

Réponse au clopidogrel et polymorphisme du gène du cytochrome CYP2C19: Etude longitudinale

Response to clopidogrel and of the cytochrome CYP2C19 gene polymorphism Tunisienne.

Rim Charfi^{1,2,3}, Khadija Mzoughi^{3,4}, Miriam Boughalleb³, Henda Hosni^{5,6}, Soumaya Kouidhi^{5,6}, Imen Sfar^{7,3}, Nadia Hammami^{8,3}, Ihsen Zaïri^{4,3}, Manel Limam⁹, Chekib Zedini⁹, Ali Mrabet³, Anis Klouz^{1,2,3}, Yousr Gorgi^{7,3}, Maher Kharra¹⁰, Hédi Baccar^{4,3}, Sameh Trabelsi^{1,2,3}

1 : Service de pharmacologie clinique, Centre National de pharmacovigilance

2 : Laboratoire de recherche de pharmacologie clinique et expérimentale LR16SP02

3 : Université de Tunis El Manar, Faculté de Médecine de Tunis

4 : Service de cardiologie, Hôpital Habib Thameur Tunis

5 : Institut Supérieur de biotechnologie Sidi Thabet

6 : Université La Manouba

7 : Service d'immunologie, Hôpital Charles Nicolle Tunis

8 : Service de cardiologie, Hôpital Charles Nicolle Tunis

9 : Département de Médecine familiale et communautaire, Faculté de Médecine de Sousse Ibn Jazzar

10 : Laboratoire de génétique humaine, Faculté de Médecine de Tunis

RÉSUMÉ

Introduction : Le clopidogrel (clopi) est une prodrogue largement prescrite dans la prise en charge des coronaropathies et qui nécessite l'intervention des cytochromes P450 2C19 (CYP2C19) hépatiques pour son activation. Cependant, il existe une variabilité interindividuelle de la réponse au clopi malgré l'usage de doses recommandées. Ainsi, les études ont mis en évidence l'effet du polymorphisme du gène Cyp2C19 sur la réponse au clopi et particulièrement le Cyp2C19*2 qui peut être associé à une augmentation du risque d'événements cardiovasculaires majeurs ou MACE. Objectif : Evaluer l'effet du polymorphisme du Cyp2C19*2 sur la survenue des MACE et des complications hémorragiques chez des patients traités par clopi.

Méthodes : Nous avons effectué une étude descriptive longitudinale incluant 71 patients mis sous clopi depuis au moins un mois, recrutés aux services de cardiologie des hôpitaux Charles Nicolle et Habib Thameur. Le génotypage a été effectué par polymérase chain reaction ou PCR classique au Service de Pharmacologie Clinique. Après un suivi clinique, nous avons procédé à des comparaisons pour évaluer l'association entre le polymorphisme Cyp2C19*2 et la survenue de MACE ou de complications hémorragiques.

Résultats : Parmi nos patients, 51% ont eu une angioplastie, 42% un traitement médical et 7% un pontage aorto-coronarien. Concernant nos patients, 52% étaient hétérozygotes, 28% homozygotes sains *1/*1 et 20% homozygotes mutés porteurs de l'allèle de perte de fonction *2/*2. La fréquence allélique du Cyp2C19*2 était de 46%. La durée moyenne de suivi était de 495±183 jours durant laquelle la prévalence des MACE était de 11% et celle des complications hémorragiques de 31%. En analyse univariée, nous n'avons pas observé d'association significative entre la survenue de MACE ou de complications hémorragiques avec le Cyp2C19*2. La moyenne de survie sans MACE était inférieure dans les groupes avec mutation de l'allèle mais sans que la différence ne soit statistiquement significative.

Conclusion : Parmi les patients traités par clopi, le port d'un allèle de perte de fonction Cyp2C19*2 ne semble pas être associé à au risque de survenue de MACE ni de complications hémorragiques. Ceci suggère l'intérêt de mener une étude à plus large échelle.

Mots-clés

Antiagrégant plaquettaire - Clopidogrel - Résistance aux substances - Polymorphisme génétique – Cytochrome P-450 CYP2C19 – Pharmacogénétique

SUMMARY

Introduction: Clopidogrel (clopi) is a prodrug widely prescribed in the management of coronary artery disease and requires the intervention of hepatic cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) for its activation. However, there is interindividual variability in response to clopi despite the use of recommended doses. Thus, the studies have highlighted the effect of the CYP2C19 gene polymorphism or Cyp2C19 gene on the response to clopi and particularly Cyp2C19 * 2 which may be associated with an increased risk of major cardiovascular events or MACE.

Objective: To evaluate the effect of Cyp2C19 * 2 polymorphism on MACE occurrence and hemorrhagic complications in patients treated with clopi.

Methods: We carried out a descriptive longitudinal study including 71 patients placed under clopi for a minimum duration of one month. Genotyping of the Cyp2C19 allele was performed by conventional polymerase chain reaction (PCR). After a follow-up period of 495 ± 183 days, we performed a statistical analysis to evaluate the association between the Cyp2C19 * 2 polymorphism and the occurrence of MACE or hemorrhagic complications.

Results: Among our patients, 51% had an angioplasty, 42% medical treatment and 7% a coronary artery bypass surgery. In our study population, 52% were heterozygous (HTZ), 28% homozygous (HMZ) healthy * 1 / * 1 and 20% HMZ had the loss of function allele * 2 / * 2. The allelic frequency of Cyp2C19 * 2 was 46%. Follow-up mean duration was of 495 ± 183 days. During this period, the prevalence of MACE was 11% and that of hemorrhagic complications was 31%. In our study, we did not observe a significant association between the occurrence of MACE or hemorrhagic complications with the genotype carrying the Cyp2C19 * 2 allele.

Conclusion: Among patients treated with clopi, wearing a Cyp2C19 * 2 function loss allele didn't seem to be associated with a significantly higher risk of MACE, nor a significantly lower risk of hemorrhagic complications. This suggests the necessity of larger studies.

