UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Archive ouverte UNIGE
https://archive-ouverte.unige.ch

Thèse 2005

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Interactions statines - clopidogrel

Senouf, David Benjamin

How to cite

SENOUF, David Benjamin. Interactions statines - clopidogrel. Doctoral Thesis, 2005. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:346

This publication URL: https://archive-ouverte.unige.ch/unige:346
Publication DOI: 10.13097/archive-ouverte/unige:346

© This document is protected by copyright. Please refer to copyright holder(s) for terms of use.

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DE MEDECINE
Section de médecine clinique
Département de Médecine Interne
Service de Cardiologie

Thèse préparée sous la direction des
Professeurs Ulrich Sigwart et François Mach

INTERACTIONS STATINES - CLOPIDOGREL

Thèse
présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine
par

David Benjamin SENOUF

de
Genève (GE)

Thèse n° 10438

Genève

2005

INTERACTIONS STATINES – CLOPIDOGREL

Résumé 3

1. Introduction 4

2. Clopidogrel 5

a. Activation plaquettaire : 5

b. Métabolisme : 6

c. Indications : 10

i. Évènements coronariens 10

ii. Angioplastie coronarienne 11

iii. Accidents vasculaires cérébraux 11

iv. Artériopathie périphérique 11

d. Efficacité, variation inter-individuelle, résistance : 12

3. Statines 13

a. Mécanisme d'action : 13

b. Pharmacocinétique et métabolisme : 16

c. Indications, efficacité et bénéfices : 16

i. Prévention secondaire 16

ii. Prévention primaire 17

iii. Artériopathie périphérique et cérébrovasculaire 17

iv. Régression de l'artériosclérose 17

v. Effets pléiotrophiques 17

4. Controverse : interactions statines/clopidogrel ? 19

a. Arguments en faveur d'une interaction : 19

b. Arguments contre une interaction significative : 21

c. Cliniquement significatif ? 22

5. Etude clinique 24
a. Description : 24
b. Sélection des volontaires et contrôles sériques : 24
c. Méthode : 25
i. Agrégations plaquettaires 25
ii. Détection des statines dans le plasma 26
iii. Analyse statistique 28

6. Résultats 29
a. Volontaires : 29
b. Agrégations plaquettaires : 29
i. Réponse au clopidogrel : 29
ii. Agrégations après les différentes statines 31
c. Dosage des statines : 32

7. Discussion 36

8. Conclusion 38

9. Bibliographie 39

Annexe 1 49

Résumé

Récemment, une controverse s'est développée concernant une éventuelle diminution de l'efficacité du clopidogrel (pro-médicament nécessitant une activation via les cytochromes), lors de la prise concomitante de statines (surtout l'atorvastatine); alors que ceux-ci sont fréquemment utilisés en association dans la pratique clinique.

Grâce à une revue de la littérature, nous exposons les mécanismes d'action, le métabolisme, la pharmacocinétique et les indications de ces médicaments, ainsi que les arguments en faveur (ou non) d'une interaction.

Puis nous présentons une étude clinique que nous avons réalisée chez des volontaires sains, durant laquelle nous mesurons les agrégations plaquettaires lors de la prise de clopidogrel seul, et associé successivement aux différentes statines prescrites cliniquement.

Nous ne mettons pas en évidence d'interaction significative avec l'atorvastatine, la pravastatine, ou la rosuvastatine, mais il semble exister une interaction avec la fluvastatine et la simvastatine. Nous décrivons également une importante variabilité inter-individuelle dans la réponse au clopidogrel.

1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont un problème majeur de santé publique et affectent un nombre toujours croissant d'individus dans le monde entier. Ainsi, les dernières statistiques disponibles aux Etats-Unis décrivent une prévalence de 34,2% dans la population générale (soit 70,1 millions de personnes).[1] La maladie coronarienne (incluant angor, infarctus) plus spécifiquement touche 14,2% de la population (26,5 millions de personnes).

La relation entre dyslipidémie et incidence d'évènements cardiovasculaires est clairement établie. Actuellement, les statines (ou inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A - HMG CoA - réductase) sont considérées comme le moyen le plus efficace de diminuer les taux sériques de cholestérol. Cette classe de médicaments a permis une diminution significative de la survenue d'évènements cardiovasculaires, en prévention primaire ou secondaire. La plupart des statines (comme de nombreux autres médicaments) sont métabolisées par les cytochromes P450, certaines quasi exclusivement par le P450 3A4. Les interactions médicamenteuses attendues sont donc multiples, telles que inhibition du métabolisme des statines, avec le risque d'une augmentation des taux sériques au-delà d'un niveau toxique, ou inhibition compétitive du métabolisme d'autres substances, selon l'affinité des molécules pour le récepteur.

Le clopidogrel inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Son efficacité a été très largement démontrée dans la réduction du risque de survenue d'évènements thrombotiques chez des patients aux antécédents cardiovasculaires, et il est plus efficace que l'Aspirine dans cette situation. L'angioplastie coronarienne avec mise en place d'une endo-prothèse vasculaire (« stent ») intra-coronaire fait partie des traitements de routine en Cardiologie. L'activation plaquettaire suite à une telle procédure est bien établie. Le clopidogrel, en association avec l'Aspirine a permis un contrôle efficace du risque de thrombose intra-stent post procédure. C'est un pro-médicament, nécessitant une activation via le cytochrome 3A4.

Récemment, plusieurs études ont rapporté une inhibition significative de l'activité du clopidogrel par l'atorvastatine (métabolisée par le cytochrome 3A4), et ont causé une certaine agitation dans la communauté médicale, au vu du nombre très important de patients au bénéfice d'une association de ces deux substances. Une controverse s'est rapidement développée, certains articles successifs n'ayant pas retrouvé cet effet.

Nous avons alors mis en place une étude clinique, afin de tester une potentielle interaction statine-clopidogrel. Des volontaires sains ont absorbés pendant toute la durée de l'étude du clopidogrel à la dose habituelle, ainsi que les cinq statines actuellement disponibles, successivement durant une semaine; chaque prise de statine était suivie d'une semaine avec seulement le clopidogrel. Les agrégations plaquettaires étaient mesurées à la fin de chaque semaine.

Dans la première partie de ce travail , nous reviendrons sur les propriétés, les mécanismes d'action, le métabolisme et les indications du clopidogrel et des statines. Nous décrirons la controverse actuelle sur les interactions potentielles entre ces deux médicaments. Enfin, nous présenterons l'étude clinique réalisée récemment à ce sujet.

2. Clopidogrel

Le clopidogrel (figure 1) est un puissant médicament anti-agrégant plaquettaire, de la classe des thienopyridines, administré par voie orale. Il inhibe sélectivement et de manière irréversible l'activation plaquettaire induite par l'Adénosine Diphosphate (ADP).

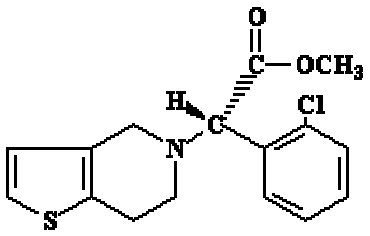


Figure 1 : Clopidogrel, $C_{16}H1_6ClNO_2S$

a. Activation plaquettaire :

Nous décrirons brièvement les mécanismes impliqués dans l'hémostase physiologique et en particulier l'agrégation plaquettaire, afin de mieux comprendre l'action du clopidogrel.

Les plaquettes jouent un rôle capital dans l'hémostase primaire, grâce à leur capacité :
- à adhérer à l'endothélium lésé
- s'agréger et participer à la formation du thrombus
- relargage de médiateurs pro et antithrombotiques [2].

L'importance de l'ADP dans l'activation plaquettaire a été montrée chez des patients avec tendance aux hémorragies [2,3], présentant un déficit soit dans le stockage intra-cellulaire de l'ADP, soit dans le mécanisme de sécrétion des granules denses, ou sur les récepteurs de l'ADP appelés P2 (à la surface des plaquettes) [4,5]. L'ADP est relâché par les globules rouges, les plaquettes activées ou des cellules endothéliales endommagées. L'ADP se lie aux récepteurs purinergiques, qui une fois activés changent la conformation du complexe GpIIb/IIIa à la surface des plaquettes, de sorte que celui-ci peut lier le fibrinogène, permettant ainsi de former des agrégats.

La détermination des différents récepteurs plaquettaires, et en particulier ceux impliqués dans l'activation plaquettaire a fait l'objet d'une intense recherche scientifique. La famille des récepteurs purinergiques est divisée en récepteurs à l'Adénosine (P1) et récepteurs nucléotidiques (P2). Ces récepteurs P2 sont eux-même divisés en 2 groupes principaux, P2X (récepteurs à canaux ioniques) et P2Y (récepteurs couplés à une protéine G).
L'agrégation plaquettaire induite par l'ADP requiert l'activation de deux récepteurs bien distincts [6-8] : le récepteur P2Y1, couplé à une phospholipase C, via une protéine G transmembranaire, et le P2Y12, également couplé à une protéine G et associé avec une inhibition de l'adenyl cyclase (figure 2). Plus spécifiquement, le récepteur P2Y1 est important pour la

mobilisation intracellulaire de Calcium, la déformation initiale des plaquettes et la production de thromboxane A2 [4], alors que le P2Y12 permet la stabilisation du thrombus et amplifie l'agrégation. L'inhibition de l'adenyl cyclase par le P2Y12 ne permet pas seule d'expliquer l'activation du récepteur plaquettaire au fibrinogène (GpIIb/IIIa), ni l'amplification de la sécrétion des granules denses, et la cascade moléculaire reste encore à préciser [4,9]. Par ailleurs, un des évènements déclenchants de la cascade de la coagulation lors du contact des plaquettes avec le collagène est la rapide exposition du facteur tissulaire. Cette exposition est inhibée in vitro par l'inhibition du récepteur P2Y12, via le clopidogrel [10].

L'effet des thienopyridines sur les récepteurs plaquettaires à l'ADP a été investigué dans de multiples études. Mills et al [11] démontrent initialement que le clopidogrel inhibe la liaison de ^{32}P-2-MeS-ADP aux plaquettes. Une autre étude [12] montre la réduction des sites de fixation à l'ADP sur les plaquettes chez des rats traités par clopidogrel (réduction du nombre de sites, sans diminution de l'affinité de ces sites pour l'ADP). La réduction du nombre de sites était corrélée avec la dose de clopidogrel administrée. Finalement, il a été montré grâce à des cellules clonées pour exprimer le récepteur P2Y12 que les thienopyridines sont des antagonistes irréversibles de ce récepteur [8,13], et récemment, ce récepteur a été caractérisé plus précisément [14].

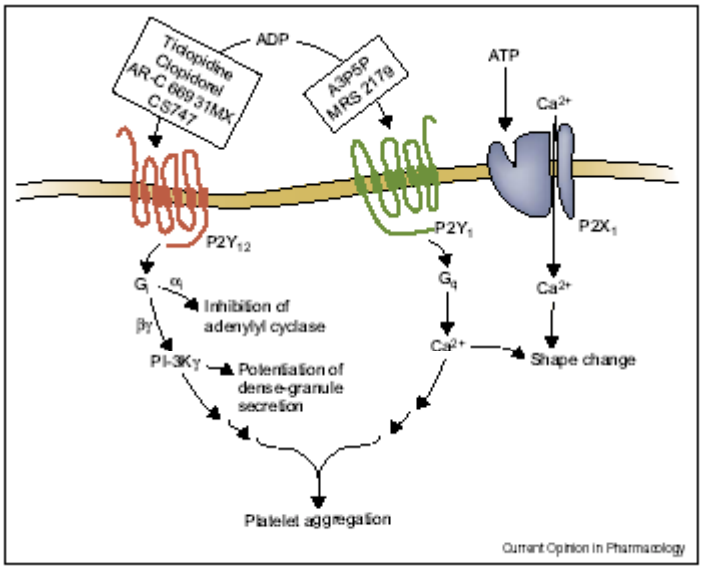


Figure 2 tirée de [4] : L'ADP se lie aux récepteurs P2Y1 et P2Y12 sur les plaquettes. Des antagonistes spécifiques se lient à ces récepteurs, comme le clopidogrel sur le P2Y12. Le récepteur P2Y12 induit normalement une inhibition de l'adenyl cyclase et « potentialise » la sécrétion des granules denses.

b. Métabolisme :

Le clopidogrel n'est pas actif in vitro et requiert une bio transformation dans le foie et le tube digestif [15], via les cytochromes (CYP).

Une étude a permis de montrer que le récepteur P2Y12 a 2 acides aminés cystéine dans sa partie extracellulaire, qui sont la cible de réactifs de type thiols [14]. La majorité du clopidogrel est hydrolysé par des estérases sous une forme inactive, alors que les CYP 450 catalysent

l'oxydation de l'anneau thiophène du clopidogrel en 2-oxoclopidogrel. Cet intermédiaire est ensuite transformé en ouvrant l'anneau thiophène pour former à la fois un groupe carboxyle et un groupe thiol (seconde oxydation), et c'est ce groupe thiol qui forme un pont disulfure avec les 2 acides aminés cystéine, ce qui inactive le récepteur [16]. Pereillo et al décrivent, en isolant une quantité suffisante de métabolites du clopidogrel, après l'avoir incubé avec des microsomes de foie humain, la structure chimique précise et l'activité biologique du métabolite actif. Seul un métabolite sur les huit isomères obtenus montrait in vitro l'activité antiplaquettaire du clopidogrel. L'interaction du métabolite actif avec son récepteur est donc extrêmement dépendante de sa conformation [17].

Ce n'est que récemment qu'on a pu déterminer le cytochrome responsable de cette « activation » du pro-médicament qu'est le clopidogrel. Ceci est d'une grande importance, au vu des potentielles interactions médicamenteuses en pratique clinique.
Savi et al avaient suspecté initialement le CYP 1A4, en mesurant la décroissance de clopidogrel marqué par du Carbone[14 18]. Clarke et al, en 2003, ont testé la capacité de microsomes, modifiés génétiquement pour ne contenir qu'une seule forme de cytochrome, à oxyder le clopidogrel. Après dix minutes d'incubation du clopidogrel en présence des différentes iso enzymes (d'origine humaine), ils ont mesuré la quantité restante de celui-ci en solution, par chromatographie liquide à haute performance. En contact avec les CYP 1A1, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 on ne note pas de différence significative. Les cytochromes 1A2 et 2B6 métabolisent une quantité faible mais significative, alors que les 3A4 et 3A5 en métabolisent une quantité très significative [19], cf. tableau1.

P450 iso enzyme	Clopidogrel restant après 10 min (si variation significative)	Valeur de *p* comparée au contrôle
	microMol	
Contrôle	50 +/- 3,7	
1A1	-	
1A2	45 +/- 2,6	0,044
2A6	-	
2B6	43 +/- 2,2	0,015
2C9	-	
2C19	-	
2D6	-	
2E1	-	
3A4	22 +/- 4,2	< 0,001
3A5	32 +/- 7,3	< 0,001

Tableau 1, modifié de [19] : oxydation du clopidogrel en présence des différents cytochromes.

Ceci va dans le même sens que l'étude clinique de Lau et al, qui montre que le métabolisme du clopidogrel est inhibé par des inhibiteurs du CYP 3A4 (érythromycine, troléandomycine), et augmenté par la rifampicine, un inducteur enzymatique [20] (et cf. infra). Dans une partie de ce travail, les investigateurs ont recruté des volontaires en bonne santé habituelle, ne prenant ni médicaments, ni d'autre substance pouvant interagir avec les cytochromes, et les ont séparés en 2 groupes. Ils ont mesuré les agrégations plaquettaires sous clopidogrel seul, puis associé soit à l'érythromycine, soit à la rifampicine (cf. figure 3).

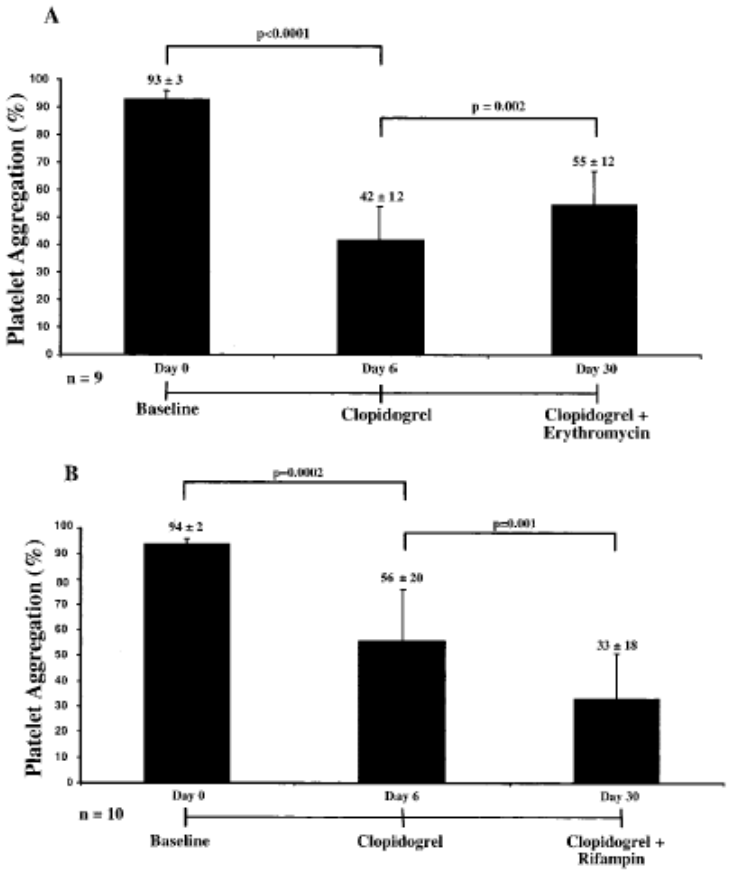


Figure 3, tirée de [20] : Mesure des agrégations plaquettaires après inhibition (A) et induction (B) du CYP 450-3A4. L'effet du clopidogrel est significativement plus marqué en présence d'un inducteur du CYP 3A4, et moins prononcé en présence d'un inhibiteur.

De plus, on a rapporté [21] (cf. figure 4) que l'agrégation plaquettaire chez des volontaires sains (n=29) était inversement proportionnelle à l'activité du CYP 3A4 chez les différents sujets. L'activité de cet enzyme était mesurée par un test non-invasif, dit « test respiratoire à l'érythromycine », où l'on mesure la quantité de CO2 expirée avant et après l'injection d'érythromycine marquée radioactivement [22]. En effet, l'érythromycine est métabolisée par le cytochrome 3A4, et la quantification du $^{14}CO2$ correspond à une mesure de l'activité du cytochrome.

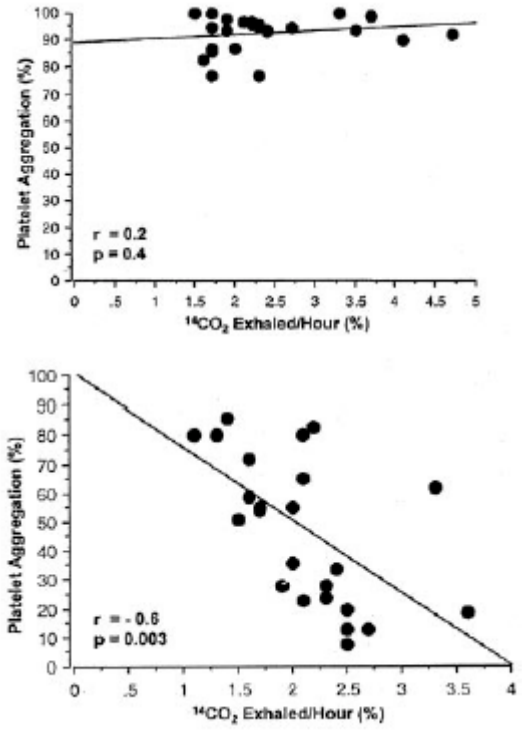


Figure 4, tirée de [21] : Pourcentage d'agrégation plaquettaire comparée avec l'activité du CYP 3A4, mesurée par le test respiratoire à l'érythromycine, avant (en haut) et après (en bas) une dose de charge de clopidogrel.

D'une façon similaire, une étude in vitro a démontré une puissante activité inhibitrice du clopidogrel sur le CYP2B6, et cette inhibition était temps- et concentration- dépendante, ainsi qu'irréversible. Le CYP 2C19 était aussi inhibé, mais moins fortement [23], cf. figure 5.

