



Thèse

2012

Open Access

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

Inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ à l'ADP: importance du métabolisme et influence des interactions médicamenteuses sur leurs paramètres pharmacocinétiques

Ancrenaz, Virginie

How to cite

ANCRENAZ, Virginie. Inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ à l'ADP: importance du métabolisme et influence des interactions médicamenteuses sur leurs paramètres pharmacocinétiques. Doctoral Thesis, 2012. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:25208

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:25208>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:25208](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:25208)

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Service de pharmacologie et toxicologie cliniques
Hôpitaux Universitaires de Genève

Section des sciences pharmaceutiques
Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur Jules Desmeules

Professeur Jean-Luc Veuthey

**Inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ à l'ADP : importance
du métabolisme et influence des interactions médicamenteuses sur
leurs paramètres pharmacocinétiques**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences, Mention Sciences Pharmaceutiques

par

Virginie ANCRENAZ

de

Contamine sur Arve (France)

Thèse N° 4490

GENÈVE

Atelier de reproduction des Hôpitaux Universitaires de Genève

2012



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DES SCIENCES

**Doctorat ès sciences
Mention sciences pharmaceutiques**

Thèse de *Madame Virginie ANCRENAZ*

intitulée :

**" Inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ à l'ADP :
importance du métabolisme et influence des interactions
médicamenteuses sur leurs paramètres pharmacocinétiques "**

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs J. DESMEULES, professeur associé et directeur de thèse (Hôpitaux Universitaires de Genève, Service de pharmacologie et toxicologie cliniques), J.-L. VEUTHEY, professeur ordinaire et codirecteur de thèse (Section des sciences pharmaceutiques), P. DAYER, professeur ordinaire (Hôpitaux Universitaires de Genève, Service de pharmacologie et toxicologie cliniques), Y. DAALI, docteur (Hôpitaux Universitaires de Genève, Service de pharmacologie et toxicologie cliniques), P. FONTANA, docteur (Hôpitaux Universitaires de Genève, Service d'angiologie et hémostasie) et P. BEAUNE, professeur (Service de biochimie, Université Paris Descartes, France), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 26 novembre 2012

Thèse - 4490 -


Le Doyen, Jean-Marc TRISCONE

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives aux thèses de doctorat à l'Université de Genève".

A ma famille,

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de nombreuses personnes. Je tiens donc à remercier :

Le Professeur Pierre Dayer pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans son service, pour avoir accepté de faire partie de mon jury, pour son soutien et la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de cette thèse.

Le Professeur Jules Desmeules, qui a supervisé mon travail. Je le remercie pour la direction de cette thèse, pour ses conseils avisés, pour avoir partagé son expérience et m'avoir ainsi permis d'enrichir mes connaissances en recherche clinique durant ces trois années de thèse.

Le Professeur Jean-Luc Veuthey pour la co-direction de cette thèse, son soutien et ses conseils.

Le Professeur Philippe Beaune et le Docteur Pierre Fontana pour avoir accepté d'être experts de ma thèse.

Je remercie également le Dr Youssef Daali pour avoir accepté de faire partie de mon jury, pour ses nombreux conseils, sa disponibilité, son soutien et son enthousiasme qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions au sein du laboratoire.

Je remercie énormément tous les membres du laboratoire sans qui je n'aurai certainement pas pu accomplir ce travail. Je pense à Fabienne Lazeyras pour sa sympathie, ses conseils précieux, et toute l'aide qu'elle m'a apportée. Je remercie Marija Bosilkovska pour le travail que nous avons réalisé ensemble durant son stage, pour tous les moments partagés au laboratoire depuis son début de thèse, pour son soutien et pour sa sympathie. Je remercie Sandra Linares pour l'aide qu'elle m'a apportée lors des expériences, son soutien et son optimisme permanent. Merci également à Mélanie Kuntzinger, Niloufar Marsousi ainsi qu'aux stagiaires que j'ai rencontré pendant cette thèse: Frédéric, Sara, Rose et Flavia, qui m'ont aidé et m'ont permis de partager avec plaisir les connaissances acquises durant ma thèse.

Je tiens à remercier aussi Julien Déglon pour ses conseils scientifiques, son aide dans le développement des méthodes analytiques lors des collaborations que nous avons eu, son soutien et sa sympathie. Je remercie également Chakradhara Rao Uppugundury pour son aide indispensable lors des expériences de PCR, ses bons conseils, sa gentillesse et sa disponibilité. Je voudrais remercier aussi les personnes externes au laboratoire avec qui j'ai pu collaborer durant ces années: Dr Richard James, Séverine Nolli, Antoine Poncet, Dr Jean-Luc Rény, Aurélien Thomas, François Versace, Anne Zufferey.

Je remercie tous les membres du Service de Pharmacologie et Toxicologie Cliniques. Merci aussi aux personnes du centre de recherche clinique et particulièrement Jocelyne Chabert, Sandrine Charvat, Ninon Horie, Isabelle Koenig, Alain Matthey, Khaled Mostaguir Anne-Sophie Rivier et Mélanie Verdon pour leur aide lors de la réalisation de l'étude clinique et leur disponibilité durant mon stage au CRC.

Je tiens à remercier tous les volontaires de l'étude clinique pour leur disponibilité et leur investissement qui contribuent à l'avancement des travaux de recherche clinique.

Un grand merci également à Liliane Gschwind et Roseline Ing Lorenzini pour m'avoir conseillée et soutenue tout au long de cette thèse.

Je remercie énormément mes parents, Henry, toute ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille et la confiance qu'ils m'ont témoignée depuis toujours. Merci à tous d'avoir été là, d'avoir su me soutenir lors des bons et des moins bons moments de ces trois dernières années.

Table des matières

Remerciements	I
Table des matières	III
Communications scientifiques	V
Abréviations	VIII
Structure de la thèse	XI
Résumé du travail.....	XIII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE	1
I. Les maladies cardiovasculaires et la thrombose	3
1.1 Maladies cardiovasculaires et syndrome coronarien aigu	3
1.2 Agrégation plaquettaire et thrombose	5
II. Les antiagrégants plaquettaires.....	7
2.1 Généralités	7
2.2 Inhibiteur du thromboxane A2: l'aspirine	8
2.3 Inhibiteurs du récepteur P2Y12.....	8
2.3.1 Clopidogrel.....	8
2.3.2 Prasugrel	12
2.3.3 Ticagrelor.....	15
2.3.4 Place de ces traitements dans la prise en charge du SCA.....	16
2.4 Les inhibiteurs du récepteur GPIIb/IIIa.....	18
III. Mesure de l'agrégation plaquettaire	21
3.1 L'agrégométrie à l'ADP	21
3.2 Le VASP.....	21
3.3 Le VerifyNow.....	23
IV. Métabolisme des médicaments et cytochromes P450	25
1.1 Les cytochromes P450.....	25
4.1.1 Historique, classification et structure.....	25
4.1.2 Variabilité génétique des CYPs et conséquences cliniques	27
4.1.3 Les différentes isoformes	28
4.2 Détermination des paramètres cinétiques du métabolisme d'un médicament	31
4.3 Outils in vitro pour la détermination de l'activité des CYPs	32
4.3.1 Foie isolé perfusé	32
4.3.2 Tranches fines de foie	32
4.3.3 Les microsomes hépatiques humains	32
4.3.4 Les cytochromes recombinants.....	35
4.3.5 Hépatocytes primaires.....	35
4.3.6 Les lignées cellulaires	35
V. Les interactions médicamenteuses	39
5.1 Les interactions pharmacodynamiques	39
5.2 Les interactions pharmacocinétiques	39
5.2.1 Absorption.....	39
5.2.2 Distribution.....	40
5.2.3 Métabolisme	40
5.2.4 Elimination	43
VI. Les antirétroviraux	45
2.1 Généralités	45
2.2 Les traitements	46
6.2.1 Les inhibiteurs de la protéase.....	46
6.2.2 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	47
6.2.3 Les inhibiteurs de fusion.....	47

6.2.4 Les différents types d'associations de traitements.....	47
VII. Métabolisme des thiénopyridines et interactions médicamenteuses	49
Résumé	49
Article 1 : <i>Impact of Genetic Polymorphisms and Drug–Drug Interactions on Clopidogrel and Prasugrel Response Variability</i>	51
Nouvelles données.....	65
Références	68
CHAPITRE 2: ETUDES IN VITRO: METABOLISME DU CLOPIDOGREL ET DU PRASUGREL ET INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES.....	75
Métabolisme du clopidogrel.....	77
Résumé	77
Article 2 : <i>Paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro</i>	79
Etude d'interaction in vitro entre le prasugrel et le ritonavir	91
Résumé	91
Article 3 : <i>Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug–drug interaction in HIV patients</i>	93
Références	101
CHAPITRE 3 : ETUDE CLINIQUE: INTERACTION PHARMACOCINETIQUE ENTRE LE PRASUGREL ET LE RITONAVIR CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN	103
Résumé	105
Article 4 : <i>Pharmacokinetic interaction between prasugrel and ritonavir in healthy volunteers</i>	107
References	122
CHAPITRE 4 : ETUDE IN VITRO DE L'INTERACTION ANTIPLAQUETTAIRES / ANTIRETROVIRAUX.....	125
Etude in vitro de l'interaction entre prasugrel / clopidogrel et les antirétroviraux à l'aide de microsomes hépatiques humains	127
Matériel et méthodes	127
Résultats et discussion.....	129
Etude in vitro de l'interaction entre clopidogrel / prasugrel et les antirétroviraux à l'aide de la lignée cellulaire hepaRG®	133
Matériel et méthodes	133
Résultats et discussion	135
Références	140
CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	141
CHAPITRE 6: ANNEXES	147
1/ Protocole de l'étude clinique: chrono-pharmacologie et risque d'interaction entre le clopidogrel et l'oméprazole chez les volontaires sains	149
Résumé	149
Protocole.....	151
2/ Editorial du journal <i>Metabolism</i>	181
3/ Carte actualisée des interactions médicamenteuses avec les CYPs et édition 2011 du journal Pharmaflash.....	187
4/ Posters.....	197

Communications scientifiques

Publications

- **Ancrenaz V**, Daali Y, Fontana P, Besson M, Samer C, Dayer P, Desmeules J. Impact of genetic polymorphisms and drug-drug interactions on clopidogrel and prasugrel response variability. *Curr Drug Metab.* 2010 Oct;11(8):667-77. Review. Impact factor : 5.113
- Daali Y, **Ancrenaz V**, Bosilkovska M, Dayer P, Desmeules J. Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug-drug interaction in HIV patients. *Metabolism.* 2011 Nov;60(11):1584-9. Impact factor : 2.664.
- **Ancrenaz V**, Desmeules J, James R, Fontana P, Reny JL, Dayer P, Daali Y. Paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro. *Br J Pharmacol.* 2012 Mar 16. Impact factor: 4.409.
- **Ancrenaz V**, Déglon J, Samer C, Staub C, Dayer P, Daali Y, Desmeules Y. Pharmacokinetic interaction between prasugrel and ritonavir in healthy volunteers. In press. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* Impact factor: 2.179.

Présentations orales

Journée APSI

Ancrenaz V., Daali Y., Dayer P., Desmeules J. *In vitro* characterisation of the clopidogrel bioactivation pathways by cytochromes P450 and potential drug-drug interactions. Après-midi académique du département APSI (Anesthésiologie, Pharmacologie et Soins Intensifs). Hôpitaux Universitaires de Genève, juin 2009.

5^{ème} Conférence Internationale sur les paraoxonases

Daali Y, Combescure C, Ancrenaz V, James R, Dayer P ; Desmeules J, Reny JL, Fontana P. The story of clopidogrel and the paraoxonase-1 Q192R genetic variant : a systematic review, meta-analysis and in-vitro data. Fifth International Conference on Paraoxonases, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA. July 2012.