Key- words

Antiaggregant - Clopidogrel – Drug resistance - Genetic polymorphism - Cytochrome P-450 CYP2C19 - Pharmacogenetics

Les maladies cardiovasculaires constituent un problème majeur de santé publique. Elles ont représenté, en 2012, 31% de la mortalité dans le monde dont 7,4 millions dus à la maladie coronarienne [1]. En Tunisie, les maladies cardiovasculaires étaient la première cause de décès en 2014 avec une incidence de 49% dont 70% de décès par maladie coronarienne [2,3]. Le clopidogrel (clopi) associé à l'acide acétylé salicylique représentent le traitement de référence dans la prise en charge des syndromes coronariens aigus (SCA). Le clopi est une prodrogue appartenant à la seconde génération des thiéno-pyridines. Les cytochromes P450 2C19 (CYP2C19) hépatiques jouent un rôle prépondérant dans les deux étapes d'oxydation du clopi en son métabolite thiol actif (MTA) le R130964. Ce MTA inhibe sélectivement et irréversiblement le récepteur purinergique P2Y12 plaquettaire et l'activation et l'agrégation plaquettaire [4,5]. Malgré son usage largement répandu en cardiologie, le clopi présente une grande variabilité interindividuelle de sa réponse chez les patients. En effet, il peut induire des effets indésirables chez certains patients (accidents hémorragiques), alors que chez d'autres « mauvais répondeurs », il peut engendrer une inhibition plaquettaire biologique et/ou clinique limitée ou absente qui peut induire des événements cardiovasculaires ischémiques majeurs (ou MACE) pour des doses recommandées de clopi [6]. Le taux constaté de mauvais répondeurs qui présentent une résistance biologique étant de 4 à 30% [7]. Cette variabilité interindividuelle de la réponse au clopi est d'origine multifactorielle dont l'origine génétique [3,8]. Le polymorphisme d'un seul nucléotide ou « Single Nucleotide Polymorphisms » (SNP) est le type le plus fréquent des polymorphismes génétiques. Certains SNP du gène du CYP2C19 ont été identifiés chez des sujets mauvais répondeurs, ou résistants au clopi. Parmi ces polymorphismes, nous citons le SNP Cyp2C19*2 (rs4244285), le plus fréquent parmi ces SNP (13 à 34%) [5]. L'identification génotypique de ces SNP a, donc, permis de classer les patients en fonction de la vitesse du métabolisme hépatique du clopi [9,10]. Les études inhérentes aux fréquences de ces allèles dans notre population et leurs rôles relatifs par rapport aux autres facteurs démographiques et cliniques interférant avec la réponse au clopi sont rares [11, 12]. La clarification de cette question est d'un intérêt clinique majeur, car elle pourrait aider à guider le choix optimal des facteurs à prendre en compte pour prédire le risque qu'un patient a d'être un faible répondeur au clopi et pour adapter le traitement antiplaquettaire en routine.

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'effet du polymorphisme du Cyp2C19*2 sur la réponse au clopi et ce en étudiant la survenue de MACE et de complications hémorragiques chez les patients sous clopi.

MÉTHODES

Nous avons mené une étude descriptive longitudinale s'étalant du 1^{er} février 2015 jusqu'au 30 juin 2017 auprès des patients admis pour prise en charge d'une coronaropathie et mis sous clopi.

L'étude a concerné des patients recrutés aux services de cardiologie des hôpitaux Charles Nicolle et Habib Thameur. Le génotypage a été effectué au Service de Pharmacologie Clinique du Centre National de Pharmacovigilance et à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet. Ont été inclus dans cette étude tous les patients : âgés de plus de 18 ans, admis pour prise en charge d'une coronaropathie, mis sous clopi pour une durée minimale d'un mois et ayant donné leur consentement éclairé pour la participation à notre étude. N'ont pas été inclus les patients avec : une hypersensibilité au médicament ou l'un de ses composants ou à une autre des thiéno-pyridines, une hémorragie active et une insuffisance hépatique sévère [13,14].

Les patients ont été exclus en cas d'échec du génotypage, apparition d'une contre-indication au traitement par clopi lors du suivi, perdus de vue lors du suivi, arrêt de la prise de clopi, mauvaise observance au clopi (Figure 1). Dans ce travail, nous avons procédé à l'identification génotypique du Cyp 2C19*2 et au suivi clinique des patients pour la détection de la survenue d'un événement ischémique au cours de ce suivi (MACE) ou d'une complication hémorragique.

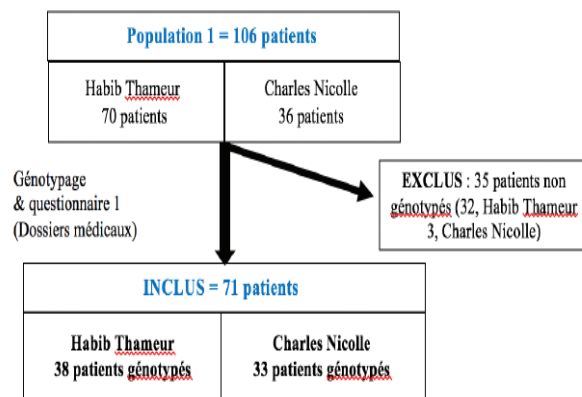


Figure 1 : Organigramme de la population étudiée

Figure 1 : Organigramme de la population étudiée

Génotypage

Cette étude de pharmacogénétique a nécessité d'une part l'accord du comité d'éthique et le consentement éclairé des patients. Le profil génotypique a déterminé moyennant une extraction de l'acide désoxyribonucléique

ou ADN par salting-out puis une polymérase chain reaction (PCR) classique avec digestion enzymatique ou PCR-RFLP d'après l'étude de Prasanthi et al [15]. Afin de vérifier la validité de ce choix, nous avons effectué des recherches «BLAST» et avons donc confirmé que les amorces choisies s'hybridaient à un seul niveau ou zone cible dans la majorité des génomes humains. D'après l'étude utilisée pour la PCR-RFLP, la digestion enzymatique par la SmaI, permet d'obtenir l'amplifiât de l'allèle muté Cyp2C19*2 qui correspond à 321 paires de bases (pb) [15]. Les patients ont été classés en :

1-Homozygote sain (HMZ *1/*1) défini par l'obtention de deux bandes électrophorétiques de 212 et 109 pb correspondant à un métaboliseur extensif.

2-Hétérozygote (HTZ *2/*1) défini par l'obtention de trois bandes électrophorétiques de 321, 212 et 109 pb correspondant à un métaboliseur intermédiaire.

3-Homozygote muté (HMZ *2/*2), défini par l'obtention d'une seule bande électrophorétique de 321 pb et correspondant à un métaboliseur lent.

Le séquençage du produit de PCR d'un patient HTZ a permis de confirmer la validité des résultats obtenus. Pour l'analyse comparative les patients ont été répartis en quatre groupes :

- Groupe 0 HMZ sains (*1/*1)
- Groupe 1 HTZ (*2/*1)
- Groupe 2 HMZ*2 (*2/*2)
- Groupe 3 Porteurs de mutation (*2) (Groupe 1 + Groupe 2)

Suivi clinique

Les données ont été recueillies à partir du dossier médical de chaque patient et d'un questionnaire téléphonique lors du suivi de chaque patient. Lors du suivi clinique, nous avons adopté la classification de l'Academic Research Consortium (ARC) pour définir les MACE et les complications hémorragiques [16,18]. Les MACE sont définis comme étant : une mort d'origine cardiaque et/ou vasculaire, un infarctus du myocarde (IDM) non fatal, une thrombose intra-stent (TIS), des revascularisations répétées et des accidents ischémiques cérébraux (AIC) regroupant les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les accidents ischémiques transitoires (AIT) [16].