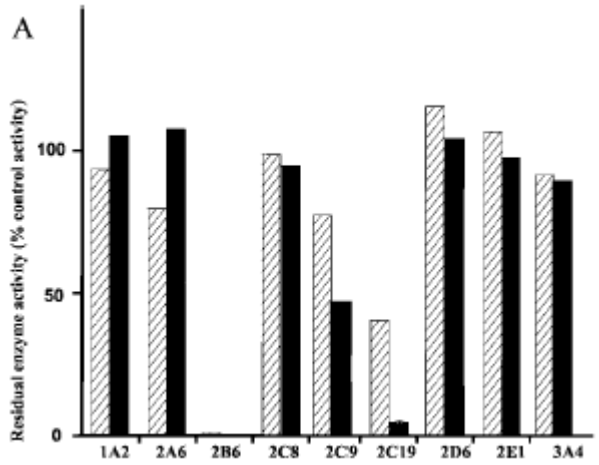


Figure 5, tirée de [23] : inhibition sélective des différents cytochromes recombinants, incubés avec 1 microM (hachuré) et 10 microM (plein) de clopidogrel.

c. Indications :

Le clopidogrel joue un rôle central dans la prévention des évènements cardio-vasculaires.

i. Évènements coronariens

Le rôle du Clopidgrel dans la prise en charge des syndromes coronariens aigus est récapitulé dans un article récent [24]. Celui-ci repose sur plusieurs études importantes que l'on présentera brièvement.

Le clopidogrel a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration américaine) en novembre 1997, après que l'étude CAPRIE (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events) ait montré une réduction supérieure des infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, et décès d'origine vasculaire chez les patients traités par clopidogrel par rapport à ceux sous Aspirine (risque annuel 5.3% contre 5.8%, p=0.04). Les patients, recrutés sur une période de trois ans, et avec un suivi moyen de 1,9 années étaient distribués aléatoirement en double aveugle en 2 groupes pour recevoir soit le clopidogrel [75 mg/j] (n=9599), soit de l'Aspirine [325 mg/j] (n=9586) [25].

L'étude CURE (Clopidogrel in addition to Aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation) [26] a ensuite évalué l'association du clopidogrel et de l'Aspirine chez des patients avec un syndrome coronarien aigu sans sus-décalage du segment ST à l'électrocardiogramme. Les investigateurs ont répartis 12562 patients (recrutés sur une période de 21 mois) en 2 groupes. Le premier (n = 6259) recevait le clopidogrel (dose de charge de 300 mg, puis 75 mg par jour), le deuxième un placebo (n = 6303), pour une période de trois à douze mois (durée moyenne 9 mois). En parallèle, l'Aspirine était débutée, ou continuée chez tous les patients. L'ajout du clopidogrel se révèle nettement bénéfique, celui-ci ayant permis de réduire le risque d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de décès toutes causes cardiovasculaires confondues (« outcome primaire ») durant les douze mois de suivi de l'étude. L' « outcome secondaire » associait en plus l'ischémie myocardique réfractaire. Cf. tableau 2 et figure 6.

Outcome	Groupe Clopidogrel N = 6259	Groupe Placebo N= 6303	Risque relatif 95 % IC	Valeur p
Primaire	582 (9,3 %)	719 (11,4 %)	0,80 (0,72-0,90)	<0,001
Secondaire	1035 (16,5%)	1187 (18,8%)	0,86 (0,79-0,94)	<0,001

Tableau 2 : incidence des évènements principaux dans l'étude CURE [26].

Cette étude incite donc à utiliser le clopidogrel en association avec l'Aspirine dans le cadre d'un syndrome coronarien aigu. Les directives actuelles [27] conseillent ainsi l'introduction de clopidogrel et son association avec l'Aspirine dès que possible chez les patients avec syndrome coronarien et infarctus myocardique sans élévation du segment ST, chez qui une intervention percutanée de revascularisation coronaire est prévue.

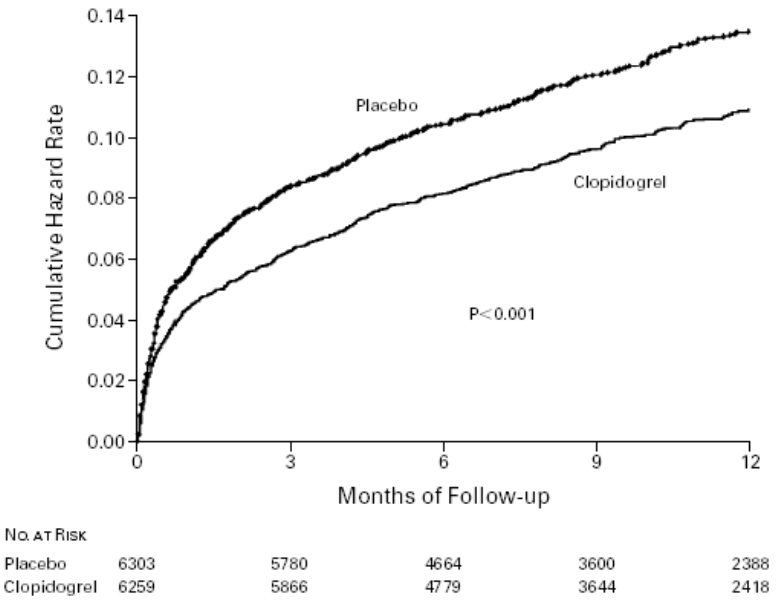


Figure 6, tirée de [26], montrant le risque cumulé de survenue d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de décès toutes causes cardiovasculaires confondues (« outcome primaire »).

ii. Angioplastie coronarienne

La coronarographie et l'angioplastie coronarienne sont devenues une des interventions les plus fréquentes en Cardiologie. Les directives pour l'usage du clopidogrel [28], recommandent la prise d'une dose de charge d'au moins 300 mg avant l'intervention, et ensuite de 75 mg par jour, pour une durée totale encore mal définie (mais plus d'un mois en tous cas) [29]. L'introduction d'un double anti-agrégation plaquettaire (aspirine et clopidogrel, ou aspirine et ticlopidine) a permis de réduire de manière très importante le taux de thrombose intra-stent [30,31].

iii. Accidents vasculaires cérébraux

Chez des patients ayant présenté un accident vasculaire cérébral (AVC) ou ischémique transitoire (AIT), d'origine non-cardioembolique, on recommande actuellement le clopidogrel parmi les autres anti-agrégant plaquettaires de premier choix (Aspirine, Dipyridamole) [32,33].

iv. Artériopathie périphérique

Cette pathologie est associée avec une hyperactivité plaquettaire. On a pu montrer que dans cette condition, le clopidogrel est un inhibiteur plus puissant de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP que l'Aspirine et qu'une association des 2 était plus efficace qu'une monothérapie [34]. Dans un article de revue [35] concernant des patients avec une artériopathie périphérique, des auteurs ont montré que l'usage du clopidogrel (et de statines) était significativement associé avec une réduction du nombre de décès, d'infarctus myocardiques et d'AVC (OR = 0,17, 0.04<95% IC<0.78, p = 0,02).

d. Efficacité, variation inter-individuelle, résistance :

Bien que le bénéfice clinique et l'efficacité du clopidogrel soient aujourd'hui largement démontrés, nous savons également que la réponse à une dose standard de ce médicament présente une importante variation interindividuelle [36-39].

Ainsi, une étude [36] a testé la réponse au clopidogrel de 92 patients devant subir la mise en place d'un stent intracoronarien, en mesurant l'agrégation plaquettaire et l'expression de récepteurs plaquettaires par cytométrie de flux. Les patients recevaient une dose de 300 mg après mise en place réussie du stent, puis 75 mg par jour pendant un mois. Les auteurs ont défini la résistance au clopidogrel comme une différence absolue entre agrégation basale et après traitement de 10 % ou moins. Ils décrivent ainsi une courbe de réponse au clopidogrel de type distribution normale, et une résistance chez 31 % des patients à 5 jours, 15 % à 30 jours.
On retrouve des résultats similaires dans une étude [37] ayant mesuré la réactivité plaquettaire deux jours après une dose de charge de 300 mg puis 75 mg par jour (également auprès de patients chez qui la mise en place d'un stent intracoronarien était prévue). En effet, on constate une inhibition plaquettaire forte chez 4 individus sur 18 (réactivité plaquettaire < 10 %), et une faible inhibition (réactivité > 60 %) chez 5 patients sur 18.
Müller et al [38] ont précisé la prévalence des « non répondeurs » au clopidogrel, toujours chez des patients (n = 105) chez qui une angioplastie coronarienne était prévue. Ils ont défini trois situations :

- répondeurs : inhibition de > 30 %
- semi-répondeurs : inhibition de 10 à 29 %
- non-répondeurs : inhibition de < 10 %.

Ces agrégations plaquettaires étaient induites par 5 et 20 microMol d'ADP. On constate que jusqu'à 5 à 11 % de ces patients ne répondent pas de manière adéquate au clopidogrel.
Enfin, une étude récente [39], rétrospective confirme une variabilité interindividuelle de réponse au clopidogrel importante (cf. figure 7).

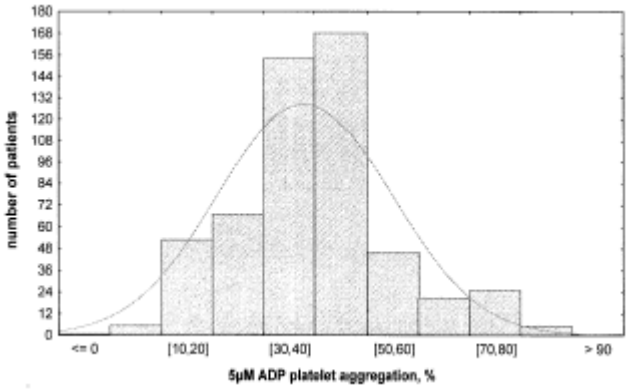


Figure 7, tirée de [39] : Distribution des agrégations plaquettaires en réponse à une stimulation par 5 microMol d'ADP chez 544 patients sous traitement de clopidogrel.

Comme on l'a vu précédemment, le clopidogrel doit être métabolisé par le cytochrome 3A4 pour être activé, et une des explications concernant cette importante variation de réponse est à trouver dans le polymorphisme des cytochromes. La mesure de l'activité du clopidogrel a pu ainsi être corrélée à l'activité métabolique du CYP 3A4 [21].

3. Statines

Les premières études concernant des statines, ou inhibiteurs de la 3-Hydroxy-3methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA)-réductase, remontent à la fin des années 1970 [40]. Depuis, cette classe de médicament est devenue l'agent le plus fréquemment prescrit pour le traitement de l'hypercholestérolémie, en prévention primaire ou secondaire.
La reconnaissance du rôle de la dyslipidémie dans l'apparition et le développement de l'athérosclérose est maintenant bien établie. Les premières études associant taux sérique élevé de cholestérol et prévalence augmentée de maladie coronarienne et infarctus remontent aux années 1930 [41]. Dans une étude de cohorte [42] basée sur près de 400000 personnes avec un suivi moyen de 6 ans, on constate une relation claire entre le taux individuel de cholestérol et la mortalité d'origine cardiovasculaire (cf. figure 8). Cette relation persiste à 12 ans [43].

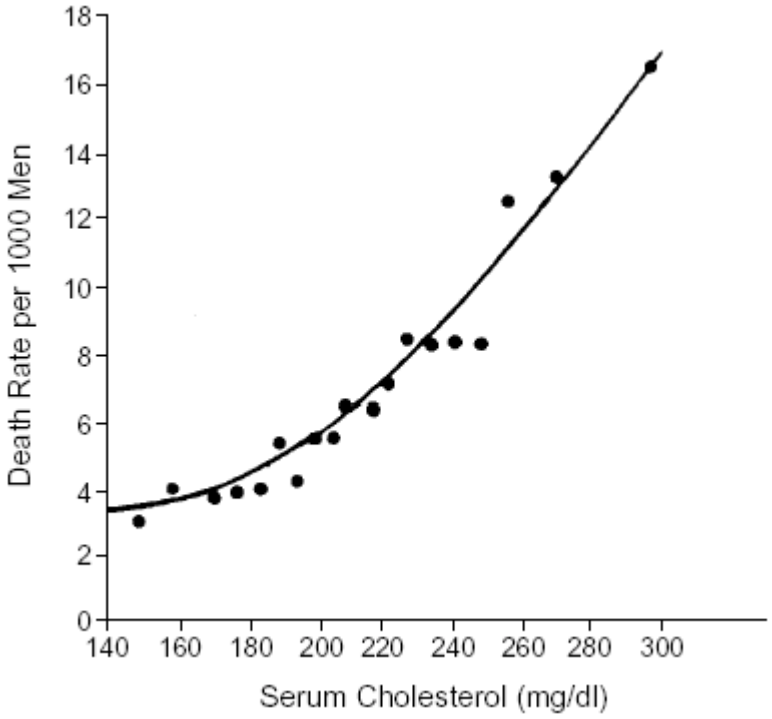


Figure 8, tirée de [42] : relation entre taux sérique de cholestérol et le taux de décès de maladie coronarienne, ajusté pour l'âge (Cholestérol en mmol/l = mg/dl * 0,025).

a. Mécanisme d'action :

La description de l'effet thérapeutique des statines nécessite un bref rappel du métabolisme des lipides, résumé sur la figure 9 [44]. Le cholestérol est absorbé par l'intestin et est transporté jusqu'au foie par les chylomicrons et absorbé par un récepteur spécifique (LRP sur la figure). Le cholestérol entre ensuite dans la circulation sanguine sous la forme d'une lipoprotéine de très basse densité (VLDL), qui est ensuite métabolisé par une lipoprotéine lipase, qui soustrait les triglycérides. Les lipoprotéines ainsi modifiées sont ensuite absorbées par le foie (récepteurs LDL, lipoprotéine de basse densité). Le cholestérol est transporté des cellules périphériques vers le foie via les HDL (lipoprotéine de haute densité), et soit recyclé en LDL et VLDL (via une enzyme CETP, cholesterol-ester-transport protein), soit métabolisé dans le foie, notamment via la lipase hépatique. Le cholestérol est excrété ensuite dans la bile.

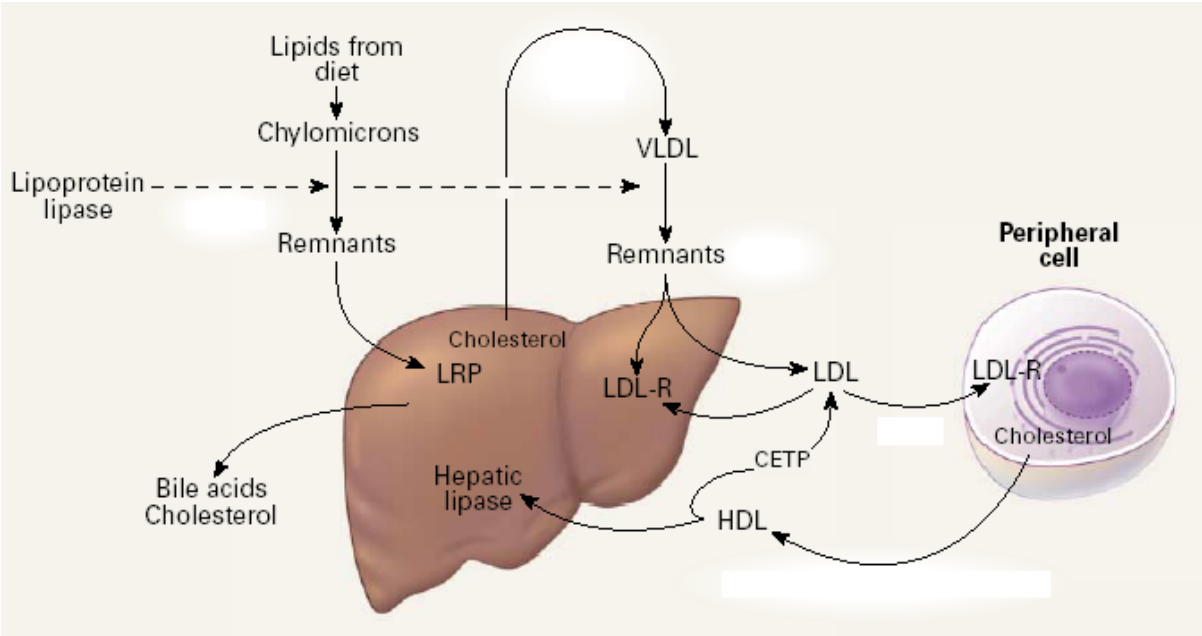
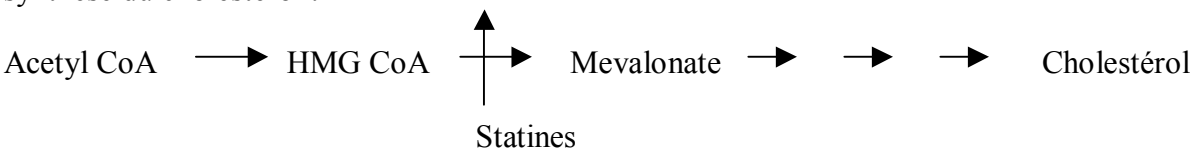


Figure 9 (modifiée à partir de [44]) : cf. texte. Il est usuel de montrer une transformation directe des VLDL en LDL dans le compartiment sanguin, plutôt qu'après passage à travers le foie.

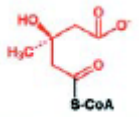
Les statines sont similaires à l'HMG-CoA, un précurseur du cholestérol, et sont des inhibiteurs compétitifs de l'HMG-CoA réductase (HMGR), une étape clé (de contrôle métabolique) dans la synthèse du cholestérol :



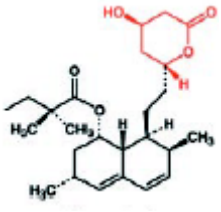
La diminution de la synthèse du cholestérol endogène implique une diminution de la concentration intracellulaire de cholestérol, ce qui active une protéase et va ensuite stimuler la synthèse des récepteurs à LDL, via une cascade moléculaire. L'expression augmentée de récepteurs LDL augmente ainsi l'endocytose des LDL et diminue la quantité de LDL circulants [45]. La majorité du cholestérol est transportée par les LDL, d'où l'utilité clinique d'augmenter son élimination.

Le mécanisme d'inhibition a été clairement élucidé par cristallographie aux rayons X [46,47]. Toutes les statines ont une partie semblable à l'HMG-CoA (figure 10), qui se fixe sur le récepteur de l'enzyme, alors que l'autre moitié de la molécule de statine, hydrophobe se positionne dans un « renfoncement » également hydrophobe de l'enzyme. L'accès du substrat HMG-CoA à l'HMGR est donc bloqué. La partie hydrophobe est constituée d'un anneau à 10 carbones pour les statines de type 1 sur la figure 10, alors que celles de type 2 ont un groupe beaucoup plus gros. Les statines de type 1 comprennent la lovastatine, la simvastatine et la pravastatine, et sont dérivées d'un champignon, *Aspergillus terreus*, les autres sont synthétiques.

HMG-CoA :

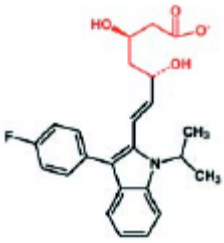


Type 1 :

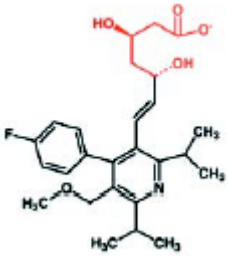


Simvastatine, IC_{50} = 11nM

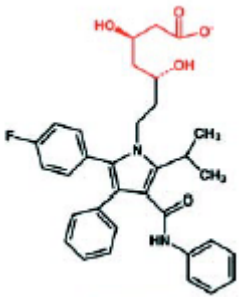
Type 2 :



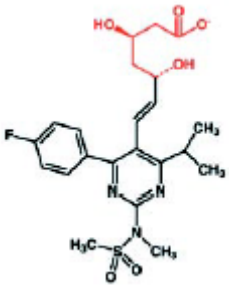
Fluvastatine
IC_{50} = 11 nM



Cerivastatine
IC_{50} = 10 nM



Atorvastatine
IC_{50} = 8 nM



Rosuvastatine
IC_{50} = 5 nM

Figure 10 (modifiée de [47]) : structure chimique de différentes statines et de l'HMG-CoA (en rouge). IC représente la concentration moyenne inhibitrice.

b. Pharmacocinétique et métabolisme :

La lova- et la simvastatine sont 2 pro-médicaments, administrés sous une forme lactone, et activées par hydrolyse, via des carboxyestérases non spécifiques, essentiellement dans la paroi intestinale et le foie. Les autres statines sont administrées sous la forme active hydroxy-acide.
Toutes les statines sur le marché actuellement sont métabolisées par les cytochromes, sauf la pravastatine et la rosuvastatine [48,49]. En effet, les substances lipophiles sont plus susceptibles d'être métabolisées par les cytochromes, et ces deux statines sont plutôt hydrophiles (par rapport aux autres). La rosuvastatine est excrétée en majeure partie (80 % environ) dans les selles sous forme inchangée [49,50]. La pravastatine est métabolisée via de multiples voies. Le tableau 3 résume les principales propriétés pharmacocinétiques des statines (actuellement commercialisées en Suisse, sauf pour la rosuvastatine), et permet de prévoir des interactions médicamenteuses potentielles. En effet, de multiples médicaments (mais également le pamplemousse) pouvant être administrés en même temps sont également des inhibiteurs des cytochromes 3A4 (ciclosporine, verapamil, diltiazem…).

