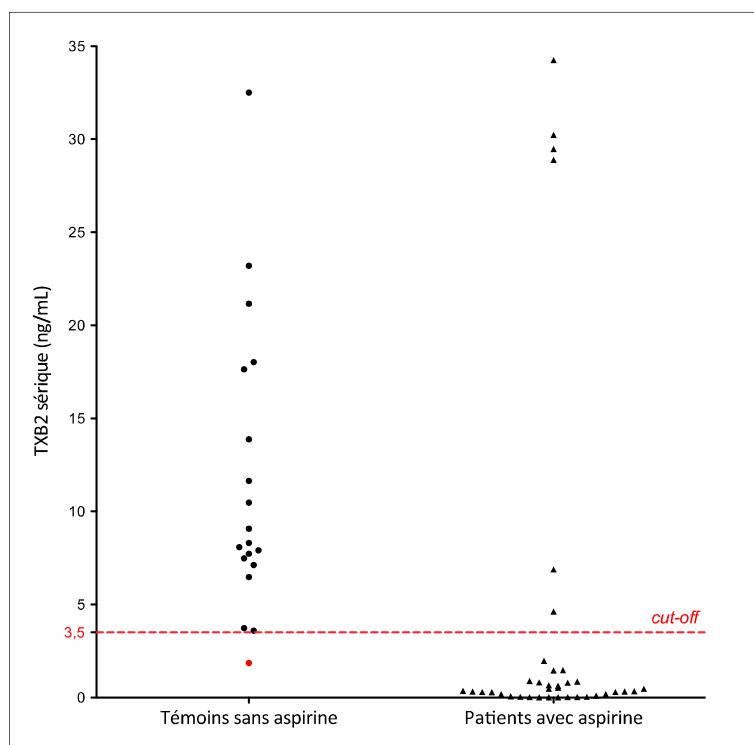
## **V.2 Validation du cut-off pour le dosage du TXB2 sérique et le ratio TXB2/taux de plaquettes**

### **V.2.a Validation du cut-off du TXB2 sérique**

La trousse choisie pour le dosage sérique du TXB2 étant totalement inconnue du laboratoire, il a été décidé de vérifier, dans nos conditions expérimentales, le cut-off du taux sérique de TXB2 retrouvé dans la littérature (3,5 ng/mL) sur une série de donneurs sains sans traitement par aspirine ou apparentés.

Ainsi, 19 dosages de témoins sains ont été réalisés afin de valider ce cut-off : ils sont représentés à gauche sur le graphique ci-après en parallèle des résultats de dosage des patients sous aspirine (à droite) (*cf figure 17*).

Le point rouge sur le graphique correspond au résultat du dosage d'un témoin a priori sain : il s'est avéré par la suite qu'il était sous ibuprofène depuis quelques jours.



**Figure 17 : Représentation graphique des dosages de TXB2 sérique chez les témoins sains (à gauche) et les patients traités par aspirine (à droite). En rouge, le témoin sain sous ibuprofène.**

Tous les témoins sains ont eu un taux supérieur à 3,5 ng/mL, excepté le témoin ayant pris de l'ibuprofène. Nous pouvons donc valider ce cut-off pour notre étude.



## V.2.b Détermination d'un cut-off pour le ratio TXB2/taux de plaquettes

La production de TXA2 et donc de TXB2 sérique étant intimement liée au plaquettes<sup>21</sup>, nous avons jugé intéressant de réaliser un ratio TXB2/taux plaquettes.

Le calcul s'est fait comme suit :

$$\text{Ratio (pg/plaquette)} = [\text{TXB2 sérique (ng/mL)}] / [\text{Plaquettes (G/L)}] \times 1000$$

Dans un premier temps nous avons réalisé une corrélation de Spearman entre les concentrations en TXB2 brutes et le ratio TXB2/plaquettes (*cf figure 18*) : le coefficient de corrélation  $r$  est retrouvé à 0,937 associé à un  $p$  inférieur à 0,0001. Les deux paramètres sont donc parfaitement corrélés.

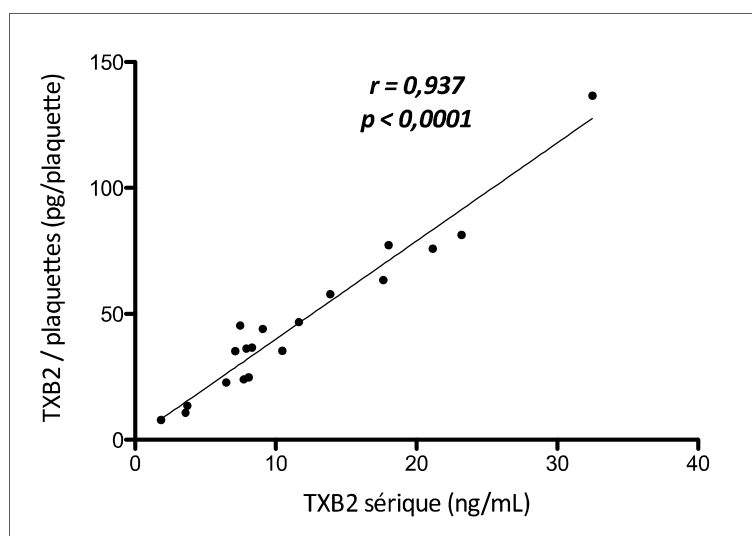
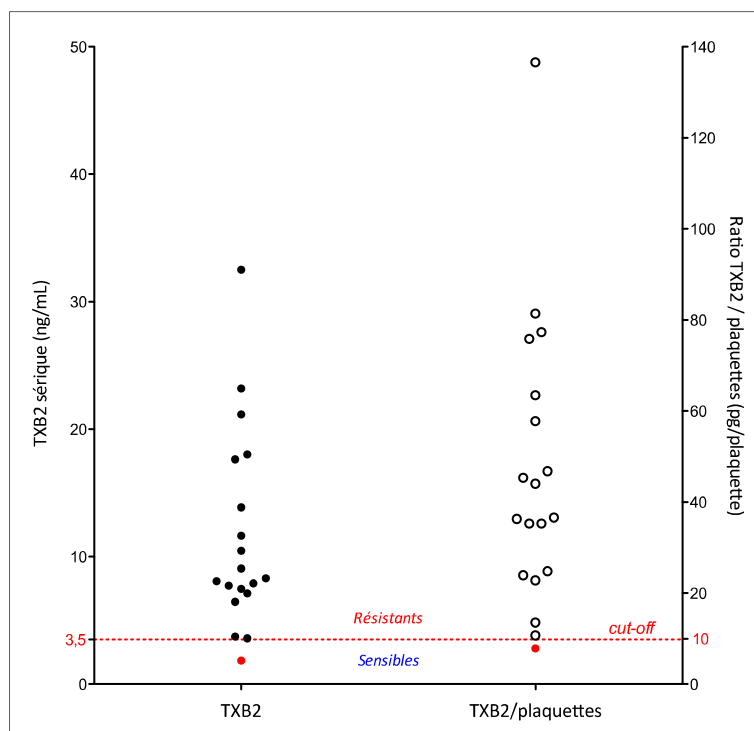


Figure 18 : Corrélation entre les concentrations en TXB2 sériques et le ratio TXB2/Taux de plaquettes

Dans un second temps, nous avons établi un cut-off pour le ratio TXB2/plaquettes parallèlement au cut-off du TXB2 sérique (*cf figure 19*).

Les valeurs du ratio TXB2/plaquettes se répartissant de manière similaire à celle des concentrations brutes en TXB2 sérique, nous avons pu facilement repérer :

- le témoin a priori sain sous ibuprofène (1,86 ng/mL en TXB2 et 7,89 pg/plaquette en ratio TXB2/plaquettes) en rouge sur le graphique,
- le premier témoin sain au dessus de la limite des 3,5 ng/mL en TXB2 qui se retrouve au dessus de 10 pg/plaquette en ratio TXB2/plaquettes (3,60 ng/mL en TXB2 et 10,74 pg/plaquette en ratio TXB2/plaquettes).



**Figure 19 : Représentation graphique des valeurs de TXB2 sériques et du ratio TXB2/plaquettes chez les témoins sains sans aspirine (en rouge, le témoin sain sous ibuprofène)**

Nous avons donc établi le cut-off du ratio TXB2/plaquettes à la valeur de 10 pg/plaquette : les patients présentant un ratio inférieur à 10 pg/plaquette seront catégorisés « sensibles » tandis que ceux présentant un ratio supérieur ou égal à 10 pg/plaquette seront catégorisés « résistants ».

### **V.3 Prévalence de la résistance à l'aspirine dans les trois techniques : Multiplate<sup>®</sup>, VerifyNow<sup>®</sup> et TXB2 sérique**

Le pourcentage de patients résistants à l'aspirine a été établi pour chaque technique (cf *tableau 10*). Les prévalences des patients résistants à l'aspirine ont été comparées deux à deux comme si les échantillons étaient indépendants (test statistique de Kruskal-Wallis).

**Tableau 10 : Prévalence des patients résistants à l'aspirine dans chaque technique : pourcentage (n)**

Multiplate <sup>®</sup> (n = 40)	32,5 % (13)	} p = 0,218	} p = 0,157
VerifyNow <sup>®</sup> (n = 31)	19,4 % (6)		
TXB2 sérique (n = 38)	18,4 % (7)		

Avec un  $p$  à 0,218, 0,922 et 0,157 respectivement pour les comparaisons Multiplate<sup>®</sup>/VerifyNow<sup>®</sup>, VerifyNow<sup>®</sup>/TXB2 sérique et Multiplate<sup>®</sup>/TXB2 sérique, il n'a pas été observé de différence significative entre les prévalences des patients résistants à l'aspirine pour les trois techniques.

#### **V.4 Evaluation de la corrélation et de la concordance entre les techniques étudiées**

Les deux tests fonctionnels d'évaluation de la résistance à l'aspirine sur sang total (Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup>) ont été comparés de deux façons : la corrélation numérique des résultats et l'étude de la concordance de leur interprétation. Dans notre travail, le dosage du TXB2 sérique a été considéré comme la méthode de référence pour déterminer la résistance biologique à l'aspirine car la plus spécifique de la voie de la COX-1. De plus, les deux techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> ont chacune été comparées avec la méthode de référence. L'ensemble des résultats des comparaisons statistiques est résumé dans le *tableau 16*.

Pour des raisons techniques, un certain nombre de données sont manquantes en technique VerifyNow<sup>®</sup> (9 échantillons) et en TXB2 sérique (2 échantillons).

##### **V.4.a Comparaison des techniques Multiplate<sup>®</sup> vs VerifyNow<sup>®</sup>**

Dans cette analyse comparative, les résultats de 31 patients ont pu être testés simultanément dans les deux techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup>.

###### **- *Corrélation numérique***

La comparaison numérique des valeurs rendues dans les deux techniques a été réalisée à l'aide d'un test statistique non-paramétrique de corrélation de Spearman. Il retrouve un coefficient de corrélation  $r$  à 0,773 avec un  $p < 0,001$  : les deux techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> sont donc significativement corrélées.

- **Concordance des résultats qualitatifs**

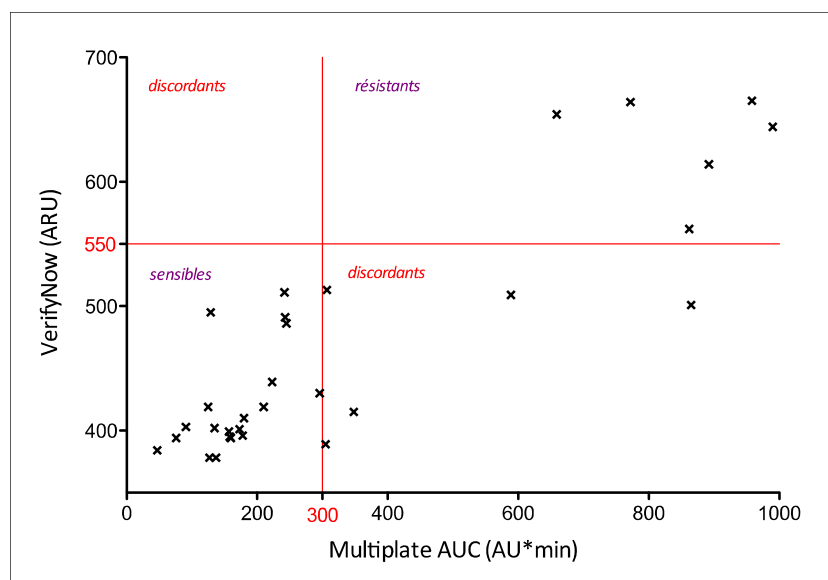
Le nombre d'accords et de discordances entre les deux techniques est résumé dans le *tableau 11* et représenté graphiquement dans la *figure 20*.

**Tableau 11 : Répartition des concordances et discordances des résultats des patients traités par aspirine entre les techniques Multiplate® et VerifyNow®**

		VerifyNow® (ARU)		Total lignes
		Sensible < 550	Résistant ≥ 550	
Multiplate® AUC (AU*min)	Sensible < 300	20	0	20
	Résistant ≥ 300	5	6	11
Total colonnes		25	6	31

Kappa de Cohen	0,61
Accuracy	83,9 %
Test de McNemar	p = 0,0736



**Figure 20 : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par les techniques Multiplate® et VerifyNow®**

L'étude statistique des concordances révèle un Kappa de Cohen à 0,61 avec un intervalle de confiance à 95% (IC<sub>95%</sub>) qui s'étend de 0,32 à 0,90. Selon l'interprétation consensuelle de ce coefficient (*cf tableau 8*), l'accord entre les deux techniques est dit « bon ».

Le pourcentage d'accord ou « accuracy » est évalué à 83,9% : il correspond au nombre total de résultats concordants (positifs et négatifs) sur le nombre total de valeurs.

Le test statistique du Chi2 de McNemar évalue l'équilibre des résultats discordants. Lorsqu'il est significatif (p < 0,05), il met en évidence un déséquilibre entre le nombre

de positifs discordants dans l'une des méthodes et le nombre de positifs discordants dans l'autre méthode. Dans cette étude, le test donne un p à 0,0736 : malgré un p très bas, il n'existe pas de différence significative entre les résultats discordants rendus positifs en Multiplate® (n = 5) et ceux rendus positifs en VerifyNow® (n = 0).

#### **V.4.b Comparaison de la technique Multiplate® avec le dosage sérique du TXB2**

Les résultats rendus par la technique Multiplate® ont été comparés aux concentrations de TXB2 sérique brutes et au ratio TXB2/Taux de plaquettes. Au total, les résultats de 38 patients ont pu être analysés dans ces deux techniques.

##### **- À partir des valeurs de TXB2 sérique brutes**

###### **o Corrélation numérique**

La corrélation de Spearman donne un coefficient de corrélation r à 0,488 avec un p à 0,0019 : les résultats du Multiplate® sont donc significativement corrélés aux résultats du dosage du TXB2 sériques.

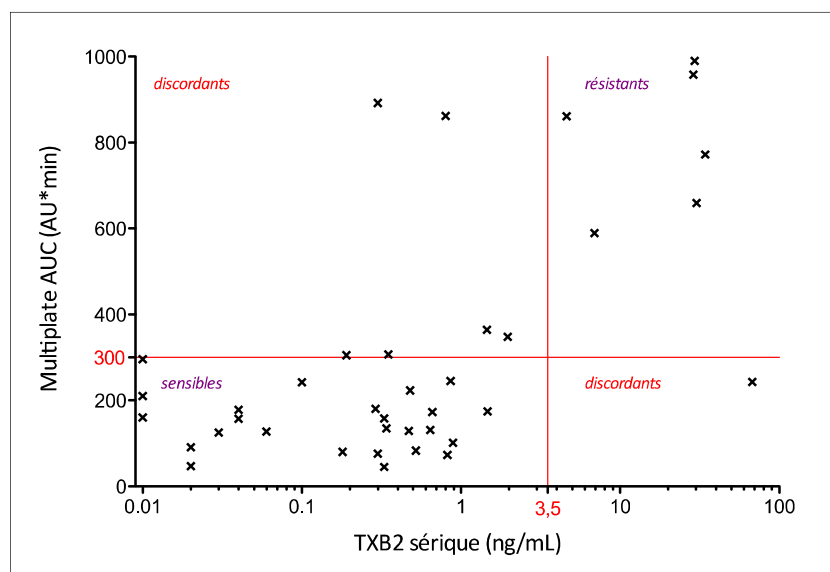
###### **o Concordance des résultats qualitatifs**

Le nombre d'accords et de discordances entre les deux techniques est résumé dans le *tableau 12* et représenté graphiquement dans la *figure 21*.

**Tableau 12 : Répartition des concordances et discordances des résultats des patients traités par aspirine entre la technique Multiplate® et les concentrations en TXB2 sérique**

		TXB2 sérique (ng/mL)		Total lignes
		Sensible < 3,5	Résistant ≥ 3,5	
Multiplate® AUC (AU*min)	Sensible < 300	25	1	26
	Résistant ≥ 300	6	6	12
Total colonnes		31	7	38

Kappa de Cohen	0,52
Accuracy	81,6 %
Test de McNemar	p = 0,1306



**Figure 21 : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique Multiplate® et par le dosage du TXB2 sérique**

L'étude statistique des concordances révèle un Kappa de Cohen à 0,52 avec un IC<sub>95%</sub> qui s'étend de 0,22 à 0,82. Autrement dit, l'accord entre les deux techniques est statistiquement « moyen » (cf tableau 8).

Le pourcentage d'accord ou « accuracy » est évalué à 81,6%.

Le test statistique du Chi<sup>2</sup> de McNemar donne un p égal à 0,1306 : il n'existe pas de différence significative entre les résultats discordants rendus positifs en Multiplate® et ceux rendus positifs par le dosage du TXB2 sérique.

- **À partir du ratio de TXB2 sérique rapporté au taux de plaquettes**

o Corrélation numérique

La corrélation de Spearman entre les résultats du Multiplate® et le ratio TXB2/plaquettes retrouve un coefficient de corrélation  $r$  à 0,475 associé à un  $p$  à 0,0026 : les résultats sont donc significativement corrélés.

o Concordance des résultats qualitatifs

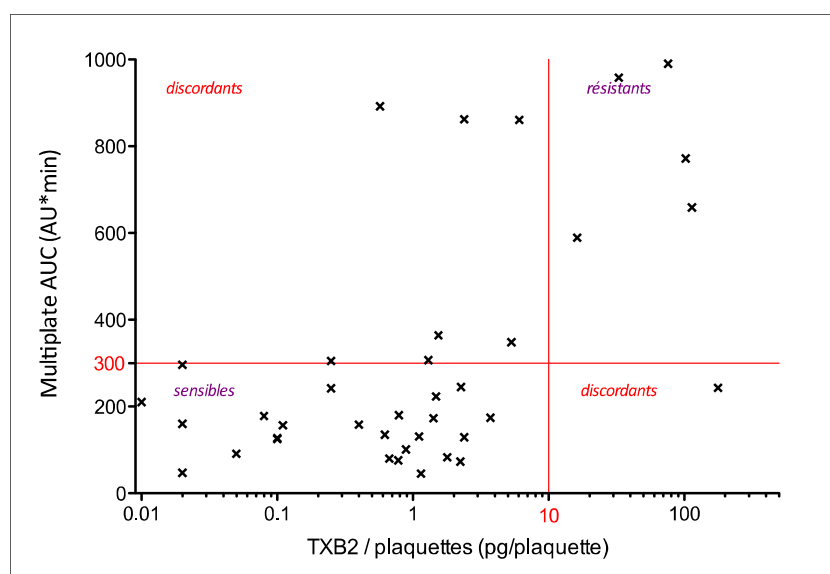
La comparaison de la technique Multiplate® au ratio TXB2/plaquettes modifie quelque peu la répartition des accords entre les deux méthodes (cf tableau 13 et figure 22). On observe la perte d'une concordance (patient résistant dans les deux techniques) au profit d'une discordance (patient résistant en Multiplate® et sensible en TXB2/plaquettes) : il s'agit du patient n°7.