Analyse statistique

Dans cette étude, Les tests statistiques ont été effectués moyennant le logiciel informatique SPSS version 22. Nous avons calculé les fréquences alléliques selon les formules de Hardy-Weinberg [19]. Pour l'analyse comparative les patients ont été répartis en quatre groupes : groupe 0 ou HMZ sains (*1/*1), groupe 1 ou HTZ (*2/*1), groupe 2 ou HMZ*2 (*2/*2) et groupe 3 des porteurs de la mutation (*2). Pour les comparaisons de variables qualitatives entre deux ou plusieurs groupes, nous avons utilisé le test du Chi 2 de Pearson ou le test exact de Fisher selon l'indication. Pour la comparaison

des moyennes entre les groupe nous avons utilisé le test t de Student. L'analyse de survie pour la survenue des MACE et de complications hémorragiques en fonction des différents groupes a été réalisée selon le modèle Kaplan Meier.

Le seuil de significativité retenu pour les tests employés était $p < 0,05$.

RÉSULTAT

Caractéristiques de patients

La population étudiée comprenait 62 hommes (87%) et neuf femmes (13%), soit un sexe ratio de 6,9. L'âge des patients variait de 30 à 85 ans avec une moyenne de 63 ± 11 ans. Trente et un patients (44%) étaient âgés de plus de 65 ans. Les principaux facteurs de risque cardiovasculaire étaient, par ordre de fréquence, le tabagisme (72%), l'hypertension artérielle (58%), le diabète (55%), la dyslipidémie (31%), l'obésité abdominale (30%) et corporelle (20%) et l'insuffisance rénale chronique (7%). Les motifs d'hospitalisation étaient un syndrome coronarien aigu (SCA) avec sus-décalage du segment ST dans 48% des cas, 35% de SCA sans sus-décalage du segment ST à troponine +, 16% pour angor instable et 1% pour angor stable. Parmi les 71 patients de l'étude, 53 (75%) n'étaient pas coronariens connus. Les antécédents cardiovasculaires des patients sont résumés dans le tableau I. A l'échographie trans-thoracique (ETT), 33 patients (52%) avaient une fraction d'éjection ventriculaire gauche conservée, une dysfonction ventriculaire gauche modérée a été constatée chez 29 (46%) patients et sévère chez un patient (2%). Une altération de la cinétique segmentaire du myocarde a été constatée chez 26 patients (41%). A la coronarographie, le statut des patients était monotronculaire dans 34% des cas, bitronculaire dans 36% des cas, tritronculaires dans 17% des cas et 13% des patients ne présentaient pas de lésion significative.

Tableau 1 : Antécédents cardiovasculaires des patients de l'étude

Antécédents	n	% (n=71)
Coronariens	18	25%
Infarctus du myocarde	10	14%
Angioplastie Transcutanée	7	10%
Pontage aorto-coronaire	2	3%
Accident vasculaire cérébral	2	3%
Artériopathie oblitérante des membres inférieurs	2	3%

Profil génotypique de nos patients

Parmi les patients de l'étude, 52% étaient HTZ *2/*1 (groupe 1), 28% étaient HMZ sains *1/*1 (groupe 0) et 20% étaient HMZ mutés *2/*2 (groupe 2). La fréquence allélique du Cyp2C19*2 selon l'équilibre de Hardy-Weinberg était de 46% (Figure 2).

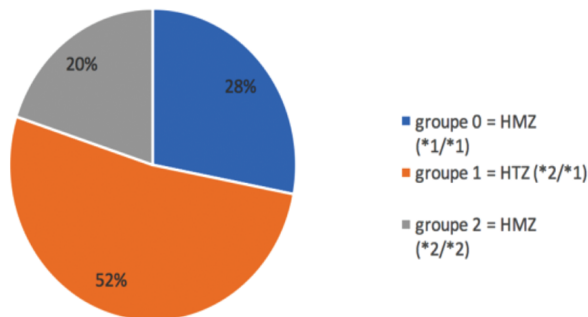


Figure 2 : Répartition des patients selon le profil génotypique Cyp2C19*2

Evènements cardiovasculaires majeurs ou MACE

La durée moyenne de notre suivi était de 495 ± 183 jours. La prévalence des MACE était de 11% (8 patients) (cinq IDM, quatre thromboses intra-stent et deux décès d'origine cardiaque). Les groupes de patients avec et sans MACE étaient comparables en termes de caractéristiques épidémiologiques, d'antécédents cardiovasculaires, de caractéristiques cliniques, paracliniques et thérapeutiques (Tableaux II et III).

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques épidémiologiques, des antécédents et des motifs d'hospitalisation en fonction de la survenue des MACE

	MACE (n=8)	Pas de MACE (n=63)	P
Caractéristiques épidémiologiques			
Age (ans)	58 ± 7	63 ± 11	0,181
Genre masculin	6 (75%)	56 (89%)	0,266
Poids (Kg)	78 ± 17	77 ± 11	0,980
Index de masse corporelle	$28,8 \pm 8$	$26,7 \pm 4$	0,528
Obésité	2/7 (29%)	9/48 (19%)	0,617
Tour de taille (cm)	105 ± 14	99 ± 10	0,186
Obésité abdominale	2/6 (33%)	12/40 (30%)	1
Diabète	5(63%)	34 (54%)	0,936
Tabac (nombre)	4 (50%)	30 (48%)	1
Hypertension artérielle	4 (50%)	37 (59%)	0,928
Dyslipidémie	4 (50%)	18 (29%)	0,243
Insuffisance rénale chronique	1 (13%)	4 (6%)	0,460
Antécédents cardiovasculaires			
Antécédents coronariens	1 (13%)	17 (27%)	0,670
ATCD d'IDM	1 (13%)	9 (14%)	1
ATCD de revascularisation	0	9 (14%)	0,584
ATCD d'ATC	0	7 (11%)	1
ATCD de pontage aorto-coronarien	0	2 (3%)	1
ATCD d'AVC ischémique	0	2 (3%)	1
ATCD AOMI	0	2 (3%)	1
Motif d'admission			
Angor stable	0	1/63 (2%)	1
Angor instable, ST(-) Troponine(-)	1/8 (12,5%)	10/63 (16%)	1
SCA ST (-) Troponine (+)	3/8 (37,5%)	22/63 (35%)	1
SCA ST (+) Troponine (+)	4/8 (50%)	30/63 (48%)	1