	Métabolisée par	Inhibiteur (puissant/*modéré*)	Solubilité	½ vie (h)
Simvastatine	CYP 3A4 / 2D6	CYP 2C9	lipophile	*2*
Fluvastatine	CYP 2C9, (2D6/2C8/3A4)	CYP 2C9	lipophile	1,2
Atorvastatine	CYP 3A4		lipophile	14
Pravastatine	Cytosol hépatique		hydrophile	1,8
Rosuvastatine	-		hydrophile	19

Tableau 3 : métabolisme des principales statines sur le marché actuellement (modifié à partir de [51])

c. Indications, efficacité et bénéfices :

Les statines ont démontré de multiples bénéfices cliniques, certains indépendamment de leur effet sur la baisse des valeurs de cholestérol [52-55], et ceci avec une incidence très faible d'effets secondaires, incitant certains à les considérer comme l' « aspirine » de demain [56]. L'efficacité des statines est bien documentée dans plusieurs situations :

i. Prévention secondaire

Plusieurs grandes études multicentriques, randomisées et en double aveugle ont bien établi qu'un traitement par statine diminue le risque de décès ou de survenue d'évènements cardiovasculaires, et cela pour une large plage de valeurs de cholestérol sérique [57-61], chez des patients avec une dyslipidémie et des antécédents cardiovasculaires (prévention secondaire).
Une importante méta-analyse récente [61] évalue l'efficacité de ce traitement chez des patients avec une maladie coronarienne, en fonction entre autres, des caractéristiques des patients traités, et des niveaux de LDL-cholestérol avant inclusion. Les études prises en compte dans cet article

regroupent 69511 participants, avec un suivi entre 0,3 et 6,1 années. Les auteurs mettent ainsi en évidence une baisse du LDL-cholestérol entre 20 et 40 %, une diminution de la mortalité par maladie coronarienne ou d'infarctus du myocarde non fatal de 25 %, et une diminution de la mortalité toutes causes confondues de 16 %.

ii. Prévention primaire

Trois grandes études ont mis en évidence le bénéfice d'un traitement de statine contre placebo dans cette situation (dyslipidémie, sans antécédent d'événement cardiovasculaire), et sont brièvement résumées dans le tableau 4:

L'étude WOSCOPS [62] a inclus 6595 hommes présentant une hypercholestérolémie (cholestérol total > 6,5 mmol/l), mais sans antécédents cardiovasculaires, randomisés pour recevoir de la pravastatine ou un placebo. On constate notamment une diminution du risque d'infarctus du myocarde associé ou non à un décès de 31 % ($p < 0,001$) dans le groupe pravastatine.

L'étude AFCAPS/TexCAPS [63] compare 6605 patients (dont 997 femmes post-ménopause), sans antécédent cardiovasculaire, et avec des valeurs de cholestérol dans la moyenne de la population (cholestérol total 5,7 mmol/l), recevant de la lovastatine ou un placebo. Les auteurs mettent en évidence une diminution nette de l'incidence d'un premier événement coronarien (183 vs 116, risque relatif 0,63, 0.50< 95 % IC<0.79) dans le groupe lovastatine.

L'étude ASCOT-LLA [64] inclut 10305 patients (à partir d'un groupe de 19342 présentant une hypertension artérielle nécessitant au moins deux anti-hypertenseurs), qui ont au moins trois autres facteurs de risque cardio-vasculaire, et un cholestérol total ≤ 6,5 mmol/l. L'étude est interrompue prématurément au vu de la survenue de 100 infarctus du myocarde associé ou non à un décès dans le groupe atorvastatine, contre 154 dans le groupe placebo (hazard ratio 0,64, 0,50< 95 % IC<0,83).

iii. Artériopathie périphérique et cérébrovasculaire

Les statines ont également prouvé leur efficacité dans la diminution du taux de survenue d'évènements cérébrovasculaires, en prévention secondaire [65].

iv. Régression de l'artériosclérose

Une méta analyse récente sur 10 essais cliniques, soit 3443 individus de 30 à 70 ans, avec un suivi de 1 à 4 ans, permet d'évaluer l'efficacité des statines pour freiner la progression de l'artériosclérose carotidienne. 8 des 10 études revues montrent une différence significative entre les statines et le placebo [66]. De même, une étude a comparé un traitement à dose élevée contre standard de statine (pravastatine 40 mg et atorvastatine 80 mg), en double aveugle, en évaluant par ultrason intravasculaire la progression de l'artériosclérose coronarienne après 18 mois. On observe une discrète progression dans le groupe pravastatine (2,7 %, 0,2<95 % IC<4,7 %), et une stabilisation dans le groupe atorvastatine (-0.4 %, –2,4< 95 % IC<1,5 %) [67].

v. Effets pléiotrophiques

En dehors de leur effet sur le métabolisme et les taux sériques de cholestérol, les statines ont une large gamme d'activités biologiques, appelés « effets pléiotrophiques ». En effet, les études in vitro suggèrent une activité anti-inflammatoire sur les cellules impliquées dans les mécanismes de l'artériosclérose (diminution de l'adhésion des cellules inflammatoires à l'endothélium, diminution de la réponse immunitaire de type Th1 dans un modèle murin…). Les inhibiteurs de l'HMGCoA réductase semblent aussi moduler l'expression et la fonction des chémokines, médiateurs impliqués dans la migration sous-endothéliale des cellules inflammatoires. L'inhibition de la synthèse du cholestérol conduit à une diminution du taux intracellulaire d'isoprénoides (intermédiaires entre le mévalonate et le cholestérol), qui sont impliqués dans la modulation de l'inflammation [68]. Plusieurs études, avec différentes statines, ont montré que cette

classe de médicament permet une diminution du taux sérique de la protéine C-réactive (« CRP »), un marqueur de l'inflammation [69-71]. La CRP est produite par les hépatocytes, principalement en réponse à l'interleukine-6, qui, en se liant à son récepteur active un facteur de transcription. Un article récent montre que les statines agissent directement dans les hépatocytes en inhibant l'activation de ce facteur de transcription [72].
Deux études parues en 2005 ont confirmé que le bénéfice clinique d'un traitement par statine, indépendemment de la diminution du cholestérol sérique, était lié à la baisse du taux de protéine C-réactive (« CRP »), un marqueur de l'inflammation. Ainsi, Ridker et al. [73] ont mesuré les taux plasmatiques de LDL-cholestérol et de CRP parmi des patients ayant présenté un infarctus myocardique ou un syndrome coronarien à haut risque et participant à une étude clinique comparant deux statines différentes [74]. 4162 patients ont été inclus entre novembre 2000 et février 2004. Ces taux plasmatiques étaient mesurés lors de l'inclusion et à 30 jours. Chez les patients qui obtiennent un taux de CRP « bas », défini comme inférieur à 2 mg/L après un mois, on constate un taux de survenue d'événement cardiovasculaire ou de décès significativement plus faible, et ceci indépendament du taux de LDL-cholestérol (2,8 vs 3,9 pour 100 patients-années, P = 0,006). Dans une autre étude, les auteurs ont réalisé un ultrason endovasculaire auprès de 502 patients, avant et 18 mois après avoir été randomisé pour recevoir soit de l'atorvastatine (80 mg/j), soit de la pravastatine (40 mg/j), afin de mesurer la progression de l'athérosclérose. L'analyse multivariée met en évidence que la diminution des taux de CRP est associée de manière indépendante des valeurs de cholestérol à une progression réduite des lésions d'athérosclérose [75]

4. Controverse : interactions statines/clopidogrel ?

Comme décrit précédemment, le clopidogrel et la plupart des statines sont métabolisés par les cytochromes. Les risques, au moins théoriques d'interactions médicamenteuses sont donc très vraisemblables. Plusieurs études [19,20,76] ont, dès 2002, suggéré une possible diminution de l'efficacité du clopidogrel lors d'une prise concomitante de certaines statines. Cependant, les mesures d'agrégations plaquettaires (ou du métabolisme du clopidogrel) sont réalisées avec des méthodes différentes, et en rendent l'interprétation difficile (cf. infra).

a. Arguments en faveur d'une interaction :

Ainsi, dans l'étude déjà évoquée précédemment [19], Clarke et al ont mesuré le taux d'oxydation du clopidogrel par des microsomes humains contenant le CYP3A en présence de différentes concentrations d'atorvastatine (forme lactone et acide de l'atorvastatine). Les deux isoformes d'atorvastatine inhibent l'oxydation du clopidogrel :

- l'atorvastatine-acide inhibe 80 % de l'oxydation du clopidogrel, à une concentration de l'ordre de dix fois celle du clopidogrel,
- la forme lactone inhibe 90 % de l'oxydation à une concentration équimolaire de clopidogrel.
- la courbe ainsi obtenue est de type hyperbolique (cf. figure 11).

L'affinité de la forme lactone pour le CYP 3A4 est donc environ 20 fois plus élevée. L'atorvastatine est administrée sous forme de sel d'atorvastatine/acide et rapidement convertie en lactone. In vivo, les deux formes sont en équilibre, avec une concentration sérique équivalente [77].

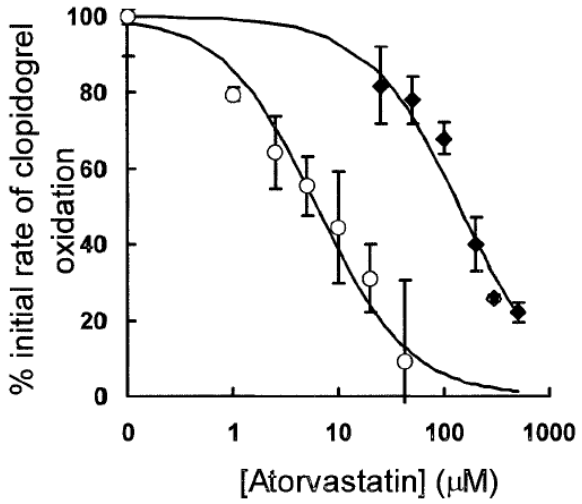


Figure 11, tirée de [19] : inhibition du taux d'oxydation du clopidogrel par les CYP 3A4 en présence d'atorvastatine – acide (losanges noirs) et lactone (ronds clairs)

L'étude menée par Lau et al [20], qui montrait que l'activation du clopidogrel dépend du cytochrome 3A4 suggère également une inhibition compétitive du cytochrome 3A4 par l'atorvastatine induisant une diminution de l'efficacité du clopidogrel. Les investigateurs ont inclus 44 patients devant bénéficier de la mise en place d'un stent intra-coronaire. Ils recevaient

une dose de charge de 300 mg de clopidogrel, puis la dose d'entretien de 75 mg pendant 28 jours. Les agrégations plaquettaires ont été mesurées à l'état basal, 24 heures après la dose de charge et, 6 à 8 jours plus tard chez 13 patients. Une partie des volontaires était au préalable sous un traitement de statine, soit métabolisée par le CYP3A4 (atorvastatine), soit non-métabolisée (pravastatine). Les agrégations plaquettaires sont mesurées par comptage automatisé de cellules et exprimées en pourcentage par rapport à un échantillon témoin. Les auteurs décrivent un coefficient de corrélation entre leur appareil et la technique de référence de mesure d'agrégation plaquettaire (agrégomètre et plasma riche en plaquettes) de 0,83. Le détail et les résultats sont résumés ci-dessous et dans les tableaux 4 et 5.

Volontaires :

n = 44

16 sans statine

19 sous statine

9 sous pravastatine 40 mg

19 sous atorvastatine
- 7 sous 10 mg
- 7 sous 20 mg
- 5 sous 40 mg

	clopidogrel seul	… et pravastatine	… et atorvastatine
Agrégations plaquettaires (%)	34 +/- 23	46 +/- 18	77 +/- 15

Tableau 4 (à partir de [20]) : agrégations 24 h après la dose de charge de clopidogrel selon la prise ou non de statine

Dose d'atorvastatine	0 mg	10 mg	20 mg	40 mg
Agrégations plaquettaires (%)	34 +/- 23	58 +/- 15	74 +/- 10	89 +/- 7

Tableau 5 (à partir de [20]) : activité antiplaquettaire du clopidogrel selon la dose d'atorvastatine

On constate donc une diminution dose dépendante de l'efficacité du clopidogrel en présence d'atorvastatine ($p<0,001$), alors que celle-ci n'est pas modifiée par la présence de pravastatine (p = ns).

Une étude similaire [76], également à partir de volontaires bénéficiant de la mise en place d'un stent coronarien, a mesuré par cytométrie de flux l'expression de P-sélectine (CD62P) à la

surface des plaquettes. Les mesures sont effectuées 0, 5, 48 heures après administration d'une dose de charge de 300 mg, puis 75 mg par jour de clopidogrel. Deux groupes sont étudiés :

- 22 volontaires (contrôles), sans prise de statine concomitante ou ayant interrompu un tel traitement depuis plus de 3 mois,
- 25 volontaires sous statine, dont 17 sous atorvastatine 20 à 40 mg par jour et 8 sous simvastatine 10 à 20 mg par jour.

Les auteurs retrouvent une diminution de l'effet du clopidogrel dans le groupe statine, avec une diminution relative d'environ 29 %, peu après la dose de charge, et de 16 % à 48 heures.

b. Arguments contre une interaction significative :

Une étude publiée en 2004 a mesuré les agrégations et des marqueurs de surface plaquettaires chez des patients devant subir une coronarographie, avant, 4 et 24 heures après la prise d'une dose de charge de 300 mg de clopidogrel [78]. Tous les patients prenaient de l'Aspirine depuis au moins une semaine. Les auteurs distinguent trois groupes de 25 : patients sous atorvastatine (10 à 80 mg), patients sous une autre statine (simva-, prava-, lova-, fluvastatine, multiples dosages), et patients sans statines. Les caractéristiques cliniques et démographiques sont par ailleurs similaires dans les trois groupes. Les auteurs ne décrivent aucune différence significative dans la réponse au clopidogrel parmi ces trois groupes. Cette étude présente cependant plusieurs limitations :

- faible nombre de patients dans chaque groupe,
- multiples dosages de statines, un effet dose-dépendant étant possible,
- le groupe « non-atorvastatine » inclut différentes statines, métabolisées ou non par le cytochrome 3A4,
- les mesures sont réalisées avant que l'état d'équilibre ne soit atteint.

De même, une étude a recherché la prévalence d'une non-réponse au clopidogrel (définie comme une diminution de la fonction plaquettaire de moins de 10% par rapport à l'état basal) chez des patients devant subir une coronarographie. La fonction plaquettaire était évaluée par trois méthodes différentes (notamment un agrégomètre optique). Certains patients recevaient une dose de charge, et le moment exact des prises de sang n'est pas précisé. Sur 50 patients, 15 sont considérés comme non-répondeurs (30%). Les auteurs ne trouvent aucune différence significative parmi les 2 groupes, y compris concernant la prise de statine ou plus spécifiquement d'atorvastatine. [79]

Une étude clinique récente a recherché l'effet du clopidogrel chez 45 patients hypercholestérolémiques ayant présenté un premier épisode de syndrome coronarien. Ces patients ont reçu de manière randomisée soit 10 mg d'atorvastatine (n = 21), soit 40 mg de pravastatine (n = 24). Parmi ces deux groupes, 30 bénéficient d'une coronarographie et reçoivent également du clopidogrel (dose de charge et entretien), 15 refusent la coronarographie et ne sont pas sous clopidogrel. Les agrégations plaquettaires sont mesurées à l'admission et après 5 semaines de traitement, par un agrégomètre optique (en présence de différentes concentrations d'ADP et de peptide-14 activateur du récepteur de la thrombine) et par cytométrie de flux (expression de P-sélectine notamment). Les auteurs ne mettent en évidence aucune différence significative dans le deux groupes. [80]

Une autre étude, quelque peu similaire, a étudié 77 patients présentant une maladie coronarienne stable. Aucun ne recevait de statine au préalable. Les volontaires ont été randomisés en plusieurs groupes : atorvastatine 20 mg (n = 7), fluvastatine 20 mg (n = 7), lovastatine 20mg (n = 20),

pravastatine 20 mg (n = 20), simvastatine 20 mg (n = 6), cerivastatine 0.5mg (n = 5), ou un placebo (n = 12), 24 heures avant de recevoir une dose de charge de 600 mg de clopidogrel, suivie d'un entretien de 150 mg par jour. Les agrégations plaquettaires sont mesurées par un agrégomètre optique, avant, 2 et 4 heures après l'administration du clopidogrel. Les auteurs ne constatent aucune différence significative entre les patients recevant une statine et un placebo, ni entre les différentes statines. [81] Cependant, ces résultats sont d'interprétation difficile au vu de la dose de charge et d'entretien du clopidogrel (double de la dose habituelle), alors que les agrégations sont mesurées très précocement et reflètent en fait l'effet de la dose de charge. De plus, les patients ne reçoivent une statine que depuis 24 heures, l'état d'équilibre est donc loin d'être atteint.

c. Cliniquement significatif ?

Comme on l'a vu précédemment, une interaction entre certaines statines et le clopidogrel est suspectée, bien que non retrouvée dans plusieurs études prospectives (sujettes à quelques critiques cependant). Certains auteurs ont recherché si des répercussions cliniques pouvaient être mises en évidence. Toutes ces études sont cependant rétrospectives.

Peu après la parution des premières études suggérant une éventuelle interaction, des auteurs ont procédé à une analyse rétrospective de l'étude CREDO [82]. L'étude CREDO (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation) [31] a enrôlé 2116 patients avec une maladie coronarienne symptomatique, nécessitant une intervention percutanée de revascularisation. Les volontaires recevaient soit une dose de charge de 300 mg de clopidogrel avant la procédure, soit un placebo, puis tous recevaient le clopidogrel pendant 28 jours. Ensuite, ceux qui avaient reçu la dose de charge continuaient pour une durée totale d'une année. A un an, on constate une diminution du risque relatif de décès, infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral de 26,9% dans le groupe clopidogrel (8,6 vs 11,8 %, p = 0,02).
Dans leur analyse post-hoc, les auteurs ont recherché la prise de statines et ont identifié 2 groupes différents : statines métabolisées par le CYP 3A4 (atorva-, lova-, ceriva-, simvastatine), et non métabolisées par le CYP 3A4 (prava- et fluvastatine). Le bénéfice de la prise du clopidogrel était maintenu malgré la prise de statine, et indépendamment du métabolisme de la statine. Les résultats sont résumés dans le tableau 6. Bien que les odds ratios à 1 an apparaissent meilleurs chez les patients prenant du clopidogrel associé à une statine non métabolisée par le CYP 3A4 (OR 0,36 vs 0,62), ces différences ne sont pas significatives. Cependant, l'interprétation de cette étude est limitée par son caractère rétrospectif ainsi que par l'absence de dosage des statines.

	Statine métabolisée par CYP 3A4 n = 1001, p = 0,03	Statine non métabolisée via 3A4 N = 158, p = 0,11
Prise de clopidogrel	7,6%	5,4%
Contrôle	11,8%	13,6%

Tableau 6 (tiré de [82]) : survenue de décès, infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral selon la prise de différentes statines, dans le groupe clopidogrel et placebo.

Une importante étude multicentrique récente [74], comprenant 4162 patients hospitalisés pour un syndrome coronarien aigu vise à comparer un traitement par atorvastatine 80 mg /j contre 40 mg/j de pravastatine. Le suivi moyen est de 24 mois (intervalle de 18 à 36 mois). Le taux global de décès, infarctus aigu, nécessité d'une procédure de revascularisation coronarienne ou accident

vasculaire cérébral à deux ans est significativement en faveur du groupe atorvastatine (26,4 % vs 22,4 %, soit une diminution de 16 % du « hazard ratio », p=0,005, 5<95 % IC<26 %). De manière intéressante, 72 % des patients ont également un traitement de clopidogrel ou ticlopidine à l'inclusion dans l'étude , 20 % le poursuivent encore à un an. Bien que cette étude ne recherche pas spécifiquement une interaction entre les statines et le clopidogrel, au vu de l'important bénéfice clinique du traitement par atorvastatine, une interaction cliniquement relevante semble peu probable.