**Tableau 13 : Répartition des concordances et discordances des résultats des patients traités par aspirine entre la technique Multiplate® et le ratio TXB2/plaquettes**

		TXB2/plaquettes (pg/plaquette)		Total lignes
		Sensible < 10	Résistant ≥ 10	
Multiplate® AUC (AU*min)	Sensible < 300	25	1	26
	Résistant ≥ 300	7	5	12
Total colonnes		32	6	38

Kappa de Cohen	0,44
Accuracy	78,9 %
Test de McNemar	$p = 0,0770$



**Figure 22 : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique Multiplate® et par le ratio TXB2/plaquettes**

Le Kappa de Cohen passe ici à 0,44 ( $IC_{95\%} = 0,13 - 0,74$ ), ce qui sous-entend un accord « moyen » entre ces deux méthodes (cf *tableau 8*).

L' « accuracy » est évalué à 78,9%.

Le test de McNemar ne révèle pas non plus de déséquilibre sur les discordances avec un p à 0,0770 : le Multiplate® ne retrouve donc pas de manière significative plus de patients résistants que le ratio TXB2/plaquettes.

#### **V.4.c Comparaison de la technique VerifyNow® avec le dosage sérique du TXB2**

Les résultats rendus par la technique VerifyNow® ont été comparés aux concentrations de TXB2 sérique brutes et au ratio TXB2/Taux de plaquettes. Au total, les résultats de 29 patients ont pu être analysés dans ces deux techniques.

##### **- À partir des valeurs de TXB2 sérique brutes**

###### **o Corrélation numérique**

La corrélation de Spearman du VerifyNow® versus TXB2 sérique a révélé un coefficient de corrélation r à 0,631 associé à  $p < 0,001$  : les deux paramètres sont donc significativement corrélés.

###### **o Concordance des résultats qualitatifs**

Les effectifs des résultats concordants et discordants sont résumés dans le *tableau 14* et représentés graphiquement dans la *figure 23*.

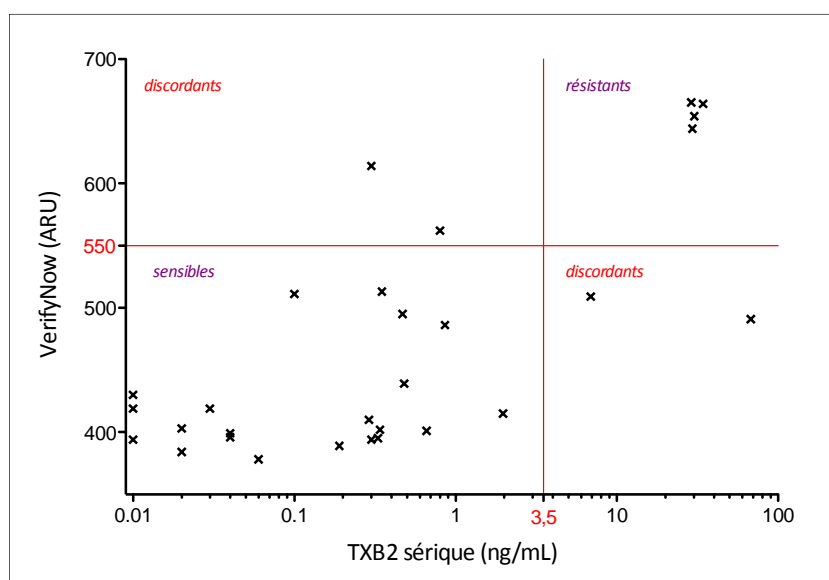


**Tableau 14 : Répartition des concordances et discordances dans les résultats des patients traités par aspirine par la technique VerifyNow® et le dosage du TXB2 sérique**

		TXB2 sérique (ng/mL)		Total lignes
		Sensible < 3,5	Résistant ≥ 3,5	
VerifyNow® (ARU)	Sensible < 550	21	2	23
	Résistant ≥ 550	2	4	6
Total colonnes		23	6	29

Kappa de Cohen	0,58
Accuracy	86,2 %
Test de McNemar	p = 1



**Figure 23 : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique VerifyNow® et le dosage du TXB2 sérique**

L'analyse statistique des accords donne un Kappa de Cohen à 0,58 (IC<sub>95%</sub> = 0,21 – 0,95) : l'accord entre le VerifyNow® et le TXB2 est donc « moyen » (cf tableau 8).

Le pourcentage d'accord est évalué à 86,2%.

Le test de McNemar révèle un équilibre dans les discordances avec un p égal à 1 : il n'existe pas de différence significative entre les résultats discordants positifs en VerifyNow® et ceux positifs sur le taux sérique de TXB2.

- **À partir d'un ratio de TXB2 sérique rapporté au taux de plaquettes**

o Corrélation numérique

L'analyse statistique de corrélation par le test de Spearman retrouve un coefficient de corrélation à 0,666 associé à un p < 0,001 : les résultats rendus dans la technique VerifyNow® et le ratio TXB2/plaquettes sont donc significativement corrélés.

○ Concordance des résultats qualitatifs

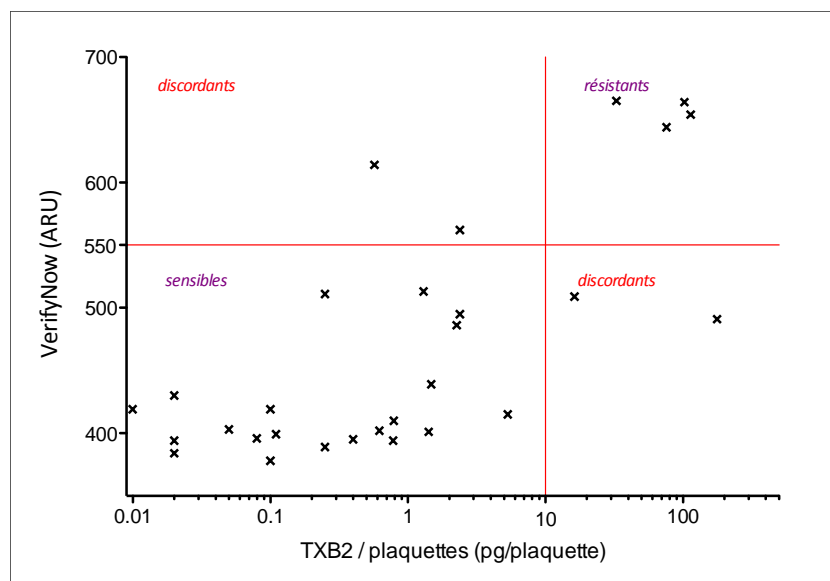
Les résultats observés dans l'étude des accords sont légèrement différents : une discordance disparaît (résistant en TXB2 et sensible en VerifyNow®), au profit d'une concordance (sensible dans les deux techniques) (cf tableau 15 et figure 24).

**Tableau 15 : Répartition des concordances et discordances dans les résultats des patients traités par aspirine par la technique VerifyNow® et le ratio TXB2/plaquettes**

		TXB2/plaquettes (pg/plaquette)		Total lignes
		Sensible < 10	Résistant ≥ 10	
VerifyNow® (ARU)	Sensible < 550	21	2	23
	Résistant ≥ 550	2	4	6
Total colonnes		23	6	29

Kappa de Cohen	0,58
Accuracy	86,2 %
Test de McNemar	p = 1



**Figure 24 : Représentation graphique des résultats des patients traités par aspirine déterminés par la technique VerifyNow® et le ratio TXB2/plaquettes**

Le Kappa de Cohen passe ici à 0,58 (IC<sub>95%</sub> = 0,21 – 0,95) : il existe un accord « moyen » entre les résultats rendus par la technique VerifyNow® et ceux rendus par le ratio TXB2/plaquettes (cf tableau 8).

#### **V.4.d Récapitulatif des comparaisons entre les techniques Multiplate<sup>®</sup>, VerifyNow<sup>®</sup>, TXB2 sérique et ratio TXB2/taux de plaquettes**

L'ensemble des paramètres de comparaison précédemment énoncés sont résumés dans le tableau ci-après (*tableau 16*).

**Tableau 16 : Récapitulatif des paramètres de comparaison des différentes méthodes**

Méthodes comparées	Multiplate <sup>®</sup>	Multiplate <sup>®</sup>	Multiplate <sup>®</sup> vs VerifyNow <sup>®</sup>	VerifyNow <sup>®</sup>	VerifyNow <sup>®</sup>
	TXB2 sérique	ratio TXB2/plaq		TXB2 sérique	ratio TXB2/plaq
N	38	38	31	29	29
Coefficient de corrélation numérique de Spearman r (p)	0,488 (0,0019)	0,475 (0,0026)	0,773 (< 0,001)	0,631 (< 0,001)	0,666 (< 0,001)
Kappa de Cohen	0,52	0,44	0,61	0,58	0,58
Test de McNemar p-value	0,1306	0,0770	0,0736	1	1
Accuracy (%)	81,6	78,9	83,9	86,2	86,2

Toutes les techniques comparées sont corrélées entre elles. Les coefficients de concordance sont tous acceptables : le plus faible (0,44 pour Multiplate<sup>®</sup> vs ratio TXB2/plaquettes) est considéré comme « moyen », tandis que tous les autres (0,52 à 0,61) sont considérés comme « bon ». Le meilleur accord est affecté à la comparaison entre le Multiplate<sup>®</sup> et le VerifyNow<sup>®</sup>.

La comparaison des deux tests fonctionnels avec le TXB2 sérique et le ratio TXB2/plaquettes montre une meilleure corrélation et une meilleure concordance du VerifyNow<sup>®</sup>.

#### **V.5 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup>**

La sensibilité et la spécificité des deux techniques ont été calculées en considérant le dosage du TXB2 comme référence. Elles sont résumées dans le *tableau 17*. Les

vrais positifs correspondent aux résultats concordants « résistants à l'aspirine » tandis que les vrais négatifs sont les résultats concordants « sensibles à l'aspirine ». Elles ont chacune été comparées dans les deux techniques en considérant les échantillons comme indépendants (test de Kruskal-Wallis).

**Tableau 17 : Sensibilité et spécificité vis à vis du dosage du TXB2 sérique dans les techniques Multiplate et VerifyNow**

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Technique Multiplate® (n = 38)	85,7	80,6
Technique VerifyNow® (n=29)	66,7	91,3
p-value	<b>0,0015</b>	<b>0,0231</b>

La sensibilité et la spécificité sont significativement différentes entre les deux techniques. La sensibilité est plus élevée dans la technique Multiplate® tandis que la spécificité est plus élevée dans la technique VerifyNow®.

## **V.6 Etude de l'influence des paramètres de l'hémogramme dans le résultat rendu par les techniques Multiplate® et VerifyNow®**

Nous avons souhaité savoir si certains paramètres de l'hémogramme pouvaient avoir une influence sur les résultats du Multiplate® et du VerifyNow®. Pour cela, nous avons envisagé l'analyse statistique sous deux angles :

- la corrélation numérique des valeurs du paramètre et de la technique,
- la comparaison des valeurs médianes de chaque paramètre entre les groupes « résistants » et « sensibles » à l'aspirine.

Les paramètres que nous avons souhaités étudier sont ceux pouvant avoir une influence sur l'encombrement des électrodes ou la lecture turbidimétrique. Ainsi, le taux de plaquettes, l'hématocrite, le taux de globules rouges, le volume globulaire moyen (VGM) et le taux de leucocytes ont été analysés. L'ensemble des données de l'hémogramme est consigné en *annexe 3*.

Rappelons que, pour des raisons techniques, 9 données sont manquantes pour la technique VerifyNow®.

## V.6.a Technique Multiplate®

### - **Corrélations numériques**

Nous avons étudié l'influence de ces cinq paramètres de l'hémogramme sur les valeurs numériques du Multiplate® grâce à une corrélation de Spearman dont les résultats sont résumés dans le tableau ci-après (*tableau 18*).

**Tableau 18 : Corrélations de Spearman entre les résultats numériques du Multiplate® des patients traités par aspirine et les paramètres de l'hémogramme**

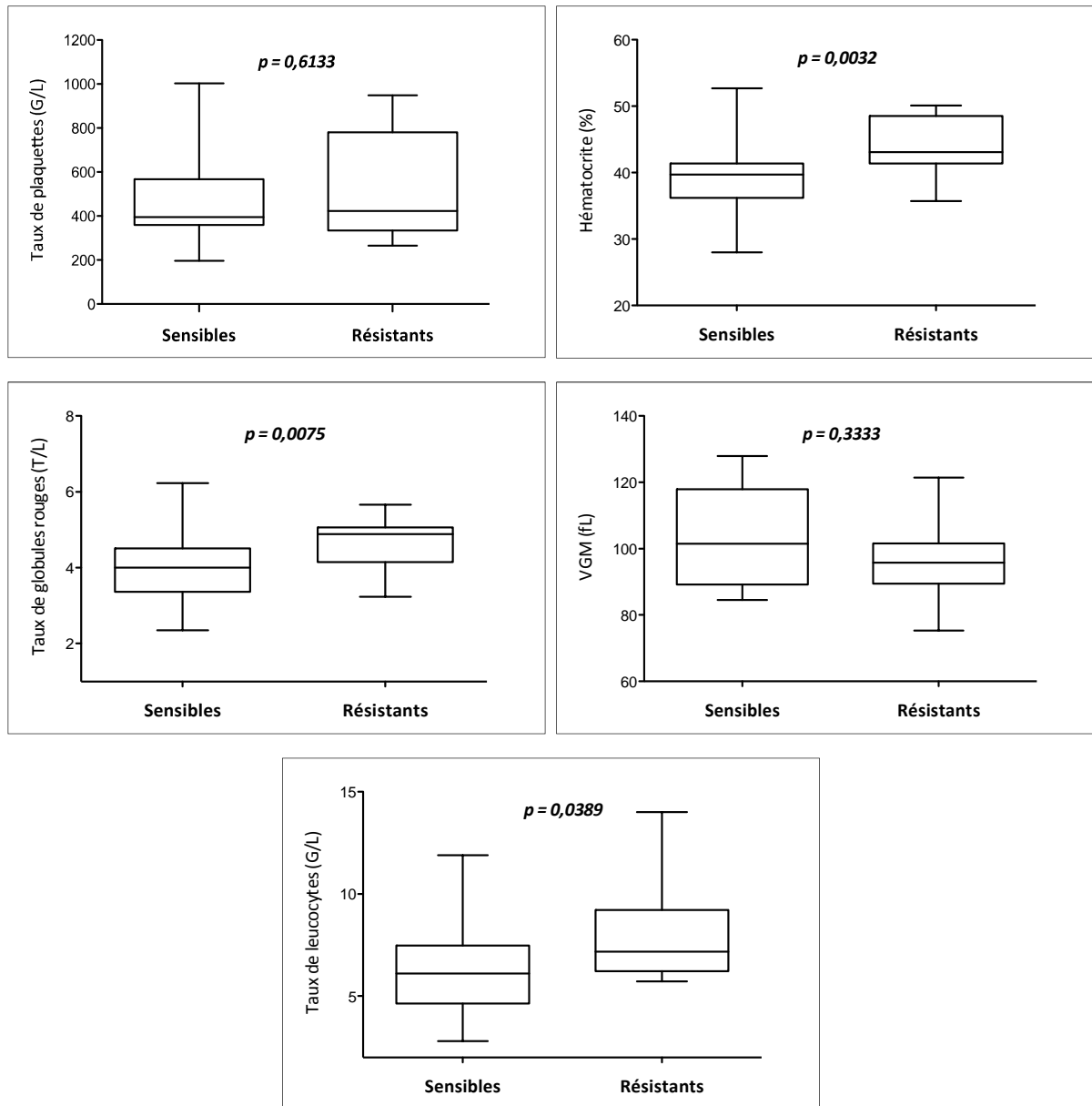
	Taux de plaquettes	Hématocrite	Taux de globules rouges	VGM	Taux de leucocytes
N	40	40	40	40	40
Coefficient de corrélation r	0,108	0,536	0,442	- 0,164	0,4670
IC <sub>95%</sub> de r	(-0,219 – 0,414)	(0,261 – 0,731)	(0,142 – 0,668)	(-0,460 – 0,165)	(0,173 – 0,685)
p-value	0,5057	<b>0,0004</b>	<b>0,0043</b>	0,3117	<b>0,0024</b>

Cette étude statistique met en évidence trois corrélations significatives sur les paramètres hématocrite, taux de globules rouges et taux de leucocytes avec des p respectivement à 0,0004, 0,0043 et 0,0024. Ils sont ici positivement corrélés avec les résultats du Multiplate®.

En revanche, le taux de plaquettes et le VGM ne semblent pas être significativement reliés aux résultats du Multiplate® : les p sont respectivement à 0,5057 et 0,3117.

### - **Comparaison des valeurs médianes de chaque paramètre pour les groupes « Sensible » versus « Résistant »**

Deux groupes ont été formés pour l'étude des paramètres de l'hémogramme : la population sensible (AUC < 300 AU\*min) avec un effectif  $n_1 = 27$ , et la population résistante (AUC  $\geq 300$  AU\*min) avec un effectif  $n_2 = 13$ . Les deux populations ont été comparées sur le taux de plaquettes, l'hématocrite, le taux de globules rouges, le VGM et le taux de leucocytes selon un test de Mann-Whitney (*cf figure 25*).



**Figure 25 : Représentation graphique des populations "sensibles" (< 300 AU\*min ;  $n_1 = 27$ ) et "résistantes" à l'aspirine ( $\geq 300$  AU\*min ;  $n_2 = 13$ ) selon la technique Multiplate® pour cinq paramètres de l'hémogramme**

Le test de Mann-Whitney révèle une différence significative pour trois paramètres : l'hématocrite, le taux de globules rouges et le taux de leucocytes (avec des p respectifs à 0,0032, 0,0075 et 0,0389). Leurs valeurs médianes sont significativement plus élevées dans le groupe « résistants » que dans le groupe « sensible ».

Les populations comparées pour les paramètres taux de plaquettes et VGM ne montrent quant à elles aucune différence significative.

## V.6.b Technique VerifyNow®

### - **Corrélations numériques**

La corrélation de Spearman pour ces cinq paramètres de l'hémogramme vis à vis des résultats rendus par le VerifyNow® a donné les résultats suivants (tableau 19).