ATCD : antécédents ; ATC : angioplastie transcutanée ; AVC : accident vasculaire cérébral ; AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs

Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques para cliniques et thérapeutiques des patients en fonction de la survenue des MACE

	MACE (n=8)	Pas de MACE (n=63)	p
ETT (n=63) et coronarographie (n=64)			
FE < 55%	3/6 (50%)	27/57 (47%)	0,617
Altération de la cinétique segmentaire	2/6 (33%)	24/57 (42%)	0,517
Lésions non significatives	0/7	8/57 (14%)	0,582
Lésions monotronculaires	3/7 (43%)	19/57 (33%)	0,937
Lésions bitronculaires	3/7 (43%)	20/57 (35%)	0,695
Lésions tritronculaires	1/7 (14%)	10/57 (18%)	1
Traitement			
Traitement médical	1/8 (12,5%)	29/63 (46%)	0,153
Revascularisation	7/8 (87,5%)	34/63 (54%)	0,153
Angioplastie transcutanée	6/8 (75%)	30/63 (48%)	0,278
Stent actif	4/6 (67%)	15/23 (65%)	1
Pontage aorto-coronarien	1/8 (25%)	4/63 (6%)	0,460

La comparaison des génotypes chez les patients ayant présenté un MACE et ceux qui n'en ont pas présenté n'a pas mis en évidence une différence significative (Tableau IV). En analyse univariée, nous n'avons pas observé d'association significative entre la survenue de MACE et le polymorphisme Cyp2C19*2 (Tableau IV).

Tableau 4 : Comparaison des génotypes chez les patients ayant présenté un MACE et ceux qui n'en n'ont pas présenté

	MACE (n=8)	Pas de MACE (n=63)	p
Groupe 0 : HMZ sains *1/*1	1/8	19/63	0,427
Groupe 1 : HTZ *2/*1	6/8	31/63	0,317
Groupe 2 : HMZ mutés *2/*2	1/8	13/63	1
Groupe 3 : Porteurs du Cyp2C19*2	7/8	44/63	0,427

HMZ : homozygote ; HTZ : hétérozygote ; MACE : évènements cardiovasculaires majeurs

Le délai moyen de survie sans MACE était de $792,85 \pm 30,3$ jours pour le groupe 0 (1 seul MACE) versus $660,61 \pm 33,21$ jours chez les porteurs de mutation d'allèle (groupe 3). Ainsi, le groupe porteur de mutation d'allèle présentait un délai moyen de survie sans MACE inférieur à celui du groupe 0 mais sans que la différence ne soit statistiquement significative ($p=0,271$) comme indiqué dans la figure 3.

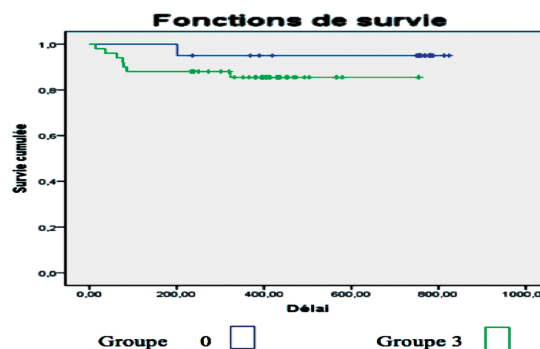


Figure 3 : Courbe de survie chez les porteurs de l'allèle muté

Le délai moyen de survie sans MACE était de $792,85 \pm 30,3$ jours pour le groupe 0, versus $645,27 \pm 41,17$ jours dans le groupe 1 et de 541 ± 07 jours dans le groupe 2 mais sans que la différence ne soit statistiquement significative ($p=0,371$) comme indiqué dans la figure 4.

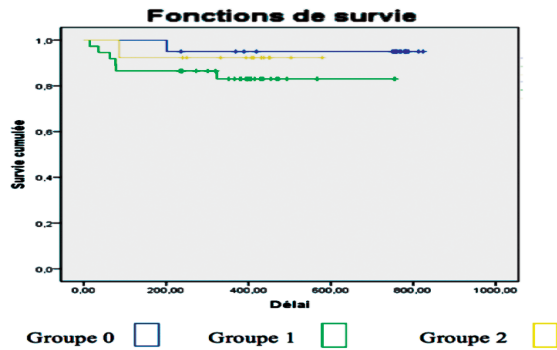


Figure 3 : Courbe de survie chez les porteurs de l'allèle muté

Evènements hémorragiques

Chez les 39 patients ayant répondu au questionnaire 2, 12 (31%) avaient présenté des complications hémorragiques réparties dans le tableau V ci-dessous.

Tableau 5 : Répartition des patients avec complications hémorragiques selon la classification de l'American research consortium (ARC)

	Type 0	Type 1	Type 2	Type 3A	Type 3B	Type 3C	Type 4	Type 5
n patients	0	7	2	1	0	2	0	0

Les génotypes des patients présentant des événements hémorragiques étaient répartis comme suit : HMZ (*1/*1) = 5 patients (42%), HTZ (*2/*1) = 5 patients (42 %), HMZ (*2/*2) = 2 patients (16%). Les groupes de patients avec et sans complications hémorragiques étaient comparables en terme de caractéristiques cliniques, paracliniques, thérapeutiques et génétiques (Tableaux VI, VII et VIII). En analyse univariée, nous n'avons pas observé d'association significative entre la survenue d'hémorragie et le polymorphisme Cyp2C19*2 (Tableau VIII).

DISCUSSION

Malgré son usage largement répandu en cardiologie, le clopi présente une grande variabilité interindividuelle de sa réponse chez les patients. Cette variabilité interindividuelle de la réponse au clopi est d'origine multifactorielle et les facteurs génétiques, particulièrement, le SNP du gène Cyp2C19 pourraient y participer. Ainsi, la recherche d'une association entre ce SNP et la réponse au clopi est d'un intérêt clinique majeur, car elle pourrait aider à guider le choix optimal des facteurs à prendre en compte pour prédire le risque qu'un patient a d'être un faible répondeur au clopi et pour adapter le traitement antiplaquettaire. C'est dans ce cadre que cette étude a été menée, au sein du service de

Tableau 6 : : Comparaison des caractéristiques épidémiologiques, antécédents et motifs d'admission avec et sans survenue d'hémorragie