Présentations à des congrès (Posters)

***In vitro* characterization of the clopidogrel bioactivation pathways by cytochromes P450 and potential drug-drug interactions.**

Ancrenaz V., Daali Y., Samer C., Besson M., Fontana P., Dayer P., Desmeules J. WorldPharma, Copenhagen, July 2010 (Poster n°2809 in Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, Special Issue. Abstracts for the 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. Volume 107, Supplement S1, pages 1-757).

Ritonavir inhibits prasugrel *in vitro* bioactivation: a potential pharmacokinetic drug-drug interaction.

V. Ancrenaz, Y. Daali, M. Bosilkovska, C. Samer, P. Dayer, J. Desmeules. ASCPT Meeting, Dallas, March 2011. (Poster n° II-59 in Clinical Pharmacology and Therapeutics. Abstracts for the ASCPT 2011, Volume 89, Supplement S1, pages 38-65).

Ritonavir inhibits prasugrel *in vitro* bioactivation: a potential pharmacokinetic drug-drug interaction.

V. Ancrenaz, Y. Daali, M. Bosilkovska, C. Samer, P. Dayer, J. Desmeules. 4^{ème} journée de la recherche clinique, HUG, Genève. May 2011 (http://crc.hug-ge.ch/journee_recherche_clinique/Programme_final_JRC2012.pdf, page 13)

PON1 is not the major bioactivation metabolic pathway of clopidogrel *in vitro*.

V. Ancrenaz, J. Desmeules, R. James, P. Dayer, Y. Daali. ASCPT Meeting, Washington, March 2012. (Poster n° I-38 in Clinical Pharmacology and Therapeutics. Abstracts for the ASCPT 2012, Volume 91, Supplement S1, pages 7-47).

Dual cytochrome P450 3A and 2B6 inhibition affects prasugrel pharmacokinetics in healthy volunteers.

V. Ancrenaz, J. Déglon, C. Samer, C. Staub, P. Dayer, Y. Daali, J. Desmeules. ASCPT Meeting, Washington, March 2012. (Poster Presidential Trainee Award n°1-10 in Clinical Pharmacology and Therapeutics. Abstracts for the ASCPT 2012, Volume 91, Supplement S1, pages 1-6).

PON1 is not the major bioactivation metabolic pathway of clopidogrel *in vitro*.

V. Ancrenaz, J. Desmeules, R. James, P. Dayer, Y. Daali. 5^{ème} journée de la recherche clinique, HUG, Genève. May 2012. (http://crc.hug-ge.ch/library/JRC_programme_2011.pdf, page 12).

Abréviations

ADN=Acide DésoxyriboNucléique

ADP= Adénosine Di-Phosphate

AM=Active Metabolite

ARN=Acide RiboNucléique

AUC= Area Under the Curve

AVC=Accident Vasculaire Cérébral

BMAP=2-Bromo-3'-MethoxyAcetoPhenone

CAPRIE study= Clopidogrel Versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events

CAR=Constitutive Androstane Receptor

CBP= 4-(4-chlorobenzyl)pyridine

CLARITY-TIMI study= Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy – Thrombolysis in Myocardial Infarction

COMMIT study= Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial

COMT=Catechol-O-MethylTransferase

CURE study= Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Ischemic Events

CYP=Cytochrome P450

DC=Dose de Charge

DISPERSE study=Dose finding Investigative Study to assess the Pharmacodynamic Effects of AZD6140 in atherosclerotic disease

DMSO=DiMethylSulfOxyde

ECG=ElectroCardioGramme

EDTA=Ethylene Diamine Tetraacetic

ESC=European Society of Cardiology

GST= Glutathione S-Transferase

hCE= human CarboxylEsterases

HDL=High Density Lipoprotein

HLM= Human Liver Microsomes

HR=Hazard Ratio

IM=Infarctus du Myocarde

IPP=Inhibiteur de la Pompe à Protons

JUMBO-TIMI study=Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally-TIMI

K_i=constante d'inhibition

K_m=constante d'affinité

LC-MS-MS= Liquid Chromatographic-Mass Spectrometry

MAB= Monoclonal AntiBody

MFI=Mean Fluorescence Intensity

NADP=Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate

NNT=Number Needed to Treat

NRTI=Nucleosid Reverse Transcriptase Inhibitor

NNRTI = Non-Nucleosid Reverse Transcriptase Inhibitor

OMS= Organisation Mondiale de la Santé

PGE1=ProstaGlandin E1

p-gp=p-glycoprotéine

PON1=Paraoxonase-1

PRI=Platelet Reactivity Index

PXR= Pregnane X Receptor

RePON1=recombinant paraoxonase-1

SCA=Syndrome Coronarien Aigu

SD=Standard Deviation

TIMI= Thrombolysis In Myocardial Infarction

TRITON-TIMI= Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with prasugrel-TIMI

UGT=UDP-glucuronyltransferase

VASP= VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein

VIH=Virus de l'Immunodéficience Humaine

V_m=vitesse maximale

Structure de la thèse

Ce manuscrit de thèse est divisé en 6 parties:

La **première partie** de ce travail consiste en la présentation du sujet. Cette partie s'articulera autour d'une revue de la littérature écrite durant cette thèse et publiée dans *Current Drug Metabolism*. Cet article fait un état des lieux de la situation actuelle concernant le métabolisme des antiagrégants plaquettaires et les interactions médicamenteuses faisant intervenir ces molécules. Une introduction générale sur les différents aspects développés pendant cette thèse ainsi qu'une mise à jour de la revue de la littérature sont également présentées.

La **deuxième partie** de ce manuscrit présente les études de métabolisme *in vitro* du clopidogrel et du prasugrel qui ont été réalisées durant cette thèse. Le métabolisme du clopidogrel est présenté sous forme d'un article publié dans le *British Journal of Pharmacology* et les résultats du métabolisme du prasugrel et de son interaction *in vitro* avec le ritonavir ont fait l'objet d'une publication dans le *Metabolism Journal*.

La **troisième partie** montre les résultats d'une étude clinique réalisée pendant cette thèse investiguant l'interaction entre le prasugrel et le ritonavir. Cette étude est présentée sous forme d'un article accepté pour publication dans le journal *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*.

La **quatrième partie** est dédiée à des résultats préliminaires d'études d'interactions *in vitro* entre les antiplaquettaires (clopidogrel et prasugrel) et les antirétroviraux les plus utilisés, à l'aide de microsomes et de la lignée cellulaire HepaRG™.

La **cinquième partie** présente les conclusions et les perspectives de ce travail.

La **sixième partie** inclut en annexes les communications scientifiques réalisées pendant la thèse mais non présentées dans le manuscrit.

Résumé du travail

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans les pays développés. Les facteurs de risque sont nombreux : cholestérol élevé, hypertension artérielle, obésité, etc. L'épidémiologie de ces maladies montre une prévalence qui s'accroît et l'enjeu économique du développement de nouveaux médicaments efficaces pour les industries pharmaceutiques est très important, expliquant la grande variété de traitements pour une même pathologie et le nombre de molécules encore en développement pour traiter ces maladies.

Une des grandes classes des médicaments antiplaquettaires utilisés dans les maladies cardiovasculaires est la famille des thiénypyridines qui sera l'objet d'une grande partie de ce travail de thèse.

Dans un premier temps, une revue de la littérature approfondie a été réalisée sur la pharmacologie de ces médicaments, leur variabilité pharmacocinétique et dynamique ainsi que les interactions dans lesquelles ils sont impliqués.

La deuxième partie de ce travail montre les résultats des études *in vitro* qui ont été effectuées pour essayer de mieux comprendre le métabolisme de ces agents antiplaquettaires et notamment l'implication des différents cytochromes P450 (CYPs) afin de caractériser les interactions médicamenteuses potentielles néfastes qui pourraient survenir en leur présence.

La plupart des études de métabolisme et la recherche des potentiels d'interactions se font désormais dans les étapes les plus précoces du développement d'un médicament et les molécules-candidates qui ont le moins d'affinité avec les CYPs sont privilégiées. Des outils *in vitro* ont été développés ces dernières années pour faciliter la caractérisation des voies métaboliques et le potentiel inhibiteur et/ou inducteur des médicaments. Cependant, les interactions médicamenteuses néfastes restent un problème majeur souvent difficilement évitable mais que l'on peut parfois prévenir ou surmonter grâce à des connaissances adéquates des mécanismes mis en jeu lors de ces phénomènes.

Durant ce travail, les interactions médicamenteuses entre les thiénypyridines et les antirétroviraux nous ont particulièrement intéressés. En effet, les interactions pharmacocinétiques potentielles avec certains des antirétroviraux comme le ritonavir et les antiplaquettaires tels que le prasugrel ont été mise en évidence *in vitro* à l'aide de microsomes et de cytochromes recombinants. L'interaction entre le prasugrel et le ritonavir, potentiellement cliniquement nuisible, conduit à une diminution de la production du

métabolite actif du prasugrel en présence de ritonavir. Une étude clinique sur des volontaires sains a été réalisée pour confirmer cette possible interaction *in vivo*. Une technique innovante non invasive : le Dried Blood Spot, a été utilisée pour prélever les échantillons dans le but d'étudier la pharmacocinétique du prasugrel et de ses métabolites. Cette méthode consiste à prélever quelques microlitres de sang capillaire au bout du doigt et à les déposer sur un papier buvard avant de réaliser une extraction au méthanol directement dans le vial d'injection et l'analyser à l'aide d'une méthode développée en HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem. Un micrococktail de phénotypage élaboré au laboratoire a également été utile à l'appréciation des différentes activités des CYPs chez les volontaires sains. Les résultats de cette étude ont confirmé une interaction pharmacocinétique entre le ritonavir et le prasugrel liée à l'inactivation du CYP3A par le ritonavir. Le ritonavir est un inhibiteur de la protéase du VIH. Il est utilisé très largement comme « booster » des autres antirétroviraux en augmentant leur concentration plasmatique *via* une inhibition de leur métabolisme par le CYP3A. Le clopidogrel et le prasugrel sont bioactivés en partie par le CYP3A et bien que le ticagrelor, le nouvel agent antiagrégant plaquettaire inhibiteur réversible du récepteur P2Y₁₂, puisse être actif sans être métabolisé, son métabolite actif est lui aussi produit par le CYP3A. Chez les patients infectés par le VIH atteints de syndrome coronarien aigu, cette interaction pourrait donc poser un problème lors de leur prise en charge.

Dans une dernière partie, le potentiel inducteur et inhibiteur des anti-VIH, longtemps débattu dans la littérature pour les traitements au long cours, a été investigué à l'aide d'une lignée cellulaire hépatique nouvellement développée au laboratoire.

Chapitre 1 :

Introduction générale

I. Les maladies cardiovasculaires et la thrombose

1.1 Maladies cardiovasculaires et syndrome coronarien aigu

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de décès dans les pays développés (1). Selon une étude de l'OMS, environ 30% de la mortalité mondiale serait imputable à ces pathologies (2).

Les maladies cardiovasculaires désignent les troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Cela comprend les cardiopathies coronariennes (infarctus du myocarde), les maladies cérébro-vasculaires (AVC), les artériopathies périphériques, les cardiopathies rhumatismales, les malformations cardiaques congénitales et les thromboses veineuses profondes et embolies pulmonaires.

Une étude a montré que neuf facteurs de risque des maladies cardiovasculaires peuvent prédire 90 et 94% des infarctus du myocarde (IM) chez les hommes et chez les femmes, respectivement. Les deux facteurs de risque les plus importants au niveau mondial sont le tabac et un rapport ApoB/ApoA1 élevé. Les facteurs psychosociaux, l'obésité abdominale, le diabète et l'hypertension sont également fortement corrélés à un risque d'IM augmenté. Par ailleurs, la consommation régulière de fruits et de légumes, la consommation modérée d'alcool et la pratique d'une activité physique régulière ont un effet protecteur vis-à-vis du risque d'IM (3).