**Tableau 19 : Corrélations de Spearman entre les résultats du VerifyNow® des patients traités par aspirine et les paramètres de l'hémogramme**

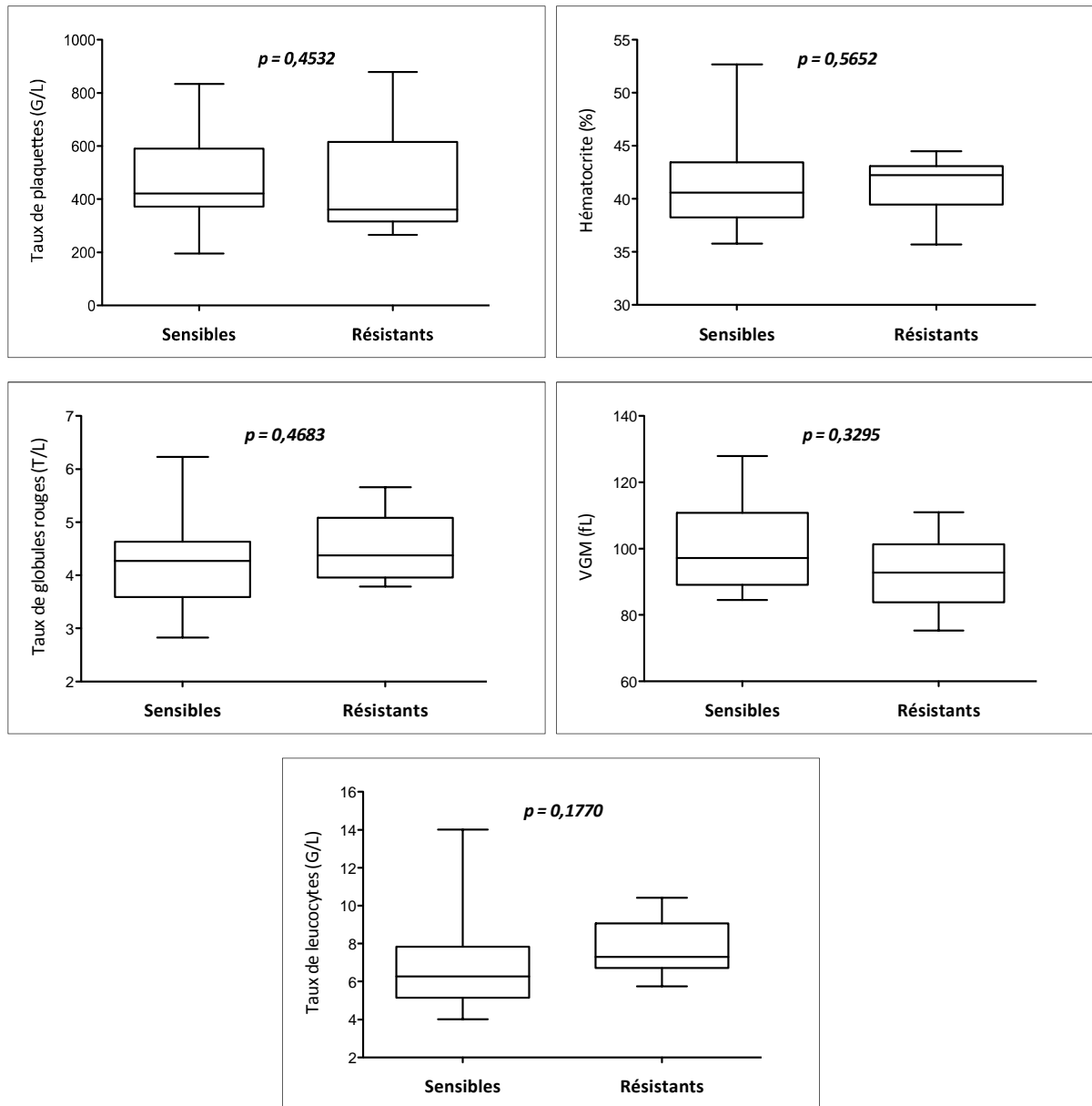
	Taux de plaquettes	Hématocrite	Taux de globules rouges	VGM	Taux de leucocytes
N	31	31	31	31	31
Coefficient de corrélation r	-0,444	0,267	0,043	0,105	0,135
IC <sub>95%</sub> de r	(-0,695 – -0,095)	(0,108 – 0,575)	(-0,326 – 0,401)	(-0,269 – 0,452)	(-0,241 – 0,476)
p-value	<b>0,0124</b>	0,1470	0,8164	0,5733	0,4679

Seul le taux de plaquettes présente une corrélation significative avec un p égal à 0,0124 : il est ici inversement corrélé aux résultats du VerifyNow®.

Le reste des paramètres de l'hémogramme étudiés ne semblent pas être significativement reliés aux résultats du VerifyNow® avec des p égal à 0,1470, 0,8164, 0,5733 et 0,4679 respectivement pour l'hématocrite, le taux de globules rouges, le VGM et le taux de leucocytes.

### - **Comparaison du groupe « Résistant » versus « Sensible » pour chaque paramètre**

Les résultats du VerifyNow® ont permis de créer deux groupes : les « sensibles » avec un résultat < 550 ARU et un effectif de  $n_1 = 25$ , et les « résistants » avec un résultat  $\geq 550$  ARU et un effectif  $n_2 = 6$ . Comme précédemment, les deux populations ont été comparées sur les cinq paramètres étudiés avec un test de Mann-Whitney (cf figure 26).



**Figure 26 : Représentation graphique des populations "sensibles" (< 550 ARU ;  $n_1 = 25$ ) et "résistantes" à l'aspirine ( $\geq 550$  ARU ;  $n_2 = 6$ ) selon la technique VerifyNow<sup>®</sup> pour cinq paramètres de l'hémogramme**

Les deux populations ne montrent aucune différence significative pour les cinq paramètres étudiés avec des p à 0,4532, 0,5652, 0,4683, 0,3295, 0,1770 respectivement pour le taux de plaquettes, l'hématocrite, le taux de globules rouges, le VGM et le taux de leucocytes.

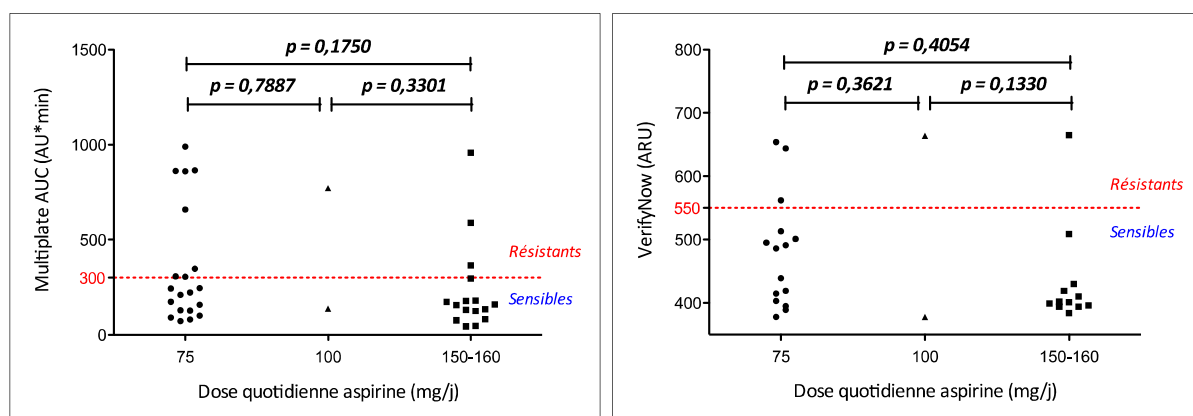


## V.7 Impact de la posologie d'aspirine sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup>

Dans un premier temps, les résultats obtenus dans les deux techniques ont été répartis en fonction de la dose quotidienne d'aspirine prise par le patient. Trois groupes ont ainsi été formés (cf figure 27) :

- le groupe « 75 mg/j » ( $n_1 = 20$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_1' = 15$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- le groupe « 100 mg/j » ( $n_2 = 2$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_2' = 2$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- le groupe « 150-160 mg/j » ( $n_3 = 16$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_3' = 12$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>).

Rappelons que, pour des raisons techniques, le nombre de patients n'est pas le même dans les deux méthodes : 9 données sont manquantes pour le VerifyNow<sup>®</sup>.



**Figure 27 : Répartition des résultats des patients traités par aspirine rendus par le Multiplate<sup>®</sup> (à gauche) et le VerifyNow<sup>®</sup> (à droite) selon la dose quotidienne d'aspirine**

La proportion des résistants à l'aspirine dans chaque population de patients est :

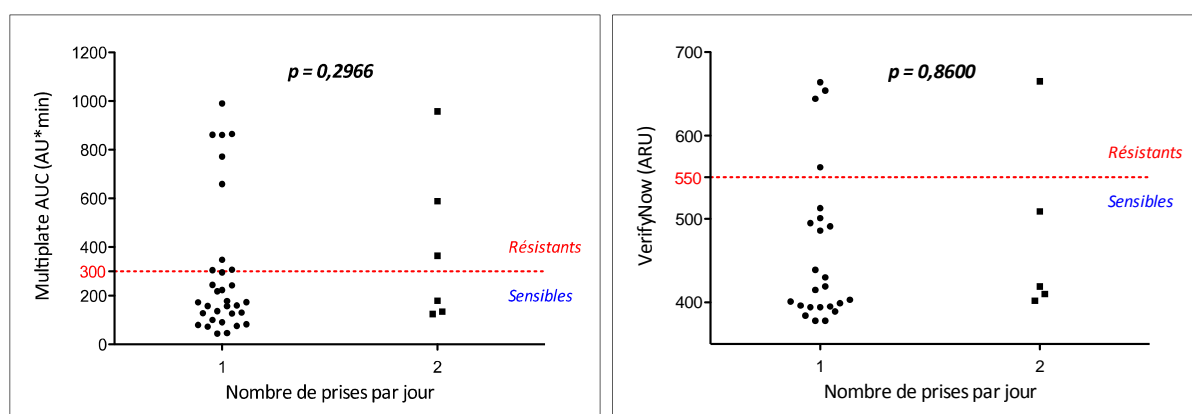
- Multiplate<sup>®</sup> : 40% pour la population « 75 mg/j », 50% pour la population « 100mg/j » et 18,8% pour la population « 150-160 mg/j »,
- VerifyNow<sup>®</sup> : 20% pour la population « 75 mg/j », 50% pour la population « 100mg/j » et 8,3% pour la population « 150-160 mg/j ».

Pour chaque test, la comparaison de la répartition des résistants à l'aspirine dans les trois populations a pu être réalisée deux à deux selon un test de Kruskal-Wallis. Il n'a pas été observé de différence significative entre les trois populations de patients : ni pour la technique Multiplate<sup>®</sup> (p égal à 0,7887, 0,1750 et 0,3301), ni pour la technique VerifyNow<sup>®</sup> (p égale à 0,3621, 0,4054 et 0,1330).

Par ailleurs, en considérant les échantillons comme indépendants, nous avons comparé la répartition des patients sensibles et résistants des deux techniques entre elles pour chaque dose d'aspirine. Il n'a pas été observé de différence significative entre les deux techniques : ni pour la population « 75 mg/j » ( $p = 0,2138$ ), ni pour la population « 100 mg/j » ( $p = 1,000$ ) et ni pour la population « 150-160 mg/j » ( $p = 0,4440$ ).

Dans un second temps, nous avons répartis les résultats de chaque technique en fonction du nombre de prise d'aspirine par jour. Deux groupes ont ainsi été formés (cf figure 28) :

- le groupe « 1 prise/j » ( $n_1 = 32$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_1' = 24$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- le groupe « 2 prises/j » ( $n_2 = 6$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_2' = 5$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>).



**Figure 28 : Répartition des résultats des patients traités par aspirine rendus par le Multiplate<sup>®</sup> (à gauche) et le VerifyNow<sup>®</sup> (à droite) selon le nombre de prise d'aspirine par jour**

Le pourcentage de résistants dans les deux populations est :

- Multiplate<sup>®</sup> : 28,1% pour la population « 1 prise/j » et 50% pour la population « 2 prises/j »,
- VerifyNow<sup>®</sup> : 16,7% pour la population « 1 prise/j » et 20% pour la population « 2 prises/j ».

La comparaison des deux populations par le test de Kruskal-Wallis n'a révélé aucune différence significative de répartition des patients sensibles et résistants à l'aspirine :

ni dans la technique Multiplate<sup>®</sup> ( $p = 0,2966$ ), ni dans la technique VerifyNow<sup>®</sup> ( $p = 0,8600$ ).

La comparaison des deux techniques entre elles a également été réalisée pour chaque nombre de prise par un test de Kruskal-Wallis en considérant les populations comme indépendantes. Aucune différence significative de répartition des patients sensibles et résistants à l'aspirine n'a été observée entre les deux techniques : ni pour la population « 1 prise/j » ( $p = 0,3192$ ), ni pour la population « 2 prises/j » ( $p = 0,3261$ ).

## **V.8 Impact du risque thrombotique du patient sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup>**

L'étude comparative des résultats des tests fonctionnels vis à vis du risque thrombotique des patients s'est faite de trois façons :

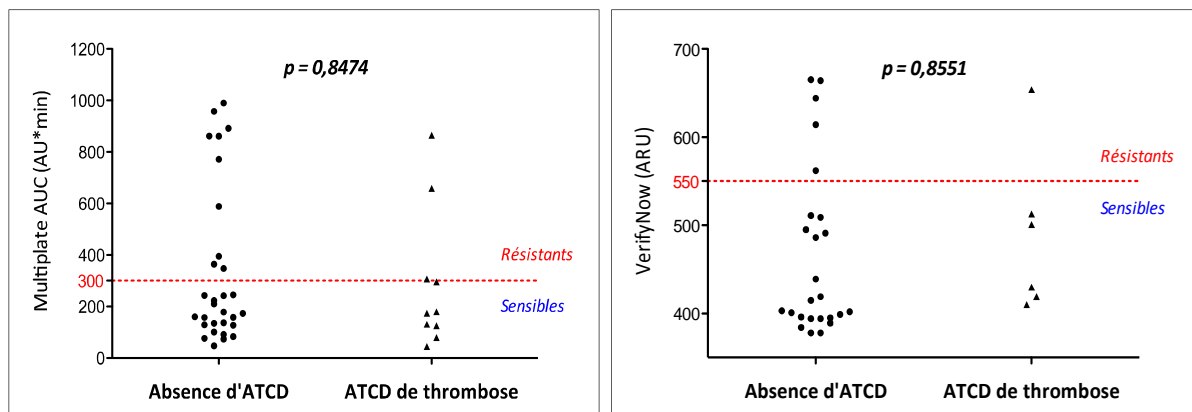
- L'existence ou non d'au moins un antécédent de thrombose,
- La stratification du risque thrombotique consensuelle fonction de l'âge et des antécédents de thrombose,
- Pour les patients TE : la classification selon le score IPSET-thrombosis.

Rappelons que, le nombre des patients dans chaque méthode n'est pas identique du fait des 9 données manquantes du VerifyNow<sup>®</sup>.

### **V.8.a Vis-à-vis de l'existence d'antécédents de thromboses**

Deux groupes ont été formés dans chaque technique selon les antécédents thrombotiques des patients (*cf figure 29*) :

- l'absence d'antécédents catégorise les patients dans le premier groupe ( $n_1 = 30$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_1' = 25$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- l'existence d'un événement thrombotique artériel ou veineux les catégorise dans le deuxième groupe ( $n_2 = 10$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_2' = 6$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>).



**Figure 29 : Répartition des résultats du Multiplate® (à gauche) et du VerifyNow® (à droite) en fonction de l'histoire thrombotique (ATCD : antécédents)**

La proportion des résistants dans chaque groupe est :

- Multiplate® : 33,3 % pour la population sans antécédent et 30,0 % dans la population avec antécédents thrombotique,
- VerifyNow® : 20,0 % pour la population sans antécédent et 16,7 % dans la population avec antécédents thrombotique.

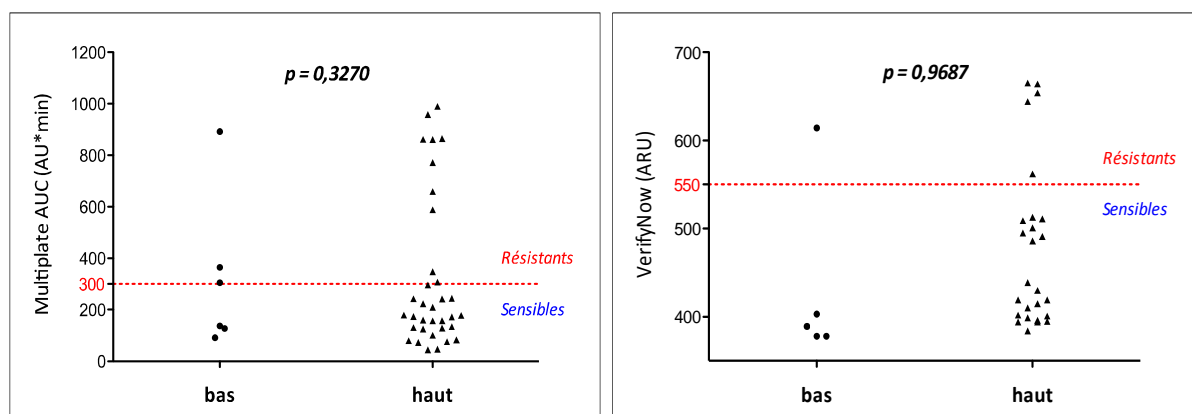
Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis afin, dans un premier temps, de voir s'il existait une différence significative entre la population « absence d'antécédent » et « antécédent thrombotique » dans chaque technique. Il n'a pas été observé de différence significative entre ces deux populations ni dans la technique Multiplate® ( $p = 0,8474$ ), ni dans la technique VerifyNow® ( $p = 0,8551$ ).

Dans un second temps, une comparaison des deux techniques a été réalisée pour chaque population par un test de Kruskal-Wallis en considérant les échantillons comme indépendants. Il n'a pas été observé de différence significative entre les deux techniques : ni pour la population sans antécédents ( $p = 0,2733$ ), ni pour la population avec antécédent thrombotique ( $p = 0,5637$ ).

### **V.8.b Vis-à-vis de la stratification consensuelle du risque thrombotique**

Classiquement, les patients atteints de TE et de PV sont catégorisés en deux groupes de risque thrombotique selon leur âge et l'existence d'antécédents de thromboses<sup>65</sup>. Nous avons donc répartis les patients fonction de cette stratification (cf figure 30) :

- le groupe « bas risque » pour les patients avec un âge inférieur à 60 ans et ne présentant pas d'antécédent thrombotique ( $n_1 = 6$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_1' = 5$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- le groupe « haut risque » pour les patients âgé de plus de 60 ans et/ou présentant au moins un antécédent de thrombose ( $n_2 = 34$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_2' = 26$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>).