D'autres auteurs ont revu les dossiers de 1651 patients admis dans un hôpital avec un syndrome coronarien entre janvier 1999 et février 2003, en recherchant la prise concomitante de clopidogrel et de statines, métabolisées ou non via les cytochromes 3A4. La mortalité et la survenue d'évènements cardiaques majeurs étaient analysés selon la statine reçue. Les résultats sont résumés dans le tableau 7. A noter que sur les 1651 dossiers revus, seule la moitié des patients environ ont reçu du clopidogrel, associé ou non à l'une ou l'autre statine. Les différents groupes étaient par ailleurs similaires concernant leurs caractéristiques démographiques ou antécédents médicaux. Ils n'observent aucune différence significative concernant le bénéfice clinique des différentes statines. [83]

Survenue de	sans statine (n = 331)	Avec statine CYP3A4 + (n = 561)	Avec statine CYP3A4 – (n = 91)	Valeur de p CYP3A4 + et-
Décès	18 (10%)	32 (5,7%)	3 (3,3%)	0,24
Infarctus myocardique	10 (8,9%)	28 (7,6%)	9 (9,7%)	0,39
AVC	2 (1,3%)	5 (1,4%)	0	0,7

Tableau 7 (tiré de [83]) : survenue d'évènements chez des patients prenant du clopidogrel seul ou associé à une statine métabolisée soit par le CYP3A4 (CYP3A4 +), soit par un autre cytochrome (CYP3A4 -).

Une autre étude est basée sur un registre allemand multicentrique des traitements de l'infarctus du myocarde (MITRA PLUS), et comprenant 53853 patients consécutifs de 1992 à 2002. 1576 patients ont reçu de l'atorvastatine à leur sortie de l'hôpital, dont 883 associée à du clopidogrel (les patients recevant du clopidogrel étaient en moyenne plus jeunes). La mortalité à long terme dans le groupe clopidogrel est de 3,2% contre 5,6% (p<0,05). Les auteurs ont ensuite recherché une différence entre les patients ayant reçu le clopidogrel à leur sortie de l'hôpital, mais associé à différentes statines (atorvastatine, n = 883), ou d'autres statines (n = 1203, dont 34 % de simvastatine). La mortalité à long terme dans le groupe atorvastatine est de 3,2 % contre 2,7 % dans l'autre groupe, mais cette différence reste non significative. [84] Ils concluent donc à un bénéfice clinique équivalent des différentes statines, associées au clopidogrel, malgré les limitations de leur étude (absence des posologies des différentes statines, confusion dans le même groupe de statines métabolisées ou non par le cytochrome 3A4, telle que la simvastatine).

5. Etude clinique

Nous avons mis en place une étude clinique, réalisée entre octobre et décembre 2003 aux HUG, dans le cadre des services de Médecine II, Cardiologie, et Hémostase, ainsi qu'avec la participation de la division de Pharmacologie (CMU), afin de tenter de mieux préciser les interactions statines-clopidogrel.

a. Description :

Notre étude a fait l'objet d'un protocole détaillé, approuvé par le comité d'éthique local. Les volontaires ont bénéficié d'informations détaillées, à la suite desquelles ils ont fourni un consentement écrit.

Cette étude n'a bénéficié d'aucun soutien direct de l'industrie pharmaceutique, tous les coûts ont été pris en charge par la fondation genevoise de Cardiologie (GECOR).

Les volontaires ont reçu durant toute la durée de l'étude (11 semaines) du clopidogrel, selon la dose usuelle de 75 mg par jour, per os. [82] Après la première semaine sous clopidogrel, tous les participants ont reçu successivement, durant une semaine à chaque fois :

- rosuvastatine, 10 mg par jour
- simvastatine, 20 mg par jour,
- fluvastatine, 80 mg par jour,
- pravastatine, 40 mg par jour,
- atorvastatine, 20 mg par jour.

Chaque semaine sous statine était suivie d'une semaine de « wash out », avec clopidogrel seul. Le clopidogrel était administré le matin, et les statines le soir (cf tableau 8).

Semaines	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Clopidogrel	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Statines	-	-	Rosuva	-	Simva	-	Prava	-	Fluva	-	Atorva
Analyses n^0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Tableau 8 : schéma chronologique récapitulant les différentes phases de l'étude.

Une prise de sang a été réalisée le premier jour de l'étude, puis chaque semaine, selon le même horaire hebdomadaire pour chaque volontaire. Les agrégations plaquettaires ont été mesurées lors de chaque prise de sang, ainsi qu'un contrôle du compte plaquettaire, et de globules rouges.

De plus, afin de nous assurer de l'observance des différents volontaires, ainsi que de l'élimination complète des statines, nous avons recherché lors de chaque prise de sang la présence de statine en circulation (détermination qualitative).

b. Sélection des volontaires et contrôles sériques :

Les volontaires recrutés (homme ou femme) devaient être en bonne santé habituelle, sans antécédent médical significatif (en particulier pas de notion de thrombophilie ni tendance aux saignements), et ne pas prendre de médicament régulièrement. Le tabagisme n'était pas un

critère d'exclusion. Nous leur avons recommandé de ne pas consommer de substance ayant une interaction avec les cytochromes, telle que le jus de pamplemousse et, de manière générale, de nous reporter toute prise supplémentaire de médicament durant la durée de l'étude.
Avant le début de l'étude, un contrôle des tests hépatiques, des valeurs de cholestérol, ainsi qu'un test de grossesse le cas échéant sont réalisés.

c. Méthode :

i. Agrégations plaquettaires

Les mesures de l'activité plaquettaire sont réalisées grâce à la collaboration de l'unité d'hémostase, et en particulier le concours du Dr Guido Reber. Plusieurs méthodes de mesure de l'activité plaquettaire sont décrites :

- détection de l'agrégation grâce à un agrégomètre (méthode optique).
- mesure de l'activation plaquettaire par quantification en cytométrie de flux de l'expression à la surface membranaire de différentes protéines.
- détermination du temps d'occlusion d'une ouverture dans une membrane recouverte de collagène, d'Adénosine Diphosphate (ADP)…, alors que du sang complet est injecté à travers.

Cependant, la première méthode est la plus ancienne [85] et reste celle de référence [86,87]. Elle est décrite ci-dessous.
Quinze millilitres de sang environ ont été prélevés, selon la technique habituelle de ponction veineuse, en utilisant une aiguille 19G, dans des tubes sous vide d'air (Beckton Dickinson, UK), et contenant 0,109 mol/L de citrate de Sodium. Ces flacons sont ensuite centrifugés durant dix minutes à 150 G, à une température de 20^0C, afin d'obtenir un plasma riche en plaquettes (PRP). Le PRP est ensuite transféré dans une éprouvette, et le sang restant centrifugé de nouveau à 3500G durant dix minutes. On obtient ainsi un plasma pauvre en plaquettes (PPP). La concentration en plaquettes dans le PRP est ensuite ajustée dans tous les échantillons à 250 G/L, en complétant avec le PPP. Les comptes plaquettaires sont réalisés en utilisant un compteur de cellules hématologiques de marque Sysmex K-1000 (TOA, Kobe, Japon).
Les mesures d'agrégations sont ensuite réalisées en utilisant un agrégomètre APACT-4 (Labor Fibrintimer, Ahrensburg, Allemagne) connecté à un ordinateur. Le PRP est normalement trouble et ne transmet qu'un minimum de lumière. L'addition de différents agonistes à ce PRP induit une agrégation dose-dépendante, résultant en une transmission de lumière augmentée. Dans notre cas, nous avons utilisé :

- 1,5 mg/mL d'acide arachidonique (BioData Corporation, Horsham PA, USA),
- 5 et 10 µmol/L d'ADP (Helena Biosciences, Sunderland, UK),
- 1 µmol/L de collagène (Nycomed Pharma, Unterschleissheim, Allemagne).

Les agrégations ont été mesurées durant dix minutes, et le maximum d'agrégation, en pourcent, exprimé.

ii. Détection des statines dans le plasma

Quelques articles décrivent la détection de statines dans des échantillons aqueux ou du plasma, en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [88-90]. Cependant, les statines n'étant pas recherchées dans le plasma de routine dans notre institution, nous avons dû développer notre propre méthode. Grâce à la collaboration du Dr Daali, du service de Pharmacologie Clinique (HUG), nous avons ainsi mis en place une méthode analytique de détection (qualitative) des différentes statines dans le plasma. De manière intéressante, celle-ci permet la séparation et la détection des 5 statines de notre étude en même temps.

Nous avons utilisé un appareil à chromatographie liquide de type Agilent 1100 LC-MS. Une colonne Zorbax Eclipse® XDB-C8 (5 µm, 4,6 x 150 mm I.D) a permis la séparation simultanée de toutes les statines en un seul passage. La phase mobile était constituée d'acétate d'ammonium et acétonitrile 20 mM (pH 6,5), et la séparation réalisée selon différents gradients d'acétonitrile :

- 0-3 min : acétonitrile 27%
- 3-12 min : acétonitrile 70%
- 12-20 min : acétonitrile 70%.

Le débit était de 0.8ml/min. Le spectroscope de masse était en mode d'ionisation positive (« électrospray »). Le débit du gaz/aérosol était fixé à 10 l/min, et le voltage du capillaire à 3500V. Les résultats pour les 5 statines sont mesurées sous forme de « single ion monitoring », avec une tension de séparation de 70V. Pour chaque statine, la forme ionique est $[M+H^+]$ (419,2 pour la simvastatine, 482.1 pour la rosuvastatine, 559,2 pour l'atorvastatine, 412,2 pour la fluvastatine, et 425,2 pour la pravastatine). Le seuil de détection était de 1ng/ml pour toutes les statines, sauf pour la pravastatine (100 ng/ml), qui n'a donc pu être détectée chez nos volontaires par cette méthode.

Pour la préparation des échantillons à partir des plasma, une phase d'extraction solide était nécessaire, en utilisant une colonne Oasis® HLB (Waters, Milford, USA). Avant leur utilisation, les colonnes étaient conditionnées avec 1 ml de méthanol et 1 ml d'acide acétique (0,5%). Après avoir chargé 1 ml de plasma dans la colonne, les cartouches sont lavées avec 1 ml du mélange méthanol/acide acétique (20/80). Les cartouches sont ensuite séchées sous vide d'air. Les substances à détecter sont ensuite « éluées » avec de l'acide acétique dans du méthanol 0,5%. Après évaporation, le résidu est reconstitué dans 100 µl d'acétonitrile/acide acétique 0,5%, et 60 µl sont injectés dans le système HPLC.

Afin de valider la méthode, nous avons d'abord détecté les cinq statines de l'étude à une concentration connue de 100 ng/ml dans un tampon contrôle (cf figure 12).

Nous avons ensuite ajouté 5 ng/ml de chaque statine à un plasma contrôle, et pu mettre en évidence la rosuvastatine, la fluvastatine, l'atorvastatine et la simvastatine, mais pas la pravastatine, en raison de la sensibilité insuffisante du détecteur. La figure 13 montre le chromatogramme ainsi obtenu.

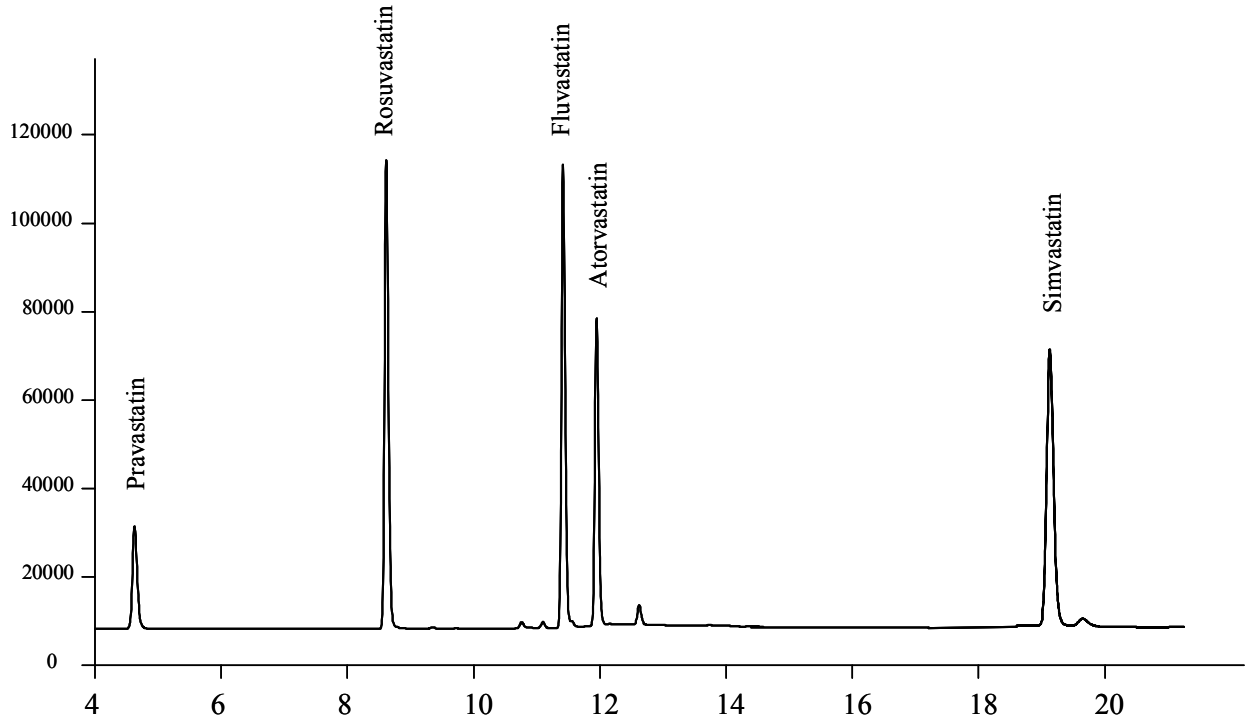


Figure 12 : Chromatogramme typique obtenu avec 5 statines, à une concentration connue de 100 ng/ml, dans une solution tampon. En abscisse, les minutes, et en ordonnée l'abondance.

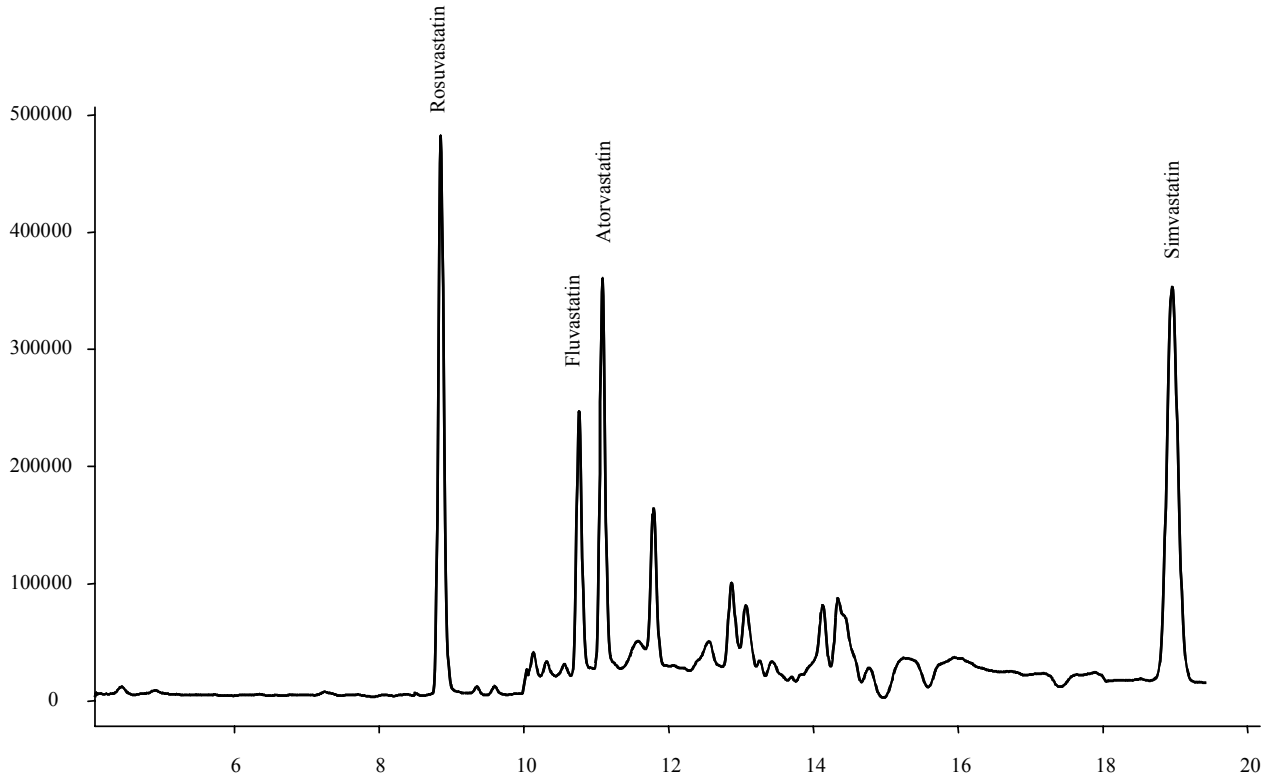


Figure 13 : chromatogramme obtenu avec les 5 statines à une concentration de 5 ng/ml, dans un plasma contrôle. La pravastatine n'est pas détectée.

iii. Analyse statistique

Nous n'avions pas réalisé au préalable à cette étude de calcul de puissance, afin de déterminer un nombre minimum de volontaires à inclure, et préféré considérer ce protocole comme une investigation préliminaire.

Les patients considérés comme « non-répondeurs » au clopidogrel après la première semaine étaient exclus de l'étude.

Les agrégations individuelles sont exprimées en pourcentage, les valeurs moyennes avec un intervalle de confiance de 95 %, et nous avons utilisé un test de rang selon Wilcoxon afin de comparer les agrégations plaquettaires après chaque semaine de statine, parmi les différents volontaires. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative.

6. Résultats

a. Volontaires :

Nous avons recruté 21 volontaires, la plupart étudiants à l'Université de Genève par le biais de petites annonces et le bouche-à-oreille. Leur âge moyen était de 25,2 +/- 4,6 ans, et la répartition par sexes de 3 femmes contre 18 hommes. Aucun ne prenait de médicament (ni contraception orale), ni supplément alimentaire. Six volontaires sur 21 (29%) étaient fumeurs (consommation quotidienne de tabac). Durant l'étude, deux volontaires ont abandonné, pour des raisons de convenance personnelle, et n'ont donc pas été inclus dans l'analyse finale. Les caractéristiques des participants ayant participé jusqu'à la fin de l'étude sont résumées dans le tableau 9.

Nombre total	19
Age moyen	25,6 +/- 4,7
Ratio H/F	17 / 2
BMI	22 +/- 2,1
Tabagisme (en % du total)	32
Médicaments	aucun

Tableau 9 : caractéristiques démographiques des volontaires ayant pleinement participé à l'étude.

b. Agrégations plaquettaires :

i. Réponse au clopidogrel :

La mesure des agrégations au début de l'étude, avant tout traitement, et après la première semaine (clopidogrel seul) met en évidence l'hétérogénéité des valeurs d'agrégations plaquettaires de base et de la réponse au clopidogrel, déjà décrits précédemment.

Avec l'ADP 5 et 10 µmol/L comme agoniste, on constate une différence statistiquement significative entre les deux semaines (ADP 5 µmol/L : agrégation initiale moyenne 68,9 %, SD 9,4, contre 27,9 %, SD 6,7, $p < 0,001$; ADP 10 µmol/L : agrégation initiale moyenne 66,6 %, SD 8,4, contre 31,3 %, SD 8,0, $p < 0,001$). Un volontaire (« O » sur le tableau 10) est non-répondeur au clopidogrel (réponse au clopidogrel définie comme une inhibition de l'agrégation inférieure à 10 %), et ceci avec l'ADP 5 ou 10 µmol/L , et deux autres sont des « semi-répondeur » (inhibition de 19,9 à 15,5 %, volontaire J et de 73,8 à 53 %, volontaire C), selon la définition déjà évoquée précédemment [38]. Le volontaire non-répondeur n'a pas été retenu pour poursuivre l'étude. Le tableau 10 récapitule les agrégations obtenues avant et après une semaine de clopidogrel, chez tous les volontaires, avec l'ADP 5 µmol/L comme agoniste.