Etant donné la gravité des événements athérothrombotiques, des critères pour stratifier ces pathologies ont été identifiés pour permettre aux cliniciens de prendre des décisions plus rapides au point de vue de la pharmacologie en particulier dans les situations aiguës et les procédures de revascularisation coronarienne.

Le syndrome coronarien aigu correspond à la rupture d'une plaque d'athérosclérose et englobe les pathologies ischémiques aiguës : angor instable, IM avec élévation du segment ST (dépolarisation des cellules myocardiques) et IM sans élévation du segment ST.

Le symptôme principal commun du syndrome coronarien est une douleur à la poitrine mais la classification des patients est basée sur l'électrocardiogramme (ECG) : une douleur aiguë à la poitrine et une élévation du ST supérieure à 20min sont souvent le reflet d'une occlusion coronarienne totale aiguë et ces patients sont très à haut risque de faire un événement thrombotique. L'objectif thérapeutique dans ce cas est d'obtenir une reperfusion rapide, complète et maintenue par une angioplastie primaire ou une thérapie par fibrinolytique (4). Chez les patients qui présentent une douleur caractéristique à la poitrine sans élévation persistante du segment ST, un dosage de troponine est effectué pour déterminer le

diagnostic d'angine instable si la troponine est négative à deux reprises ou d'IM sans élévation du segment ST si la troponine est positive (figure 1).

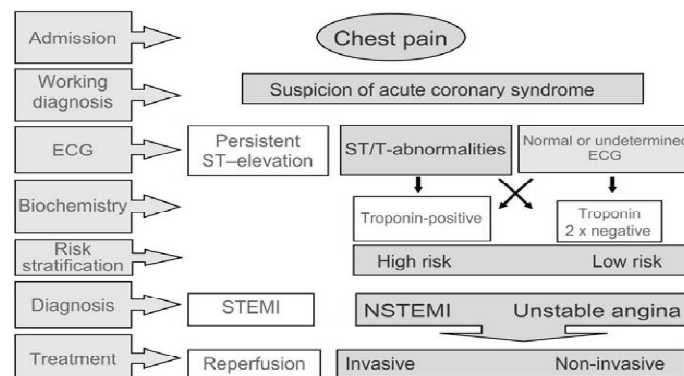


Figure 1 : Spectre des syndromes coronariens aigus (European Society of Cardiology)

L'origine de ces événements cardiovasculaires est souvent la présence de plaques athéromateuses qui se forment sur la paroi des artères (plaques d'athérosclérose). Lorsque la plaque grandit, un thrombus vient interrompre la circulation sanguine et obstruer les artères, le phénomène d'athérothrombose apparaît alors (figure 2)(5).



Image 1) Artère normale sans athérosclérose

Image 2) Athérosclérose débutante avec des dépôts lipidiques pouvant se transformer en plaques

Image 3) Artère rétrécie avec des plaques athérosclérotiques sévères

Figure 2 : Processus de formation des plaques athérosclérotiques

L'athérosclérose est un processus inflammatoire qui résulte de l'interaction entre des lipoprotéines modifiées, des macrophages dérivés de monocytes, des cellules T et des éléments cellulaires normaux de la paroi artérielle. La rupture de cette plaque formée suite au processus inflammatoire a pour conséquence des complications cliniques aiguës possibles comme l'IM ou l'AVC (6).

1.2 Agrégation plaquettaire et thrombose

La rupture de la plaque d'athérosclérose expose les composants lipidiques à la circulation sanguine, en initiant la cascade de coagulation, l'adhérence plaquettaire puis la thrombose (figure 3).

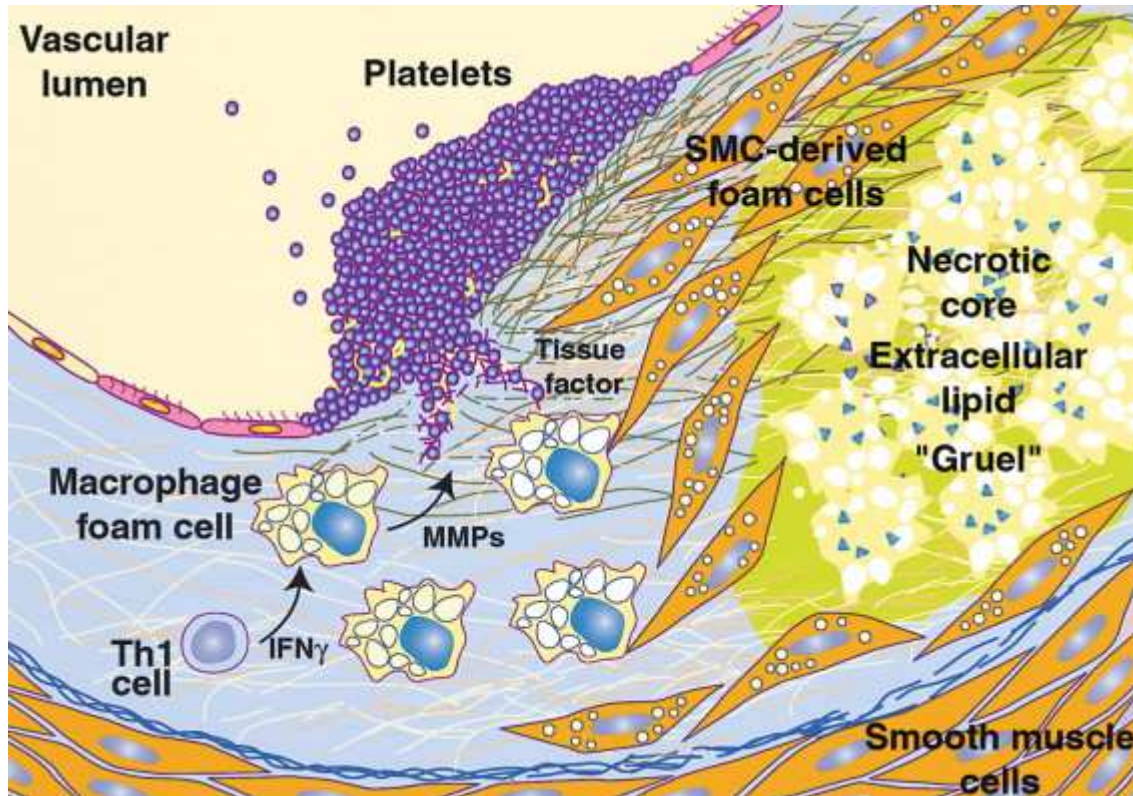


Figure 3 : Rupture de plaque et thrombose. La rupture de la plaque d'athérosclérose expose les composants sanguins aux facteurs tissulaires, initiant ainsi la coagulation, le recrutement des plaquettes et la formation du thrombus (7).

Les plaquettes sont des cellules anucléées de 1 à 2 microns de diamètre qui proviennent de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes, grandes cellules qui prennent naissance dans la moelle osseuse.

Les plaquettes sanguines sont distribuées principalement dans le compartiment sanguin avec un taux plaquettaire normal fixé à 150-400 g/l. La fonction principale des plaquettes est de stopper une hémorragie en cas de lésion vasculaire. La durée de vie des plaquettes est de 7 à 12 jours.

En cas de lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent à la matrice protéique sous-endothéliale : les récepteurs plaquettaires GPIb se fixent au facteur XIII (Von Willebrand) de la matrice sous-endothéliale, au collagène et aux autres protéines d'adhésion (8). L'activation plaquettaire se fait ensuite grâce à la libération d'ADP par les granules, la

synthèse et la libération de thromboxane A₂ par les plaquettes ainsi que l'augmentation du contenu de la membrane plaquettaire en phospholipides anioniques avec la fixation de prothrombinase et de facteur VII puis la production de thrombine qui mène à l'activation plaquettaire. Lors de leur activation, les plaquettes changent de forme, deviennent sphériques et émettent des pseudopodes qui leur permettent de s'étaler et d'interagir plus facilement.

L'activation plaquettaire conduit à un changement de conformation du récepteur GPIIb/IIIa qui fixe le fibrinogène. Le fibrinogène circulant, qui forme des ponts entre les plaquettes, va permettre la formation d'agrégats plaquettaires en présence de calcium.

La taille de l'agrégat dépend des forces de cisaillement du flux vasculaire et de l'importance de la sténose artérielle.

II. Les antiagrégants plaquettaires

2.1 Généralités

L'activation plaquettaire et par conséquent l'agrégation des plaquettes jouent un rôle important dans la propagation du thrombus dans les artères car la rupture de plaque d'athérosclérose est suivie d'une adhésion, une activation et une agrégation plaquettaire conduisant à la formation d'un thrombus comme décrit ci-dessus (9). Le traitement standard actuel dans le SCA est une double thérapie antiplaquettaire comprenant l'aspirine, pour bloquer l'activation des plaquettes par l'inhibition du thromboxane-A₂, et un inhibiteur de récepteurs à l'ADP pour bloquer une deuxième voie d'activation plaquettaire. La double thérapie doit débiter le plus tôt possible après la pose du diagnostic de SCA.

Il existe à l'heure actuelle trois catégories principales d'antiagrégants plaquettaires avec des mécanismes d'action différents (ECS guidelines) (voir figure 4) dont les plus utilisées actuellement seront détaillées dans les paragraphes ci-après (10).

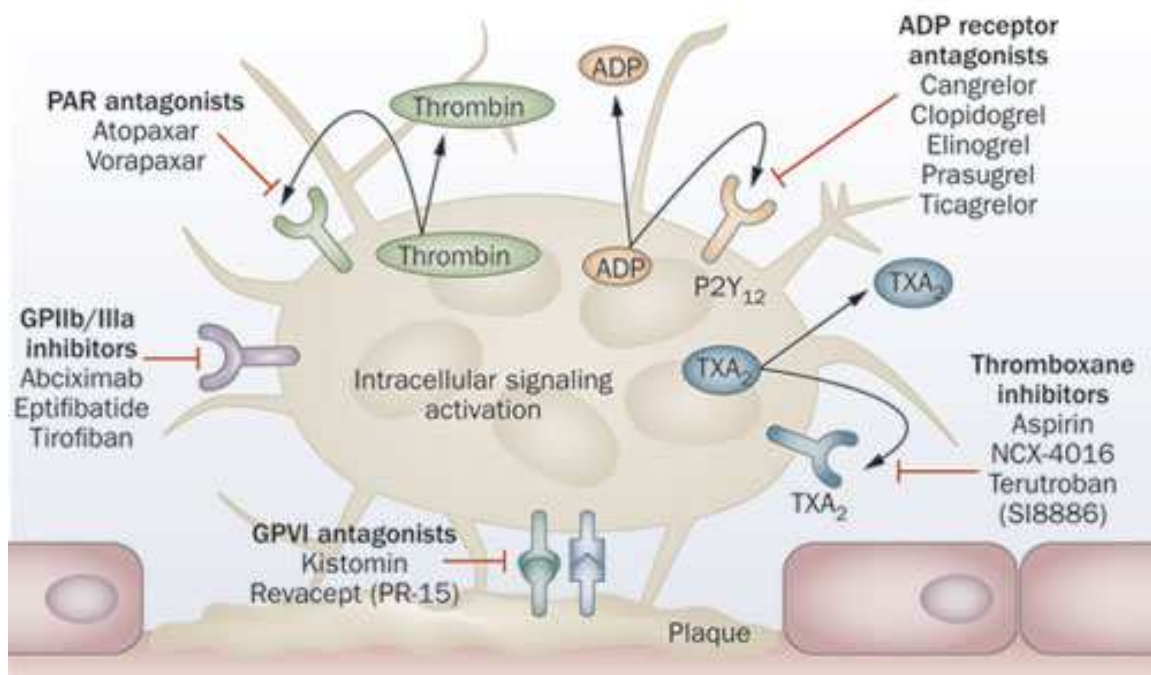


Figure 4 : Les stratégies de traitement après un syndrome coronarien aigu reposent sur l'inhibition des différents récepteurs cibles des plaquettes activées pour interrompre la cascade de la thrombose conduite par les plaquettes. Les agents pharmacologiques qui ciblent ces récepteurs sont cités dans cette figure. Abréviations: GP, glycoprotéine; PAR, protease-activated receptor; TXA₂, thromboxane A₂ (10).