**Figure 30 : Répartitions des résultats des patients traités par aspirine du Multiplate<sup>®</sup> (à gauche) et du VerifyNow<sup>®</sup> (à droite) dans les populations "bas risque" et "haut risque" de la stratification du risque thrombotique dans les TE et PV**

La proportion de résistants dans les deux populations est :

- Multiplate<sup>®</sup> : 50% de résistants à l'aspirine dans la population présentant un bas risque et 29,4% pour la population à haut risque,
- VerifyNow<sup>®</sup> : 20% de résistants à l'aspirine dans la population présentant un bas risque et 19,2% pour la population à haut risque

Le test de Kruskal-Wallis qui analyse la répartition des résistants dans chaque technique n'a mis en évidence aucune différence entre les populations « bas risque » et « haut risque » : ni dans la technique Multiplate<sup>®</sup> ( $p = 0,3270$ ), ni dans la technique VerifyNow<sup>®</sup> ( $p = 0,9687$ ).

Par ailleurs, en considérant les échantillons comme indépendants, la comparaison des deux techniques pour chaque population par le test de Kruskal-Wallis n'a mis en évidence aucune différence significative : ni pour la population « bas risque » ( $p = 0,3261$ ), ni pour la population « haut risque » ( $p = 0,3708$ ).

## V.8.c Vis-à-vis du score IPSET-thrombosis

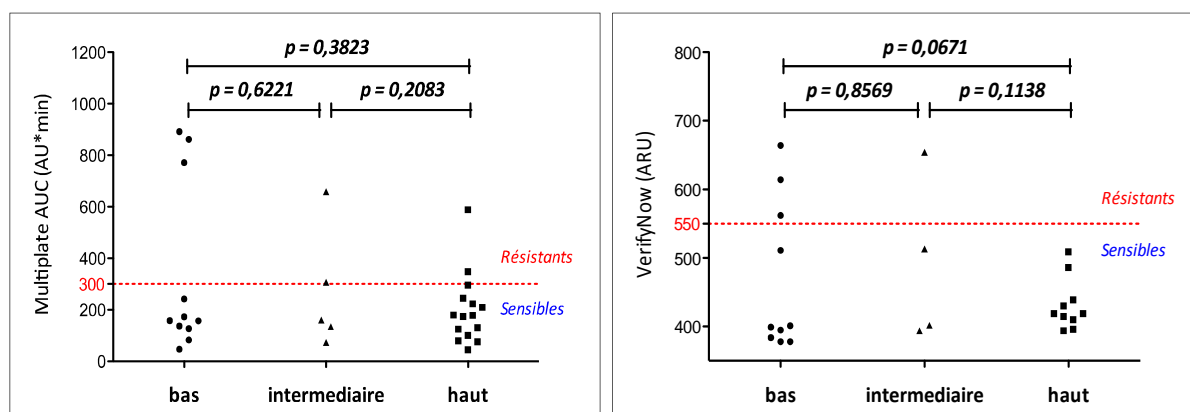
Les patients atteints d'une TE ont pu être classés selon le score IPSET-thrombosis (International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization – essential thrombocythemia) qui catégorise les patients selon l'âge, l'antécédent de thrombose, la présence de la mutation JAK2 V617F et la présence d'au moins un FDRCV parmi l'hypertension artérielle, le diabète et le tabagisme actif<sup>66</sup> (cf tableau 20). Ainsi, trois catégories de risque se dégagent : bas, intermédiaire et haut.

**Tableau 20 : Score IPSET-thrombosis pour la stratification du risque thrombotique chez les patients atteints d'une TE<sup>66</sup>**

Facteur de risque	Points	Score et catégorie
Âge > 60 ans	1	0 à 1 : bas risque
FDRCV	1	
Antécédent(s) de thrombose	2	2 : risque intermédiaire
Présence de la mutation JAK2 V617F	2	≥ 3 : haut risque

Nous avons donc réparti les résultats des patients atteints d'une TE dans chaque technique selon ces trois catégories (cf figure 31):

- le groupe « bas risque » ( $n_1 = 11$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_1' = 10$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- le groupe « risque intermédiaire » ( $n_2 = 5$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_2' = 4$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- et le groupe « haut risque » ( $n_3 = 15$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_3' = 10$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>).



**Figure 31 : Répartitions des résultats des patients TE traités par aspirine rendus par le Multiplate<sup>®</sup> (à gauche) et par le VerifyNow<sup>®</sup> (à droite) selon le score IPSET-thrombosis**

La proportion de résistants à l'aspirine dans chaque catégorie est :

- Multiplate<sup>®</sup> : 37,5% dans la population « bas risque », 40% dans la population « risque intermédiaire », et 13,3% dans la population « haut risque »,
- VerifyNow<sup>®</sup> : 30% dans la population « bas risque », 25% dans la population « risque intermédiaire », et 0% dans la population « haut risque ».

La comparaison de la proportion de patients résistants à l'aspirine dans les trois catégories de risque a été réalisée deux à deux, à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis et pour chaque technique. Il n'a pas été observé de différence significative entre les trois catégories : ni pour la technique Multiplate<sup>®</sup> ( $p$  égal à 0,6221, 0,3823, 0,2083), ni pour la technique VerifyNow<sup>®</sup> ( $p$  égal à 0,8569, 0,0671 et 0,1138). Notons que la comparaison de la population « bas risque » et de la population « haut risque » dans la technique VerifyNow<sup>®</sup> révèle un  $p$  proche de la significativité ( $p = 0,0671$ ).

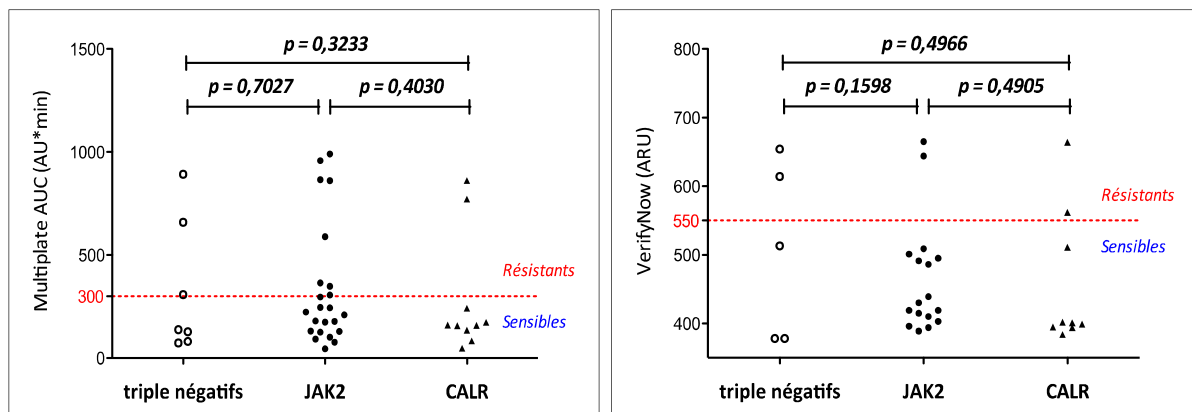
Nous avons également comparé les deux techniques pour chaque catégorie de risque par le test de Kruskal-Wallis en considérant les échantillons comme indépendants. Il n'a pas non plus été observé de différence significative entre les deux techniques : ni pour la population « bas risque » ( $p = 0,8927$ ), ni pour la population « risque intermédiaire » ( $p = 0,6547$ ), et ni pour la population « haut risque » ( $p = 0,2382$ ).

## **V.9 Impact du statut mutationnel sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup>**

Les résultats des patients dans les deux techniques ont été divisés en trois groupes selon leur statut mutationnel (*cf figure 32*) :

- les triple négatifs ( $n_1 = 7$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_1' = 5$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- les JAK2 positifs ( $n_2 = 23$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_2' = 17$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>),
- et les CALR positifs ( $n_3 = 10$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n_3' = 9$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>).

Aucun des patients de notre étude ne présentait de mutation MPL.



**Figure 32 : Répartition des résultats des patients traités par aspirine rendus par le Multiplate® (à gauche) et par le VerifyNow® (à droite) dans les populations triple négatifs, JAK2 positifs et CALR positifs**

La proportion de résistants à l'aspirine dans chaque population est :

- Multiplate® : 42,9% pour les « triple négatifs », 34,8% pour les « JAK2 positifs » et 20% pour les « CALR positifs »,
- VerifyNow® : 40% pour les « triple négatifs », 11,8% pour les « JAK2 positifs » et 22,2% pour les « CALR positifs ».

La comparaison de la proportion de patients résistants dans les trois populations deux à deux par le test de Kruskal-Wallis n'a montré aucune différence significative : ni dans la technique Multiplate® ( $p$  égal à 0,7027, 0,3233 et 0,4030), ni dans la technique VerifyNow® ( $p$  égal à 0,1598, 0,4966 et 0,4905).

En considérant les échantillons comme indépendants, les deux techniques ne montrent pas de différence significative dans la proportion des résistants par le test de Kruskal-Wallis : ni pour la population « triple négatifs » ( $p = 0,9245$ ), ni dans la population « JAK2 positifs » ( $p = 0,1008$ ) et ni dans la population « CALR positifs » ( $p = 0,9081$ ).



## VI. DISCUSSION

---

Notre travail s'est intéressé à une population de SMP Ph- composée de TE et de PV. Comme nous l'avons déjà évoqué, ces patients présentent un risque accru de thrombose. Malgré un traitement par aspirine adapté et bien mené, il n'est pas rare d'observer chez certains de ces patients des accidents thrombotiques. Ce phénomène pourrait être expliqué par une résistance biologique à l'aspirine. Rappelons que cette notion est définie par l'incapacité de l'aspirine à atteindre sa cible (COX-1 préférentiellement) et à inhiber la production de TXA2 (agent pro-agrégant très puissant). De par la complexité des processus physiopathologiques de la thrombose chez ces patients SMP Ph-, la détermination au laboratoire de cette résistance biologique peut s'avérer parfois délicate.

L'objectif de notre étude a donc été d'évaluer, dans nos conditions expérimentales, le test permettant de déterminer la résistance biologique à l'aspirine chez les patients SMP Ph- avec les meilleures performances. Pour cela, nous avons comparé deux tests fonctionnels plaquettaires sur sang total spécifiques de la résistance à l'aspirine : le Multiplate<sup>®</sup> ASPItest (déjà installé au laboratoire) et le VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin test. Pour nous aider dans notre démarche, nous avons confronté nos résultats au dosage d'un métabolite direct de la voie de la COX-1 : le TXB2.

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence une supériorité éventuelle d'une technique par rapport à l'autre vis-à-vis de la résistance biologique vraie à l'aspirine. Nous avons également vérifié si les conditions hémostatiques de l'échantillon avaient un impact sur les deux techniques en étudiant l'influence de différents paramètres de l'hémogramme sur les résultats des deux automates.

Dans un second temps, nous avons étudié le lien qu'il pouvait exister entre résistance à l'aspirine et posologie d'aspirine d'une part, résistance à l'aspirine et histoire thrombotique d'autre part, et enfin résistance à l'aspirine et statut mutationnel. Les deux méthodes seront confrontées dans ces différentes comparaisons.

## **VI.1 Caractéristiques de la population étudiée**

La population recrutée pour notre étude est représentative de la population générale des SMP Ph-. Il s'agit de patients vus en consultation pour un suivi ou un diagnostic de TE ou de PV. L'âge médian (72,5 ans) est conforme aux données de la littérature<sup>45,52</sup>. La répartition des statuts mutationnels en rapport avec la pathologie correspond aux données attendues<sup>48</sup>, malgré une légère distorsion probablement due au faible effectif. Cent pour cent des patients PV sont porteurs de la mutation JAK2 V617F et les patients TE présentent pour 45% d'entre eux une mutation JAK2 V617F, 32% une mutation CALR tandis que 15% des patients sont triple négatifs.

L'histoire thrombotique des sujets de notre étude confirme les données de la littérature<sup>49,53</sup> : au moment du recrutement, 25% des patients ont au moins un antécédent de thrombose, et la moitié de ces 25% comptabilise au moins deux événements thrombotiques spatio-temporels distincts. Par ailleurs, l'impact du statut mutationnel sur l'histoire thrombotique de notre population d'étude confirme également les données de la littérature. En effet, 7 patients sur les 23 porteurs de la mutation JAK2 V617F ont déjà thrombosé (soit 30,4%), tandis qu'aucun des 10 patients porteurs de la mutation CALR n'a d'antécédent thrombotique.

La quasi-totalité des patients recrutés a un traitement cytoréducteur (90%). Ceci s'explique par le fait que notre population d'étude est constituée d'une majorité de patients en suivi et peu de patients au diagnostic.

Les caractéristiques hématologiques des patients sont conformes aux données attendues. Pour les patients TE, comme l'indique la valeur médiane du taux de plaquettes (388 G/L), la thrombocytose reste modérée grâce au traitement cytoréducteur. La population de PV, quant à elle, rapporte un hématicrite moyen dans les valeurs normales (46,4%), témoignant également de l'efficacité des traitements mis en œuvre.

Le VGM est quant à lui plus élevé que la population normale avec une valeur médiane à 98,1 fL. Ceci s'explique par l'administration chez 90% des patients de notre étude de chimiothérapie myélofreinatrice telle que l'hydroxyurée (70% des patients) : elle inhibe la synthèse de l'ADN et induit donc une augmentation du VGM. Enfin, le taux médian de leucocytes reste dans les valeurs normales : seuls 15% des patients ont une leucocytose modérée toujours inférieure à 15 G/L.

## **VI.2 Validation du cut-off pour le dosage du TXB2 sérique et du ratio TXB2/taux de plaquettes**

Dans la littérature, plusieurs équipes ont établi un cut-off pour l'interprétation du dosage du TXB2 sérique qui permet de déterminer la valeur limite prédictive d'un risque thrombotique. Selon les auteurs, ce cut-off varie de 2 à 7,2 ng/mL<sup>29,39,40,67-69</sup>. Il était donc nécessaire de valider une valeur seuil pour notre étude afin de pouvoir interpréter le dosage du TXB2 sérique dans l'évaluation de la réponse à l'aspirine. Nous avons sélectionné une valeur intermédiaire à 3,5 ng/mL rapportée dans deux études<sup>39,40</sup>, que nous avons ensuite validée par la réalisation de dosages sur des sujets sains dépourvus de traitement par aspirine.

Les sérums de 19 sujets sains non traités par aspirine ont été dosés par technique ELISA sur la trousse Thromboxane B2 Express EIA Kit – Monoclonal. Dix-huit d'entre eux ont rapporté un dosage > 3,5 ng/mL, tandis que l'un d'entre eux présentait un dosage très inférieur à cette valeur (1,86 ng/mL). Après interrogatoire, il s'est avéré que ce patient était sous ibuprofène au moment du prélèvement. L'ibuprofène appartient à la famille des AINS et possède une activité pharmacologique anti-COX non sélective, contrairement à l'aspirine qui présente une activité anti-COX-1 préférentielle<sup>20</sup>. Il impacte donc peu la fonction plaquettaire, mais induit une inhibition modérée de la production de TXA2 et donc de TXB2 sérique<sup>70</sup>.

Par ailleurs, d'après le graphique (*figure 17*) la répartition de la population traitée par aspirine (à droite sur le graphique) forme deux groupes distincts bien séparés par le seuil de 3,5 ng/mL :

- les sujets ayant un taux sérique de TXB2 très inférieur à 3,5 ng/mL, dont le taux médian est à 0,33 ng/mL [0,05 ; 0,65]. L'effondrement du taux est caractéristique de la bonne inhibition de la COX-1 : ils sont donc qualifiés de bon-répondeurs (ou « sensibles »).
- les sujets dont les taux sérique de TXB2 sont supérieurs à 3,5 ng/mL qui s'étalent sur une large gamme de valeurs (de 4,62 à 67,74 ng/mL). Ils se situent dans les valeurs de référence de notre population saine dépourvue d'aspirine, et ce malgré une bonne compliance du traitement. Ces sujets peuvent donc être catégorisés comme mauvais répondeurs (ou « résistants ») car possédant des fonctions plaquettaires comparables à la population saine.

**Ainsi, les résultats de cette étude confirment que, dans nos conditions expérimentales, un taux de TXB2 > 3,5 ng/mL est observé pour la totalité de notre population de témoins sains non traités par aspirine. Le cut-off retrouvé dans la littérature à 3,5 ng/mL a donc été retenu pour la suite de notre travail.**

L'élaboration d'un ratio de TXB2 rapporté au taux de plaquettes (TXB2/plaquettes) nous a permis de nous affranchir des valeurs extrêmes de thrombocytose. En effet, près de 50% de notre population d'étude présente un taux de plaquettes supérieur à la normale. La production de TXB2 étant essentiellement d'origine plaquettaire, le taux sérique de TXB2 pourrait donc être influencé par le taux de plaquettes<sup>21</sup>. L'utilisation d'un tel ratio permettra donc de comparer les sujets de cette population en éliminant l'impact éventuel de la numération plaquettaire. Ce ratio sera utilisé dans la suite de l'étude lors des comparaisons des techniques Multiplate® et VérifyNow®. Nous chercherons à savoir si les conclusions de notre étude diffèrent entre les comparaisons avec le TXB2 sérique et celles avec le ratio TXB2/plaquettes. Le ratio TXB2/plaquettes des 19 sujets se répartit de manière identique à la concentration en TXB2 brute, avec une corrélation très élevée ( $r = 0,937$ ,  $p < 0,0001$ ). Il nous a donc été permis de déterminer le cut-off du ratio en miroir avec celui du TXB2 sérique. **Nous retrouvons ainsi une valeur seuil de 10 pg/plaquette pour l'interprétation du ratio TXB2/plaquettes** qui permettra de classer :

- les bon-répondeurs (ou « sensibles ») lorsque le ratio est inférieur à 10 pg/plaquette,
- les mauvais répondeurs (ou « résistants ») lorsque le ratio est supérieur ou égal à 10 pg/plaquette.

### **VI.3 Prévalence de la résistance à l'aspirine dans chaque technique**

Dans un premier temps, nous avons observé les prévalences de patients résistants à l'aspirine dans les trois techniques. Nous avons comparé ces prévalences entre elles pour voir si, au vu du nombre de patients étudiés, il existait une différence significative entre les techniques.

**Les proportions de patients considérés résistants à l'aspirine selon le Multiplate<sup>®</sup> ou le VerifyNow<sup>®</sup> ne sont pas significativement différentes (respectivement 32,5% et 19,4%,  $p = 0,218$ ).** Il semble malgré tout que la prévalence soit plus importante dans la technique Multiplate<sup>®</sup> que dans la technique VerifyNow<sup>®</sup>. En effet, les deux techniques regroupant des effectifs assez faibles et non-équivalents ( $n = 40$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n = 31$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>), le test statistique manque de significativité et il est difficile de conclure sur ce point.

Les données de la littérature sont assez pauvres à ce sujet, mais le même écart a été retrouvé dans une autre étude réalisée en 2010 qui montrait une prévalence de 3% de résistants à l'aspirine dans la technique VerifyNow<sup>®</sup> contre 22,7% dans la technique Multiplate<sup>®</sup><sup>71</sup>.