La figure 14 représente les agrégations plaquettaires moyennes avec l'ADP 5 et 10 µmol/L comme agoniste, après exclusion du volontaire non répondeur.

De manière importante, on ne constate aucune différence statistiquement significative entre les différentes agrégations moyennes à la fin de chaque semaine de wash out.

Volontaires	Avant clopidogrel	1 semaine de clopidogrel	Variation en %
A	67,6	39,1	42
B	62,2	19,5	69
C	73,8	53	*28*
D	85,2	16,9	80
E	68,2	9,4	86
F	65,4	28,4	57
G	75,6	47,2	38
H	72,5	31,9	56
I	72,7	36,6	50
J	19,9	15,5	*22*
K	81	30	63
L	87	47,1	46
M	34,9	2,5	93
N	59	23,9	59
O	32,8	41,1	*(<0)*
P	104	20,2	81
Q	70,5	10,1	86
R	90,6	45,1	50
S	86,6	12	86
Moyenne (IC)	68,9 (+/- 9,4)	27,9 +/- 6,7	

Tableau 10 : Agrégations plaquettaires de base et après une semaine sous clopidogrel, avec l'ADP 5 µmol/L comme agoniste, chez tous les volontaires. Le sujet O est non-répondeur au clopidogrel, et n'a pas poursuivi l'étude.

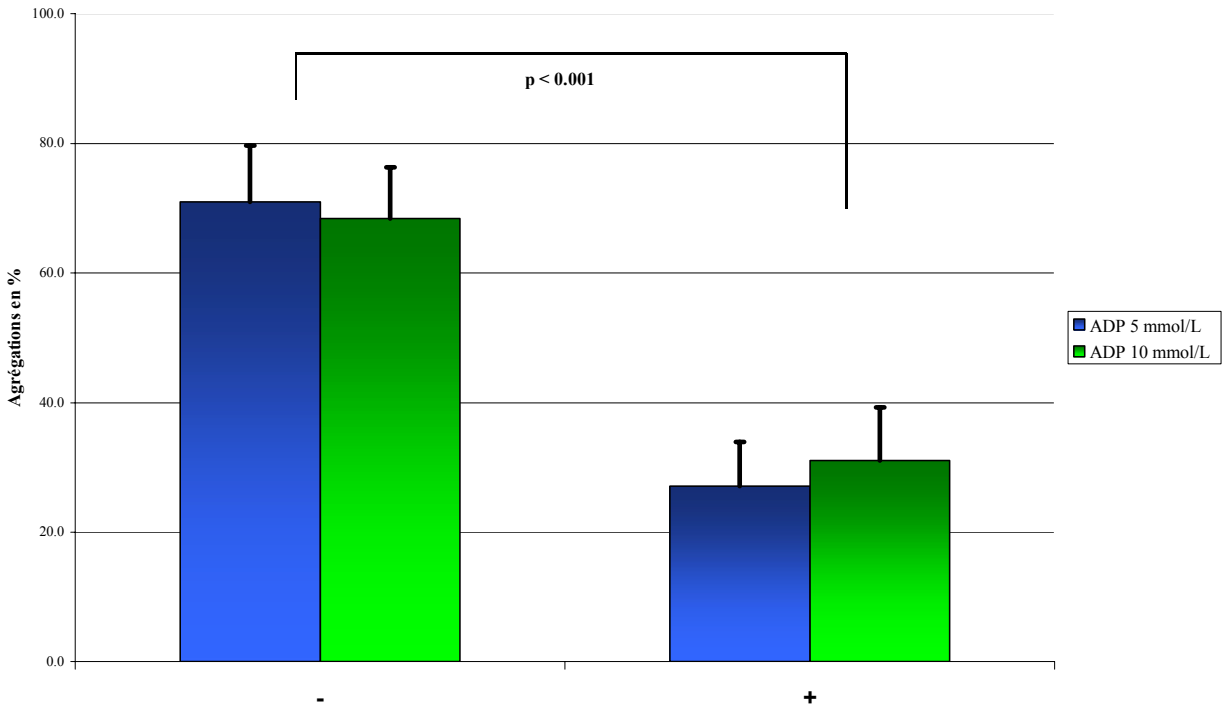


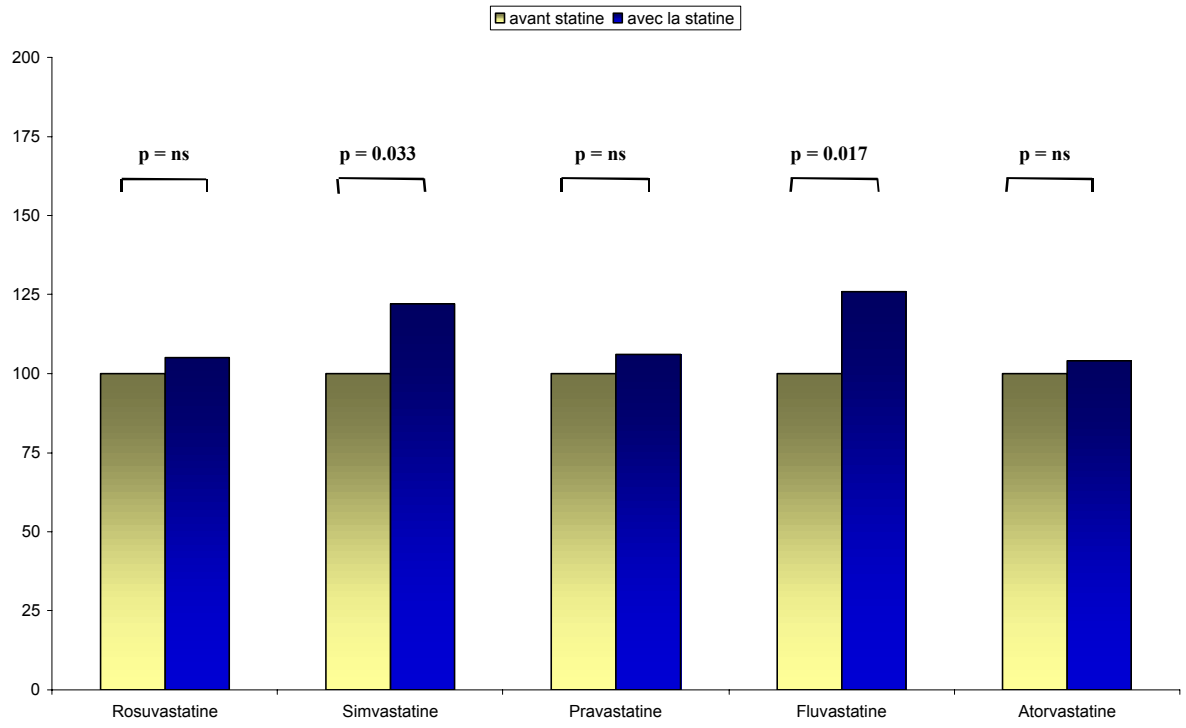
Figure 14 : évolution des agrégations plaquettaires moyennes en %, avec l'agoniste ADP à 2 concentrations, après exclusion du volontaire non-répondeur, avant (-) et après (+) 1 semaine sous clopidogrel.

ii. Agrégations après les différentes statines

L'évolution des agrégations plaquettaires avec l'ADP 5 µmol/L pour chaque volontaire est représentée dans l'annexe 1. Afin de mieux juger des variations, et vu l'absence de différence statistiquement significative entre chaque de semaine de wash out, nous avons exprimé l'agrégation moyenne à la fin de chaque wash out comme 100 %, et comparé l'évolution après 1 semaine sous les différentes statines.
Nous avons observé que le clopidogrel avait induit une diminution de l'agrégation plaquettaire moyenne significativement moins importante lorsqu'il était administré en parallèle avec la simvastatine (p=0,037), et la fluvastatine (p=0,017), en comparaison avec la semaine précédente de wash out. Il n'y avait pas de différence significative pour la rosuvastatine (p=0,37), la pravastatine (p=0,33), ou l'atorvastatine (p=0,31). Le tableau 11 et la figure 15 montrent les variations d'agrégations exprimées en pourcentage par rapport aux semaines de wash out. A noter que, de manière individuelle, on n'observe cependant pas l'apparition de « non-répondeurs » au clopidogrel, et le taux de « semi-répondeur » restant stable au cours de l'étude (entre 1 et 2 volontaires selon les semaines). Les résultats sont similaires avec l'ADP 10 µmol/L, bien que moins significatifs.

Tableau 11 / figure 15 : évolution des agrégations après chaque semaine sous statine, par rapport aux wash out (exprimées en pourcentage)

Semaines de wash out	100 %
+ Rosuvastatine	105 %
+ Simvastatine	122 %
+ Pravastatine	106 %
+ Fluvastatine	126 %
+ Atorvastatine	104 %



La figure 16 montre les agrégations plaquettaires moyennes en ADP 5 µmol/L (valeurs absolues). On constate ainsi que la différence d'effet du clopidogrel après la prise de simvastatine est surtout dû à la faible agrégation moyenne durant la semaine précédente (cependant, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les différentes semaines de wash out).

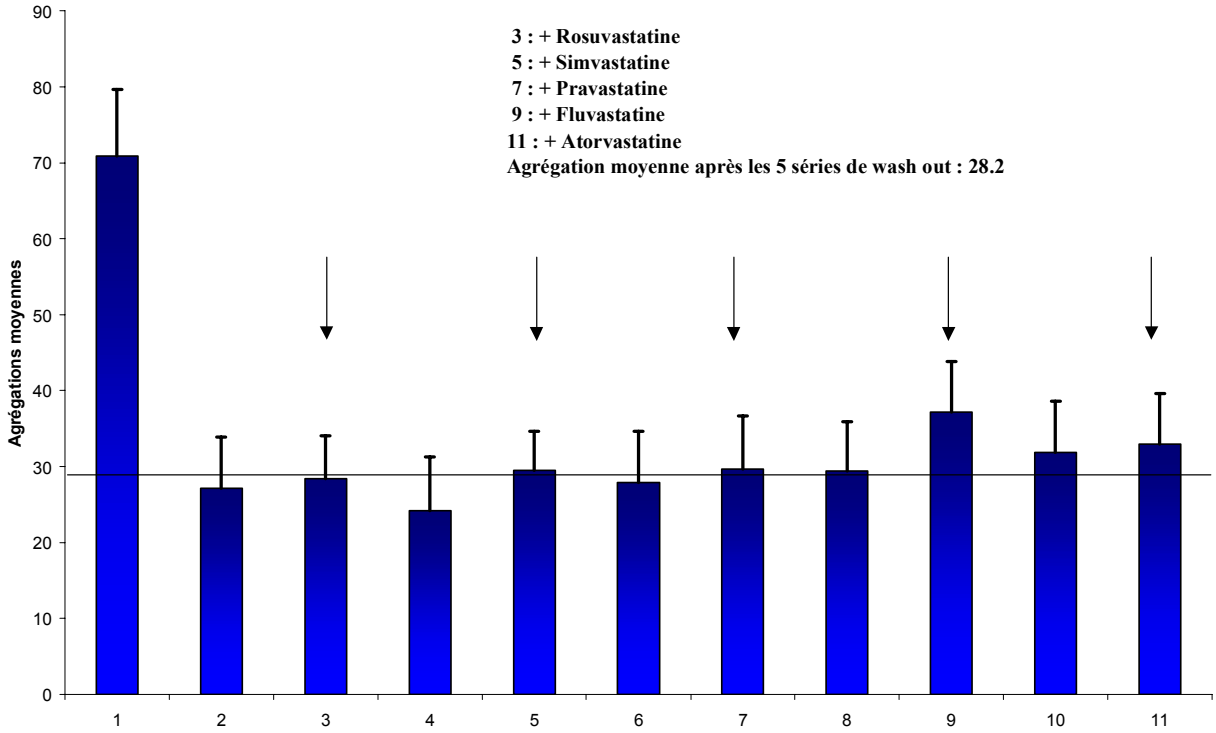


Figure 16 : Evolution des agrégations plaquettaires moyennes en ADP 5 µmol/L. En abscisses, les semaines : 1 (valeurs de base), 2-4-6-8-10 (wash out = clopidogrel seul), 3-5-7-9-11 (différentes statines)

c. Dosage des statines :

A la fin de chaque semaine sous statine (analyses 3, 5, 7, 11 – cf tableau 8), nous avons pu détecter chez chaque volontaire la présence de la statine attendue (cf figures 14, 15, 16, 17).
Nous avons systématiquement recherché la présence de statines dans les plasma des différents volontaires, à la fin de chaque période de « wash out » (analyses n^0 1, 4, 6, 8 – cf tableau 8), et nous n'en avons jamais mis en évidence, confirmant l'élimination complète de celles-ci. Les figures 17 à 21 montrent des exemples réels de chromatogramme d'un volontaire.

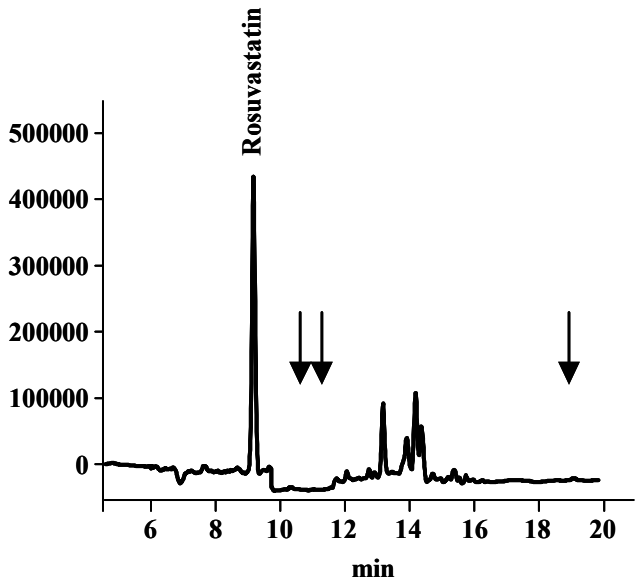


Figure 17 : exemple de détection de la rosuvastatine chez un des volontaires – analyse 3-. Les flèches indiquent les pics des autres statines.

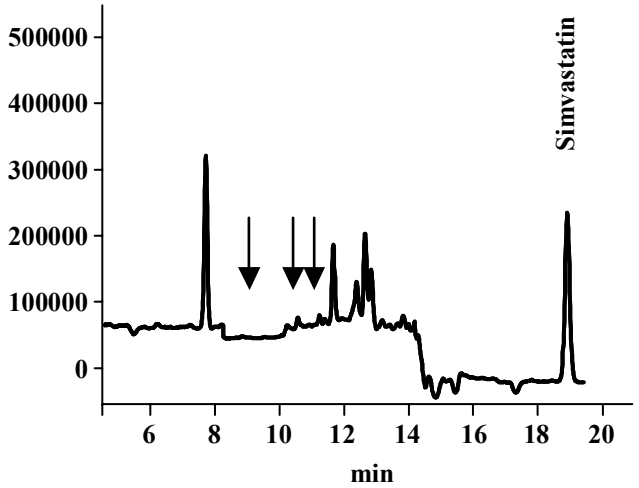


Figure 18 : exemple de détection de la simvastatine chez un des volontaires – analyse 5-. Les flèches indiquent les pics des autres statines.

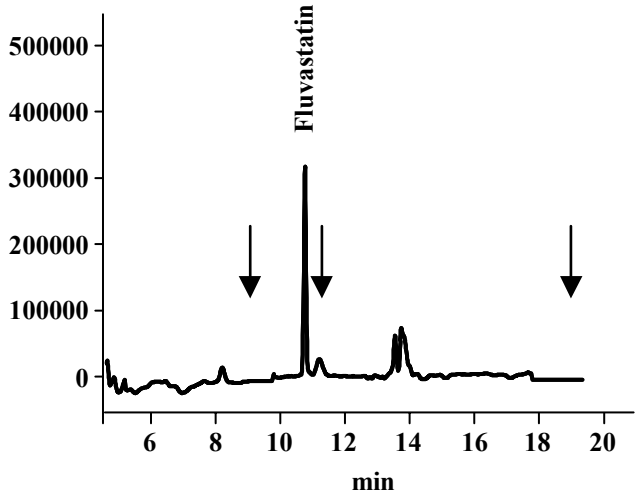


Figure 19 : exemple de détection de la fluvastatine chez un des volontaires – analyse 7-. Les flèches indiquent les pics des autres statines.

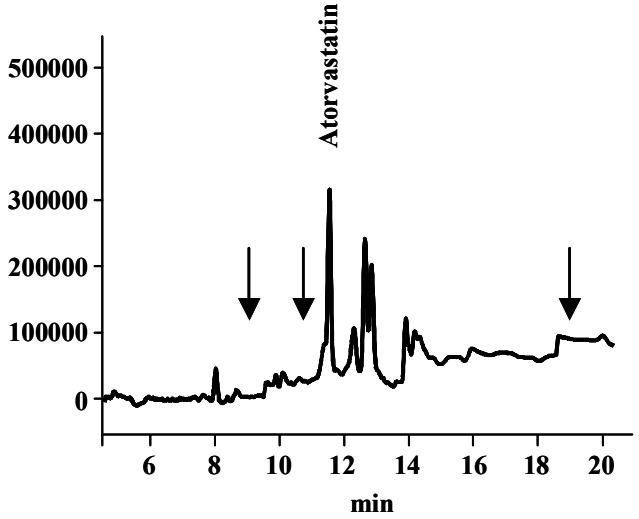


Figure 20 : exemple de détection de l'atorvastatine chez un des volontaires – analyse 11-. Les flèches indiquent les pics des autres statines.

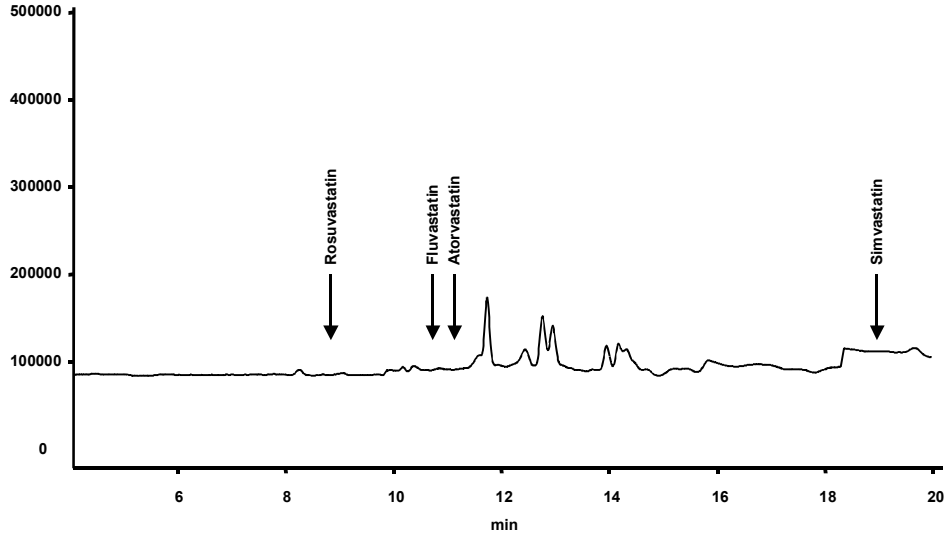


Figure 21 : exemple de chromatogramme (volontaire « P »), obtenu à partir de l'ensemble des plasma à la fin des semaines de « wash out ». Absence de détection des différentes statines.

7. Discussion

Résultats :

Nous avons mis en évidence une atténuation significative de l'effet du clopidogrel lorsque celui-ci est administré avec la simvastatine et la fluvastatine. Cet effet est cependant nettement plus marqué en valeur absolue pour la fluvastatine. On ne constate pas de modification avec les autres statines. De manière importante, les agrégations de tous les volontaires durant l'étude sont restées dans la marge efficace.

Concernant la rosuvastatine et la pravastatine, ceci est conforme aux attentes, ces substances n'étant pas métabolisées par les cytochromes.

Une interaction simvastatine-clopidogrel a déjà été évoquée (Neubauer [76]), et serait dûe à une inhibition compétitive, ces deux substances étant métabolisées par le cytochrome 3A4 (cf supra). L'interaction entre la fluvastatine et le clopidogrel, par contre n'avait pas été décrite précédemment. La fluvastatine est métabolisée essentiellement par le cytochrome 2C9 (cf supra), et également par le 3A4, alors que le cytochrome 2C9 est au moins en partie inhibée par le clopidogrel. Une hypothèse serait que suite à l'inhibition du cytochrome 2C9, la fluvastatine entre également en compétition pour le cytochrome 3A4 avec le clopidogrel.