2.2 Inhibiteur du thromboxane A2: l'aspirine

L'inhibiteur du thromboxane A2 le plus connu et le plus utilisé est l'acide acétylsalicylique (aspirine) qui agit en bloquant la cyclo-oxygénase plaquettaire par acétylation irréversible d'un résidu sérine au site actif de l'enzyme (11). Il inhibe ainsi la synthèse du thromboxane A2 qui est la substance activatrice physiologique libérée par les plaquettes.

Cette inhibition plaquettaire est irréversible car les plaquettes en l'absence de matériel nucléaire ne sont plus capables de reformer de nouvelles cyclo-oxygénases et il faut donc attendre environ 9-10 jours (durée de vie moyenne des plaquettes) pour retrouver une fonction plaquettaire normale après l'arrêt du traitement (12).

Chez les patients ayant présenté un IM, une réduction du risque relatif de 30% des décès de causes cardiovasculaires, IM ou AVC a été observée avec l'utilisation de l'aspirine (13).

L'utilisation de l'aspirine est recommandée chez tous les patients ayant eu un événement cardiovasculaire ischémique à une dose de charge de 150 à 300mg suivie par une dose de maintien de 75 à 100mg par jour. En effet, l'essai de grande taille CURRENT-OASIS 7 a montré chez plus de 25 000 patients randomisés pour recevoir une faible dose (75-100mg) ou une dose plus élevée d'aspirine (300-325mg) que le critère composite primaire regroupant le décès pour cause cardiovasculaire, les IM, les AVC ou les TIMI, n'était pas différent entre les deux groupes mais que les saignements mineurs et les saignements gastro-intestinaux étaient plus importants avec une forte dose d'aspirine (14).

2.3 Inhibiteurs du récepteur P2Y12

2.3.1 Clopidogrel

Mécanisme d'action

Le clopidogrel est un antagoniste irréversible du récepteur à l'ADP P2Y12 des plaquettes. L'ADP est un agoniste important *in vivo* et se fixe sur deux récepteurs de la membrane plasmique des plaquettes : P2Y1 et P2Y12. P2Y1 est un récepteur membranaire trans-7 couplé à la protéine Gq et la fixation de l'ADP à ce récepteur entraîne la mobilisation du calcium, la modification de la conformation des plaquettes et une agrégation des plaquettes rapidement réversible. D'autre part, les récepteurs P2Y12 sont liés à une protéine inhibitrice G et la liaison de l'ADP à ce récepteur entraîne la stabilité de l'amplification de l'agrégation et de la sécrétion plaquettaire (figure 5) (15, 16). Le métabolite actif du clopidogrel contient un groupement carboxyl et un groupement thiol qui se fixe de manière spécifique et irréversible aux récepteurs P2Y12 en formant un pont disulfure avec deux résidus cystéines situés sur la partie extracellulaire de ces récepteurs (17). Ceci va empêcher la liaison de l'ADP à son récepteur, ce qui va entraîner une diminution de calcium et donc une inhibition de l'agrégation.

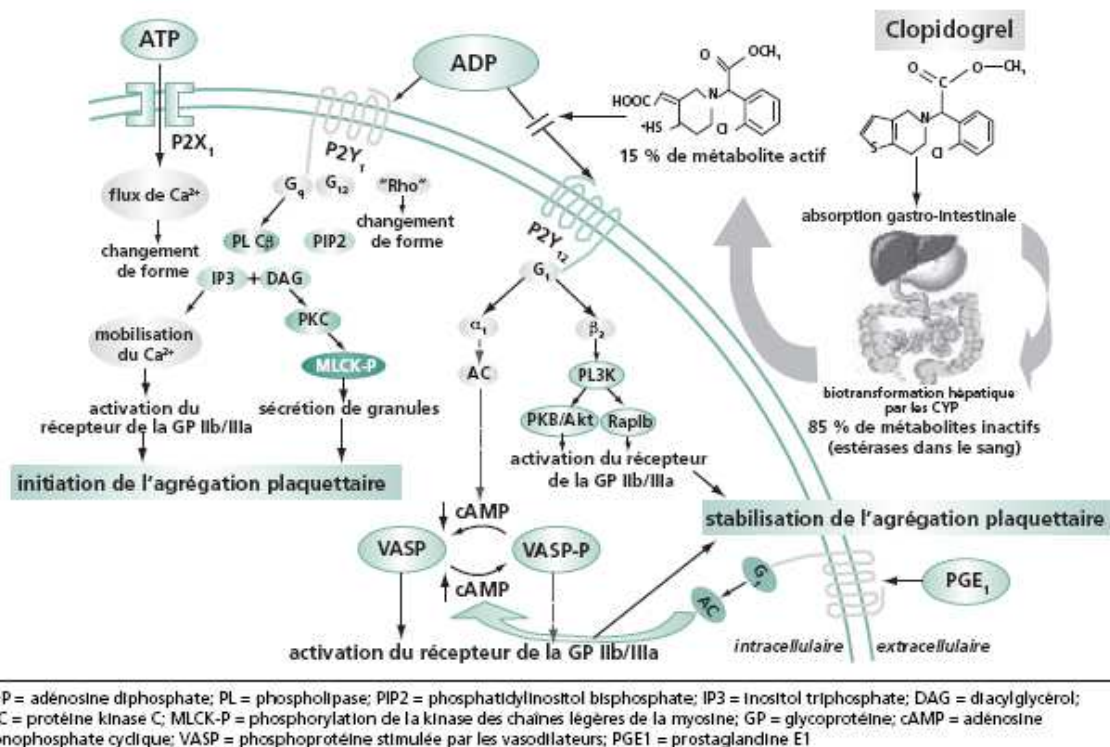


Figure 5. Bioactivation, mécanisme d'action et effet antiagrégant plaquettaire du clopidogrel.

Pharmacocinétique

Le clopidogrel (Plavix®) se présente sous la forme de comprimés de 75mg ou 300mg (dose de charge) et étant donné qu'une bioactivation hépatique est nécessaire pour l'effet pharmacologique du médicament, le clopidogrel n'est disponible que sous forme *per os*. Le clopidogrel est rapidement absorbé et le pic plasmatique du métabolite actif est atteint 30 minutes à 1 heure après la prise du comprimé.

Le clopidogrel et son métabolite actif sont fortement et réversiblement liés aux protéines plasmatiques à 98% et 94%, respectivement (18).

Le clopidogrel est inactif, c'est une pro-drogue qui nécessite une bioactivation en son métabolite actif pour avoir un effet pharmacologique (19) (figure 6).

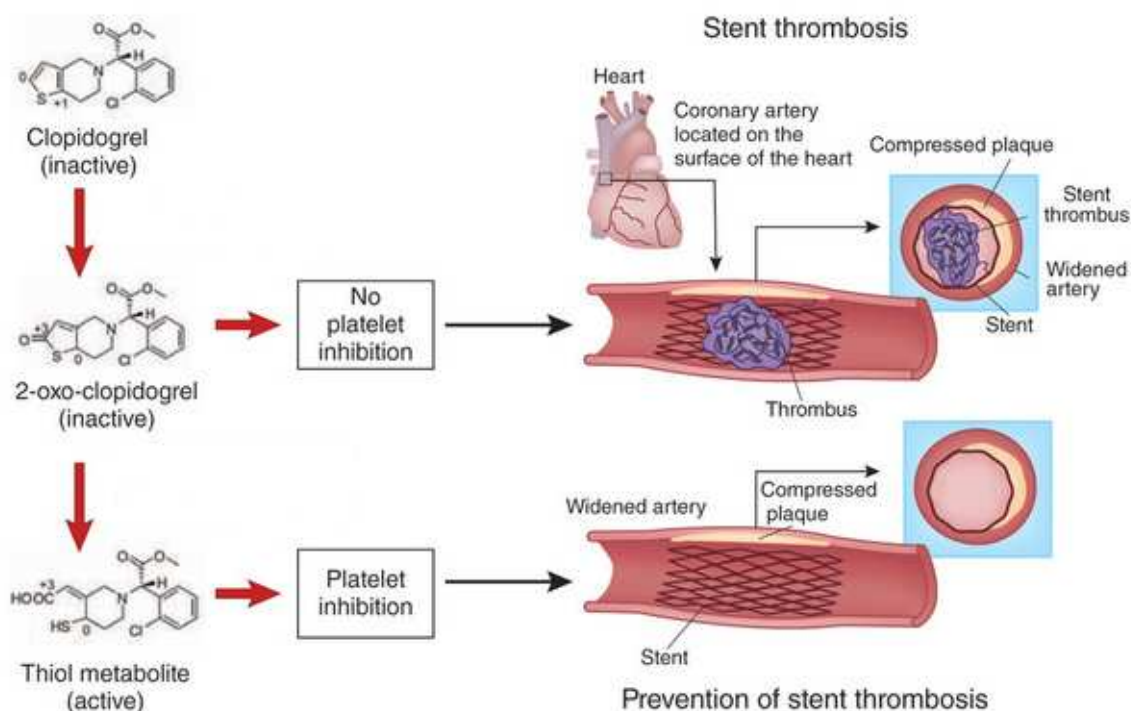


Figure 6: Métabolisme du clopidogrel et prévention des thromboses sur stent (20) (modifiée).

Le clopidogrel est tout d'abord pris en charge à 85% par des carboxylestérases hépatiques hCE1 pour être hydrolysé en un acide carboxylique inactif (21). Une fraction mineure (15%) de clopidogrel va être métabolisée par un processus en deux étapes *via* les CYPs. Les CYP1A2, 2B6 et 2C19 principalement vont transformer le clopidogrel en une forme thiolactone (2-oxo-clopidogrel) qui sera ensuite bioactivée par les CYP3A, 2C19 et 2B6 pour donner le métabolite actif du clopidogrel (clopi-AM) (figure 7).

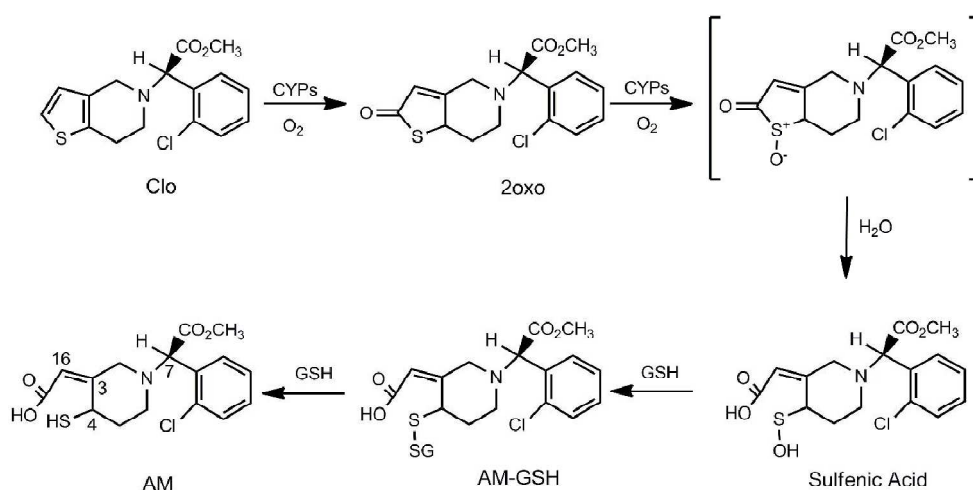


Figure 7. Voies métaboliques du clopidogrel (22).