**La comparaison des prévalences de patients résistants dans la technique Multiplate<sup>®</sup> et le dosage du TXB2 sérique ne montre pas de différence significative (respectivement 32,5% et 18,4%,  $p = 0,157$ ).** Comme précédemment, les prévalences semblent diverger avec une plus forte proportion de patients résistants pour le Multiplate<sup>®</sup>. Encore une fois, le faible effectif de notre population pourrait être responsable du manque de significativité. Il n'a pas été retrouvé de données dans la littérature permettant de comparer ce résultat.

**Enfin, les prévalences de patients résistants à l'aspirine dans la technique VerifyNow<sup>®</sup> et le dosage du TXB2 sérique ne sont pas significativement différentes (respectivement 19,4% et 18,4%,  $p = 0,922$ ).** Au vu des proportions observées, le VerifyNow<sup>®</sup> pourrait apparaître comme la technique la plus proche du dosage biochimique du TXB2 sérique que nous avons choisi comme référence dans notre étude. Le manque de données dans la littérature ne nous a cependant pas permis de comparer ce résultat.

#### **VI.4 Evaluation de la corrélation et de la concordance entre le Multiplate<sup>®</sup> et le VerifyNow<sup>®</sup>**

L'un des objectifs principaux de l'étude était de comparer les deux tests fonctionnels plaquettaires sur sang total dans la détermination de la résistance à l'aspirine sur une population atteinte d'un SMP Ph- (TE ou PV).

#### **VI.4.a Comparaison des techniques Multiplate® et VerifyNow®**

Nous avons dans un premier temps comparé les résultats des deux techniques entre eux. La corrélation de Spearman donne un coefficient  $r$  à 0,773 ( $p < 0,001$ ) : **les valeurs numériques rendues dans les techniques Multiplate® et VerifyNow® sont significativement corrélées**. Par ailleurs, l'étude des concordances donne un Kappa à 0,61 soit un « bon » accord dans l'interprétation des résultats des deux techniques (cf tableau 8). En effet, 83,9% ( $n = 26$ ) des résultats sont concordants. Notons que tous les résultats discordants ( $n = 5$ ) sont rendus résistants par le Multiplate® et sensibles par le VerifyNow®. Néanmoins, le résultat du test statistique de McNemar ne permet pas de confirmer ce déséquilibre de manière significative ( $p = 0,0736$ ), mais semble malgré tout indiquer une tendance vers une « surestimation » par le Multiplate® des patients rendus résistants. Le faible effectif global des échantillons comparés peut être à l'origine de ce manque de significativité.

Les données de la littérature sont pauvres à ce sujet mais l'étude de Grove *et al*<sup>72</sup> réalisée dans les mêmes conditions expérimentales (AA 0,5 mM pour le Multiplate® ASPItest) sur 43 patients ne confirment pas le résultat de la corrélation numérique ( $r = -0,05$ ,  $p > 0,05$ ). En revanche, l'utilisation de l'AA à 0,75 mM pour le Multiplate® ASPItest montrait dans cette même étude une corrélation significative avec le VerifyNow® ( $r = 0,32$ ,  $p < 0,05$ ). Cette divergence nous semble difficile à expliquer au vu de la significativité de nos résultats. L'analyse des concordances que nous avons réalisée n'a quant à elle pas pu être confrontée aux résultats de la littérature faute de données comparables.

#### **VI.4.b Comparaison de chaque technique avec la technique de référence pour notre étude : le dosage du TXB2 sérique**

Dans un second temps chaque technique a été comparée au critère de jugement principal que constitue le dosage du TXB2 sérique. Nous avons ensuite décidé de confirmer ces observations par la comparaison de chaque technique avec le ratio TXB2/plaquettes qui s'affranchit des taux de plaquettes sanguines.

Les corrélations respectives du Multiplate® et du VerifyNow® avec le taux de TXB2 sérique donnent des coefficients  $r = 0,488$  ( $p = 0,0019$ ) et  $r = 0,631$  ( $p < 0,001$ ). **Les**

**valeurs numériques rendues par les techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> sont donc significativement corrélées aux taux de TXB2 sérique.** Le coefficient de Kappa est similaire dans les deux techniques : 0,52 pour le Multiplate<sup>®</sup> contre 0,58 pour le VerifyNow<sup>®</sup>. **L'accord entre l'interprétation de chaque technique et l'interprétation du taux de TXB2 sérique est identique pour le Multiplate<sup>®</sup> et le VerifyNow<sup>®</sup> : il est « moyen » (cf tableau 8).** La proportion des résultats concordants (ou accuracy) est comparable entre les deux techniques (86,2% et 81,6%). Les deux techniques ne montrent donc pas d'écart quant à leurs résultats bruts et leurs interprétations.

Pour aider à la compréhension de nos résultats, nous pouvons apparenter :

- les résultats interprétés « résistants » par le Multiplate<sup>®</sup> ou le VerifyNow<sup>®</sup> et « sensibles » par le taux de TXB2 sérique comme les « faux positifs »,
- les résultats interprétés « sensibles » par le Multiplate<sup>®</sup> ou le VerifyNow<sup>®</sup> et « résistants » par le taux de TXB2 sérique comme les « faux négatifs ».

C'est sur le test de McNemar que l'on observe une différence notable entre la comparaison des deux techniques et le TXB2 sérique. Bien que la proportion des discordances avec le TXB2 sérique ne soient pas très différente pour les deux techniques (18,4% pour le Multiplate<sup>®</sup> et 13,8% pour le VerifyNow<sup>®</sup>), la répartition des discordances semble diverger. Elle est équilibrée entre la technique VerifyNow<sup>®</sup> et le TXB2 sérique ( $p = 1$ ) : il y a autant de faux négatifs ( $n = 2$ ) que de faux positifs ( $n = 2$ ). Bien que non significative ( $p = 0,1306$ ), la répartition des discordances semble davantage déséquilibrée entre le Multiplate<sup>®</sup> et le TXB2 sérique : il y a plus de faux positifs ( $n = 6$ ) que de faux négatifs ( $n = 1$ ). Le taux de TXB2 sérique étant considéré comme la référence pour notre étude, **nous suspectons une surestimation de la résistance biologique à l'aspirine par le Multiplate<sup>®</sup>** qui pourrait être confirmée sur un échantillonnage de patients plus conséquent.

Aucune étude traitée dans ce sens n'a pu être retrouvée dans la littérature. L'étude de Grove *et al*<sup>72</sup> nous a néanmoins permis de comparer nos corrélations numériques vis-à-vis du TXB2 sérique. On y retrouve des résultats similaires aux nôtres pour le VerifyNow<sup>®</sup> ( $r = 0,041$ ,  $p < 0,05$ ), mais des résultats différents pour le Multiplate<sup>®</sup>. Avec un  $r$  à  $-0,39$  ( $p < 0,05$ ), Multiplate<sup>®</sup> et TXB2 sérique y montrent une corrélation significative inverse. Cette constatation semble surprenante au regard de la physiologie plaquettaire et n'a pas été commentée par les auteurs.

L'utilisation du ratio de TXB2/plaquettes à la place du TXB2 sérique nous a permis de nous détacher d'un biais dû à la concentration plaquettaire élevée dans notre population d'étude. Ce ratio n'apporte pas d'information supplémentaire au taux brut de TXB2 sérique. Seul un patient est affecté dans la répartition des concordances : catégorisé en concordant résistant (vrai positif) lors de la comparaison avec le taux brut de TXB2, il se retrouve dans le groupe des faux positifs dans la comparaison avec le ratio TXB2/plaquettes (rendu résistant en Multiplate<sup>®</sup> et sensible par le ratio). Ce patient présentait un taux de plaquettes très élevé (762 G/L) pour un taux de TXB2 relativement proche du cut-off (4,62 ng/mL). Le ratio normalisé l'a donc naturellement catégorisé du côté des bons répondeurs (ou sensibles). La valeur de TXB2 sérique à 4,62 ng/mL est assez proche du seuil mais pourrait malgré tout refléter une inhibition insuffisante de la COX-1. En effet, les autres patients de notre étude présentant des thrombocytoses élevées avaient des taux de TXB2 effondrés. Cette concentration pourrait être révélatrice d'un pool plaquettaire réactif susceptible de propager une activation plaquettaire localement. Catégoriser le patient en « résistant » semble donc être la solution la plus sécurisante en vue d'une adaptation thérapeutique. **L'utilisation des taux de TXB2 sérique bruts semble donc être adaptée à notre population d'étude puisque le ratio ne permet pas d'améliorer l'interprétation de la résistance à l'aspirine par le dosage du TXB2.**

En conclusion, nos résultats montrent que Multiplate<sup>®</sup> ASPItest et VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin test sont des techniques comparables d'un point de vue statistique. Il existe néanmoins un déséquilibre, bien que non significatif, qui indique que le Multiplate<sup>®</sup> classe plus facilement les patients en résistants à l'aspirine que le VerifyNow<sup>®</sup>. La comparaison avec le TXB2 sérique confirme ce constat : le VerifyNow<sup>®</sup> semble plus spécifique de la résistance biologique vraie à l'aspirine que le Multiplate<sup>®</sup>.

Afin de comprendre les raisons de cette tendance, il convient d'étudier les éléments susceptibles d'influencer les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et ceux du VerifyNow<sup>®</sup> (*cf partie VI.6*).



## **VI.5 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> vis-à-vis de la détermination de la résistance biologique à l'aspirine**

Comme nous l'avons évoqué plus tôt, le TXB2 est le métabolite direct du TXA2 : il reflète fidèlement l'activité enzymatique de la COX-1. Ce dosage constitue la référence de la vraie résistance biologique à l'aspirine et nous permet ainsi de déterminer la sensibilité et la spécificité de chaque méthode. Pour cela, l'interprétation de la réponse à l'aspirine par le taux de TXB2 sérique a été considérée comme la référence, et les interprétations des résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup> y ont été confrontées.

**Le Multiplate<sup>®</sup> a une sensibilité pour la détection de la résistance à l'aspirine significativement plus élevée que le VerifyNow<sup>®</sup> (86,7% contre 66,7%,  $p = 0,0015$ ).** La technique Multiplate<sup>®</sup> semble être supérieure dans la détection des patients résistants : elle a une meilleure capacité à éviter les faux négatifs. Il faut néanmoins noter que le faible effectif de résistants à l'aspirine ( $n = 7$  pour la comparaison Multiplate<sup>®</sup>, et  $n = 6$  pour la comparaison VerifyNow<sup>®</sup>) rend notre résultat discutable et ne permet pas d'affirmer une réelle supériorité du Multiplate<sup>®</sup> dans ce cas de figure.

En revanche, **la technique VerifyNow<sup>®</sup> a une spécificité pour la détection de la résistance à l'aspirine significativement plus élevée que le Multiplate<sup>®</sup> (91,3% contre 80,6%,  $p = 0,0231$ ).** Elle semble être meilleure dans la détection des patients sensibles à l'aspirine (ou bons répondeurs) : elle a une meilleure capacité à éviter les faux positifs. Ici, l'effectif des patients sensibles à l'aspirine est plus conséquent ( $n = 31$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n = 23$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>) : la détermination de la spécificité semble donc plus fiable. **Dans nos conditions expérimentales, nos résultats montrent donc que la méthode VerifyNow<sup>®</sup> est plus spécifique de la vraie résistance biologique à l'aspirine que la méthode Multiplate<sup>®</sup>.**

À ce stade, se pose la question du cut-off utilisé pour le Multiplate<sup>®</sup>. Nous pouvons en effet remettre en cause le choix de notre valeur seuil sélectionnée selon les recommandations du fournisseur.

Sur la simple observation de la répartition des valeurs du Multiplate® (cf figure 33), deux populations semblent se distinguer : l'une sensible à l'aspirine (valeurs basses), l'autre résistante à l'aspirine (valeurs plus élevées). Le cut-off de 300 AU\*min coupe pourtant notre premier nuage de point au lieu de se situer entre les deux populations. Il existe en effet un fossé entre le *patient 3* à 364 AU\*min, valeur la plus élevée de notre premier nuage de point, et le *patient 16* à 589 AU\*min, valeur la plus basse du deuxième nuage de point. Par ailleurs, trois valeurs se situent juste au niveau de notre valeur seuil (AUC = 296, 301 et 307 AU\*min). Avec un CV analytique annoncé à 7% par le fournisseur<sup>59</sup>, ces trois valeurs se situent dans une zone grise qui rend l'interprétation difficile.

Plusieurs auteurs ont choisi de déterminer leur propre valeur seuil au cours de leurs études sur des populations de sujets témoins et de patients traités par aspirine. Il est ainsi possible de retrouver dans la littérature des cut-off variant de 200 AU\*min à 760 AU\*min<sup>73-75</sup>. Il n'existe pas de consensus sur la valeur appropriée qui détermine les patients bons et mauvais répondeurs à l'aspirine. À l'avenir, il serait donc opportun de réévaluer ce cut-off sur un effectif important de sujets sains et de patients SMP Ph- traités par aspirine.

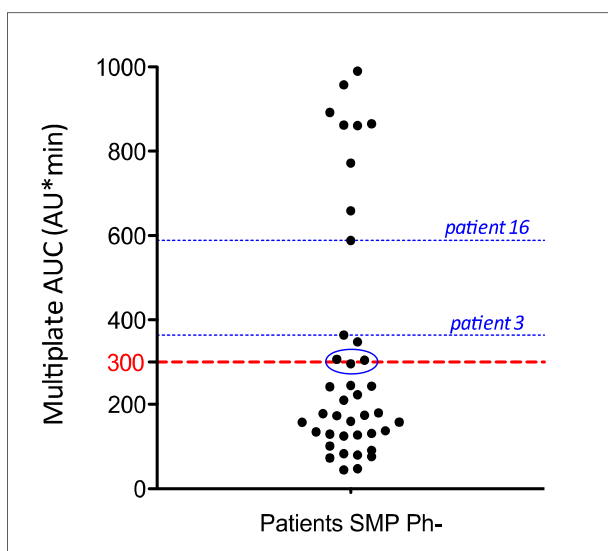


Figure 33 : Répartition graphique des résultats Multiplate® des patients traités par aspirine

## **VI.6 Influence des paramètres de l'hémogramme sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup>**

L'étude des concordances entre les deux techniques nous a montré que le Multiplate<sup>®</sup> ASPItest et le VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin test ne rendaient pas des interprétations parfaitement comparables. Nous avons donc cherché à savoir si les paramètres de l'hémogramme pouvaient impacter les mesures de chaque méthode. Rappelons qu'après l'ajout de l'agoniste spécifique (AA), le Multiplate<sup>®</sup> mesure une variation d'impédance entre deux électrodes, tandis que le VerifyNow<sup>®</sup> détecte une variation de transmission lumineuse. Quatre axes principaux ont été exploités dans notre étude : la thrombocytose, la viscosité sanguine (hématocrite et taux de globules rouges), la macrocytose (VGM), et la leucocytose.

### **VI.6.a Etude de l'influence de la thrombocytose**

Les principes de mesure utilisés par les deux techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> nous ont fait craindre une influence du taux plaquettaire sur la mesure du signal. Le nombre élevé de plaquettes dans la cellule de mesure pourrait en effet faciliter la formation passive d'agrégats plaquettaires et ainsi augmenter artificiellement le signal mesuré. Ceci pourrait ainsi être à l'origine d'une surestimation des résultats.

**La numération plaquettaire n'a montré aucune influence sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup>.** En effet, l'étude de la corrélation numérique ( $r = 0,108$ ,  $p = 0,5057$ ) et la comparaison des taux médians de plaquettes entre les groupes de patients « sensibles » et « résistants » ( $p = 0,6133$ ) ont démontré que la thrombocytose n'avait pas d'effet sur la mesure du signal par impédance. L'augmentation du nombre de plaquettes dans le milieu réactionnel ne semble donc pas entraver l'évaluation de la réponse à l'aspirine par le Multiplate<sup>®</sup>.

**En revanche, les résultats du VerifyNow<sup>®</sup> et le taux de plaquettes sont significativement inversement corrélés ( $r = -0,444$ ,  $p = 0,0124$ ).** Ce résultat semble indiquer que plus le taux de plaquettes est élevé, plus le résultat du VerifyNow<sup>®</sup> tend vers des valeurs basses. Seule la corrélation numérique a montré cette tendance. La comparaison des taux médians plaquettaires des groupes de patients « sensibles » et « résistants » déterminés par le VerifyNow<sup>®</sup> n'a en effet montré aucune différence significative ( $p = 0,4532$ ). Notons cependant que l'effectif

du groupe de patients « résistants » évalués par le VerifyNow<sup>®</sup> est très faible (n = 6) comparé à celui du groupe de patients « sensibles » (n = 25), ce qui peut remettre en cause la fiabilité de cette comparaison.

Une des raisons potentielles expliquant cette tendance réside dans le principe de mesure du VerifyNow<sup>®</sup>. Rappelons que cette méthode optique turbidimétrique détecte l'agrégation plaquettaire par une augmentation de la transmission lumineuse soit une diminution de la turbidité. La mesure peut donc dans ce cas de figure souffrir d'une turbidité excessive due au nombre de plaquettes élevé dans le milieu réactionnel, ce qui pourrait entraver la détection des agrégats. Nos résultats suggèrent donc qu'**une thrombocytose élevée pourrait être à l'origine d'une sous-évaluation de la résistance à l'aspirine par le VerifyNow<sup>®</sup>.**

La confrontation aux données de la littérature a été délicate dans la mesure où les études menées dans ce sens ont été réalisées sur des populations de patients avec un taux de plaquettes ne dépassant pas 400 G/L. Nous avons malgré tout tenté de comparer nos résultats avec les données disponibles.

Pour le Multiplate<sup>®</sup>, des résultats identiques aux nôtres ont été retrouvés dans l'étude de Labuz-Rozzak *et al*<sup>62</sup>. L'étude s'était intéressée aux deux populations de patients « bon répondeurs » (AUC < 300 AU\*min) et « mauvais répondeurs » (AUC ≥ 300 AU\*min) et n'avait pas montré de différence significative entre les taux médians de plaquettes de ces deux groupes.

En revanche, plusieurs études<sup>76-78</sup> ont montré des résultats divergents aux nôtres : taux de plaquettes et AUC y montraient une corrélation positive. Nous émettons cependant la critique que dans ces études, ce sont les taux bas de plaquettes qui influencent les résultats du Multiplate<sup>®</sup> vers des valeurs basses. Les résultats des tests fonctionnels plaquettaires sont, de manière générale, très impactés par les valeurs basses de plaquettes. Il leur est en effet impossible de différencier thrombopénie et thrombopathie. Ceci rend donc ces études difficilement comparables à nos résultats.

Pour le VerifyNow<sup>®</sup>, ces mêmes études ont également apportées des résultats divergents aux nôtres car le taux de plaquettes et les résultats d'agrégation y affichaient une corrélation positive. La même critique que précédemment sur les taux bas de plaquettes peut ici être formulée pour expliquer cet écart. Encore une fois, le

manque de données sur une population de patients comparables (avec thrombocytose) rend la confrontation délicate.

Notons que le choix des anticoagulants contenus dans les tubes de prélèvements (hirudine ou citrate de sodium) n'a pas permis d'expliquer les divergences observées entre ces études et nos résultats.