Contrairement à l'étude de Lau [20] qui décrivait une inhibition complète de l'activité du clopidogrel chez 5 volontaires, suite à l'administration d'atorvastatine, on ne constate ici pas d'interaction significative. Ce résultat quelque peu surprenant peut être expliqué de plusieurs façons :

- l'importante hétérogénéité des agrégations plaquettaires individuelles et la variabilité de la réponse au clopidogrel,
- le faible nombre de volontaires dans les deux études,
- la méthode de mesure des agrégations plaquettaires, différente entre les deux études.

Cette absence d'interaction avait cependant déjà été évoquée par plusieurs auteurs (cf supra).

Limitations de l'étude :

Sur le plan méthodologique, à posteriori, on peut regretter de ne pas avoir testé différentes doses de statines chez les mêmes volontaires (mais les doses utilisées correspondent aux doses usuelles). Nous aurions pu également mettre en place un protocole légèrement différent, en introduisant le clopidogrel chez des volontaires déjà sous statine au long cours, ce qui aurait été plus proche de la réalité clinique, et permis probablement de mieux mettre en évidence une interaction (pas de traitement préalable par le clopidogrel).

Une des limitations principales de l'étude résulte dans le petit nombre de volontaires inclus (bien que les différences soient statistiquement significatives), au vu de l'importante variabilité interindividuelle (et même individuelle au cours du temps) des agrégations.
Cette variabilité peut même sembler plus élevée que l'impact (mineur) des statines sur l'efficacité du clopidogrel.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe plusieurs méthodes de mesure des agrégations plaquettaires, et nous avons utilisé un agrégomètre optique (méthode habituelle de référence), à la différence de certaines études précédente. La comparaison des résultats est donc

difficile. De plus, cette méthode ne quantifie pas l'adhésion des plaquettes, ni leur activation (expression de protéines de surface).

Par ailleurs, cette étude ne permet de tirer aucune conclusion quant aux répercussions cliniques d'une éventuelle interaction. L'analyse rétrospective de l'étude CREDO, dont la plupart des patients étaient sous traitement combiné statine/clopidogrel, comme évoqué plus haut, n'avait pas montré de différence dans le nombre de décès ou de survenue d'évènements cardiovasculaires. Seules des études prospectives ultérieures, à large échelle, comparant par exemple l'administration de clopidogrel associé à différentes statines après la mise en place de stents pourront établir si cette interaction est cliniquement relevante.

8. Conclusion

Ceci est à notre connaissance la première étude à avoir testé chez les même volontaires, systématiquement, les cinq statines disponibles, en parallèle avec la prise de clopidogrel, en mesurant les agrégations plaquettaires grâce à un agrégomètre optique (méthode de référence). Nous constatons une diminution significative de l'effet du clopidogrel lorsqu'il est administré en association avec la simvastatine et la fluvastatine, mais pas avec les autres statines. Nous retrouvons également une importante hétérogénéité interindividuelle dans la réponse au clopidogrel.
Les résultats de cette étude clinique confirment certaines données de la littérature, et permettent de mieux apprécier la sécurité d'emploi du clopidogrel avec les statines.

9. Bibliographie

1. Association AH. Heart disease and stroke statistics - 2005 Uptade. In; 2005.

2. Nurden P, Savi P, Heilmann E, Bihour C, Herbert JM, Maffrand JP, Nurden A. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest*. 1995;95:1612-22.

3. Cattaneo M, Lecchi A, Randi AM, McGregor JL, Mannucci PM. Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. *Blood*. 1992;80:2787-96.

4. Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:175-80.

5. Mills DC. ADP receptors on platelets. *Thromb Haemost*. 1996;76:835-56.

6. Savi P, Laplace MC, Herbert JM. Evidence for the existence of two different ADP-binding sites on rat platelets. *Thromb Res*. 1994;76:157-69.

7. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost*. 2001;86:222-32.

8. Herbert JM, Savi P. P2Y12, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Semin Vasc Med*. 2003;3:113-22.

9. Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem*. 2002;277:46035-42.

10. Leon C, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Moosbauer C, Eckly A, Spannagl M, Gachet C, Engelmann B. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood*. 2004;103:594-600.

11. Mills DC, Puri R, Hu CJ, Minniti C, Grana G, Freedman MD, Colman RF, Colman RW. Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:430-6.

12. Savi P, Laplace MC, Maffrand JP, Herbert JM. Binding of [3H]-2-methylthio ADP to rat platelets--effect of clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;269:772-7.

13. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 2001;409:202-7.

14. Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood*. 2003;101:3908-14.

15. Lindell M, Karlsson MO, Lennernas H, Pahlman L, Lang MA. Variable expression of CYP and Pgp genes in the human small intestine. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:493-9.

16. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost*. 2000;84:891-6.

17. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:1288-95.

18. Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC, Maffrand JP, Berger Y, Herbert JM. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost*. 1994;72:313-7.

19. Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:53-9.

20. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, Tait AR, Carville DG, Guyer KE, Bates ER. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation*. 2003;107:32-7.

21. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, Guyer KE, Tait AR, Bates ER. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation*. 2004;109:166-71.

22. Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics*. 1994;4:171-84.

23. Richter T, Murdter TE, Heinkele G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308:189-97.

24. Wodlinger AM, Pieper JA. The role of clopidogrel in the management of acute coronary syndromes. *Clin Ther*. 2003;25:2155-81.

25. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*. 1996;348:1329-39.

26. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001;345:494-502.

27. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, Jones RH, Kereiakes D, Kupersmith J, Levin TN, Pepine CJ, Schaeffer JW, Smith EE, 3rd, Steward DE, Theroux P, Gibbons RJ, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Smith SC, Jr. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1366-74.

28. Smith SC, Jr., Dove JT, Jacobs AK, Kennedy JW, Kereiakes D, Kern MJ, Kuntz RE, Popma JJ, Schaff HV, Williams DO, Gibbons RJ, Alpert JP, Eagle KA, Faxon DP, Fuster V, Gardner TJ, Gregoratos G, Russell RO. ACC/AHA guidelines of percutaneous coronary interventions (revision of the 1993 PTCA guidelines)--executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (committee to revise the 1993 guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty). *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:2215-39.

29. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet*. 2001;358:527-33.

30. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med*. 1996;334:1084-9.

31. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288:2411-20.

32. Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126:483S-512S.

33. Hirsh J, Guyatt G, Albers GW, Schunemann HJ. The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy: evidence-based guidelines. *Chest*. 2004;126:172S-173S.

34. Jagroop IA, Matsagas MI, Geroulakos G, Mikhailidis DP. The effect of clopidogrel, aspirin and both antiplatelet drugs on platelet function in patients with peripheral arterial disease. *Platelets*. 2004;15:117-25.

35. Dey S, Mukherjee D. Clinical perspectives on the role of anti-platelet and statin therapy in patients with vascular diseases. *Curr Vasc Pharmacol*. 2003;1:329-33.

36. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003;107:2908-13.

37. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med*. 2002;252:233-8.

38. Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost*. 2003;89:783-7.

39. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:246-51.

40. Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem*. 1977;77:31-6.

41. Levine GN, Keaney JF, Jr., Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med*. 1995;332:512-21.

42. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet*. 1986;2:933-6.

43. Neaton JD, Blackburn H, Jacobs D, Kuller L, Lee DJ, Sherwin R, Shih J, Stamler J, Wentworth D. Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med.* 1992;152:1490-500.

44. Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med.* 1999;341:498-511.

45. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1-10.

46. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J.* 2002;144:S27-32.

47. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292:1160-4.

48. Igel M, Sudhop T, von Bergmann K. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;57:357-64.

49. Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Hill SJ, Giles PB, Phillips PJ, Lenz E. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers. *Clin Ther*. 2003;25:2822-35.

50. Rosenson RS. Rosuvastatin: a new inhibitor of HMG-coA reductase for the treatment of dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2003;1:495-505.

51. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005;19:117-25.

52. Arnaud C, Veillard NR, Mach F. Cholesterol-independent Effects of Statins in Inflammation, Immunomodulation and Atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5:127-34.

53. Skaletz-Rorowski A, Kureishi Y, Shiojima I, Walsh K. The pro- and antiangiogenic effects of statins. *Semin Vasc Med*. 2004;4:395-400.

54. Mach F. Statins as immunomodulatory agents. *Circulation*. 2004;109:II15-7.

55. Steffens S, Mach F. Anti-inflammatory Properties of Statins. *Semin Vasc Med*. 2004;4:417-22.

56. Veillard NR, Mach F. Statins: the new aspirin? *Cell Mol Life Sci*. 2002;59:1771-86.

57. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-9.

58. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;335:1001-9.

59. Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, Ford I, Gaw A, Hyland M, Jukema JW, Kamper AM, Macfarlane PW, Meinders AE, Norrie J, Packard CJ, Perry IJ, Stott DJ, Sweeney BJ, Twomey C, Westendorp RG. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:1623-30.

60. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339:1349-57.

61. Wilt TJ, Bloomfield HE, MacDonald R, Nelson D, Rutks I, Ho M, Larsen G, McCall A, Pineros S, Sales A. Effectiveness of statin therapy in adults with coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 2004;164:1427-36.

62. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333:1301-7.

63. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM, Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 1998;279:1615-22.

64. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361:1149-58.

65. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation*. 2000;101:207-13.

66. Kang S, Wu Y, Li X. Effects of statin therapy on the progression of carotid atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2004;177:433-42.

67. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:1071-80.

68. Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation*. 2004;109:II18-26.

69. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM, Jr. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med*. 2001;344:1959-65.

70. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *Jama*. 2001;286:64-70.

71. Ridker PM, Rifai N, Lowenthal SP. Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation*. 2001;103:1191-3.

72. Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, Mach F. Statins Reduce Interleukin-6-Induced C-Reactive Protein in Human Hepatocytes. New Evidence for Direct Antiinflammatory Effects of Statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005.

73. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*. 2005;352:20-8.

74. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350:1495-504.

75. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Orazem J, Magorien RD, O'Shaughnessy C, Ganz P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:29-38.

76. Neubauer H, Gunesdogan B, Hanefeld C, Spiecker M, Mugge A. Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function--a flow cytometry study. *Eur Heart J*. 2003;24:1744-9.

77. Kantola T, Kivisto KT, Neuvonen PJ. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 1998;64:58-65.

78. Serebruany VL, Midei MG, Malinin AI, Oshrine BR, Lowry DR, Sane DC, Tanguay JF, Steinhubl SR, Berger PB, O'Connor CM, Hennekens CH. Absence of interaction between

atorvastatin or other statins and clopidogrel: results from the interaction study. *Arch Intern Med*. 2004;164:2051-7.

79. Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol*. 2004;93:456-8.

80. Mitsios JV, Papathanasiou AI, Rodis FI, Elisaf M, Goudevenos JA, Tselepis AD. Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004;109:1335-8.

81. Muller I, Besta F, Schulz C, Li Z, Massberg S, Gawaz M. Effects of statins on platelet inhibition by a high loading dose of clopidogrel. *Circulation*. 2003;108:2195-7.

82. Saw J, Steinhubl SR, Berger PB, Kereiakes DJ, Serebruany VL, Brennan D, Topol EJ. Lack of adverse clopidogrel-atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized, placebo-controlled clopidogrel trial. *Circulation*. 2003;108:921-4.

83. Mukherjee D, Kline-Rogers E, Fang J, Munir K, Eagle KA. Lack of clopidogrel-CYP3A4 statin interaction in patients with acute coronary syndrome. *Heart*. 2005;91:23-6.

84. Wienbergen H, Gitt AK, Schiele R, Juenger C, Heer T, Meisenzahl C, Limbourg P, Bossaller C, Senges J. Comparison of clinical benefits of clopidogrel therapy in patients with acute coronary syndromes taking atorvastatin versus other statin therapies. *Am J Cardiol*. 2003;92:285-8.

85. Begent NA, Born GV. Quantitative investigation of intravascular platelet aggregation. *J Physiol*. 1970;210:40P-41P.

86. Madan M, Berkowitz SD, Christie DJ, Jennings LK, Smit AC, Sigmon KN, Glazer S, Tcheng JE. Rapid assessment of glycoprotein IIb/IIIa blockade with the platelet function analyzer (PFA-100) during percutaneous coronary intervention. *Am Heart J*. 2001;141:226-33.

87. Janes SL, Wilson DJ, Chronos N, Goodall AH. Evaluation of whole blood flow cytometric detection of platelet bound fibrinogen on normal subjects and patients with activated platelets. *Thromb Haemost*. 1993;70:659-66.

88. Miao XS, Metcalfe CD. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003;998:133-41.

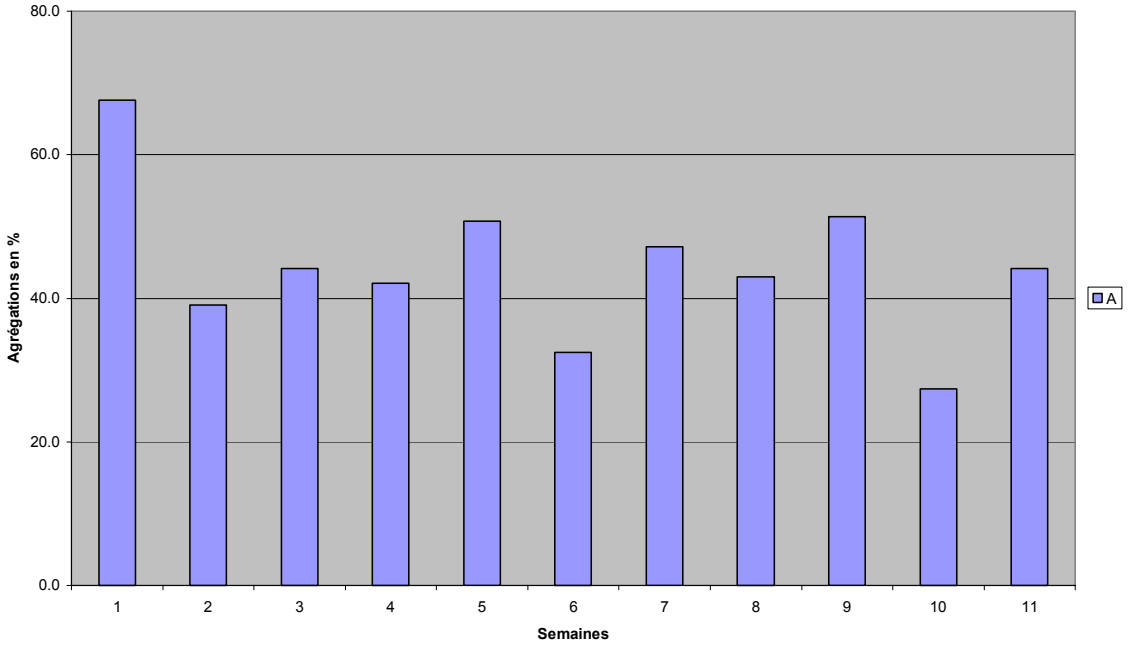
89. Al-Rawithi S, Hussein RF, Alzahrani A. Sensitive assay for the determination of fluvastatin in plasma utilizing high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Ther Drug Monit*. 2003;25:88-92.

90. Erturk S, Onal A, Muge Cetin S. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;793:193-205.

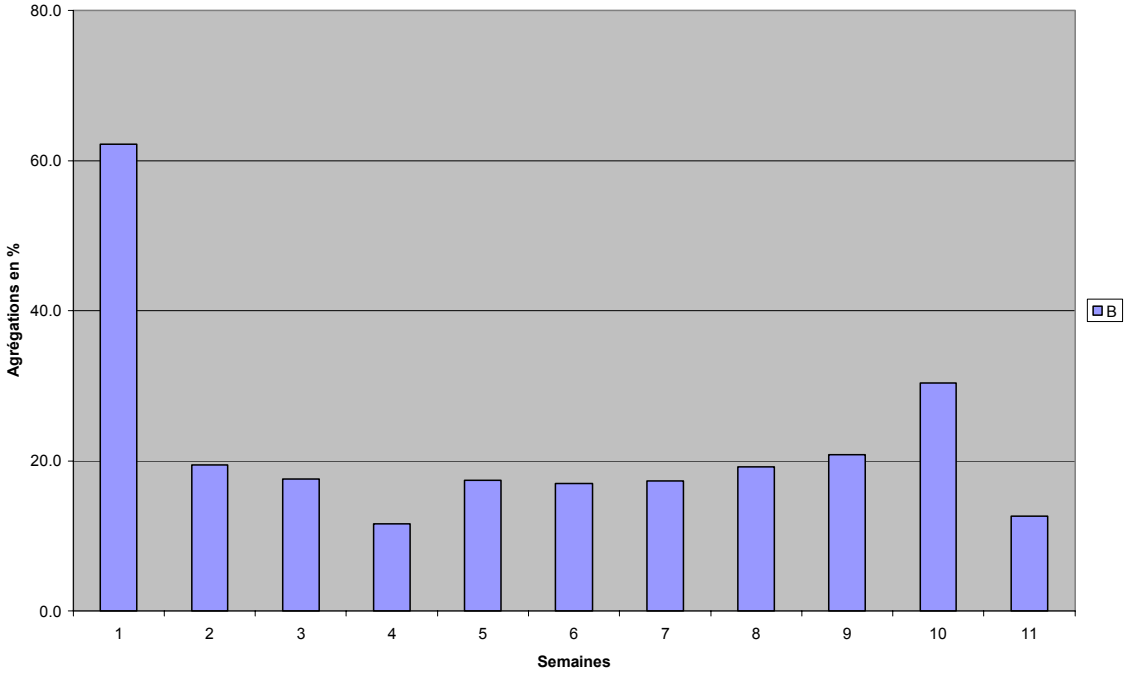
Annexe 1

Evolution des agrégations plaquettaires en ADP 5 µmol/L, pour chaque volontaire, durant toute l'étude. En abscisse, les semaines : 1 (valeurs de base), 2 (clopidogrel seul), 3 (+ rosuvastatine), 4 (clopidogrel seul), 5 (+ simvastatine), 6 (clopidogrel seul), 7 (+ pravastatine), 8 (clopidogrel seul), 9 (+ fluvastatine), 10 (clopidogrel seul), 11 (+ atorvastatine)