D'après une étude utilisant une dose unique de clopidogrel 75mg radiomarké, le clopidogrel est excrété à 50% dans les urines et 46% dans les fèces dans les 5 jours après administration. La demi-vie d'élimination du principal métabolite circulant était de 8h après des doses uniques ou répétées (23).

Efficacité et sécurité

Le clopidogrel est une molécule de la classe des thiénopyridines de 2^{ème} génération qui a pendant longtemps dominé le marché et qui continue à être très utilisée dans le traitement des événements athérothrombotiques en prévention secondaire (24).

Chez les patients présentant un syndrome coronarien aigu, une dose de charge de 300mg ou 600mg suivie d'une dose de 75mg/j est recommandée dans les guidelines de l'ESC (25).

Plusieurs études ont montré l'efficacité et l'utilité du clopidogrel : l'étude CURE a randomisé 12562 patients ayant subi une angioplastie coronarienne pour recevoir un placebo ou le clopidogrel (dose de charge de 300mg suivie de 75mg par jour) en plus de l'aspirine pour une durée de 3 mois à 1 an. Le critère principal composite comprenant les décès, les IM et les AVC, a été réduit de 20% dans le groupe clopidogrel versus placebo (9.3 vs. 11.4%; CI95% :0.72-0.90 ;p<0.001). Cependant, une augmentation des saignements majeurs a été mise en évidence dans le groupe clopidogrel (3.7 vs. 2.7%, p=0.001) mais il n'y a pas eu d'augmentation de saignements mettant en jeu le pronostic vital ni d'hémorragies intracrâniennes (26).

Une deuxième étude : COMMIT a randomisé 45852 patients avec une suspicion d'IM aigu avec élévation du segment ST dans les 24h pour prendre du clopidogrel 75mg/j ou un placebo en plus d'une dose de 162mg/j d'aspirine. Une réduction du nombre d'événements survenus (décès cardiovasculaires, IM, AVC) a été observée dans le groupe clopidogrel par rapport au groupe placebo (9.2% vs. 10.1%, p=0.002). Les décès toutes causes ont également diminué dans le groupe clopidogrel (7.5% vs. 8.1%, p=0.03) et le risque global de saignements n'a pas changé entre les deux groupes (0.58% vs. 0.55%, p=0.59) (27).

L'étude CLARITY-TIMI 28 a confirmé l'efficacité du clopidogrel chez 3491 patients dans les 12h après le début d'IM avec élévation du segment ST qui recevaient de l'aspirine, des fibrinolytiques et parfois de l'héparine et qui étaient randomisés pour recevoir du clopidogrel (300mg puis 75mg/j) ou un placebo. Le critère principal composite (occlusion artérielle, décès ou récurrence d'IM) était moins élevé dans le groupe clopidogrel que dans le groupe placebo (15% vs. 21.7%, p<0.001). Les taux de saignements majeurs ou hémorragies intracrâniennes étaient les mêmes dans les deux groupes (28).

Au vu de ces résultats, le clopidogrel a été introduit dans la prise en charge du syndrome coronarien aigu en plus de l'aspirine. Il présente cependant quelques inconvénients. Tout d'abord, sa biodisponibilité est faible car seulement 15% de la molécule absorbée est bioactivée en métabolite actif qui exerce l'activité d'antiagrégation plaquettaire en se fixant sur les récepteurs P2Y₁₂. De plus, une grande variabilité de réponse a été observée chez les patients traités par le clopidogrel : chez 4 à 30% des patients, une grande réactivité plaquettaire est maintenue alors que le traitement antiplaquettaire a été administré de manière adéquate (29), conduisant à une augmentation du risque cardiovasculaire. La variabilité de réponse au clopidogrel sera plus amplement détaillée dans la revue de la littérature qui suit (Article 1).

Les effets indésirables liés à la prise de clopidogrel ont pu être évalués principalement à travers de grandes études telles que CAPRIE et CURE.

L'étude CAPRIE menée chez plus de 19185 patients pour comparer l'efficacité de l'aspirine et du clopidogrel a montré que les effets indésirables les plus courants étaient des problèmes gastro-intestinaux (indigestion, nausées, vomissements) à 15%, des saignements chez 9% des patients ainsi que des rashes (6%), des diarrhées (4.5%), des altérations des fonctions hépatiques (3%) et enfin des hémorragies gastrointestinales (2%) ou intracrâniennes (0.3%) (30).

Dans l'étude CURE, 12562 patients avec un angor instable ont été randomisés pour recevoir de l'aspirine seule ou en combinaison avec le clopidogrel en prévention de la récurrence d'événements thrombotiques. Dans cet essai, il n'y a pas eu de différence d'occurrence d'événements indésirables dans les deux groupes. Des douleurs à la poitrine sont apparues chez 2.7% des patients alors que des maux de tête et des vertiges ont été mis en évidence chez 3.1 et 2.4% des patients respectivement. Des problèmes gastro-intestinaux tels que douleurs abdominales (2.3%), dyspepsie (2%) et diarrhées (2.1%) ont également été observés chez les patients.

2.3.2 Prasugrel

Mécanisme d'action

Le prasugrel est une nouvelle thiényopyridine qui a obtenu l'AMM en Europe en février 2009.

Bien qu'exerçant le même effet pharmacodynamique que le clopidogrel au niveau des récepteurs P2Y₁₂ des plaquettes, le prasugrel montre une plus grande biodisponibilité et par conséquent, une puissance 10 fois supérieure au clopidogrel a été démontrée dans les études pré-cliniques.

Pharmacocinétique

Le prasugrel est rapidement absorbé puis métabolisé. Il est d'abord pris en charge entièrement par des carboxylestérases hCE2 qui le transforment de manière très rapide en un métabolite intermédiaire inactif (figure 8).

Les carboxylestérases sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de composés contenant des liaisons esters, amides ou thioesters. Les hCE1 et hCE2 sont présentes dans le foie malgré une dominance de la forme HCE1 dans le foie et de hCE2 dans l'intestin. L'affinité du prasugrel pour les deux formes semble identique mais le taux d'hydrolyse du prasugrel par les hCE2 est 26 fois plus important que par les hCE1 (31). La dégradation rapide du prasugrel par les estérases expliquerait l'impossibilité de détecter le prasugrel dans le plasma des patients (32).

Le métabolite inactif formé est ensuite bioactivé par les CYPs 3A4 et 2B6 principalement (33).

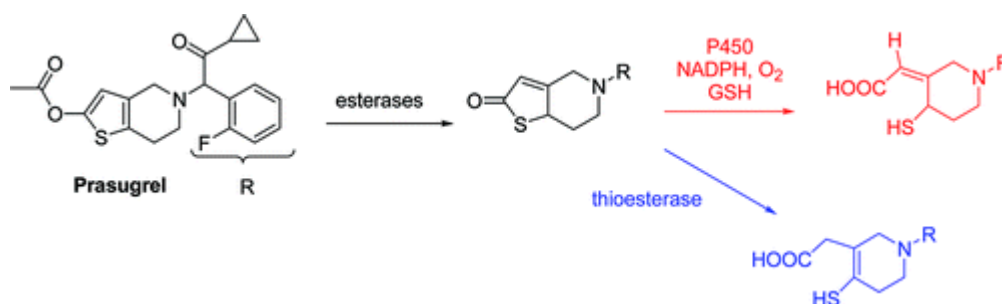


Figure 8. Voies métaboliques empruntées par le prasugrel (34).

Le prasugrel est excrété sous la forme de métabolites inactifs à 68% dans l'urine et 27% dans les faeces. La concentration maximale de métabolite actif est atteinte dans les 30 minutes après la dose et les temps de demi-vie initial et terminal sont respectivement de 1 et 7,4h (35, 36).

Efficacité et sécurité

Une étude randomisée croisée réalisée sur 68 volontaires sains prenant une dose de charge de 60mg de prasugrel ou 300mg de clopidogrel, a démontré une corrélation entre l'efficacité moindre du clopidogrel et la concentration plus faible de son métabolite actif par rapport au prasugrel. En effet, la concentration maximale de métabolite actif de prasugrel était plus de 14 fois supérieure à celle du métabolite actif du clopidogrel (512 vs. 35.9 ng/ml) (37). Une autre étude randomisée contrôlée a confirmé ces résultats par l'observation d'une plus forte inhibition de l'agrégation plaquettaire chez les volontaires traités par le prasugrel 60mg que par le clopidogrel 600mg du fait d'une plus grande exposition au métabolite actif (38).

Un point fort du prasugrel est une plus faible variabilité de réponse qu'avec le clopidogrel. En effet, une étude de Jernberg et al. a montré que le prasugrel générât une variabilité de réponse très inférieure à celle du clopidogrel après une dose de charge de 300mg de clopidogrel ou 60mg de prasugrel (52% vs. 3% de mauvais répondeurs (agrégation plaquettaire <25%)) ainsi qu'après une semaine de clopidogrel 75mg ou prasugrel 10mg (45% vs. 0%) (39).

L'étude de phase 2 randomisée JUMBO-TIMI 26 a évalué la sécurité du clopidogrel et du prasugrel chez 904 patients en attente de la pose d'un stent coronaire randomisés en 4 groupes dont un prenant du clopidogrel (300mg de dose de charge (DC) + 75mg/j) et trois autres prenant du prasugrel à des doses croissantes (60mg DC + 10mg/jour ; 60mg DC + 15mg/jour or 40mg DC+7.5mg/j). L'étude a montré un taux de saignements mineurs plus importants chez les sujets sous prasugrel à fortes doses avec une relation dose-effet (40). Dans l'étude randomisée en double aveugle TRITON-TIMI 38 réalisée sur 13608 patients avec un syndrome coronarien aigu modéré à grave devant subir la pose d'un stent coronaire, l'occurrence de décès pour des causes cardiovasculaires, des IM ou des AVC était moins élevée chez les patients sous prasugrel que sous clopidogrel (HR=9.9% vs. 12.1% ; NNT=46). Cependant, les saignements majeurs (NNH=167), nécessitant un traitement à vie (NNH=200) ou encore mortels (NNH=333) étaient aussi plus importants chez les patients sous prasugrel que sous clopidogrel. Ceux-ci incluaient un taux élevé d'épisodes de saignements menaçant la vie des patients. Chez les patients ayant subi un pontage aorto-coronarien, il y avait un taux beaucoup plus élevé de saignements chez les patients sous prasugrel que sous clopidogrel (13.4% vs. 3.2% ; NNH=10). Il fut aussi remarqué dans une étude post-hoc que les patients de moins de 60kg ou âgés de plus de 75 ans ne percevaient pas d'effet clinique bénéfique en prenant le prasugrel par rapport au clopidogrel (41).

Le prasugrel pourrait ainsi permettre de contrer un certain nombre de limitations associées au traitement par le clopidogrel (variabilité de réponse, faible biodisponibilité,...) car il est plus efficace et a une action plus rapide que le clopidogrel même administré à hautes doses. Cependant, ces meilleurs effets antiagrégants n'ont pas été démontrés chez les personnes âgées (>75 ans) ou de moins de 60kg et sont associés à un risque de saignements majeurs plus important qu'en présence de clopidogrel.

Les études de cohorte citées précédemment ont mis en évidence un risque de saignements accru en présence d'un traitement par le prasugrel. Les effets indésirables les plus fréquemment observés depuis la mise sur le marché sont des anémies, des hématomes, des hémorragies nasales, sous-cutanées ou gastro-intestinales, des hématuries, des hématomes au site de ponction vasculaire et des contusions.