	Hémorragie (n=12)	Pas d'hémorragie (n=27)	p
Caractéristiques épidémiologiques			
Age (ans)	64 ± 8	64 ± 11	0,185
Genre masculin	11/12 (92%)	23/27 (85%)	1
Poids (Kg)	81 ± 10	79 ± 12	0,570
Index de masse corporelle	27,7 ± 4	26,3 ± 4	0,338
Obésité	2/10 (20%)	4/21 (19%)	1
Tour de taille (cm)	101 ± 12	98 ± 10	0,447
Obésité abdominale	2/9 (22%)	5/19 (26%)	1
Diabète	7/12 (58%)	15/27 (55%)	0,872
Tabagique	8/12 (67%)	12/27 (44%)	0,2
Hypertension artérielle	7/12 (58%)	14/27 (52%)	0,708
Dyslipidémie	3/12 (25%)	9/27 (33%)	0,885
Insuffisance rénale chronique	2/12 (17%)	2/27 (7%)	1
Antécédents cardiovasculaires			
Antécédents coronariens	3/12 (25%)	6/27 (22%)	1
ATCD d'IDM	0	2/27 (%)	0,573
ATCD de revascularisation	0	3/27 (%)	0,539
ATCD d'angioplastie transcutanée	0	2/27 (7%)	1
ATCD de PAC	0	1/27 (3,5%)	1
ATCD d'AVC ischémique	1/12 (8%)	1/27 (3,5%)	0,526
ATCD AOMI	1/12 (8%)	0	0,308
Motif d'admission			
Angor stable	0	1/27 (%)	1
Angor instable, ST(-) Troponine(-)	1/12 (8%)	2/27 (7%)	1
SCA ST (-) Troponine (+)	4/12 (33%)	12/27 (44%)	0,765
SCA ST (+) Troponine (+)	7/12 (58%)	12/27 (44%)	0,423

Pharmacologie Clinique du CNPV. Il s'agit de la première étude de Pharmacogénétique à être effectuée au sein du Service de Pharmacologie Clinique du CNPV. Elle a permis d'évaluer l'intérêt clinique de pratiquer, en routine, le test d'identification génotypique du Cyp2C19*2 par PCR-RFLP. Notre étude a présenté certaines limitations, essentiellement inhérentes au nombre de patients inclus d'une part et à un manque de moyens techniques d'autre part.

Prévalence du polymorphisme Cyp2C19*2

Dans notre étude, la fréquence allélique était de 46% pour Cyp2C19*2 et 54% pour Cyp2C19*1. D'après les données de la littérature, la fréquence allélique du Cyp2C19*2 avait varié de 15% chez les Caucasiens et les Africains à 29 à 35% chez les Asiatiques et il s'agit du plus fréquent polymorphisme du gène du CYP2C19 [5,15]. Dans notre étude, la fréquence du variant allélique Cyp2C19*2 est considérée comme élevée et plutôt proche des fréquences rapportées chez les asiatiques. Cette fréquence élevée suggère que cette mutation est ancienne et se serait produite avant la séparation des populations Caucasiennes, Orientales et Noires [20]. Cette théorie pourrait expliquer le fait que la fréquence du polymorphisme Cyp2C19*2 rapportée dans notre étude soit proche de celles rapportées en Asie de l'Est et du Sud. La fréquence allélique du Cyp2C19*2 de notre étude est supérieure à celles rapportées dans deux études tunisiennes dont le génotypage a été effectué par PCR-RFLP, comme dans la nôtre. La première est l'étude de Abid et al, publiée en 2013 et réalisée en collaboration avec l'université de Sfax, où elle était de 11,5% chez 100 patients tunisiens ayant eu une angioplastie dans les

suites d'un SCA [11]. Dans la seconde étude, celle de Abdelhedi et al publiée en 2015, elle était de 9% chez 258 sujets tunisiens sains [21]. Ceci suggère l'hétérogénéité de notre population et la nécessité d'augmenter l'effectif des patients de l'étude.

Cyp2C19*2 et événements cardiovasculaires majeurs

Lors du suivi clinique, nous avons observé la survenue de MACE chez 11% des patients. L'incidence des IDM était de 7% et celle des TIS de 6%. Ces taux sont plus élevés que ceux du registre tunisien FAST-MI de l'IDM publié en 2015 (respectivement 3,7% et 1,6%) [22]. Dans notre étude, il n'y avait pas d'association significative entre la survenue de MACE et le SNP Cyp2C19*2. Dans l'étude tunisienne de Ben Moussa et al, sur 120 patients coronariens, il n'y avait également pas d'association entre les MACE et le génotype muté [23]. Alors que dans l'étude tunisienne de Abid et al, la prévalence de MACE était de 8,2% et les auteurs ont noté un taux de MACE significativement plus élevé dans le groupe porteur de SNP (18,2 vs 5,3% ; $p=0,04$) [11]. En effet, il existe une grande controverse dans les données de la littérature sur l'association des MACE au Cyp2C19*2 [42], certaines études sont en faveur de cette association [24-27] et d'autres sont contre [28-29].

Simon et al, dans une étude portant sur 2208 patients du registre français FAST-MI, ont rapporté que les porteurs de deux allèles de perte de fonction Cyp2C19 (*2, *3, *4 ou *5) avaient un taux de MACE plus élevé que les patients non porteurs (21,5% vs 13,3% ; $p=0,045$) [24]. L'incidence des MACE chez les patients porteurs de deux allèles Cyp2C19*2 était de 3,58 fois supérieure à celle des non porteurs chez les 1535 patients bénéficiant d'une

Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques paracliniques et thérapeutiques des patients avec et sans survenue d'hémorragie

	Hémorragie (n=12)	Pas d'hémorragie (n=27)	p
ETT (n=63) et coronarographie (n=64)			
FE < 55%	4/10 (%)	12/26 (%)	0,519
Altération de la cinétique segmentaire	5/10 (%)	9/26 (%)	0,318
Lésions non significatives	0/11	5/26 (%)	0,295
Lésions monotronculaires	5/11 (%)	7/26 (%)	0,474
Lésions bitronculaires	5/11 (%)	9/26 (%)	0,802
Lésions tritronculaires	1/11 (%)	5/26 (%)	0,646
Traitement			
Traitement médical	4/12 (%)	9/27 (%)	1
Revascularisation	8/12 (87,5%)	18/27 (%)	1
Angioplastie transcutanée	8/12 (%)	14/27 (%)	0,389
Stent actif	4/7 (%)	9/10 (%)	0,250
PAC	0/12 (%)	4/27 (%)	0,292
Suivi			
Evènement ischémique	2/12	3/27	0,494
IDM	2/12	0/27	0,089
TIS	1/12	2/27	0,680
Décès d'origine cardiovasculaire	0/12	2/27	0,474