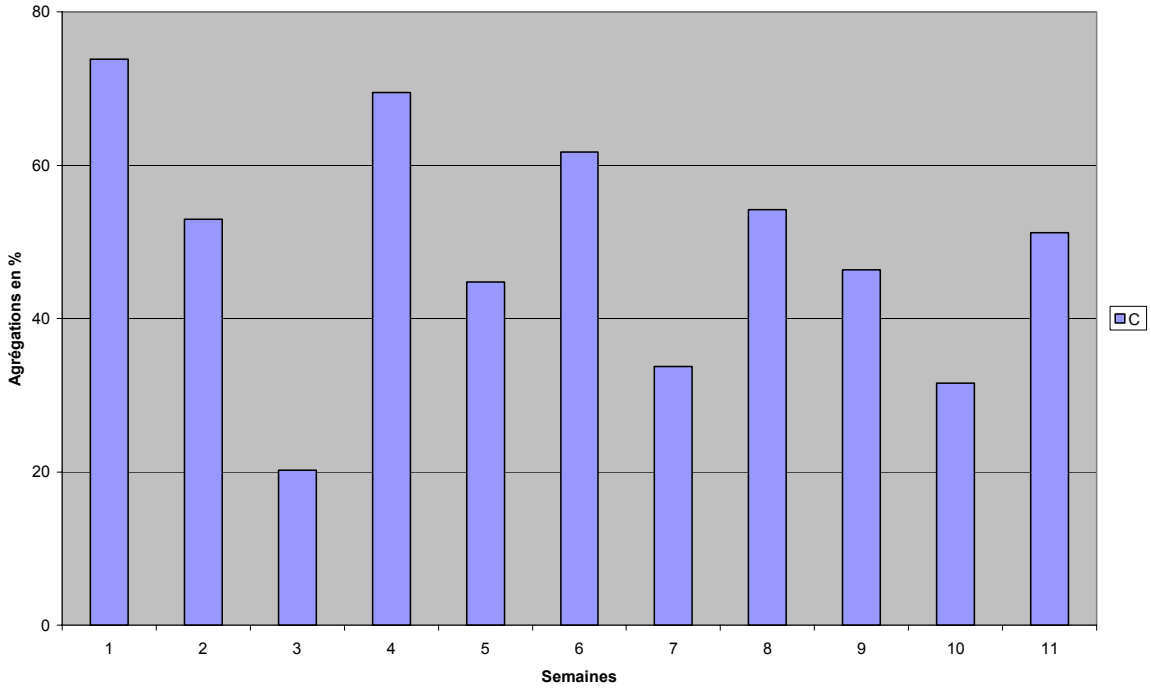
Volontaire A



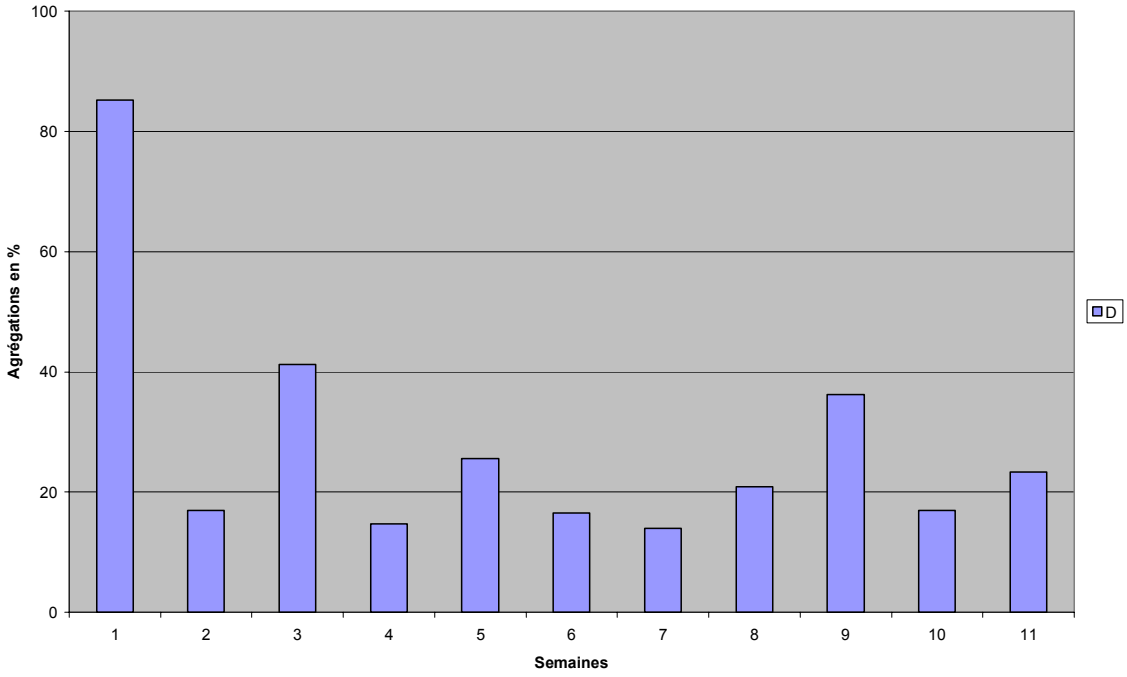
Volontaire B



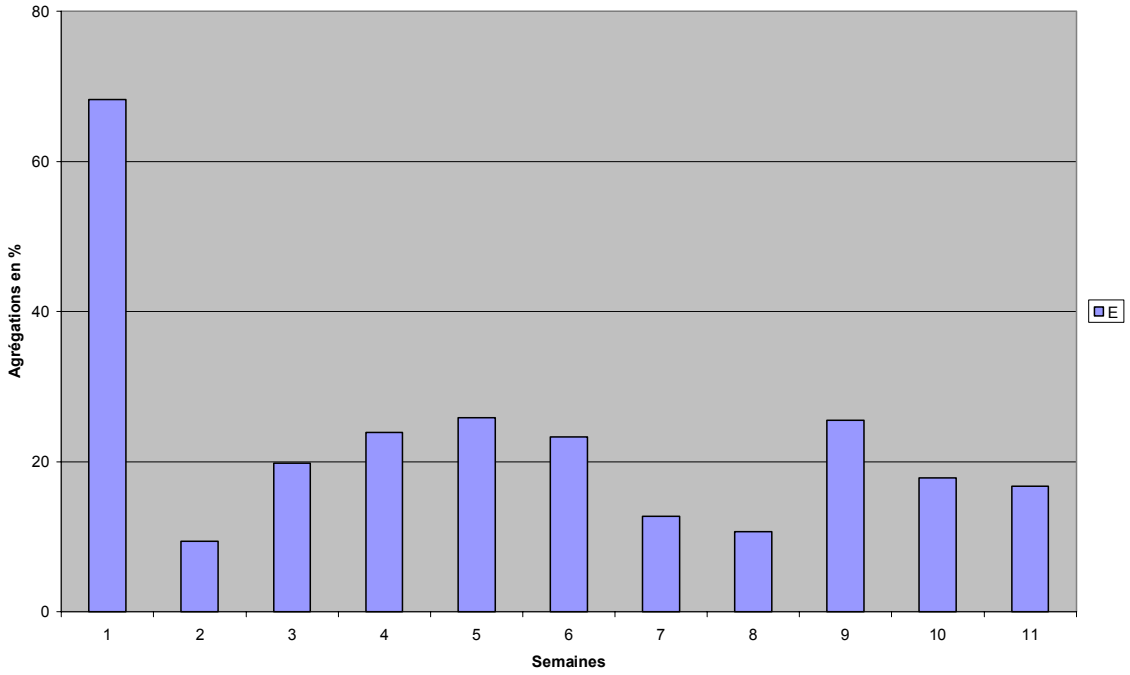
Volontaire C



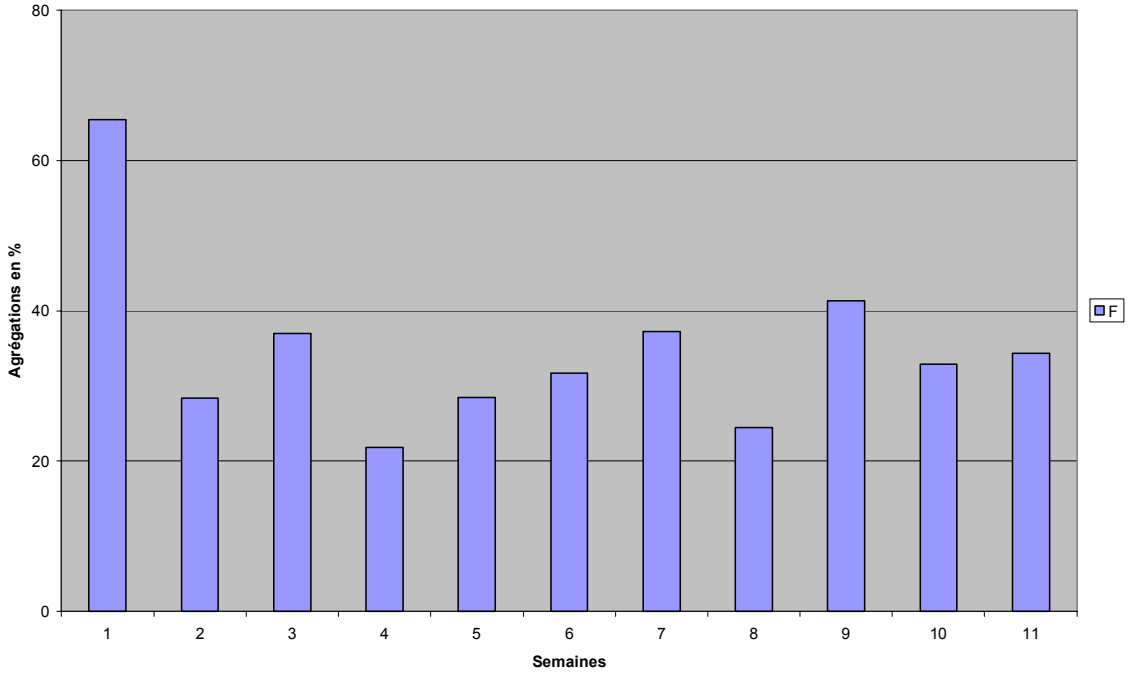
Volontaire D



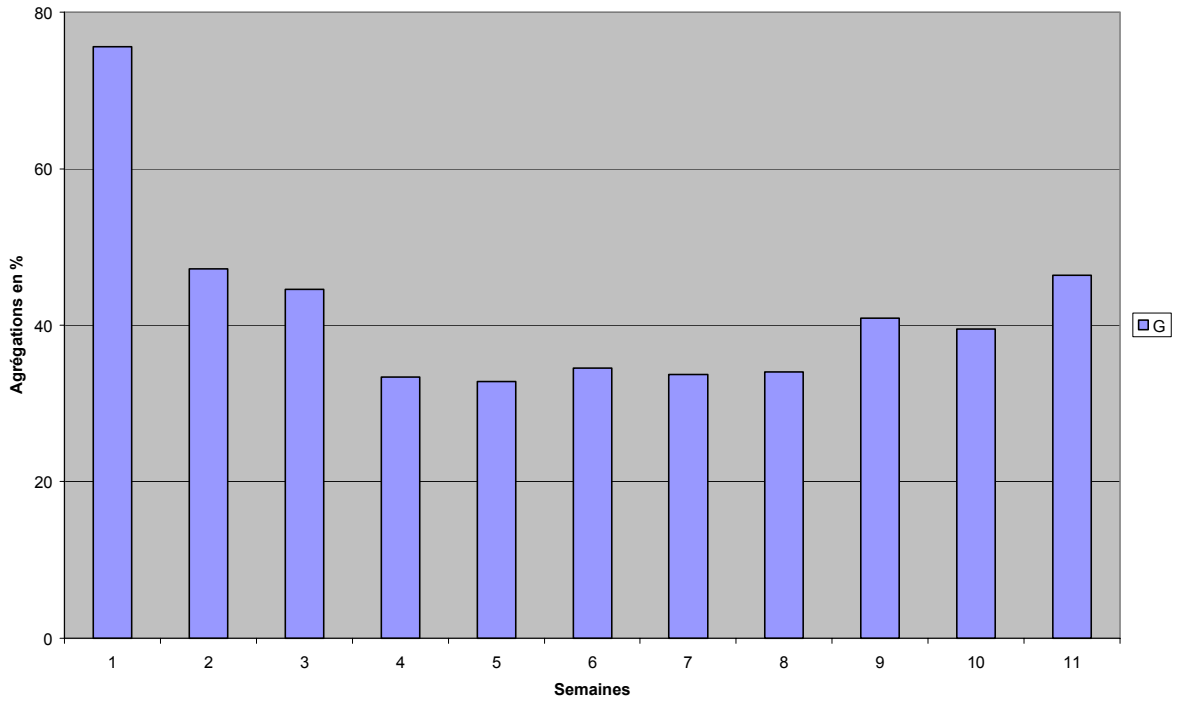
Volontaire E



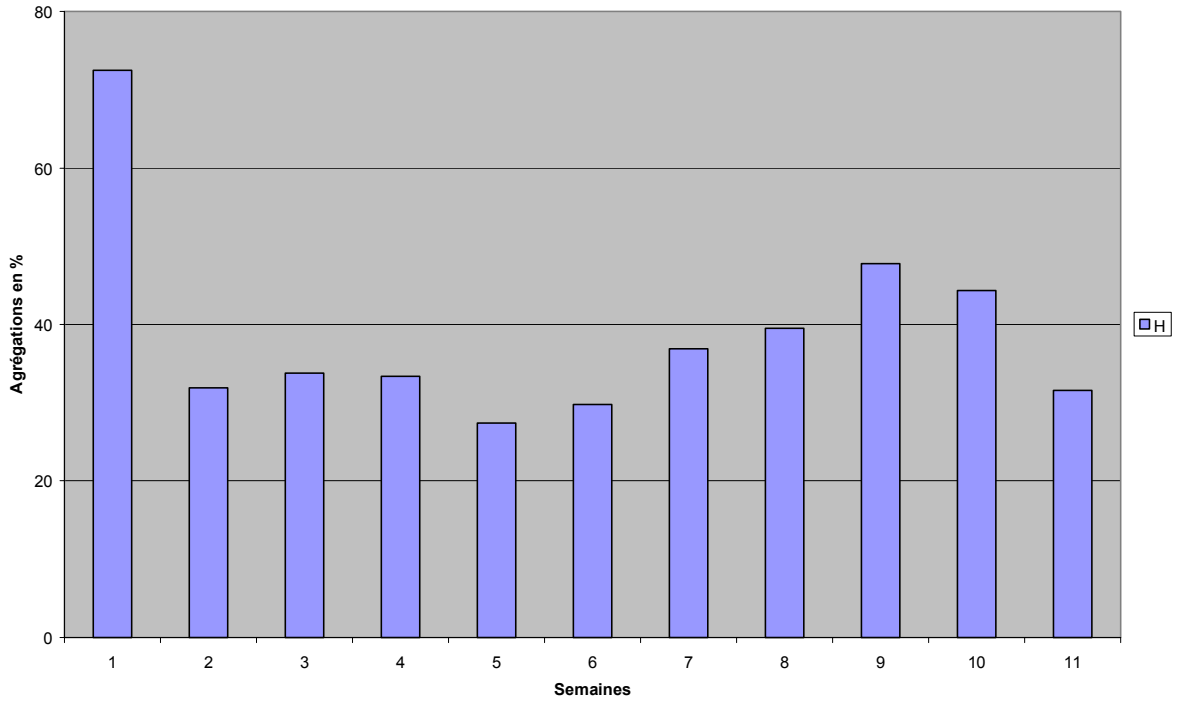
Volontaire F



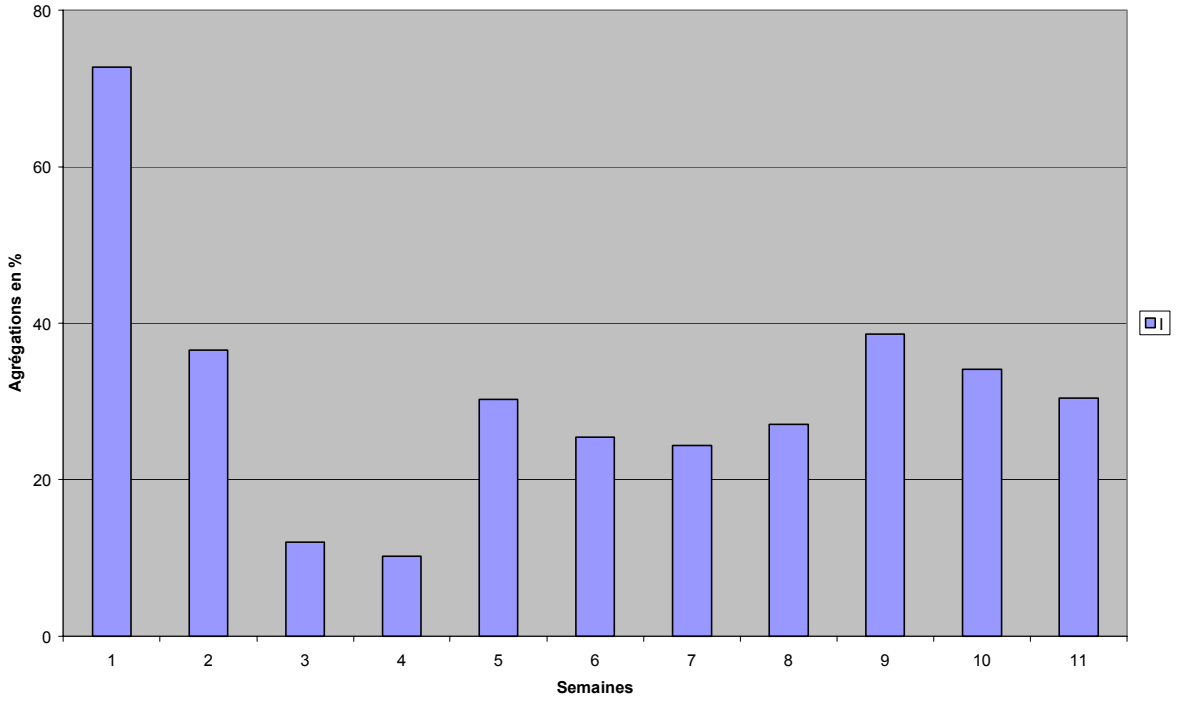
Volontaire G



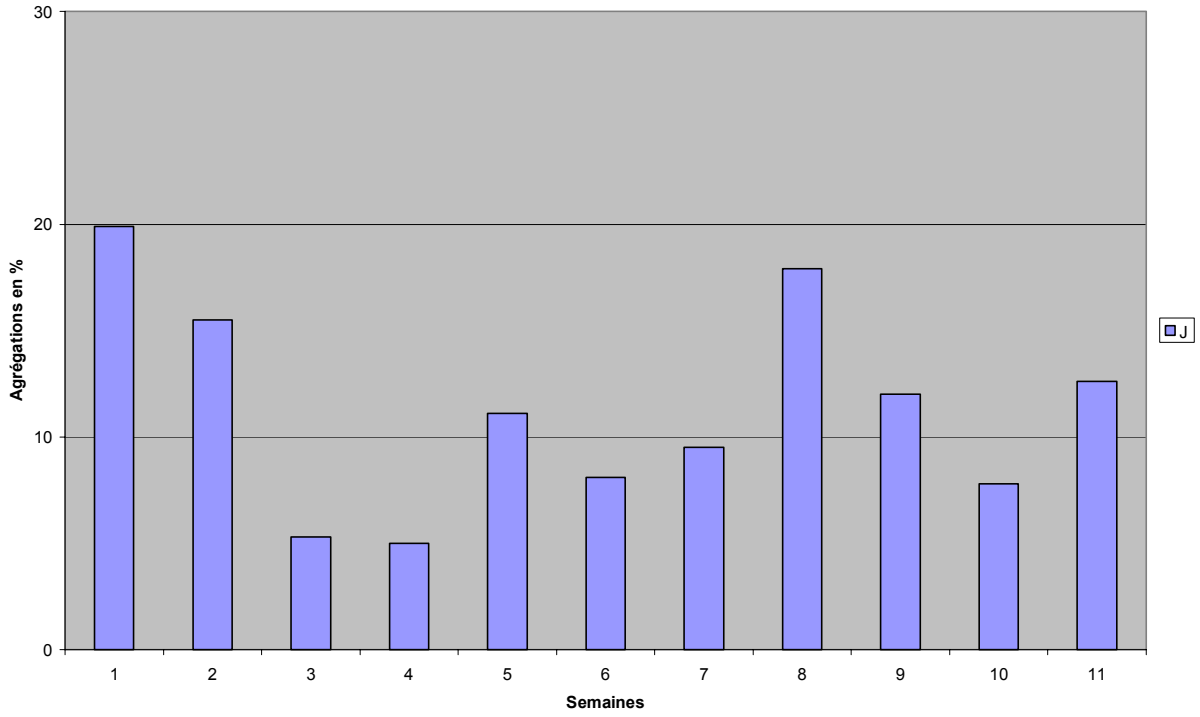
Volontaire H