2.3.3 Ticagrelor

Mécanisme d'action

Le ticagrelor est un nouvel antiplaquettaire disponible depuis 2011, le premier mis sur le marché de la nouvelle classe des cyclopentyl-triazolopyrimidine. Il est chimiquement différent des thiénopyridines comme le clopidogrel ou le prasugrel. Le ticagrelor est un antagoniste de l'ADP réversible au niveau des récepteurs P2Y₁₂, ce qui peut être dû à un site de liaison indépendant sur les récepteurs P2Y₁₂ (42). Étant donné que le ticagrelor n'inhibe pas directement la liaison de l'ADP sur son récepteur, le mécanisme proposé pour son action pharmacodynamique est un changement de conformation du récepteur qui le rend inactif pour induire une activation plaquettaire, tout en le laissant intact (43).

Pharmacocinétique

Le ticagrelor est un médicament donné par voie orale rapidement absorbé sans avoir besoin d'activation métabolique. Le ticagrelor est également pris en charge par le CYP3A pour donner un métabolite actif dont les concentrations plasmatiques atteignent un tiers des concentrations de la molécule mère (44). Le $t_{\max}$ du ticagrelor a été observé à 1.5h et son métabolite actif apparaît rapidement dans le plasma avec un $t_{\max}$ d'environ 3h. Une inhibition de l'agrégation plaquettaire proche de 90% est observée dans les 2 à 4 heures suivant l'administration orale de ticagrelor 100mg deux fois par jour (45). La demi-vie du ticagrelor est de 7 à 8,5h alors que celle de son métabolite est de 12h.

Efficacité et sécurité

La plus grande étude ayant étudié l'efficacité du ticagrelor est l'étude PLATO qui a randomisé 18624 patients avec syndrome coronarien aigu dans deux groupes : ticagrelor 180mg puis 90mg 2x/j ou clopidogrel 300 à 600mg puis 75mg/j, en plus de l'aspirine et des autres traitements pris par les patients. Le critère principal d'efficacité (décès pour causes cardiovasculaires, IM ou l'AVC à 12 mois) a été observé chez 9.8% des patients recevant le ticagrelor versus 11.7% chez les patients sous clopidogrel ($p < 0.001$). Pour les critères composites, le ticagrelor diminue significativement les IM (5.8% vs. 6.9%, $p = 0.005$) et les décès pour causes cardiovasculaires (4% vs. 5.1%, $p = 0.001$) mais pas les AVC (4.5% vs. 3.8%, $p = 0.03$) par rapport au clopidogrel. Du point de vue de la sécurité, le taux de saignements majeurs était le même dans les deux groupes (11.6% vs. 11.2%, $p = 0.43$). Cependant, les dyspnées étaient plus importantes dans le groupe ticagrelor que dans le groupe clopidogrel (13.8% vs. 7.8%, $p < 0.001$) ainsi que les saignements intracrâniens fatals (0.1% vs. 0.01%) (46).

Dans l'étude DISPERSE-2, 990 patients avec syndrome coronarien aigu sans élévation du segment ST ont été randomisés pour recevoir pendant 12 semaines le ticagrelor 90mg 2x/j, le ticagrelor 180mg/j ou le clopidogrel 300mg + 75mg/j. Le critère principal était le taux de

saignements mineurs et majeurs à 4 semaines. Il n'y a pas eu de différence observée entre les groupes (8.1%, 9.8% et 8% sous clopidogrel, ticagrelor 90mg et ticagrelor 180mg, respectivement ; $p=0.43$ et $p=0.96$ vs. clopidogrel). Cependant, les dyspnées ont été plus importantes dans les groupes sous ticagrelor que sous clopidogrel (6.4%, 10.5% et 15.8% pour clopidogrel, ticagrelor 90mg et ticagrelor 180mg, respectivement) (47).

Le tableau ci-dessous résume les essais randomisés les plus importants qui ont contribué à l'évolution de la place de chacune de ces classes de médicaments dans la prise en charge des patients avec un syndrome coronarien aigu (48).

Etude	Patients (n)	Durée	Intervention	Critère primaire	Résultats
CLARITY-TIMI 28	STEMI et Fibrinolyse (n = 3491)	30 jours	Clopidogrel 300 mg DC + 75 mg DM	TIMI, décès, récurrence IM avant angiographie	21.7% vs 15% ($p < 0.001$)
TRITON TIMI 38	ACS (n = 13608)	15 mois	Clopidogrel 300 mg/75 mg vs Prasugrel 60/10 mg	Décès CV, IM ou AVC	12.1% vs 9.9% ($p < 0.001$)
TRITON TIMI 38 STEMI	STEMI (n = 3534)	15 mois	Clopidogrel 300 mg/75 mg vs Prasugrel 60/10 mg	Décès CV, IM ou AVC	12.4% vs 10% ($p = 0.0221$)
PLATO	ACS (n = 18624)	12 mois	Clopidogrel 300/600 mg/ 75 mg vs Ticagrelor 180 mg LD/90 mg 2x/j	Décès CV, IM ou AVC	11.7% vs 9.8% ($p < 0.001$)
PLATO STEMI	STEMI (n = 7544)	12 mois	Clopidogrel 300/600 mg/ 75 mg vs Ticagrelor 180 mg LD/90 mg 2x/j	Décès CV, IM ou AVC	10.8% vs 9.4% ($p = 0.07$)

2.3.4 Place de ces traitements dans la prise en charge du SCA

Des méta-analyses ont été publiées récemment pour comparer et évaluer la place de chacun de ces traitements dans la prise en charge de la maladie coronarienne aiguë.

Une méta-analyse a inclut 7 essais randomisés pour comparer le clopidogrel à dose standard (300mg suivi de 75mg/j) aux nouveaux antiplaquettaires (prasugrel et ticagrelor)

dans le syndrome coronarien aigu. Cette méta-analyse a montré que le prasugrel et le ticagrelor sont associés à une réduction de mortalité, thrombose sur stent et récurrence d'IM par rapport au clopidogrel. Au niveau de la sécurité, dans les 7 essais retenus dans cet article, il n'y a pas eu d'augmentation du risque hémorragique avec les nouveaux antiplaquettaires par rapport au clopidogrel (49).

Une autre méta-analyse plus récente a également étudié ces 3 traitements sachant que l'analyse comparative du prasugrel vs. ticagrelor ne peut se faire que de façon indirecte étant donné qu'aucune étude n'a été réalisée pour comparer ces deux traitements de manière randomisée et contrôlée. Dans cette méta-analyse, trois essais cliniques ont été inclus, prenant en compte 32893 patients. Le bénéfice clinique du prasugrel et du ticagrelor semble supérieur à celui du clopidogrel au niveau des IM, des thromboses de stent et des décès sans différence significative pour les AVC et les saignements majeurs. Lors de la comparaison indirecte du prasugrel avec le ticagrelor, aucune différence significative n'a été mise en évidence sur les critères cliniques d'efficacité alors que le ticagrelor semblait provoquer moins de saignements majeurs globaux ou associés à une intervention coronarienne. Aucune différence n'a été constatée pour les saignements majeurs non liés à cette intervention (50).

Selon les nouvelles recommandations de l'ESC, le ticagrelor 180mg en dose de charge suivi de 90mg 2x/j est le traitement antiplaquettaire de choix chez les patients avec SCA sans élévation du segment ST avec un risque modéré ou élevé d'événements ischémiques. Le prasugrel est préconisé chez les patients naïfs sans risque hémorragique très élevé, avec une anatomie coronarienne connue et chez qui une angioplastie est envisagée. Le clopidogrel devrait désormais n'être prescrit que dans les cas où le ticagrelor ou le prasugrel ne peuvent être utilisés.

2.4 Les inhibiteurs du récepteur GPIIb/IIIa

Les inhibiteurs de la GPIIb/IIIa empêchent la fixation du fibrinogène sur son récepteur GPIIb/IIIa. Les 3 inhibiteurs disponibles actuellement pour une administration en intraveineuse sont l'abciximab, l'eptifibatide et le tirofiban (figure 9).

L'abciximab est un inhibiteur non compétitif des récepteurs GPIIb/IIIa. C'est un fragment Fab murin humanisé chimérique de l'anticorps monoclonal 7E3 dirigé contre la GPIIb/IIIa (51).

L'eptifibatide est un peptide de synthèse compétitif qui occupe le site de liaison du GPIIb/IIIa.

Le tirofiban est un dérivé tyrosine non peptidique qui bloque également le site de liaison de la GPIIb/IIIa en mimant la conformation spatiale de la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) du fibrinogène.

Etant donné que l'eptifibatide et le tirofiban ont des demi-vies plasmatiques très courtes (2h-4h), une infusion en continu est nécessaire pour maintenir une inhibition plaquettaire (52). Ces traitements sont en général utilisés pendant une durée inférieure à 48h par voie intraveineuse.

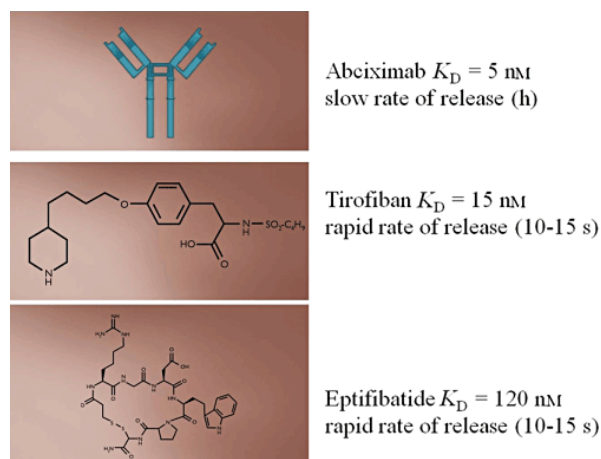


Figure 9. Structure et paramètres cinétiques des antagonistes GPIIb/IIIa disponibles sur le marché (52)

Cette classe d'inhibiteurs (abciximab notamment) est surtout utilisée pour éviter les complications de l'angioplastie car des études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de GPIIb/IIIa réduit de 50% la survenue de décès, d'IM ou de thrombose avec revascularisation urgente par rapport au placebo (53, 54).

Chez les patients avec SCA sans élévation du ST, ces inhibiteurs ont montré un bénéfice chez les patients à haut risque comme les diabétiques, les insuffisants rénaux ou les personnes âgées (55).

L'utilisation de cette classe reste limitée à des cas où les patients n'ont pas reçu une thérapie par antiplaquettaire adéquate avant une angioplastie ou chez des patients ayant un

thrombus très important. De plus, le risque de saignements est augmenté avec l'utilisation de ces inhibiteurs de la GP IIb/IIIa (56).

III. Mesure de l'agrégation plaquettaire

La mesure de l'efficacité de ces traitements antiplaquettaires au niveau pharmacodynamique est réalisée par plusieurs méthodes. L'agrégométrie à transmission lumineuse est considérée comme le « gold standard » alors que des tests de réactivité plaquettaire plus récents comme le VASP ou le VerifyNow rendent la mesure plus simple et sont spécifiques des récepteurs P2Y₁₂, donc de l'action antiplaquettaire du clopidogrel ou du prasugrel. Cependant, les valeurs seuils qui permettraient de déceler les patients qui ne répondraient pas au traitement ne sont pas clairement définies et ces méthodes doivent être validées en recherche clinique.

3.1 L'agrégométrie à l'ADP

L'agrégométrie à l'ADP repose sur le principe de la transmission lumineuse : un faisceau lumineux traverse la suspension plaquettaire dans un plasma riche en plaquettes (PRP). Lorsque les plaquettes ne sont pas agrégées, la solution est trouble et un agent agrégant tel que l'ADP ou l'acide arachidonique est ajouté pour provoquer l'agrégation des plaquettes et ainsi rendre plus limpide la solution et rendre plus propice la transmission lumineuse. Toutes les analyses se font à l'aide d'un agrégomètre qui mesure en parallèle l'agrégation d'un plasma témoin en présence du même agent agrégant que le plasma-test dans des conditions physiologiques, à 37°C.