ETT : Echographie transthoracique ; FE : fraction d'éjection ; PAC : pontage aorto-coronarien ; TIS : thrombose intra-stent

Tableau 8 : Comparaison des génotypes chez les patients ayant présenté une hémorragie et ceux qui n'en n'ont pas présenté

	Hémorragie (n=12)	Pas d'hémorragie (n=27)	p
Groupe 0 : HMZ sains (*1/*1)	5/12	5/27	0,258
Groupe 1 : HTZ (*2/*1)	5/12	15/27	0,423
Groupe 2 : HMZ mutés (*2/*2)	2/12	7/27	0,693
Groupe 3 : Porteurs allèle muté *2	7/12	22/27	0,308

HMZ : homozygote ; HTZ : hétérozygote

angioplastie transcutanée ($p=0,005$) [24]. Dans l'étude de Mega [25], l'association entre les SNP de plusieurs gènes du complexe CYP450 (2C19, 2C9, 2B6, 3A5 et 1A2) et la réponse clinique chez 1477 patients inclus dans l'essai clinique TRITON-TIMI (admis pour SCA et mis clopi ou prasugrel ayant bénéficié d'une angioplastie transcutanée) a été évaluée. Ainsi, les porteurs du Cyp2C19*2 avaient une augmentation relative de 53% du risque de survenue de : MACE en comparaison avec les non porteurs (12,1% vs 8,0% ; $p=0,01$), mort d'origine cardiovasculaire (2,0% vs 0,4% ; p non précisé), IDM non fatal (10,1% vs 7,5% ; p non précisé), AVC (0,88% vs 0,24% ; p non précisé) et une augmentation de trois fois le risque de TIS (2,7% vs 0,8% ; $p=0,04$) [25]. En 2010, l'étude de Paré et al, après le génotypage Cyp2C19 (*2,*3,*17) chez 5059 patients inclus dans les essais CURE et ACTIVE-A a remis en question la relation entre le polymorphisme du Cyp2C19 et la survenue de MACE. Dans cette étude, il n'y avait pas d'association significative entre la prévalence des MACE et le génotype Cyp2C19*2/*3 [28]. Bhatt et al ont montré en 2012, dans l'essai CHARISMA, incluant 4819 patients sous clopi, l'absence d'association entre le génotype Cyp2C19*2 et la survenue de MACE [30].

Toutefois, dans ces deux études le pourcentage de patients coronariens ayant eu une angioplastie était faible : 0% dans l'étude ACTICVE-A, 14,5% dans CURE et 28,1% dans CHARISMA. L'essai ACTIVE-A était de plus composé de patients non coronariens mis sous clopi pour fibrillation auriculaire. En effet, les allèles de perte de fonction du CYP2C19 jouent un rôle chez les patients présentant un SCA particulièrement le groupes à haut risque cardiovasculaire bénéficiant d'une revascularisation par angioplastie transcutanée tout au long de la phase péri-interventionnelle [29,31]. Les populations d'études montrant des associations positives entre les Cyp2C19*2 et la survenue de MACE sous clopi, comme dans le registre français de l'IDM (FAST-MI) [24], le registre (AFIJI) [26], l'essai (RECLOSE) [27] et l'essai (TRITON-TIMI) [25], étaient largement composées de patients atteints de SCA et traités par angioplastie transcutanée. Alors que les populations d'études qui présentent des associations négatives, comme la nôtre (où seuls 51% des patients avaient bénéficié d'une angioplastie transcutanée), les essais CURE, ACTIVE-A et CHARISMA, n'étaient pas à un risque cardiovasculaire

comparativement aussi élevé. Conformément, les méta-analyses qui incluent des études avec de faibles fréquences d'angioplastie transcutanée, des patients sans maladie coronarienne, des périodes de suivi au-delà de la durée du traitement par clopi n'ont pas observé un rôle majeur du Cyp2C19*2 dans la variabilité de la réponse au clopi [5, 19]. Une méta-analyse de Kim en 2013, incluant 2188 patients (532 IDM et 1656 angor stable) ayant eu une angioplastie transcutanée, démontrait que comparé aux métaboliseurs extensifs, les métaboliseurs lents porteurs d'allèle de perte de fonction du Cyp2C19 et ayant présenté un IDM, avaient un risque significativement plus élevé de MACE (HR=2,88 ; $p=0,011$). Une association significative entre les génotypes Cyp2C19 et les deux sous-groupes de patients a été observée pour les MACE ($P=0,045$) [46]. Dans la méta-analyse de Zhang et al, publiée en 2015, le Cyp2C19*2 était associé à un risque plus élevé de MACE (RR : 1,68 ; $p = 0,003$), de TIS (RR : 1,75 ; $p = 0,0001$) sous les doses usuelles de clopi et après traitement par une forte dose de clopi (RR : 1,82 ; $p < 10^{-5}$) [32]. En 2017, Wu et al ont trouvé une prévalence plus importante des MACE dans le groupe des métaboliseurs lents (*2/*2) en comparaisons aux autres groupes métaboliseurs intermédiaires (34 vs 19%, $p=0,026$) et extensifs (15,5%, $p=0,005$) dans une cohorte 376 patients coronariens traités par angioplastie transcutanée durant un suivi de 12 mois ou plus [33]. L'implantation d'un stent pourrait entraîner des lésions endothéliales et une activation plaquettaire, ainsi les patients stentés seraient plus à risque de développer des MACE en cas d'inefficacité du traitement antiagrégant plaquettaire [34-38]. De nombreuses études ont démontré qu'en cas d'angioplastie transcutanée, les niveaux de réactivité plaquettaire sont plus élevés malgré un traitement antiplaquettaire par clopi. Ce phénomène est appelé hyperréactivité plaquettaire sous traitement et les patients ont, dans ce cas, un risque accru de survenue de MACE [31,39-41].

Cyp2C19*2 et événements hémorragiques

La prévalence des complications hémorragiques dans notre étude était de 13%. Dans notre étude, il n'y avait pas d'association significative entre la survenue de complications hémorragiques et le SNP Cyp2C19*2. Dans l'étude de Harmsze et al, publiée en 2011 et

incluant 820 patients coronariens sous clopi traités par angioplastie transcutanée, le risque de saignement majeur était plus élevé (HR=2,6 ; p=0,046) dans le groupe des métaboliseurs extensifs [42]. Bhatt et al ont trouvé, dans une cohorte de 4819 patients sous clopi, que le taux de saignement était significativement plus faible chez les porteurs d'allèles de perte de fonction Cyp2C19*2 que chez les non-porteurs (HR= 0,80 ; p=0,003) [30]. De même, dans l'étude de Wu et al, le taux d'hémorragie le plus élevé a été observé chez les répondeurs au clopi par rapport aux semi-répondeurs (33 vs 18,9% ; p=0,008) et non répondeurs (17,7% ; p=0,008) [33]. Dans l'étude de Paré et al, aucune association n'a été observée avec la survenue des complications hémorragiques et les Cyp2C19 (*2,*3,*17) chez 5059 patients inclus dans les essais CURE et ACTIVE-A [28].