#### **VI.6.b Etude de la viscosité sanguine : influence de l'hématocrite et du taux de globules rouges**

Nous avons également suspecté une interférence due à la viscosité sanguine sur la mesure du signal. L'hématocrite et le taux de globules rouges sont les deux paramètres de l'hémogramme reflétant la masse globulaire et donc la viscosité sanguine. Nous avons ainsi envisagé qu'une élévation de la masse sanguine pourrait causer une augmentation de l'impédance entre les deux électrodes de mesure (pour le Multiplate®) et une diminution de la transmission lumineuse (pour le VerifyNow®). Notre hypothèse impliquerait donc qu'une viscosité sanguine élevée serait à l'origine d'une surestimation des résultats du Multiplate® et une sous-estimation des résultats du VerifyNow®.

**Nos résultats suggèrent que la viscosité sanguine a un impact sur les résultats du Multiplate® : plus la masse sanguine est élevée et plus les résultats d'agrégation tendent vers des valeurs hautes.** On observe une corrélation numérique positive des résultats du Multiplate® avec l'hématocrite et avec le taux de globules rouges ( $p$  respectivement à 0,0004 et 0,0024). Les médianes de l'hématocrite et du taux de globules rouges sont significativement plus élevées dans le groupe de patients « résistants » que dans le groupe de patients « sensibles » à l'aspirine ( $p$  respectivement à 0,0032 et 0,0075). Ainsi, nous pouvons suspecter que plus la masse sanguine entre les deux électrodes est importante, et plus la valeur rendue par le Multiplate® a tendance à s'élever.

Il est intéressant d'observer qu'*a contrario* **nos résultats n'ont montré aucune association entre les résultats du VerifyNow® et ces deux paramètres.** Il n'existe pas de corrélation numérique significative ( $p$  respectivement à 0,1470 et 0,8164), et les comparaisons des médianes de l'hématocrite et du taux de globules rouges des groupes de patients « sensibles » et « résistants » n'ont montré aucune différence

significative (p respectivement à 0,5652 et 0,4683). Il n'existe donc pas d'interférence de la masse sanguine sur la mesure optique turbidimétrique du VerifyNow®.

**Ainsi, le Multiplate® semble être plus sensible à son environnement rhéologique que le VerifyNow®.** Les conditions hémostatiques de l'échantillon de sang total semblent en effet interférer sur la mesure par impédancemétrie et ainsi surestimer les résultats d'agrégation plaquettaire.

L'analyse des données de la littérature a encore une fois été délicate car aucune des études menées sur les automates Multiplate® et VerifyNow® n'ont été réalisées sur des populations comparables à la nôtre. Dans tous les cas, les patients testés y ont des valeurs d'hématocrite et de taux de globules rouges dans les valeurs normales.

Une seule étude confirme l'un de nos résultats quant à l'association entre hématocrite et résultats du Multiplate®. L'équipe de Labuz-Rozak *et al*<sup>62</sup> montre en effet un hématocrite médian significativement plus élevé dans la population avec un AUC  $\geq 300$  AU\*min (mauvais répondeurs) que dans la population avec un AUC  $< 300$  AU\*min (bons répondeurs).

Les autres auteurs<sup>76,78</sup> n'ont malheureusement apporté que des résultats divergents aux nôtres. Ainsi, aucune corrélation n'y a été observée entre ces deux paramètres de l'hémogramme et les résultats du Multiplate®. Quant au VerifyNow®, l'équipe de Würtz *et al*<sup>76</sup> montre une corrélation inverse entre les valeurs d'hématocrite et les résultats d'agrégation plaquettaires (p < 0,0001). Ceci semblerait alimenter notre hypothèse initiale : une masse sanguine élevée pourrait interférer sur la mesure turbidimétrique du VerifyNow® et ainsi sous-estimer le résultat.

Les sujets de notre étude ayant des caractéristiques hématologiques particulières, il est difficile d'établir des comparaisons robustes avec la littérature sur ce point. Les résultats de notre étude pourraient révéler des informations nouvelles quant à l'influence de la masse sanguine sur la mesure d'agrégation plaquettaire par impédancemétrie (Multiplate®) chez les patients SMP Ph-. Une nouvelle étude sur un effectif plus important de patients SMP Ph- permettrait de confirmer ces conclusions.

### **VI.6.c Etude de l'influence du volume globulaire moyen (VGM)**

Les sujets de notre étude ont un VGM au-dessus des valeurs normales du fait du traitement cytoréducteur. Nous avons émis l'hypothèse qu'une macrocytose pourrait être responsable d'un encombrement stérique des électrodes. Les cellules de taille augmentée pourraient entraver la progression des plaquettes dans le milieu réactionnel et empêcher l'accès aux électrodes (pour le Multiplate<sup>®</sup>) ou les billes recouvertes de fibrinogène (pour le VerifyNow<sup>®</sup>). Un VGM élevé serait ainsi responsable d'une sous-estimation des résultats d'agrégation plaquettaire.

**Nos résultats ne montrent aucune association entre le VGM et les résultats d'agrégation des techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup>.** Les corrélations numériques ont été non significatives ( $p$  à 0,3117 et 0,5733). La comparaison des groupes de patients « sensibles » et « résistants » à l'aspirine dans les deux techniques n'a pas non plus montré de différence significative vis-à-vis du VGM ( $p$  à 0,3333 et 0,3295). Sans pouvoir en tirer de conclusion évidente, nous pouvons noter que la valeur médiane du VGM semble être légèrement inférieure pour les patients déterminés « résistants », et ce dans les deux techniques. Une augmentation importante du volume globulaire pourrait être à l'origine d'une sous-estimation des résultats d'agrégation, mais le faible effectif de notre population ne nous permet pas d'affirmer un tel constat.

Les données de la littérature concernant le lien entre VGM et résultats du Multiplate<sup>®</sup> ou du VerifyNow<sup>®</sup> sont inexistantes. Notre étude conclut donc à ce jour à l'absence d'association entre le VGM et les résultats des deux méthodes étudiées. Le volume des cellules du milieu réactionnel ne semble pas interférer sur la mesure du signal.

### **VI.6.d Etude de l'influence de la leucocytose**

Comme nous l'avons mentionné dans les généralités, les globules blancs contiennent des substances réactives capables d'initier l'agrégation plaquettaire localement (enzymes protéolytiques, ATPases, espèces réactives de l'oxygène,...)<sup>54</sup>. Les sujets de notre étude (SMP Ph-) présentent des anomalies qualitatives des leucocytes avec pour conséquence une augmentation de la libération de ces substances pro-coagulantes. Nous avons donc cherché à savoir si un taux élevé de

leucocytes pouvait augmenter les résultats d'agrégation plaquettaire par une initiation locale de l'hémostase primaire.

**Notre étude a montré que les résultats du Multiplate<sup>®</sup> sont influencés par la leucocytose.** Ils sont positivement et significativement corrélés au taux de leucocytes ( $p = 0,0024$ ). Le taux médian de leucocytes est significativement plus élevée dans le groupe de patients « résistants » que dans le groupe de patients « sensibles » à l'aspirine ( $p = 0,0389$ ). Ainsi, plus le taux de leucocyte est élevé dans l'échantillon, et plus les résultats d'agrégation plaquettaire tendent vers des valeurs hautes.

En revanche, **nos résultats n'ont montré aucun lien entre les résultats du VerifyNow<sup>®</sup> et la leucocytose.** L'étude de la corrélation numérique ( $p = 0,4679$ ) et la comparaison des taux médians de leucocytes des deux groupes ( $p = 0,1770$ ) sont unanimes dans ce constat. La mesure d'agrégation plaquettaire par le VerifyNow<sup>®</sup> semble donc être insensible à la leucocytose environnante.

Deux études<sup>76,78</sup> ont confirmé nos résultats vis-à-vis du Multiplate<sup>®</sup>, tandis que l'étude de Labuz-Rosazak *et al*<sup>62</sup> ne montre aucun lien entre résultats du Multiplate<sup>®</sup> et taux de leucocytes.

Les données de la littérature ne nous ont pas permis de confirmer nos résultats concernant le VerifyNow<sup>®</sup>. Les équipes de Würtz *et al*<sup>76</sup> et Rubak *et al*<sup>78</sup> ont effectivement montré un lien significatif entre la leucocytose et les résultats du VerifyNow<sup>®</sup>.

Encore une fois, les sujets des études mentionnées plus haut ne possèdent pas les mêmes caractéristiques que notre population d'étude. Même si une confirmation sur des effectifs de patients plus importants pourrait être intéressante, nos résultats montrent qu'une nouvelle fois, le Multiplate<sup>®</sup> semble être la seule technique à être influencée par un autre paramètre de l'hémodogramme : la leucocytose.



### **VI.6.e Interprétation des tests de détection de la résistance à l'aspirine par rapport à la physiopathologie des SMP Ph- : quelle méthode est la plus adaptée à cette population de patients ?**

Selon les résultats de notre étude, les deux tests fonctionnels plaquettaires sur sang total (Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup>) ne sont pas parfaitement concordants. Le VerifyNow<sup>®</sup> semble être plus spécifique que le Multiplate<sup>®</sup> pour l'exploration de la voie de la COX-1 car mieux associé au taux de TXB2 sérique. Rappelons que la définition entendue dans notre travail par « résistance biologique à l'aspirine » correspond à une incapacité de la molécule à inhiber sa cible, la COX-1. De plus, cette technique ne semble pas sensible aux différents paramètres hématologiques. Nos résultats indiquent donc que le VerifyNow<sup>®</sup> est la technique la plus spécifique de la vraie résistance biologique à l'aspirine et probablement la plus robuste car moins impactée par les variations des conditions environnementales.

Le Multiplate<sup>®</sup>, quant à lui, est plus sensible à son environnement global. Il semble être davantage influencé par un certain nombre de paramètres de l'hémogramme (hématocrite, taux de globules rouges et leucocytose) et paraît ainsi « surestimer » la résistance biologique vraie à l'aspirine.

L'analyse des données cliniques disponibles dans la littérature nous a apporté des informations intéressantes à ce sujet. Les études cliniques ont récemment élaboré des facteurs prédictifs de thrombose en plus de l'âge (> 60 ans) et des antécédents de thromboses (artérielles ou veineuses). L'étude de Carobbio *et al*<sup>79</sup> a démontré qu'il existe un lien entre une leucocytose supérieure à 11 G/L ( $p = 0,04$  ; HR = 1,7), la présence de la mutation JAK2 V617F ( $p = 0,009$  ; HR = 2,6) et la survenue d'événements thrombotiques. Dans cette même étude, aucune association n'a été mise en évidence entre la numération plaquettaire et la survenue d'événements thrombotiques. Il y est même démontré qu'un taux de plaquettes supérieur à 1000 G/L est associé à un bas risque de thrombose artérielle ( $p = 0,007$  ; HR = 0,4). Rappelons d'ailleurs que des thrombocytoses extrêmes (supérieures à 1000 G/L) peuvent s'associer à un risque hémorragique par Willebrand acquis<sup>48</sup>.

Par ailleurs, les conditions rhéologiques anormales rencontrées dans les PV ont également un rôle dans la pathogénicité des thromboses<sup>52,54,65</sup>. Bien que l'étude prospective ECLAP (*European collaboration study on low-dose aspirin in polycythemia*) n'ait mis en évidence aucun lien probant entre hématocrite et survenue de thrombose<sup>54,80</sup>, le rôle de la masse sanguine dans la génération de

thrombus est bien connu<sup>54,55</sup>. Ces différents phénomènes physiopathologiques ont été détaillés dans les généralités (*cf partie II.4.c*).

Le parallélisme avec ces données cliniques nous amène à formuler une hypothèse : au delà de l'évaluation de la résistance biologique à l'aspirine, le Multiplate<sup>®</sup> pourrait permettre de détecter un risque thrombotique chez le patient. En effet, si la viscosité sanguine et la leucocytose jouent un rôle majeur dans le risque thrombotique, nous retrouvons la même influence de ces paramètres dans les résultats du Multiplate<sup>®</sup>.

Nous pourrions ici introduire un nouveau concept de « pseudo résistance » biologique à l'aspirine. Le Multiplate<sup>®</sup> ASPItest est spécifique de la voie de la COX-1 car il utilise l'acide arachidonique comme agoniste : il s'agit donc bien d'une évaluation de la vraie résistance biologique à l'aspirine. Néanmoins, ses résultats sont affectés par les variations des paramètres de l'hémogramme, d'où le terme de « pseudo résistance ». Il interprète ainsi la réponse des plaquettes à l'aspirine au sein de leur environnement natif, et pourrait mieux se rapprocher des conditions réelles *in vivo*. Chez les patients SMP Ph-, le Multiplate<sup>®</sup> pourrait apparaître comme la technique la plus adaptée dans l'évaluation de la réponse à l'aspirine car elle tient compte des caractéristiques hématologiques complexes que présentent ces sujets. Cette technique pourrait apporter une information complémentaire à celle du VerifyNow<sup>®</sup> en reflétant le risque thrombotique encouru par le patient.

Pour confirmer cette hypothèse, une étude prospective sur le long terme permettrait de recenser la survenue d'évènements thrombotiques chez les patients SMP Ph-, et de vérifier si les sujets préalablement étiquetés résistants par la méthode Multiplate<sup>®</sup> sont plus à même de thromboser que les patients sensibles.

## **VI.7 Impact de la posologie d'aspirine sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup>**

Nous avons regardé le lien qu'il pouvait exister entre la posologie d'aspirine administrée et la résistance à l'aspirine dans les deux techniques. Il est intéressant de savoir si cette résistance est dose dépendante : autrement dit, une faible dose d'aspirine (75 mg/j) est-elle en lien avec une résistance biologique plus importante qu'une dose plus élevée (150-160 mg/j). Au regard du trop faible effectif de patients à la dose de 100 mg/j, nous n'avons pas pu réaliser de comparaison fiable. Seules les

posologies de 75 mg/j et 150-160 mg/j ont été prises en compte dans l'analyse de notre travail.

Par ailleurs, nous avons cherché à évaluer l'impact du fractionnement des doses sur la résistance à l'aspirine : un étalement de la dose quotidienne d'aspirine sur le nyctémère a-t-il tendance à induire moins de résistance à l'aspirine ? Pour cela, les proportions de patients résistants à l'aspirine ont été comparées en fonction du nombre de prise par jour (1 ou 2), et ce pour les deux techniques de notre travail.

Selon les résultats de notre étude, **les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup> ne sont pas impactés par la dose d'aspirine quotidienne.** Les proportions de patients résistants à l'aspirine dans les populations à 75 mg/j et à 150-160 mg/j n'étaient pas significativement différentes pour la technique Multiplate<sup>®</sup> ( $p = 0,1750$ ) et pour la technique VerifyNow<sup>®</sup> ( $p = 0,4054$ ). Par ailleurs, les deux techniques n'ont pas montré de répartitions significativement différentes des populations de patients sensibles et résistants ( $p = 0,2138$  pour 75 mg/j,  $p = 0,444$  pour 150-160 mg/j). Ainsi, pour les deux techniques étudiées, la résistance à l'aspirine ne semble pas être dose-dépendante.

Par ailleurs, **les proportions de patients résistants à l'aspirine déterminés par les deux techniques n'ont montré aucune différence significative entre la population à une prise et la population à deux prises par jour** ( $p = 0,2966$  pour le Multiplate<sup>®</sup>,  $p = 0,8600$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>). Les deux techniques ne donnaient pas de répartitions de patients résistants à l'aspirine significativement différentes ( $p = 0,3192$  et  $p = 0,3261$ ). Le fractionnement de la dose quotidienne en deux prises par jour ne semble donc pas, selon nos résultats, induire moins de résistance à l'aspirine qu'avec une seule prise par jour. Cependant, le faible effectif de la population à deux prises par jour ( $n = 6$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $n = 5$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>) ne permet pas de tirer des conclusions fiables. Il serait opportun de reconduire la même analyse sur des effectifs de patients plus importants pour confirmer ce constat.

L'analyse des données de la littérature ne confirme pas les résultats de notre travail. Une étude récente réalisée par Ajzenberg *et al*<sup>81</sup> sur 77 sujets atteints d'un SMP Ph- traités par aspirine montre l'influence de la dose sur la résistance biologique à l'aspirine déterminée par technique LTA : 23% des patients traités par 75 mg/j d'aspirine sont qualifiés résistants, contre 8% pour les patients recevant une dose de 100 mg/j. Une élévation de la dose de 75 à 100 mg/j sur 7 jours abolit la résistance à

l'aspirine chez ces patients. Pour les patients résistants ayant une dose initiale à 100 mg/j, seul le fractionnement de la dose à 75 mg deux fois par jour permet d'obtenir une bonne réponse à l'aspirine.

D'autre part, l'étude de Pascale *et al*<sup>82</sup> réalisée sur 41 patients atteints de TE et traités par aspirine apporte des informations similaires. Le dosage du TXB2 sérique rapporte un taux très inférieur pour le groupe traité par 100 mg d'aspirine deux fois par jour que pour le groupe traité par 200 mg une fois par jour ( $p < 0,05$ ). Cette étude a également montré chez ces patients qu'il y avait une reprise de l'activité de la COX-1 à distance de la prise d'aspirine. Ceci serait donc en faveur d'une meilleure réponse à l'aspirine en fractionnant la dose en deux prises par jour pour les patients TE. Cette équipe est d'ailleurs allée plus loin dans la compréhension du mécanisme physiopathologique de la résistance à l'aspirine chez les patients TE : en analysant le lien entre le taux de plaquettes immatures (IPF) et le taux sérique de TXB2 elle montre que le turnover plaquettaire accru chez ces patients est responsable d'une surproduction de COX-1.

Notons par ailleurs que Tefferi *et al*<sup>48</sup> recommandent désormais en cas de mauvaise réponse à l'aspirine, le fractionnement des doses en deux prises par jour, voire la modification du traitement par la prescription de clopidogrel seul ou associé à l'aspirine.

Au vu des données de la littérature, les résultats de ce versant de l'étude nous semblent contradictoires. En effet, les faibles effectifs des groupes comparés dans notre étude sont certainement responsables du manque de significativité de l'influence de la posologie sur la résistance à l'aspirine. Qui plus est, notons que les comparaisons ont été établies sur des groupes indépendants de patients différents. Une étude prospective sur une même population de patients traités à des posologies d'aspirine différentes entrecoupées de période de « wash-out » nous permettrait peut-être d'obtenir des résultats similaires aux études précédemment énoncées.

Nous pouvons néanmoins émettre l'hypothèse qu'il n'existe pas de dose d'aspirine idéale prédéfinie dans la prévention du risque thrombotique dans le cadre des SMP Ph-. Il conviendrait donc d'évaluer pour chaque patient l'efficacité du traitement par l'un des tests de détection de la résistance à l'aspirine.

## **VI.8 Impact du risque thrombotique sur la résistance à l'aspirine déterminée par les techniques Multiplate® et VerifyNow®**

Notre étude s'est intéressée au lien qu'il pouvait exister entre résistance à l'aspirine et risque thrombotique. La résistance à l'aspirine est en effet un concept controversé car, si de nombreuses études ont été menées à ce sujet, la pertinence clinique n'a pas toujours été mise en évidence.