L'étude quantitative des courbes d'agrégation permet d'identifier les mécanismes biochimiques et physiologiques qui contrôlent l'agrégation et permet de déterminer l'effet des médicaments qui inhibent l'agrégation plaquettaire et de comprendre leur mécanisme d'action.

Cette technique présente cependant quelques inconvénients : il y a une grande variabilité des résultats entre différents laboratoires, la procédure est complexe et nécessite un savoir-faire spécifique ainsi que des préparations pré-analytiques relativement longues. De plus, l'analyse doit être faite dans les 3 heures après le prélèvement sanguin (57).

3.2 Le VASP

Un nouveau test d'agrégation plaquettaire basé sur l'état de phosphorylation de la protéine VASP est désormais très utilisé. Il présente l'avantage d'être spécifique des récepteurs P2Y₁₂, contrairement à l'agrégométrie à l'ADP (58). Le VASP est une technique sensible et reproductible avec une procédure standardisée qui limite la variabilité analytique. L'échantillon sanguin peut être conservé pendant 24h (59).

La protéine VASP appartient à la famille des Ena/VASP. C'est une protéine intracellulaire présente dans de nombreuses cellules (60, 61). C'est une phosphoprotéine qui participe à la

régulation de l'expression de la glycoprotéine GPIIb/IIIa dans les plaquettes et cette activité dépend de l'état de phosphorylation de la protéine VASP. La protéine VASP phosphorylée correspond à une relaxation plaquettaire alors que lorsque la protéine n'est pas phosphorylée, elle montre une activation plaquettaire. En effet, lorsque l'ADP se fixe sur ses récepteurs P2Y₁₂, l'adénylate cyclase est inhibée via une protéine G_i qui provoque également une diminution de l'AMPc. La diminution de l'AMPc résultera en une inhibition de la PKA, protéine responsable de la phosphorylation de VASP. Ainsi, la protéine VASP non-phosphorylée va activer le récepteur GPIIb/IIIa qui va se lier au fibrinogène et entraîner l'activation plaquettaire. La prostaglandine E₁ (PGE₁) est à l'opposé un activateur de la l'agrégation plaquettaire en empêchant la phosphorylation de VASP.

Le clopidogrel ou le prasugrel, qui empêchent l'ADP de se fixer sur ses récepteurs P2Y₁₂, vont donc permettre la phosphorylation de VASP et vont ainsi favoriser la relaxation des plaquettes. Le principe du test d'agrégation VASP est donc basé sur l'étude de la phosphorylation de la protéine VASP induite par les inhibiteurs des récepteurs P2Y₁₂ (59, 62).

Des kits commerciaux existent actuellement dont le plus connu est le Platelet VASP®.

Dans ce test, le sang citraté est incubé avec de la PGE₁ ou avec PGE₁ + ADP pendant 10 minutes et est ensuite fixé avec du paraformaldéhyde. Les plaquettes sont alors perméabilisées et mis en présence d'un anticorps monoclonal primaire dirigé contre la protéine VASP phosphorylée suivie d'une incubation avec un anticorps secondaire polyclonal de chèvre antisouris qui est conjugué à la fluoresceine isothiocyanate.

L'analyse par cytométrie en flux permet de comparer les deux conditions testées pour déterminer la capacité de l'ADP à inhiber la phosphorylation de VASP dans chaque échantillon. Un indice de réactivité plaquettaire (PRI) est ensuite calculé à partir de l'intensité de fluorescence médiane dans les échantillons incubés avec PGE₁ ou PGE₁+ADP selon la formule suivante :

$$PRI = [(MFI(PGE1)-MFI(PGE1+ADP))/MFI(PGE1)] \times 100$$

Deux petites études ont eu pour but de déterminer une valeur « cut-off » pour tenter de définir la résistance au clopidogrel. Une étude a mesuré le PRI 12h après une dose de charge de 600mg de clopidogrel chez 195 patients avec syndrome coronarien aigu nécessitant la pose d'un stent coronarien. Une valeur de cut-off de 53% de PRI a été déterminée pour détecter des patients à haut risque cardiovasculaire pendant le premier mois après l'angioplastie (63). Une autre étude a suivi 144 patients nécessitant une angioplastie incluant 26% avec syndrome coronarien aigu après une dose de 300mg de

clopidogrel. Une valeur de cut-off de 50% a été déterminée pour exclure un haut risque cardiovasculaire chez les patients sous clopidogrel (64).

La méthode Platelet VASP® est donc une méthode très utile afin de déterminer l'agrégation plaquettaire spécifique pour les inhibiteurs des récepteurs P2Y₁₂. Cependant, une des principales limitations de cette technique est la nécessité d'un cytomètre en flux, appareil disponible seulement dans des laboratoires spécialisés. De plus, les valeurs seuils qui permettraient de « classer » les patients par rapport à leur réponse au traitement restent à être validées dans des études de plus grande ampleur.

3.3 Le VerifyNow

Le système VerifyNow est un appareil qui permet de mesurer l'agrégation plaquettaire au lit du patient sur du sang total prélevé dans un tube citraté et qui est inséré dans une cartouche à usage unique contenant les agonistes nécessaires à la mesure. La mesure d'agrégation se fait grâce à la transmission lumineuse. Trois types de cartouches sont disponibles pour différents types de médicaments antiplaquettaires : aspirine, clopidogrel et inhibiteurs du GPIIb/IIIa. Dans le cas du clopidogrel, un premier compartiment contenant un fort agoniste de l'activation plaquettaire indépendant de l'aspirine et du clopidogrel permet de déterminer une fonction plaquettaire maximale de base. Un deuxième compartiment contient l'ADP et la PGE1 pour mesurer l'agrégation plaquettaire sous clopidogrel (65, 66).

Quelques études de corrélation ont été réalisées pour comparer ces différentes méthodes.

Une étude a inclut 211 patients en attente d'une angioplastie avec pose de stent sur lesquels le test d'agrégation à l'ADP ainsi que le VerifyNow ont été réalisés. Une grande corrélation a été trouvée entre le pourcentage d'agrégation tardive mesuré par agrégation à l'ADP et les unités de réaction de P2Y₁₂ (PRU) mesuré par le système VerifyNow ($r=0.75$) (67). D'autres recherches ont confirmé cette corrélation entre les différentes méthodes (68, 69).

Dans les études cliniques, on retrouve souvent deux méthodes de mesure de l'agrégation pour assurer la validité des résultats et pouvoir corréler les méthodes dans le même temps alors qu'en pratique clinique, le test va surtout dépendre des moyens à disposition. Le VerifyNow permet de contrecarrer les inconvénients de l'agrégométrie à l'ADP tels que le traitement immédiat de l'échantillon au laboratoire, la nécessité d'une personne qualifiée et d'un cytomètre en flux à disposition. Ce système permet de faire la mesure directement, d'avoir le résultat instantanément mais les résultats des études de corrélation avec les méthodes standards sont relativement récents et les appareils ainsi que les cartouches représentent un investissement important.

IV. Métabolisme des médicaments et cytochromes P450

1.1 Les cytochromes P450

4.1.1 Historique, classification et structure

Les cytochromes P450 ont été découverts en 1959 par Williams et ont été décrits comme des hémoprotéines en 1962 par Omura et al (70).

Les CYPs ont des propriétés spectrales particulières : leur forme réduite se lie au monoxyde de carbone pour donner un complexe qui absorbe la lumière à 450nm, d'où leur nom (71).

Un système de nomenclature des CYPs a été mis en place dans les années 1980 pour permettre d'identifier individuellement les différentes isoformes en se basant sur la similarité de leurs séquences. Les protéines dont les séquences d'acides aminés ont plus de 40% de similitude sont classées dans la même famille et les sous familles représentent des protéines dont les séquences ont 55% ou plus de similitude. Le premier chiffre désigne la famille puis une lettre indique la sous famille et enfin le dernier chiffre représente l'identification individuelle de l'enzyme (72).

Chez l'humain, 18 familles de gènes des CYPs et 44 sous-familles ont été identifiées. Il existe 57 gènes et 58 pseudogènes associés aux CYPs chez l'humain (73).

Chez les mammifères, les CYPs sont présents dans la plupart des tissus mais ils sont particulièrement diversifiés et nombreux dans le foie. Ils sont localisés dans les membranes du réticulum endoplasmique des hépatocytes (figure 10) (74). Le réticulum endoplasmique est une structure riche en lipides et particulièrement propice aux échanges. De 12 à 15 % du réticulum endoplasmique est composé de CYPs.

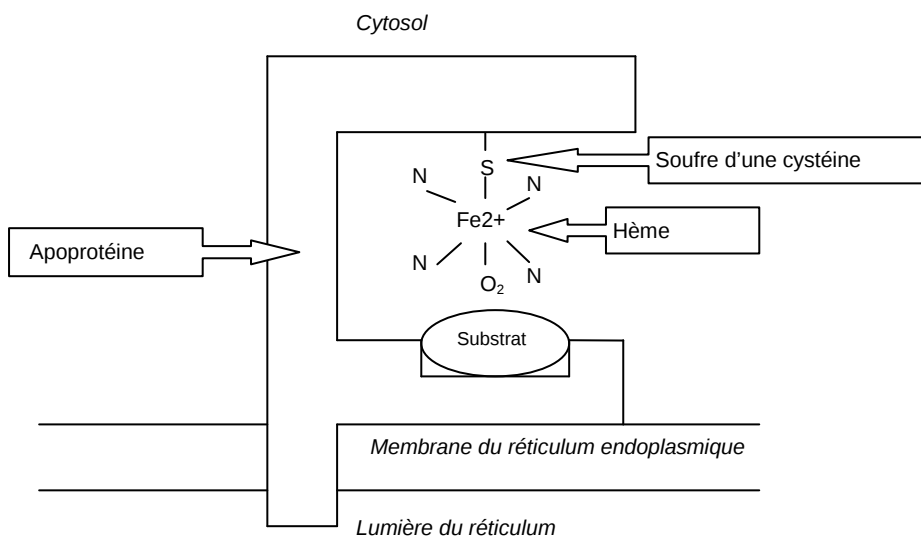


Figure 10. Schéma d'un CYP.

Les CYPs sont donc constitués d'une chaîne polypeptidique appelée apoprotéine et d'un hème qui va être responsable de la catalyse de la réaction. L'hème est lié de manière non covalente à l'apoprotéine par une cystéine (Figure 10). Le substrat se fixe sur le site catalytique hydrophobe de l'enzyme.

Le foie a différentes activités : il joue un rôle dans la sécrétion et l'évacuation de la bile par les canalicules biliaires ainsi que dans la distribution de nombreux métabolites provenant de la nutrition. Le foie intervient également dans la synthèse des protéines plasmatiques, des lipides, de l'urée et dans le stockage et la distribution du glucose dans le sang. Le foie produit des substrats à haut potentiel énergétique, stocke de nombreuses vitamines et a un rôle prépondérant dans la détoxification.

Quantitativement, les CYPs les plus abondants du foie sont les CYP3A et CYP2C9 (Figure 11).