Autres facteurs de variabilité de réponse au clopidogrel

Pour ce qui est des facteurs génétiques, le polymorphisme Cyp2C19*2 représente 12% de la variabilité de réponse au clopi [43]. De nombreux autres facteurs tels que le diabète sucré, l'indice de masse corporelle élevé, la non-observance et les interactions médicamenteuses contribuent au phénomène de résistance au clopi et devraient être bien contrôlés. De plus, les facteurs identifiables ne représentaient que 18% de la variabilité de la pharmacocinétique du clopi et seulement 35% à 65% de la variabilité de la réactivité plaquettaire [44].

Limitations méthodologiques de l'étude

Notre étude a présenté certaines limitations :

- Bien que nous ayons identifié le polymorphisme génétique le plus fréquemment associé avec une réduction de fonction du CYP450 essentiel à l'activation du clopi, plusieurs autres allèles déterminants de perte ou de gain de fonction n'ont pas été recherchés, tel que respectivement le Cyp2C19*3 et Cyp2C19*17 et leur rôle ne peut pas être exclu. Toutefois, face aux difficultés techniques, nous n'avons pas pu identifier ces SNP chez nos patients.
- Les patients inclus étaient à des niveaux de risque cardiovasculaire très hétérogènes. Ceci étant un biais de sélection observé dans de nombreuses études [5,45].
- D'autre part, la difficulté de remémoration d'événements perçus comme anodins par les patients a limité la détection de différences significatives sur la base du génotype.
- La technique de génotypage par PCR classique n'est pas aussi spécifique que la technique de génotypage par PCR en temps réelle et ceci pourrait expliquer le pourcentage élevé de patients mutés dans notre étude. Toutefois, la vérification du résultat de quelques patients par séquençage permet d'affirmer que les résultats obtenus sont corrects sur le plan technique.

- Enfin, il aurait été intéressant de faire le dosage plasmatique du MTA, métabolite actif du clopi et de comparer les concentrations plasmatiques obtenues dans les groupes porteurs et les non porteurs du SNP. Toutefois, les moyens techniques actuels au service de pharmacologie clinique ne permettent pas encore d'effectuer ce dosage.

Recommandations

L'ensemble de nos résultats rejoignent les données de la littérature et soulignent l'hétérogénéité des résultats au vu des niveaux différents de risque cardiovasculaire.

Les dernières recommandations des sociétés savantes européennes et américaines (L'ACC/AHA de 2016 [46], l'ESC 2014 [47] et 2017 [6]) de cardiologie pour la mise en œuvre du génotypage stipulent que par manque d'un niveau de preuve suffisant (classe III), l'utilisation du génotypage en routine n'est pas recommandée. Toutefois, les tests pourraient être considérés dans des situations spécifiques à haut risque [6,47-49]. En Tunisie, il n'y a à ce jour pas d'autres alternatives au clopi puisque c'est le seul inhibiteur du P2Y12 qui est commercialisé. Ainsi, l'identification des SNP du Cyp2C19 peut s'avérer utile en cas de haut risque cardiovasculaire.

CONCLUSION

D'après notre étude, constituée de patients à niveaux de risque cardiovasculaire hétérogène traités par clopi, le port d'un allèle de perte de fonction Cyp2C19*2 ne semble pas être associé à au risque de survenue de MACE ni de complications hémorragiques. La prévalence de ce polymorphisme dans notre population est plus élevée que celle rapportée dans la littérature. Ces résultats pourraient être secondaires au nombre limité de patients et leur sélection non aléatoire.