Pour ce versant de l'étude, deux aspects ont été abordés :

- Nous avons tout d'abord étudié l'influence d'antécédents thrombotiques sur les résultats : un patient ayant déjà thrombosé est-il plus susceptible d'être catégorisé résistant à l'aspirine qu'un patient sans antécédent ?
- Ensuite, nous avons utilisé les classifications consensuelles permettant de catégoriser les patients selon leur risque thrombotique. Deux scores pronostiques ont été étudiés : la stratification consensuelle selon Tefferi *et al*<sup>48</sup> pour l'ensemble des patients de l'étude, et le score IPSET-thrombosis uniquement pour les patients TE. Un patient considéré *a priori* comme ayant un haut risque thrombotique est-il plus exposé à la résistance à l'aspirine qu'un patient classé en bas risque ?

Si 25% des patients seulement ont au moins un antécédent de thrombose à leur actif, 85% d'entre eux sont catégorisés en haut risque thrombotique de par leur âge supérieur à 60 ans.

**Les résultats de notre étude n'ont pas montré de proportion significativement plus élevée de patients résistants à l'aspirine parmi les sujets ayant au moins un antécédent de thrombose.** La comparaison des proportions de patients résistants des deux groupes de patients (sans et avec antécédents) n'a montré aucune différence significative dans les techniques Multiplate® ( $p = 0,8474$ ) et VerifyNow® ( $p = 0,8551$ ). D'autre part, les deux techniques comparées deux à deux n'ont pas donné de résultats différents ( $p = 0,2733$  pour le groupe sans antécédent,  $p = 0,5637$  pour le groupe avec antécédents). Au regard de ces résultats, l'existence d'antécédents thrombotiques chez le patient ne semble pas le prédisposer à une mauvaise réponse au traitement par aspirine.

Par ailleurs, **la proportion de patients résistants à l'aspirine chez les sujets catégorisés en haut risque thrombotique (selon la classification de Tefferi ou le**

**score IPSET-thrombosis) n'est pas significativement plus élevée que chez les sujets classés en bas risque.** La proportion des sujets résistants classés selon la stratification de Tefferi n'était pas significativement différente entre les populations haut risque et bas risque ( $p = 0,3270$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $p = 0,9687$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>). Il en est de même pour la classification selon le score IPSET-thrombosis ( $p = 0,3823$  pour le Multiplate<sup>®</sup> et  $p = 0,0671$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>). Enfin, la comparaison des deux techniques ne montre pas de répartitions différentes des patients résistants. Ainsi, les patients à haut risque thrombotique ne semblent pas être plus sujets à la résistance à l'aspirine que les patients à bas risque, quelque soit la technique employée.

Il ne semble donc pas exister, selon nos résultats, d'association entre la résistance biologique à l'aspirine et le risque thrombotique clinique. De nombreuses études divergent en effet sur la pertinence clinique de tels tests<sup>41-43</sup>.

Cependant, notre étude ne permet pas de conclure en l'absence de lien entre la résistance à l'aspirine et la survenue d'accident thrombotique. D'une part, le faible effectif de patients dans certaines catégories de risque peut être à l'origine d'un manque de significativité de nos résultats. D'autre part, l'aspect statique de notre étude présente un frein à l'extrapolation de nos conclusions. Une étude prospective au moyen d'un suivi régulier à long terme des patients étiquetés résistants permettrait de recenser les événements thrombotiques futurs. Il serait ainsi possible d'analyser l'impact de la résistance biologique à l'aspirine sur la survenue *a posteriori* d'accident thrombotique.

## **VI.9 Impact du statut mutationnel sur les résultats du Multiplate<sup>®</sup> et du VerifyNow<sup>®</sup>**

La mutation JAK2 V617F est reconnue comme étant prédictive d'un risque thrombotique<sup>54,79</sup>, tandis que la mutation CALR est apparue comme étant de bon pronostic vis à vis de ce risque notamment chez les sujets jeunes<sup>83</sup>. Il nous a donc semblé intéressant de vérifier si notre étude mettait en évidence une proportion plus élevée de résistance biologique à l'aspirine parmi les patients porteurs de la mutation JAK2 V617F. Et de la même façon, cette proportion pourrait-elle être moins importante parmi les patients porteurs de la mutation CALR.

Aucun des sujets de notre population n'était porteur de la mutation MPL. La proportion de mutation JAK2 V617F représentait plus de la moitié de notre population d'étude avec 57,5% (n = 23), alors que 25% (n = 10) étaient porteurs de la mutation CALR. Le reste de la population ne présentait aucune des trois mutations (17,5% ; n = 7).

**Les résultats de notre étude n'ont pas mis en évidence de différences significatives de répartition des patients résistants à l'aspirine entre la population porteuse de la mutation JAK2 V617F, celle porteuse de la mutation CALR, et la population triple négative.** La population porteuse de la mutation JAK2 ne présentait pas de proportion significativement plus élevée de patients résistants que la population triple négative ( $p = 0,7027$  pour le Multiplate<sup>®</sup>,  $p = 0,1598$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>). La population porteuse de la mutation CALR ne présentait pas de proportion significativement moins élevée de patients résistants que la population triple négative ( $p = 0,3233$  pour le Multiplate<sup>®</sup>,  $p = 0,4966$  pour le VerifyNow<sup>®</sup>). Par ailleurs, les deux techniques étudiées ne montraient pas de résultats significativement différents. Selon ces résultats, aucun statut mutationnel ne semble être prédictif de la résistance biologique à l'aspirine.

Les données de la littérature à ce sujet sont inexistantes. Il ne nous a donc pas été possible de confronter nos résultats. Cependant, malgré un effectif acceptable pour les sujets porteurs de la mutation JAK2 V617F, les contingents des patients porteurs d'un gène CALR muté ou triple-négatif sont trop faibles pour effectuer des comparaisons robustes. Cette analyse mériterait donc d'être reconduite sur des effectifs de patients plus importants afin d'apporter des éléments de réponse fiables à cette question. Il pourrait alors être intéressant d'y associer l'étude de la quantité d'allèle muté JAK2 V617F : une proportion supérieure à 50% indique la présence d'une mutation homozygote, qui semblerait être prédictive d'un risque thrombotique plus élevé chez les patients atteints de PV<sup>65</sup>.

## VII. CONCLUSION

---

Les patients SMP Ph- présentent un risque accru de thrombose. En dépit d'un traitement antiagrégant bien conduit, des accidents thromboemboliques peuvent survenir chez certains de ces patients. La résistance biologique à l'aspirine pourrait en partie expliquer cet échec thérapeutique. Les méthodes Multiplate<sup>®</sup> ASPItest et VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin test sont deux tests d'agrégation plaquettaire sur sang total permettant l'évaluation de la résistance biologique à l'aspirine au moyen d'un même agoniste spécifique de la voie de la COX-1 : l'acide arachidonique. Elles se différencient par leur principe de mesure basé sur l'impédancemétrie pour le Multiplate<sup>®</sup> et la turbidimétrie pour le VerifyNow<sup>®</sup>. L'interprétation de ces tests dans la détermination de la résistance à l'aspirine peut néanmoins être délicate, en particulier chez les patients SMP Ph-. En effet, ces patients présentent des conditions hémorhéologiques particulières pouvant influencer le résultat de ces techniques. Notre étude avait donc pour but d'évaluer ces deux méthodes d'évaluation de la résistance à l'aspirine chez les patients SMP Ph-.

Malgré des résultats numériquement corrélés, notre étude a montré qu'il existait des discordances dans l'interprétation de techniques Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup>. La confrontation de ces résultats avec le dosage du TXB2 sérique a apporté des informations intéressantes : le VerifyNow<sup>®</sup> est plus spécifique de la vraie résistance biologique à l'aspirine que le Multiplate<sup>®</sup>. Par ailleurs, le Multiplate<sup>®</sup> s'est montré plus sensible à son environnement local que le VerifyNow<sup>®</sup> : en effet, la viscosité sanguine et la leucocytose semblent être responsables d'une surévaluation de la résistance à l'aspirine par le Multiplate<sup>®</sup>. Ainsi, chacune de ces deux techniques apportent des informations différentes mais complémentaires. Alors que le VerifyNow<sup>®</sup> détecte la résistance intrinsèque des plaquettes à l'aspirine, le Multiplate<sup>®</sup> évalue la réponse des plaquettes à l'aspirine en intégrant les paramètres de leur environnement natif. Il conviendrait donc de déterminer *a priori* l'information recherchée pour réaliser le test adéquat.

Certaines données de notre travail restent à démontrer sur des cohortes de patients plus importantes. En effet, nos résultats n'ont pas montré d'influence de la posologie d'aspirine, du risque thrombotique ou du statut mutationnel sur la résistance à l'aspirine au sein de notre population d'étude.



Les perspectives futures de ce travail sont multiples. Il conviendrait désormais de comparer la population de patients SMP Ph- sous aspirine à une population sous aspirine pour une cause cardiovasculaire autre. Il sera alors intéressant d'observer :

- s'il existe une « surestimation » des résultats du Multiplate<sup>®</sup> par rapport au VerifyNow<sup>®</sup> dans la population sous aspirine hors SMP Ph-,
- si la prévalence de patients résistants à l'aspirine est plus importante dans la population SMP Ph- que dans la population cardiovasculaire,
- d'analyser les causes potentielles de résistance à l'aspirine chez les patients SMP Ph- : turnover plaquettaire (comparaison de la résistance avec l'IPF), synthèse de COX *de novo* (comparaison des taux de TXB2 sur un même échantillon à des temps différents après la prise d'aspirine) ou hyperréactivité plaquettaire basale (utilisation du test PFA-100<sup>®</sup>) ?

Par ailleurs, comme précédemment cité, une étude prospective sur les patients SMP Ph- pourrait apporter des informations complémentaires à notre travail concernant l'impact de la posologie d'aspirine sur la résistance biologique à l'aspirine d'une part, et concernant l'implication clinique de ce résultat biologique vis-à-vis de la survenue d'accidents thromboemboliques d'autre part.

En conclusion, même si la résistance biologique à l'aspirine apparaît comme une idée séduisante pour expliquer un échec thérapeutique chez les patients SMP Ph-, la concordance clinico-biologique est encore à démontrer sur des études de plus grande ampleur. Une analyse prospective sur une cohorte de patients SMP Ph- permettra d'établir la pertinence des résultats biologiques de la résistance à l'aspirine dans la détermination de la résistance clinique à l'aspirine.

## VIII. BIBLIOGRAPHIE

---

1. Cramer-Bordé E. Production plaquettaire : régulation cellulaire et moléculaire. *EMC - Hématologie* 3, 1–10 (2008).
2. Deutsch VR & Tomer A. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br. J. Haematol.* 161, 778–793 (2013).
3. Bellucci S. Physiologie plaquettaire. *EMC - Hématologie*. 13-000-F-10 (1991).
4. Wendling F *et al.* cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 369, 571–574 (1994).
5. Choi ES *et al.* The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis. *Br. J. Haematol.* 95, 227–233 (1996).
6. Kaushansky K *et al.* Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3234–3238 (1995).
7. Bellucci S. Physiologie de l'hémostase primaire. *EMC - Hématologie*. 13-019-A-05, 9p (2002).
8. Jandrot-Perrus M & Nurden P. Des fonctions plaquettaires aux implications thérapeutiques. *Rev. Médecine Interne* 31, S319–S323 (2010).
9. Jobin F. L'hémostase. *Presses Université Laval* (1995).
10. Clemetson KJ & Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 86, 189–197 (2001).
11. Barnes MJ, Knight CG & Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr. Opin. Hematol.* 5, 314–320 (1998).
12. Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb. Haemost.* 86, 298–307 (2001).
13. Hechler B & Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal.* 7, 293–303 (2011).
14. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost.* 86, 222–232 (2001).
15. Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X & Le Breton GC. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell. Signal.* 16, 521–533 (2004).
16. Hanson J. Conception, synthèse et évaluation pharmacologique de nitrobenzènesulfonylurées et sulfonylcyanoguanidines en tant qu'antagonistes des récepteurs au thromboxane A2. Thèse de doctorat en sciences biomédicales et pharmaceutiques, direction Dogne JM & Pirotte B, Université de Liège, (2007).
17. Kudo I & Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 3–58 (2002).
18. Jouzeau JY, Daouphars M, Benani A & Netter P. Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroenterol Clin Biol.* 28, C7-C17 (2004).
19. Chen CYK, Poole EM, Ulrich CM, Kulmacz RJ & Wang LH. Functional analysis of human thromboxane synthase polymorphic variants. *Pharmacogenet. Genomics* 22, 653–658 (2012).
20. Viel E, Ripart J & Eledjam JJ. Pharmacologie des anti-inflammatoires non stéroïdiens et indications pour l'analgésie postopératoire. *SFAR Conférences*

*D'actualisation* 42, 323–334 (2000).

21. Reny JL *et al.* Le concept de « résistance » à l'aspirine : mécanismes et pertinence clinique. *Rev. Médecine Interne* 30, 1020–1029 (2009).
22. Perneby C, Wallén NH, Rooney C, Fitzgerald D & Hjemdahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thromb. Haemost.* 95, 652–658 (2006).
23. Hedegaard SS *et al.* Optical platelet aggregation versus thromboxane metabolites in healthy individuals and patients with stable coronary artery disease after low-dose aspirin administration. *Thromb. Res.* 124, 96–100 (2009).
24. Lecompte T & Toussaint-Hacquard M. Inhibiteurs du fonctionnement plaquettaire. *EMC - Hématologie* 1, 1–12 (2006).
25. Nurich A. Antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS). UFR Sciences pharmaceutiques Victor-Segalen Bordeaux 2 (2009).
26. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324, 71–86 (2002).
27. Antithrombotic Trialists' Collaboration *et al.* Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease : collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 373, 1849–1860 (2009).
28. HAS & ANSM. Bon usage des agents antiplaquettaires. Juin 2012. *J. Eur. Urgences Réanimation* 24, 180–186 (2012).
29. Cattaneo M. High on-treatment platelet reactivity – definition and measurement. *Thromb. Haemost.* 109, 792–798 (2013).
30. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs : molecular mechanisms and laboratory detection. *J. Thromb. Haemost. JTH* 5 Suppl 1, 230–237 (2007).
31. Faraday N *et al.* Heritability of platelet responsiveness to aspirin in activation pathways directly and indirectly related to cyclooxygenase-1. *Circulation* 115, 2490–2496 (2007).
32. Cracowski JL. Les isoprostanes : un rôle physiopathologique potentiel en pathologie vasculaire. *Rev. Médecine Interne* 25, 459–463 (2004).
33. Catella-Lawson F *et al.* Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N. Engl. J. Med.* 345, 1809–1817 (2001).
34. Evangelista V *et al.* De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ. Res.* 98, 593–595 (2006).
35. Fontana P & Reny JL. Pharmacogénétique et médicaments antiplaquettaires. *Rev. Médecine Interne* 26, 725–732 (2005).
36. Grove EL. Antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. *Dan Med J.* 59(9):B4506 (2012).
37. Madsen EH, Schmidt EB, Gehr N, Johannesen NL & Kristensen SR. Testing aspirin resistance using the platelet function analyzer-100: some methodological caveats and considerations. *J. Thromb. Haemost.* 6, 386–388 (2008).
38. Lordkipanidzé M *et al.* A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 28, 1702–1708 (2007).
39. Santos MT *et al.* Residual platelet thromboxane A<sub>2</sub> and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with

- vascular disease. *J. Thromb. Haemost.* 6, 615–621 (2008).
40. Valles J *et al.* TXA2 synthesis and COX1-independent platelet reactivity in aspirin-treated patients soon after acute cerebral stroke or transient ischaemic attack. *Thromb. Res.* 132, 211–216 (2013).
  41. Snoep JD, Hovens MMC, Eikenboom JCJ, 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.* 167, 1593–1599 (2007).
  42. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS & Buchanan MR. Aspirin ‘resistance’ and risk of cardiovascular morbidity : systematic review and meta-analysis. *BMJ* 336, 195–198 (2008).
  43. Reny JL *et al.* Antiplatelet drug response status does not predict recurrent ischemic events in stable cardiovascular patients: results of the Antiplatelet Drug Resistances and Ischemic Events study. *Circulation* 125, 3201–3210 (2012).
  44. Swerdlow SH *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition (2008).
  45. Costello R *et al.* Thrombocythémie essentielle. *EMC - Hématologie* 8, 1–11 (2013).
  46. Landgren O *et al.* Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* 112, 2199–2204 (2008).
  47. Brière J. Thrombocythémie essentielle. Critères du diagnostic. Stratification pronostique. Ébauche de stratégie thérapeutique. *EMC - Hématologie* 1, 1–19 (2006).
  48. Tefferi A & Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia : 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 90, 162–173 (2015).
  49. Barbui T *et al.* Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 3179–3184 (2011).
  50. Harrison CN *et al.* Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* 353, 33–45 (2005).
  51. Haute Autorité de Santé. JAKAVI (ruxolitinib), Avis de la commission de transparence (09/01/2013).
  52. Najman A. Maladie de Vaquez. *EMC - Hématologie* 5, 1–14 (2010).
  53. Tefferi A *et al.* Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 27, 1874–1881 (2013).
  54. Barbui T, Finazzi G & Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood* 122, 2176–2184 (2013).
  55. Adams BD, Baker R, Lopez JA & Spencer S. Myeloproliferative disorders and the hyperviscosity syndrome. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 24, 585–602 (2010).
  56. Afshar-Kharghan V & Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr. Opin. Hematol.* 13, 34–39 (2006).
  57. Trappenburg MC *et al.* Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* 94,

911–918 (2009).

58. Tintillier-Collin V, Cambier N, Bourgeois-Petit E, Rose C, Forzy G, Demory JL, Charpentier A. Elevated circulating platelet-derived microparticles in Ph1 negative chronic myeloproliferative disorders. ASH annual meeting. Abstract 1906 (2009).

59. Roche Diagnostics®, Multiplate® ASPItest : Fiche technique révisée en 2015.

60. Von Pape KW *et al.* Control of aspirin effect in chronic cardiovascular patients using two whole blood platelet function assays. PFA-100 and Multiplate. *Haemostaseologie* 27, 155–160; 161–162 (2007).

61. Ibrahim O, Maskon O, Darinah N, Raymond AA & Rahman MM. Aspirin resistance in patients with acute coronary events: risk factors and prevalence as determined by whole blood multiple electrode aggregometry. *Pak. J. Med. Sci.* 29, 1319–1322 (2013).

62. Łabuz-Roszak B, Pierzchała K, Niewiadomska E, Skrzypek M & Machowska-Majchrzak A. Searching for factors associated with resistance to acetylsalicylic acid used for secondary prevention of stroke. *Arch. Med. Sci.* 1, 106–114 (2015).

63. Accumetrics®, VerifyNow® Aspirin Test : Fiche technique révisée en 2011.

64. Cayman Chemicals® Thromboxane B2 Express EIA Kit - Monoclonal (ref 10004023) : Fiche technique révisée en 2014.

65. Vannucchi AM & Barbui T. Thrombocytosis and Thrombosis. *ASH Educ. Program Book* 2007, 363–370 (2007).

66. Barbui T *et al.* Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* 120, 5128–5133; quiz 5252 (2012).

67. Seidel H, Rahman MM & Scharf RE. Monitoring of antiplatelet therapy. *Hämostaseologie* 31, 41–51 (2011).

68. Temperilli F *et al.* Arachidonic acid-stimulated platelet tests : Identification of patients less sensitive to aspirin treatment. *Platelets.* 1–5 (2015).