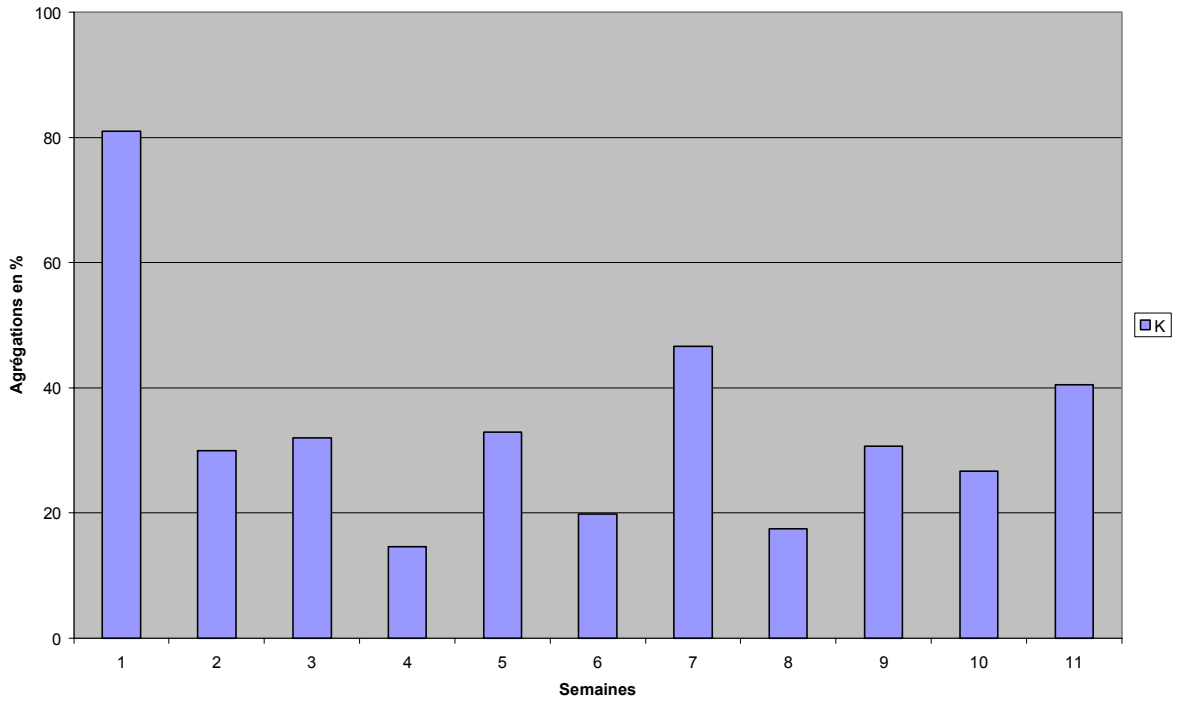
Volontaire I



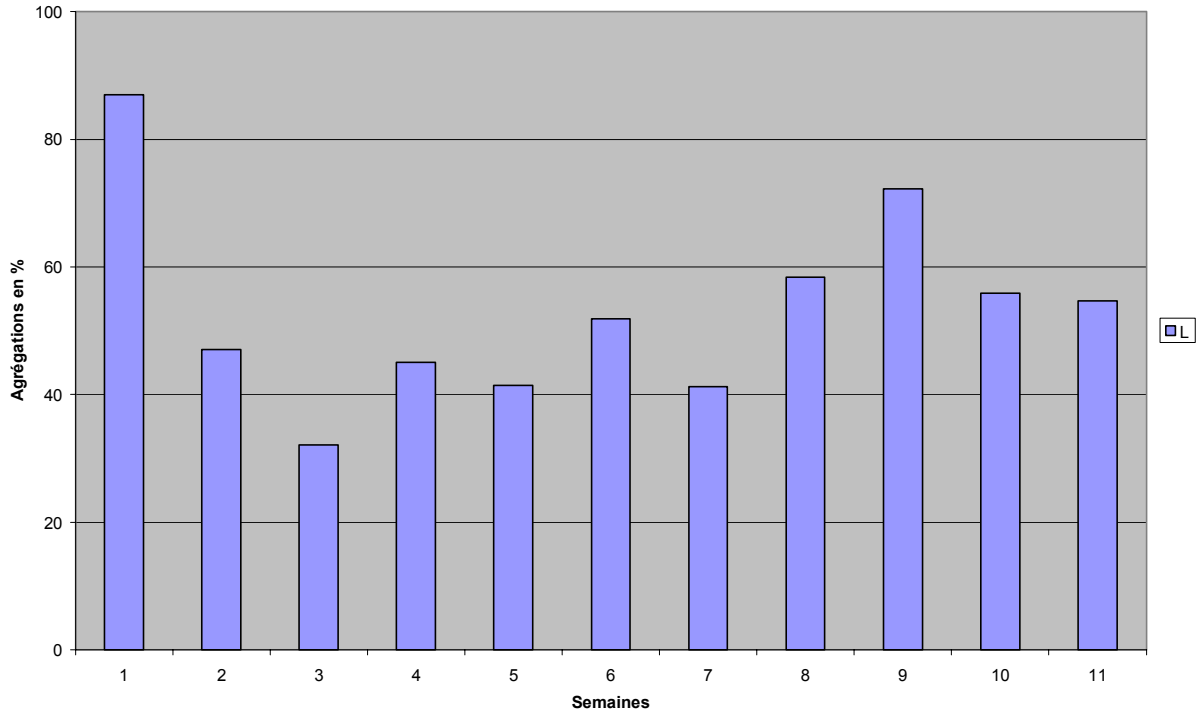
Volontaire J



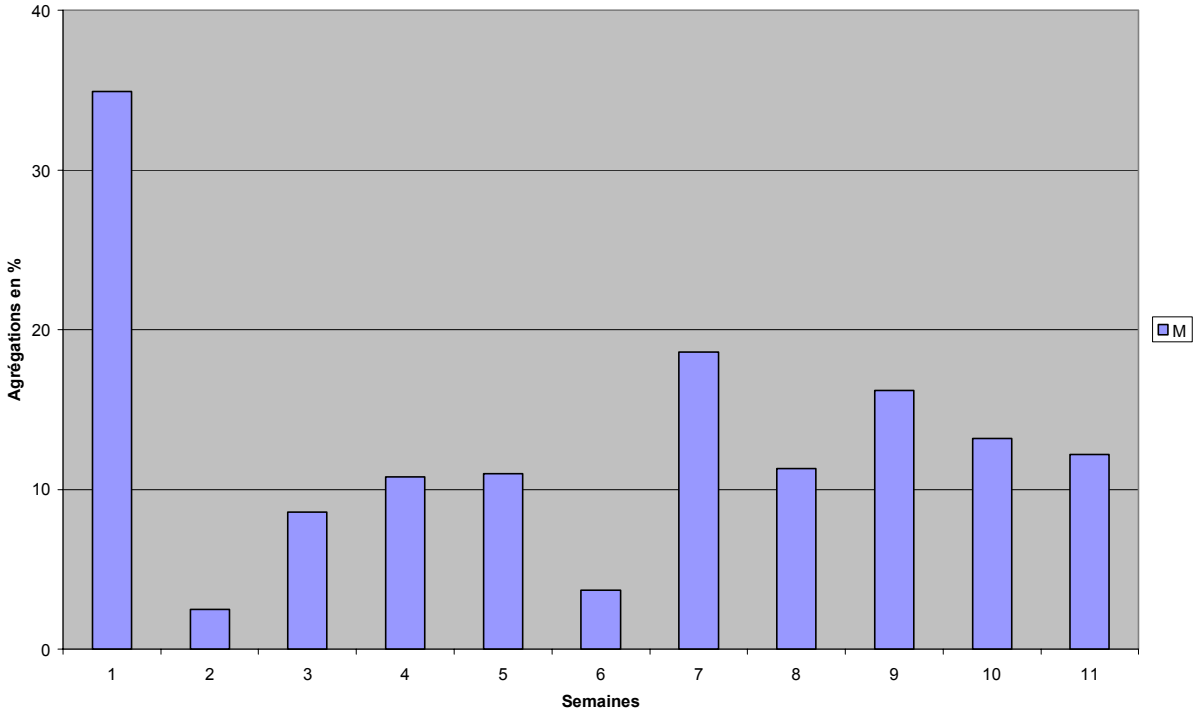
Volontaire K



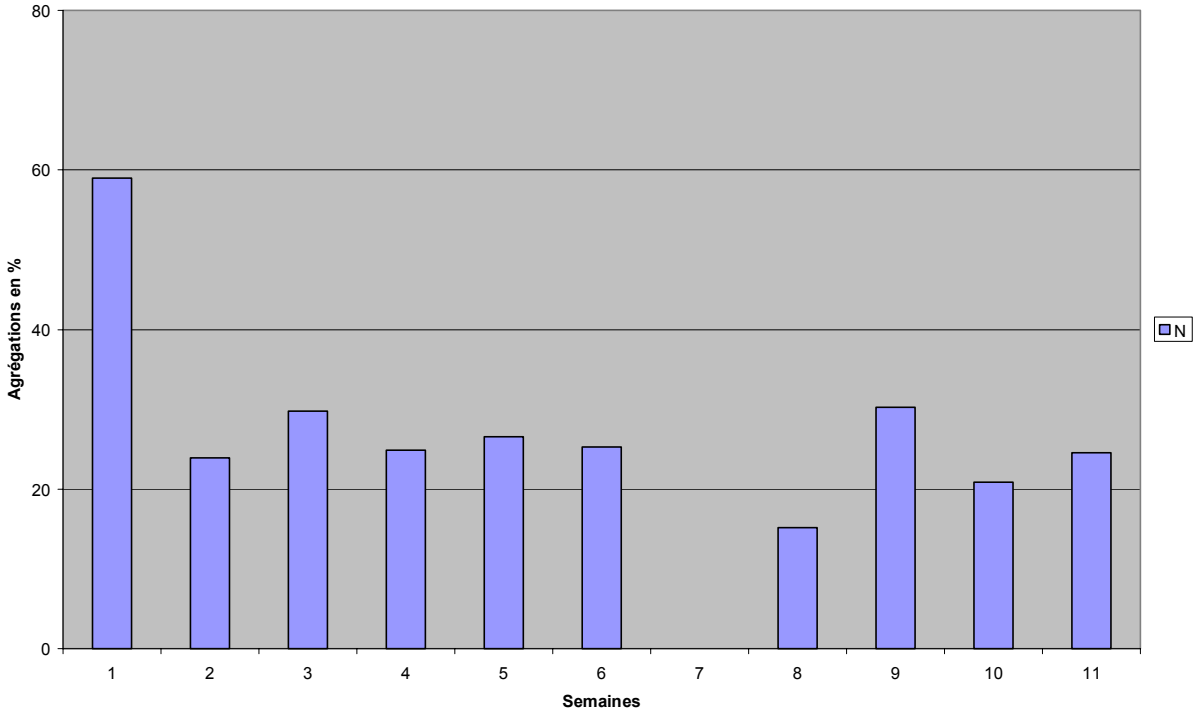
Volontaire L



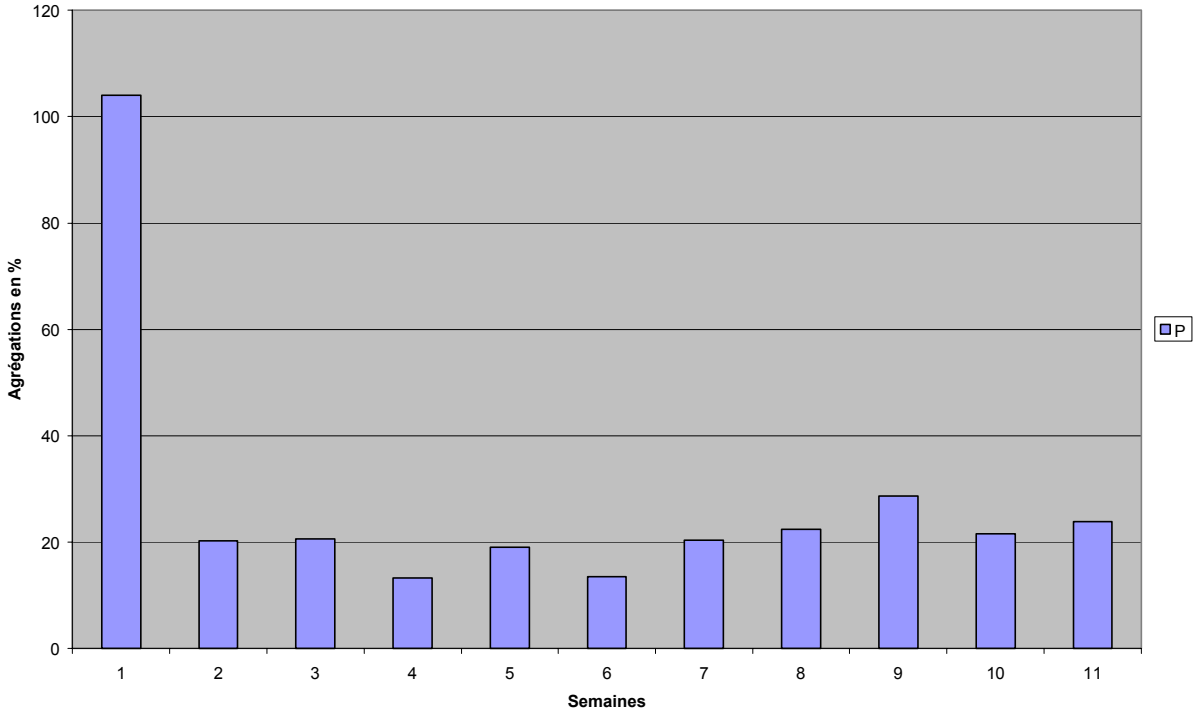
Volontaire M



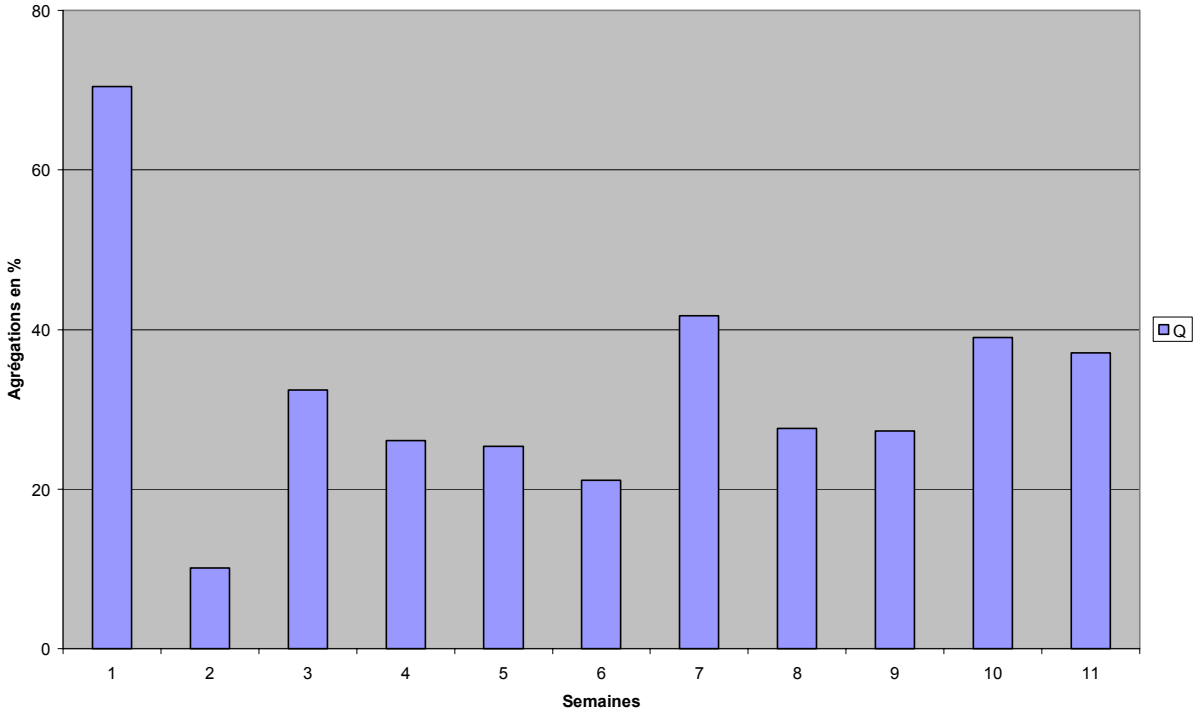
Volontaire N



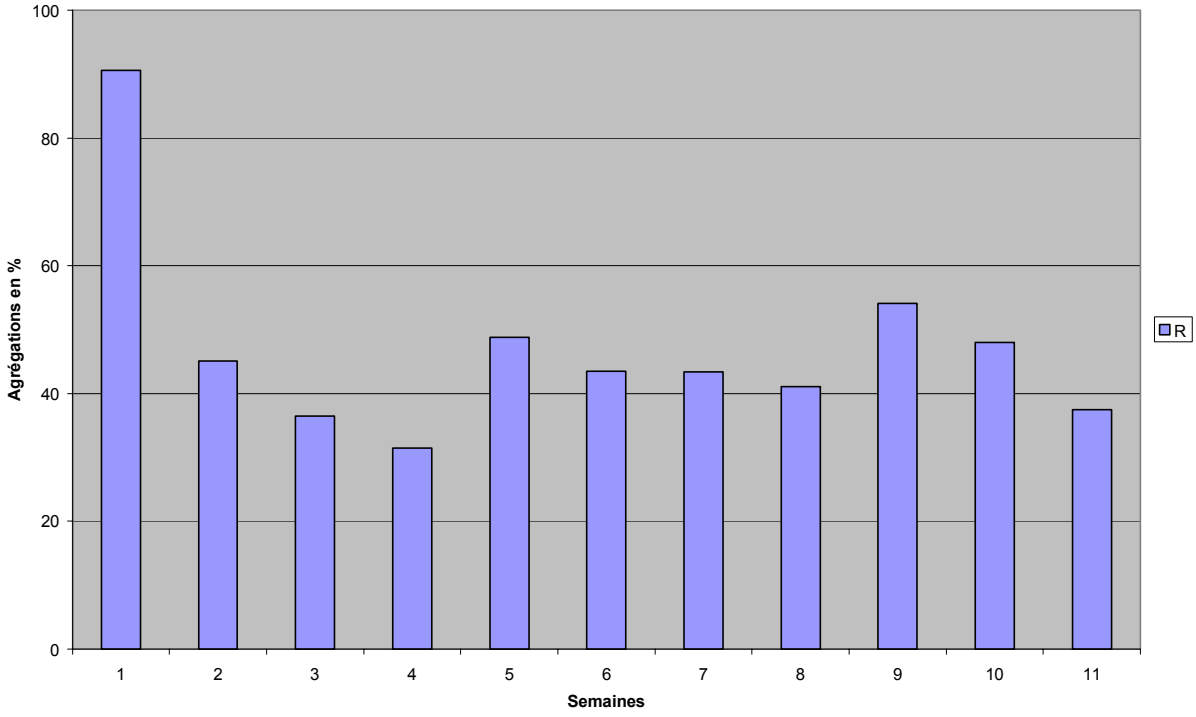
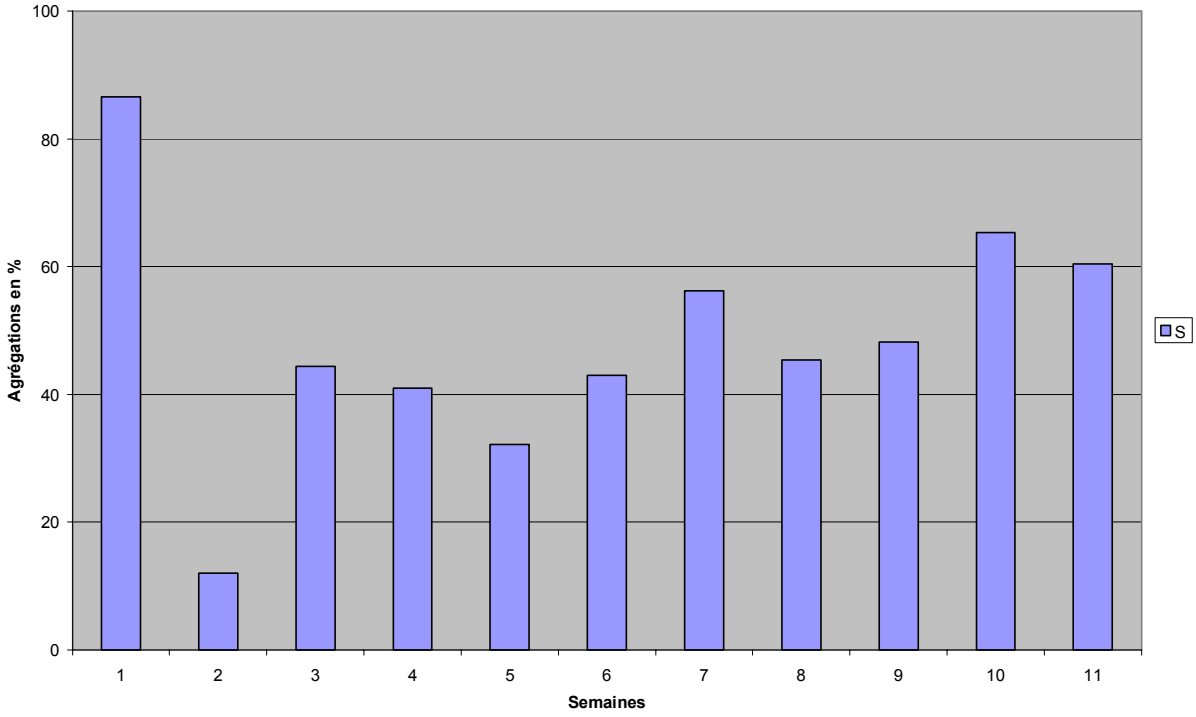
Volontaire P



Volontaire Q



Volontaire R



Volontaire S