REFERENCES

- OMS (Organisation mondiale de la santé) (2015). "Maladies cardiovasculaires". Disponible sur : <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>> (consulté le 28/11/2016).
- OMS (Organisation mondiale de la santé) (2016). "Les maladies cardiaques : première cause de décès dans le monde et en Tunisie". Disponible sur : <<http://www.lediplomate.tn/les-maladies-cardiaques-premiere-cause-deces-dans-le-monde-et-en-tunisie/>> (consulté le 1/1/2017).
- Saidi O, Ben Mansour N, O'Flaherty M, Capewell S, Critchley JA, Romdhane HB. Analyzing Recent Coronary Heart Disease Mortality Trends in Tunisia between 1997 and 2009. Samuel J-L, editor. PLoS ONE. 2013;8(5):e63202.
- Qureshi Z, Hobson AR. Clopidogrel "Resistance": Where are We Now?: Clopidogrel "Resistance". Cardiovasc Ther. 2013;31(1):3–11.
- Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot J-S, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 Update. Clin Pharmacol Ther. 2013;94(3):317–23.
- Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet J-P, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Eur Heart J [En ligne]. 2017 Aout [12/10/2017];[48 pages]. Disponible à l'URL: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-pdf/doi/10.1093/eurheartj/ehx419/21382744/ehx419.pdf>
- Committee CS, others. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). The Lancet. 1996;348(9038):1329–39.
- Holmes DR, Dehmer GJ, Kaul S, Leifer D, O'Gara PT, Stein CM. ACCF/AHA Clopidogrel Clinical Alert: Approaches to the FDA "Boxed Warning." J Am Coll Cardiol. 2010;56(4):321–41.
- SNP [Internet]. [cited 2017 Sep 18]. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>
- Genetics Home Reference. CYP2C19 gene [En ligne]. [18/09/2017]. Disponible à l'URL: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CYP2C19>
- Abid L, Laroussi L, Bahloul A, Siala A, Abdelhédi R, Kharrat N, et al. Impact of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism on the clinical cardiovascular events after stent implantation in patients receiving clopidogrel of a southern Tunisian region. World J Cardiovasc Dis. 2013;03(01):4–10.
- Bouassida M, Bouchareb S. Facteurs prédictifs de la résistance au clopidogrel. Le 8ème Congrès International de Cardiologie et Biotechnologie CARDIOBIOTEC. 28-30 avril 2016), p14.
- Haute Autorité de Santé. Bon usage des agents antiplaquettaires. Recommandations de bonne pratique. Paris : HAS ; 2012. plavix-13370.htm [En ligne]. [cited 2017 Sep 18]. Disponible à l'URL: <http://www.vidal.fr/Medicament/plavix-13370.htm>
- AffichageDoc.php [Internet]. [cited 2017 Sep 18]. Available from: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=68235154&typedoc=R#RcpContreindications>
- S Jand V. Pharmacogenomics Study of Clopidogrel by RFLP based Genotyping of CYP2C19 in Cardiovascular Disease Patients in North-East Population of India. J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics [En ligne]. 2014 Mai [18/09/2017];05(03). Disponible à l'URL: <http://omicsonline.org/open-access/pharmacogenomics-study-clopidogrel-by-rflp-based-genotyping-of-cypc-in-cardiovascular-disease-patients-india-2153-0645-5-132.php?aid=27130>
- Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, Boam A, Cohen DJ, van Es G-A, et al. Clinical End Points in Coronary Stent Trials: A Case for Standardized Definitions. Circulation. 2007;115(17):2344–51.
- Société de Chirurgie Vasculaire et endovasculaire de Langue Française. Qu'est-ce qu'un accident vasculaire cérébral ischémique. Paris: SCVE ; 2017.
- Mehran R, Rao SV, Bhatt DL, Gibson CM, Caixeta A, Eikelboom J, et al. Standardized Bleeding Definitions for Cardiovascular Clinical Trials: A Consensus Report From the Bleeding Academic Research Consortium. Circulation. 2011;123(23):2736–47.
- Hardy.html [Internet]. [cited 2017 Sep 19]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/Hardy.html>
- Buzoianu AD, Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Militaru CF, Bocşan CI et al. Screening for CYP2C19*2, *3 and *4 gene variants in a Romanian population study group. Farmacia. 2010;58(6):806–12.
- Abdelhedi R, Bouayed NA, Alfadhli S, Abid L, Rebai A, Kharrat N. Characterization of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19 polymorphisms in Tunisian, Kuwaiti and Bahraini populations. J Genet. 2015;94(4):765–70.
- Addad F, Gouider J, Boughzela E, Kamoun S, Boujenah R, Haouala H, et al. Prise en charge de l'infarctus du myocarde en Tunisie : résultats préliminaires du registre FAST-MI Tunisie de la Société tunisienne de cardiologie et de chirurgie cardiovasculaire. Ann Cardiol Angéiologie. 2015;64(6):439–45.
- Ben Moussa N. Résistance au clopidogrel: Prévalence, déterminants génétiques et impacts pronostiques dans une cohorte de patients coronariens [Thèse]. Médecine : Tunis; 2011.
- Simon T, Verstuyt C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. N Engl J Med. 2009;360(4):363–75.
- Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. N Engl J Med. 2009;360(4):354–362.
- Collet J-P, Hulot J-S, Pena A, Villard E, Esteve J-B, Silvain J, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. The Lancet. 2009;373(9660):309–17.
- Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Panicia R, et al. Relation of Cytochrome P450 2C19 Loss-of-Function Polymorphism to Occurrence of Drug-Eluting Coronary Stent Thrombosis. Am J Cardiol. 2009;103(6):806–11.
- Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. N Engl J Med. 2010;363(18):1704–14.
- Mega JL, Simon T, Collet J, et al. Reduced-function cyp2c19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for pci: A meta-analysis. JAMA. 2010;304(16):1821–30.
- Bhatt DL, Paré G, Eikelboom JW, Simonsen KL, Emison ES, Fox KAA, et al. The relationship between CYP2C19 polymorphisms and ischaemic and bleeding outcomes in stable outpatients: the CHARISMA genetics study. Eur Heart J. 2012;33(17):2143–50.
- Kim HS, Chang K, Koh YS, Park MW, Choi YS, Park CS, et al. CYP2C19 poor metabolizer is associated with clinical outcome of clopidogrel therapy in acute myocardial infarction but not stable angina. Circ Cardiovasc Genet. 2013;6(5):514–21.
- Zhang L, Yang J, Zhu X, Wang X, Peng L, Li X et al. Effect of high-dose clopidogrel according to CYP2C19*2 genotype in patients undergoing percutaneous coronary intervention— a systematic review and meta-analysis. Thromb Res. 2015;135(3):449–58.
- Wu Y, Zhang XX, Tian L, Jiang JJ, Xu L, Huang YL et al. Impact of CYP2C19 genotype and platelet function on clinical outcome in coronary atherosclerotic heart diseases patients received clopidogrel post percutaneous coronary intervention [article en chinois]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. 2017;45(5):377–385.
- Serrano CV, Ramirez JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, et al. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression: evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. J Am Coll Cardiol. 1997;29(6):1276–83.

35. Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1992;12(12):1475–87.
36. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials.* 2004;25(26):5681–703.
37. Motovska Z, Kala P. Benefits and risks of clopidogrel use in patients with coronary artery disease: Evidence from randomized studies and registries. *Clin Ther.* 2008;30:2191–202.
38. Janssen PWA, Mol EA, Geene SMC, Barbato E, ten Berg JM. Does percutaneous coronary stent implantation increase platelet reactivity? *Blood Rev.* 2017;31(5):271–5.
39. Geisler T, Langer H, Wydymus M, Gohring K, Zurn C, Bigalke B, et al. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J.* 2006;27(20):2420–5.
40. Chan MY, Weitz JI, Merhi Y, Harrington RA, Becker RC. Catheter thrombosis and percutaneous coronary intervention: fundamental perspectives on blood, artificial surfaces and antithrombotic drugs. *J Thromb Thrombolysis.* 2009;28(3):366–80.
41. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and Future Directions on the Definition of High On-Treatment Platelet Reactivity to Adenosine Diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):919–33.
42. Harmsze AM, van Werkum JW, Hackeng CM, Ruven HJT, Kelder JC, Bouman HJ et al. The influence of CYP2C19*2 and *17 on on-treatment platelet reactivity and bleeding events in patients undergoing elective coronary stenting: *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(3):169–75.
43. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(12):1057–64.
44. Frere C, Cuisset T, Morange P-E, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, et al. Effect of Cytochrome P450 Polymorphisms on Platelet Reactivity After Treatment With Clopidogrel in Acute Coronary Syndrome. *Am J Cardiol.* 2008;101(8):1088–93.
45. Gurbel PA, Tantry US, Shuldiner AR, Kereiakes DJ. Genotyping. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(2):112–6.
46. Levine GN, Bates ER, Bittl JA, Brindis RG, Fihn SD, Fleisher LA, et al. 2016 ACC/AHA Guideline Focused Update on Duration of Dual Antiplatelet Therapy in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(10):1082–115.
47. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet.* 2010; 376(9749):1320–8.
48. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(24):e44–122.
49. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE Jr, Ganiats TG, Holmes DR Jr, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014;130(25):2354–94.