69. Postula M *et al.* Association of plasma concentrations of salicylic acid and high on ASA platelet reactivity in type 2 diabetes patients. *Cardiol. J.* 20, (2013).

70. Van Hecken A *et al.* Comparative Inhibitory Activity of Rofecoxib, Meloxicam, Diclofenac, Ibuprofen, and Naproxen on COX-2 versus COX-1 in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 40, 1109–1120 (2000).

71. Woo KS *et al.* Determination of the Prevalence of Aspirin and Clopidogrel Resistances in Patients with Coronary Artery Disease by using Various Platelet-function Tests. *Korean J. Lab. Med.* 30, 460 (2010).

72. Grove EL *et al.* A comparison of platelet function tests and thromboxane metabolites to evaluate aspirin response in healthy individuals and patients with coronary artery disease: *Thromb. Haemost.* 103, 1245–1253 (2010).

73. Ulehlova J *et al.* The assessment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry. *Int. J. Lab. Hematol.* 33, 305–309 (2011).

74. Consuegra Sanchez L. Assessment of high on-treatment platelet reactivity in patients with ischemic heart disease : concordance between the Multiplate and VerifyNow assays. *J. Thromb. Haemost.* 379

75. Ibrahim O *et al.* Evaluation of Aspirin and Clopidogrel resistance in patients with Acute Coronary Syndrome by using Adenosine Diphosphate Test and Aspirin

Test. *Pak. J. Med. Sci.* 29, (2012).

76. Würtz M, Hvas AM, Kristensen SD & Grove EL. Platelet aggregation is dependent on platelet count in patients with coronary artery disease. *Thromb. Res.* 129, 56–61 (2012).

77. Hanke AA *et al.* Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *Eur. J. Med. Res.* 15, 214–219 (2010).

78. Rubak P, Villadsen K & Hvas AM. Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thromb. Res.* 130, 420–423 (2012).

79. Carobbio A *et al.* Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood* 117, 5857–5859 (2011).

80. Finazzi G. A prospective analysis of thrombotic events in the European collaboration study on low-dose aspirin in polycythemia (ECLAP). *Pathol. Biol.* 52, 285–288 (2004).

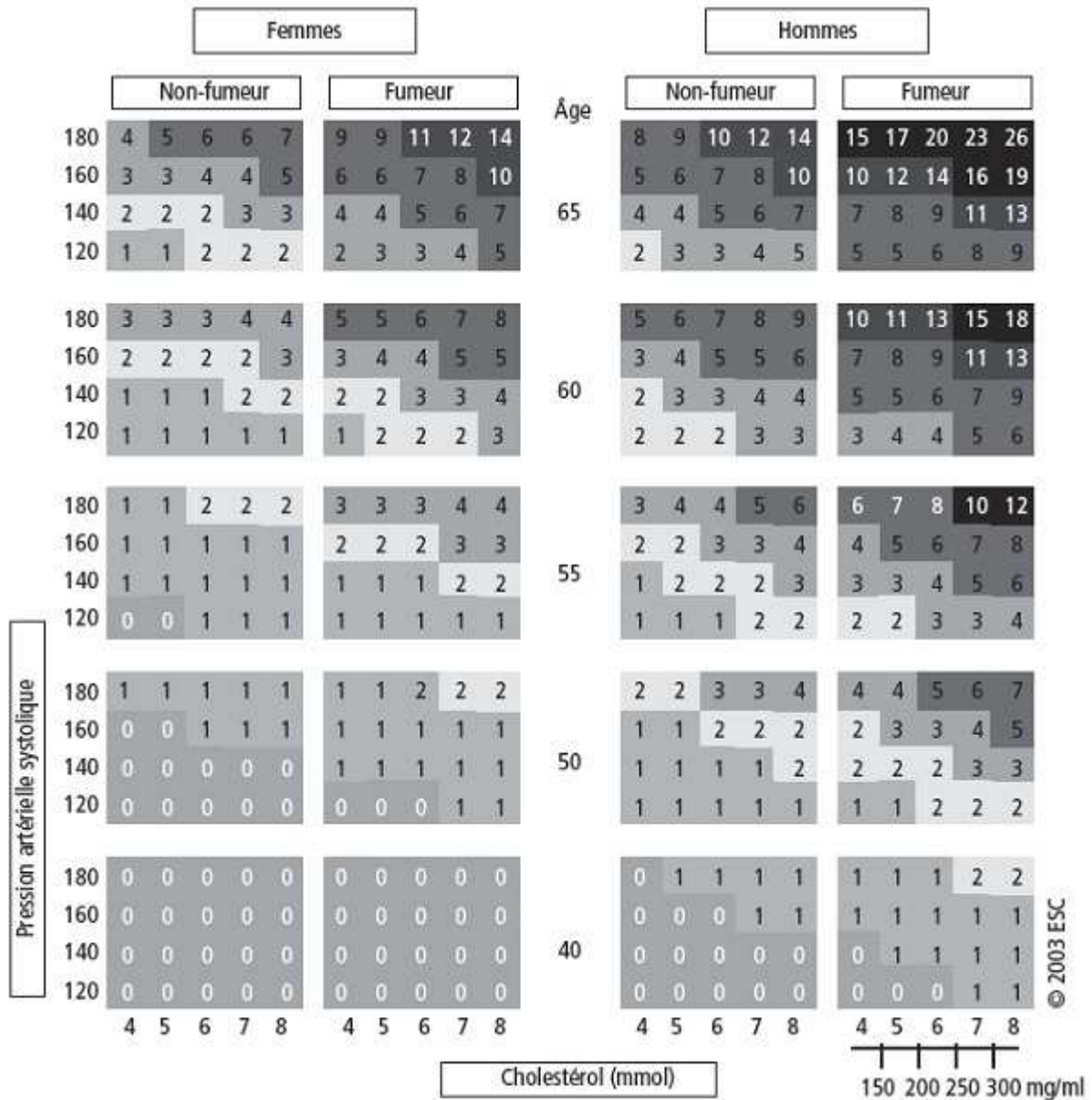
81. Ajzenberg N, Faille D, Huisse MG & Cung AH. Aspirin in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms : What is the optimal dose? *56th ASH annual meeting and exposition, San Fransisco, CA.* 6-9 dec 2014.

82. Pascale S *et al.* Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. *Blood* 119, 3595–3603 (2012).

83. Gangat N *et al.* Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia : prognostic interaction with age and thrombosis history. *Eur. J. Haematol.* 94, 31–36 (2015).

# IX. ANNEXES

**Annexe 1 : Table SCORE pour l'Europe du Sud : risque cardiovasculaire fatal à 10 ans (%) en fonction du sexe, de l'âge, du tabagisme, de la pression artérielle systolique et de la cholestérolémie totale<sup>28</sup>.**



## Annexe 2 : Tableau des données cliniques des sujets de l'étude

	sexe	Age	Pathologie	Statut mutationnel	Traitement cytoréducteur	Existence d'antécédents de thromboses	Nombre d'événements thrombotiques	Stratification du risque thrombotique	Stratification du risque selon le score IPSET-thrombosis (TE)
Patient 1	H	78	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	haut
Patient 2	F	77	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	oui	2	haut	haut
Patient 3	F	42	PV	JAK2 V617F	Non	non	0	bas	
Patient 4	F	86	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	oui	2	haut	haut
Patient 5	F	77	TE	Triple négatif	hydroxyurée	non	0	haut	intermédiaire
Patient 6	H	57	TE	Triple négatif	IFN- $\alpha$ pégylé	oui	>3	haut	haut
Patient 7	H	68	PV	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	
Patient 8	H	62	TE	CALR	hydroxyurée	non	0	haut	bas
Patient 9	F	86	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	oui	1	haut	haut
Patient 10	F	54	TE	Triple négatif	hydroxyurée	oui	1	haut	intermédiaire
Patient 11	F	76	TE	CALR	pipobroman	non	0	haut	intermédiaire
Patient 12	F	64	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	haut
Patient 13	F	78	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	oui	1	haut	haut
Patient 14	F	82	TE	JAK2 V617F	pipobroman	non	0	haut	haut
Patient 15	H	74	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	haut
Patient 16	F	73	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	haut
Patient 17	H	63	TE	CALR	anagrélide	non	0	haut	bas
Patient 18	H	78	TE	CALR	anagrélide	non	0	haut	bas
Patient 19	F	66	TE	CALR	hydroxyurée	non	0	haut	bas
Patient 20	H	76	TE	CALR	anagrélide	non	0	haut	bas
Patient 21	H	78	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	haut
Patient 22	F	77	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	oui	2	haut	haut
Patient 23	H	66	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	haut
Patient 24	F	41	PV	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	bas	
Patient 25	F	51	TE	Triple négatif	Non	non	0	bas	bas
Patient 26	F	66	TE	CALR	hydroxyurée	non	0	haut	bas
Patient 27	F	40	TE	Triple négatif	Non	non	0	bas	bas
Patient 28	F	23	TE	Triple négatif	Non	non	0	bas	bas
Patient 29	H	76	TE	CALR	anagrélide	non	0	haut	bas
Patient 30	F	78	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	oui	1	haut	haut
Patient 31	F	81	PV	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	
Patient 32	F	72	PV	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	
Patient 33	H	81	PV	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	
Patient 34	F	78	PV	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	
Patient 35	F	54	TE	Triple négatif	hydroxyurée	oui	1	haut	intermédiaire
Patient 36	H	47	PV	JAK2 V617F	pipobroman	non	0	bas	
Patient 37	F	66	TE	CALR	hydroxyurée	non	0	haut	bas
Patient 38	F	64	TE	JAK2 V617F	hydroxyurée	non	0	haut	haut
Patient 39	H	63	TE	CALR	hydroxyurée	non	0	haut	intermédiaire
Patient 40	H	86	PV	JAK2 V617F	hydroxyurée	oui	2	haut	



**Annexe 3 : Tableau des données biologiques de l'hémogramme des sujets de l'étude**

	Taux de leucocytes (G/L)	Taux de globules rouges (T/L)	Hématocrite (%)	Hémoglobine (g/dL)	VGM (fL)	Taux de plaquettes (G/L)
Patient 1	8,1	4,23	43	14	101,7	1003
Patient 2	2,8	2,35	28	9,8	117,9	290
Patient 3	9,58	4,89	48,6	16,1	99,4	948
Patient 4	5,91	4	42,7	14,3	106,8	396
Patient 5	4,3	2,69	34	11,3	126	365
Patient 6	6,3	3,94	35	12,1	88,6	263
Patient 7	8,85	5,46	50,1	16,8	91,8	762
Patient 8	4,48	3,36	41,3	14,7	122,9	288
Patient 9	5,74	3,17	33,1	10,6	104,4	581
Patient 10	5,76	4,89	42,4	14,1	86,7	266
Patient 11	6,27	4	40,6	13,3	101,5	552
Patient 12	4,64	4,51	38,1	11,5	84,5	388
Patient 13	4,02	2,83	35,8	12,1	126,5	360
Patient 14	7,26	3,93	40,9	12,9	104,1	381
Patient 15	4,47	3,55	42	14,1	118,3	326
Patient 16	5,75	3,23	39,2	12,3	121,4	424
Patient 17	7,04	3,79	35,7	11,3	94,2	335
Patient 18	7,48	4,92	43,8	13,9	89	464
Patient 19	8,19	4,27	38,3	12,4	89,7	834
Patient 20	7,44	4,29	42,1	13,5	98,1	333
Patient 21	10,26	3,5	40,8	13,2	116,6	373
Patient 22	5,52	3,63	38,1	11,9	105	422
Patient 23	7	4,9	48,5	16,2	99	370
Patient 24	6,68	4,43	46	14,4	103,8	755
Patient 25	11,91	4,63	41,2	13,3	89	567
Patient 26	6,69	4,16	38,2	12,1	91,8	805
Patient 27	8,61	4,46	40,7	12,8	91,3	528
Patient 28	6,18	4,36	38,9	12,9	89,2	621
Patient 29	7,04	4,08	40	13	98	395
Patient 30	4,9	2,83	36,2	12,4	127,9	342
Patient 31	7,18	4,01	44,5	14,3	111	879
Patient 32	10,43	5,66	42,6	12,5	75,3	388
Patient 33	6,11	4,64	45,1	14,5	97,2	196
Patient 34	10,8	6,23	52,7	15,1	84,6	382
Patient 35	5,73	4,92	43,1	14,2	87,6	268
Patient 36	4,05	3,26	38,5	13,3	118,1	476
Patient 37	4,71	3,81	36,2	11,8	95	373
Patient 38	5,42	4,6	39,7	12,1	86,3	466
Patient 39	10,73	4,56	41,4	14,8	90,8	614
Patient 40	14,01	5,21	49,9	16,1	95,8	798
Moyenne	6,96	4,15	40,9	13,3	100,7	489,4
Ecart-type	2,40	0,83	5,0	1,6	13,6	208,5
Médiane	6,49	4,20	40,9	13,3	98,1	395,5
Interquartiles	[5,50 - 8,12]	[3,61 - 4,63]	[38,2 - 43,0]	[12,1 - 14,3]	[89,6 - 107,9]	[355,5 - 589,3]

**Annexe 4 : Tableau des données concernant le traitement par aspirine et les tests d'évaluation de la résistance à l'aspirine**

	Dose quotidienne d'aspirine (mg/j)	Nombre de prises par jour	Taux de TXB2 sérique (ng/mL)	Ratio TXB2/plaquettes	Multiplate® AUC (AU*min)	VerifyNow® (ARU)
Patient 1	75	1	0,89	0,89	101	
Patient 2	160	1	0,33	1,15	45	
Patient 3	150	2	1,46	1,54	364	
Patient 4	75	1	1,47	3,72	174	
Patient 5	75	1	0,82	2,24	73	
Patient 6	75	1	0,18	0,67	80	
Patient 7	75	1	4,62	6,06	861	
Patient 8	160	1	0,52	1,79	83	
Patient 9	160	1	0,64	1,11	131	
Patient 10	75	1	30,24	113,68	659	654
Patient 11	150	2	0,34	0,62	135	402
Patient 12	160	1	0,30	0,78	76	394
Patient 13	150	2	0,29	0,79	180	410
Patient 14	75	1	0,86	2,26	245	486
Patient 15	75	1	0,48	1,48	223	439
Patient 16	150	2	6,89	16,26	589	509
Patient 17	100	1	34,26	102,26	772	664
Patient 18	160	1	0,66	1,42	173	401
Patient 19	75	1	0,33	0,40	158	395
Patient 20	75	1	0,80	2,39	862	562
Patient 21	75	1	0,01	0,01	210	419
Patient 22	160	1	0,01	0,02	296	430
Patient 23	75	1	1,97	5,32	348	415
Patient 24	75	1	0,19	0,25	305	389
Patient 25	75	1	0,06	0,10	127	378
Patient 26	160	1	0,02	0,02	47	384
Patient 27			0,30	0,57	892	614
Patient 28	100	1			137	378
Patient 29			0,10	0,25	242	511
Patient 30	150	2	0,03	0,10	125	419
Patient 31	150	2	28,90	32,88	958	665
Patient 32	75	1	29,47	75,95	990	644
Patient 33	75	1	0,47	2,39	129	495
Patient 34	75	1	67,74	177,32	243	491
Patient 35	75	1	0,35	1,30	307	513
Patient 36	75	1	0,02	0,05	91	403
Patient 37	160	1	0,04	0,11	157	399
Patient 38	160	1	0,04	0,08	178	396
Patient 39	160	1	0,01	0,02	160	394
Patient 40	75	1			865	501
Moyenne			5,69	14,69	319,8	469,5
Ecart-type			13,98	38,15	293,6	93,7
Médiane			0,41	1,13	179,0	419,0
Interquartiles			[0,12 - 1,32]	[0,25 - 2,39]	[128,5 - 352,0]	[397,5 - 510,0]

Les cases vides correspondent aux données manquantes des sujets de notre étude.

Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2014/2015

**Nom :** Bovyn  
**Prénom :** Mathilde

**Titre du mémoire :** Comparaison des méthodes Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> dans l'évaluation de la résistance biologique à l'aspirine chez des patients atteints d'une thrombocytémie essentielle ou d'une polyglobulie de Vaquez.

**Mots-clés :** aspirine – résistance biologique à l'aspirine – Multiplate<sup>®</sup> – VerifyNow<sup>®</sup> – dosage sérique du thromboxane B2 – syndrome myéloprolifératif Ph1 négatif – risque thrombotique – thrombocytose – viscosité sanguine

---

**Résumé :** Les méthodes Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> sont des tests d'agrégation plaquettaire sur sang total permettant la détection de la résistance biologique à l'aspirine grâce à un agoniste spécifique de la voie de la COX-1 : l'acide arachidonique. Les patients SMP Ph- présentent des conditions hémorrhéologiques particulières qui rendent délicate l'interprétation de tels tests. Ce travail évalue quelle méthode est la plus adaptée pour cette population de patients. Pour cela, une comparaison des deux méthodes Multiplate<sup>®</sup> et VerifyNow<sup>®</sup> a été réalisée en utilisant comme référence le dosage d'un métabolite direct de la voie de la COX-1 : le TXB2 sérique. Nous avons ensuite étudié quelle influence pouvait avoir la thrombocytose, la viscosité sanguine, la macrocytose et la leucocytose sur les résultats de ces deux tests.

Les résultats de notre travail ont montré une supériorité du VerifyNow<sup>®</sup> dans la spécificité de la détection de la résistance à l'aspirine comparé au Multiplate<sup>®</sup>. Le Multiplate<sup>®</sup> est plus sensible à son environnement local que le VerifyNow<sup>®</sup>. Alors que la thrombocytose ne montre aucun impact, la viscosité sanguine (hématocrite et taux de globules rouges) et la leucocytose semblent surévaluer les résultats du Multiplate<sup>®</sup>. Ces deux techniques apportent donc des informations différentes mais complémentaires. Alors que le VerifyNow<sup>®</sup> détecte la résistance intrinsèque des plaquettes à l'aspirine, le Multiplate<sup>®</sup> évalue la réponse des plaquettes à l'aspirine en intégrant les paramètres de leur environnement natif.

Malgré un manque de spécificité, le Multiplate<sup>®</sup> pourrait apparaître comme une technique intéressante dans la détection de la résistance à l'aspirine chez les patients SMP Ph- car il prend en compte des paramètres physiopathologiques complexes de ces sujets. Même si notre hypothèse doit être confirmée sur des études de grande ampleur, nos résultats suggèrent que le Multiplate<sup>®</sup> pourrait également évaluer un risque thrombotique clinique.

---

**Membres du jury :**

<b>Président :</b>	<b>Madame le Professeur A. Dupont</b>
<b>Assesseurs :</b>	<b>Monsieur le Professeur J-L. Demory</b>
	<b>Madame le Docteur A. Bauters</b>
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>Madame le Docteur A. Charpentier</b>