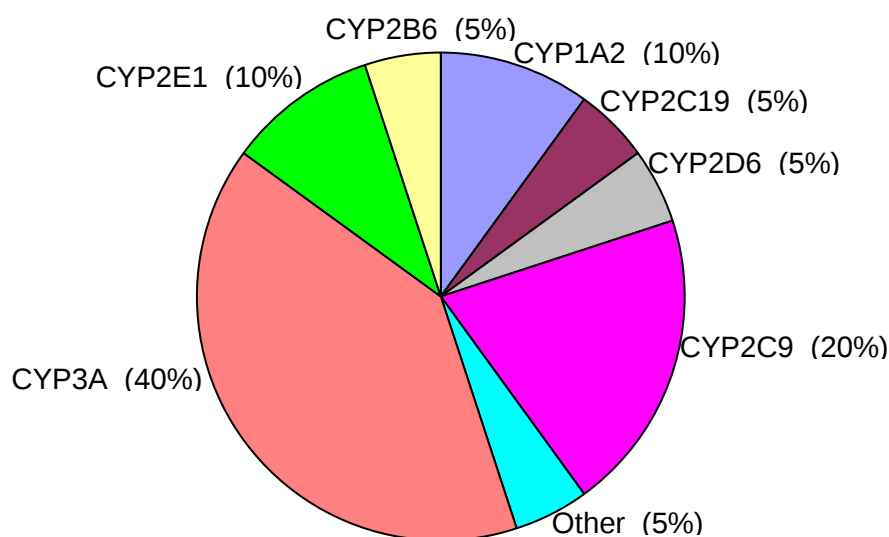
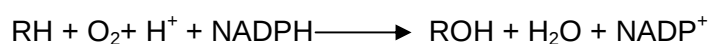


Figure 11. Répartition des différents CYP450s dans le foie.

Le CYP transforme en général un substrat hydrophobe en un produit plus hydrophile par l'introduction d'une fonction hydroxyle ou d'une déméthylation. Les CYPs catalysent des réactions d'oxydo-réduction qui requièrent l'activation d'oxygène. Le fer de la protoporphyrine catalyse la fission de la molécule d'oxygène suivie de l'introduction d'une molécule d'oxygène dans le substrat à métaboliser, aboutissant à l'hydroxylation de ce dernier et à la formation d'eau.



Un premier électron est transféré vers le CYP et transforme Fe^{3+} en Fe^{2+} . La fixation d'oxygène est alors possible et l'addition d'un deuxième électron va conduire au clivage de l'oxygène et la formation de l'intermédiaire très réactif $\text{Fe}=\text{O}$. Cet intermédiaire va capturer un atome d'hydrogène du substrat, formant ainsi un radical $\text{R}\cdot$. Le radical va capturer le groupe hydroxyl de l'atome de fer formant ROH . L'atome de fer retourne à son ionisation initiale Fe^{3+} (figure 12)(75).

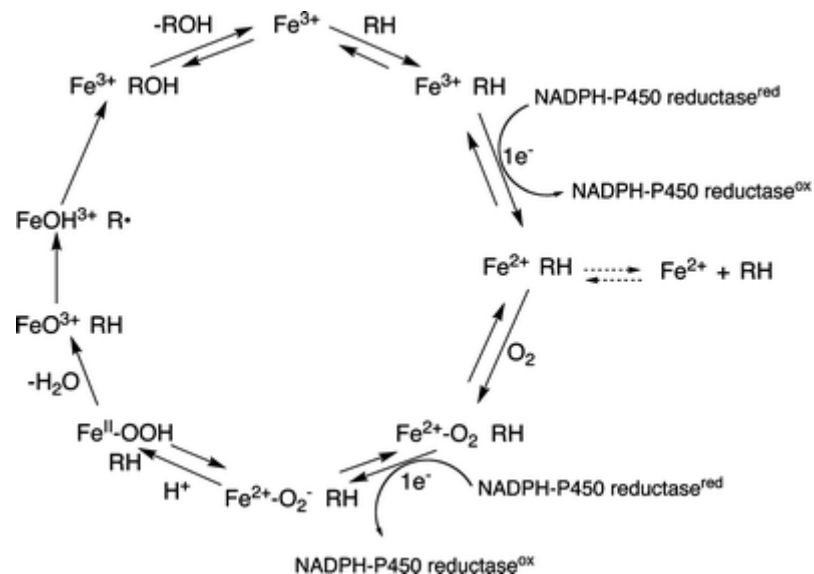


Figure 12. Cycle catalytique des CYPs (76)

Les CYPs peuvent catalyser de nombreux substrats différents tels que les médicaments. Les CYPs assurent particulièrement les fonctions de détoxification et de synthèse (77). Les familles CYP1, CYP2 et CYP3 sont impliquées dans le métabolisme des médicaments et sont détaillées ci-dessous (78). Les CYPs sont très étudiés à cause de leur grande importance dans le métabolisme de phase I et leur rôle crucial dans la variabilité interindividuelle de la réponse aux médicaments et dans les interactions médicamenteuses, qui constituent deux des problèmes majeurs rencontrés en pharmacologie clinique.

4.1.2 Variabilité génétique des CYPs et conséquences cliniques

Lors de l'administration de médicaments, la variabilité génétique des CYPs est à prendre en compte. Quelques CYPs impliqués dans le métabolisme des médicaments (CYP2C9,

CYP2C19, CYP2D6) sont polymorphiques et ceci peut expliquer des variabilités de réponse à quelques traitements. Le polymorphisme génétique est défini comme la présence de plusieurs formes alléliques d'un gène chez au moins 1% des individus dans une population.

L'objectif de l'étude du polymorphisme génétique est de pouvoir prédire la réponse à un médicament et de prévenir d'éventuels effets indésirables, dans le but final d'arriver à une individualisation thérapeutique par rapport au statut génétique du patient.

Pour évaluer l'activité des CYPs, des substances tests de chaque CYP sont utilisées pour déterminer le phénotype du patient par le dosage de la molécule mère et de son métabolite. Le rapport métabolite / molécule mère renseigne sur le phénotype du patient. Dans le cas d'un métabolisme ralenti, la molécule peut s'accumuler et provoquer des effets toxiques alors qu'un métabolisme ultrarapide pourra avoir comme conséquence une absence d'effet. En présence d'une pro-drogue qui nécessite une bio-activation pour exercer son effet pharmacologique, un métaboliseur lent présentera un effet moindre du médicament. Le phénotypage permet une mesure précise de l'activité enzymatique mais le résultat peut être influencé par d'autres facteurs d'origine non génétique.

Le génotypage, quant à lui, recherche des mutations, délétions ou duplications par des techniques de biologie moléculaire. Cette méthode est simple et efficace et permet l'identification du génotype mais elle ne renseigne pas sur les caractéristiques fonctionnelles de l'enzyme. Ces deux techniques sont donc complémentaires et permettent de connaître le statut génétique de l'individu et l'activité enzymatique correspondante.

4.1.3 Les différentes isoformes

CYP1

La famille CYP1A regroupe chez les humains le CYP1A1, CYP1A2 et le CYP1B1. Tous ces CYPs métabolisent des composés endogènes : les prostaglandines, les oestrogènes et la mélatonine (73).

Le CYP1A2 est le CYP majeur de cette famille, principalement localisé dans le foie. Parmi les substances métabolisées par ce CYP, on trouve la phénacétine qui est un analgésique utilisé dans les années 1980s, retiré du marché pour des cas rapportés de néphropathies. Son métabolite est le paracétamol qui conserve les propriétés analgésiques sans les effets indésirables de la phénacétine.

La théophylline et la caféine sont également substrats du CYP1A2. Le CYP1A2 est beaucoup étudié car il joue un rôle important dans le métabolisme de substances pro-carcinogènes. Certains paramètres environnementaux tels que la fumée de cigarette, les viandes grillées et les choux-fleurs ou brocolis peuvent induire son activité (79, 80).

CYP2

La plus grande famille de CYP chez l'homme est la famille CYP2 avec trois sous-familles CYP2B, CYP2C et CYP2D particulièrement abondantes dans le foie et jouant un rôle essentiel dans le métabolisme des médicaments.

CYP2B

Les gènes 2B sont localisés sur le chromosome 19 (81). Le CYP2B6 est un CYP mineur du foie même si le contenu hépatique en CYP2B6 varie énormément entre les différentes études (82). Cependant, sa proportion a été revue à la hausse plus récemment car au début des années 1990s, il représentait 0.2% dans les études (83) alors que dans des études plus récentes (84), une plus grande fréquence de détection ainsi qu'une plus grande proportion du CYP2B6 par rapport aux CYPs totaux a été observée. L'utilisation d'anticorps hétérologues peu spécifiques du CYP2B6 pourrait être à l'origine de cette différence. De plus, une variabilité ethnique a été observée avec un contenu hépatique en CYP2B6 dix fois plus élevé chez les Caucasiens que chez les Japonais (85). Certains polymorphismes de ce CYP ont été mis en évidence ainsi que des inhibitions et des inductions, qui peuvent expliquer une variabilité interindividuelle d'activité enzymatique et qui rendent ainsi ce CYP plus important au niveau du métabolisme et des interactions médicamenteuses (86). En outre, le CYP2B6 est impliqué dans le métabolisme d'un certain nombre de médicaments comme le bupropion, le cyclophosphamide, l'efavirenz, la méthadone ou encore la kétamine. En cas d'interactions médicamenteuses avec par exemple le cyclophosphamide qui a une marge thérapeutique étroite, les conséquences peuvent être graves car son effet thérapeutique peut être diminué par un inhibiteur du CYP2B6.

CYP2C

La sous-famille CYP2C se compose de 4 isoformes : CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19. On estime à ~25% la proportion de médicaments utilisés en pratique métabolisés par ces CYPs (87). Le CYP2C9 intervient principalement dans le métabolisme des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme le flurbiprofène et l'ibuprofène ou encore de certains anticoagulants tels que la warfarine et l'acénocoumarol, des antidiabétiques (glibenclamide, tolbutamide), des antiépileptiques (phénytoïne, valproate) et des antihypertenseurs comme le losartan ou le bosentan. Le CYP2C19 est impliqué dans le métabolisme de la méphénytoïne, des IPPs et de quelques antidépresseurs. La rifampicine et le phénobarbital sont des inducteurs connus de ces CYPs. Une de leurs caractéristiques est un polymorphisme génétique qui peut être à l'origine d'une variabilité de réponse interindividuelle à certains médicaments. La fréquence de ces polymorphismes des CYP2C est très variable d'une population ethnique à l'autre : les allèles CYP2C9*2 et *3 sont plus

présents chez les caucasiens que chez les asiatiques (12% vs 0% pour le *2) alors qu'à l'inverse les allèles CYP2C19*2 et *3 sont plus fréquents chez les asiatiques (30% vs. 15% pour le *2) (88).

CYP2D

Le polymorphisme CYP2D6 a été le premier décrit (89). Dans la population Caucasienne, 48 mutations ont été décrites à l'heure actuelle. Il existe plus de 30 allèles délétères différents pour ce CYP dont 6 d'entre eux contribuent à une large partie du phénotype de métaboliseur lent. Le polymorphisme correspondant à un métabolisme diminué concerne environ 6% de la population caucasienne. Les métaboliseurs ultrarapides du CYP2D6 ont un métabolisme augmenté avec une diminution consécutive des effets des médicaments substrats du CYP2D6 comme les antidépresseurs tricycliques (90). Le CYP2D6 est impliqué dans le métabolisme de nombreux médicaments comme certains analgésiques (tramadol, oxycodone), quelques antidépresseurs de type tricycliques (amitriptyline, clomipramine), tetracycliques (mirtazapine, miansérine), inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (fluoxétine, citalopram) ou inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et norépinephrine (venlafaxine, duloxétine). Certains neuroleptiques typiques (halopéridol) et atypiques (rispéridone) ainsi que quelques bêtabloquants (métoprolol, propranolol) sont également substrats du CYP2D6.

CYP3

La famille CYP3 contient la seule sous-famille CYP3A.

CYP3A

Le CYP3A4 est le CYP le plus important car il est le plus abondant dans le foie mais il participe aussi au métabolisme de la majorité des médicaments dont les voies métaboliques sont connues. Il est capable de métaboliser également de nombreuses substances environnementales comme les pesticides ainsi que des composés endogènes (91). Ses substrats, en général de type hydrophobes, sont donc très diversifiés au niveau de leurs tailles, leurs poids moléculaires et leurs caractéristiques chimiques. Sa participation peut désormais être étudiée *in vitro* et *in vivo* à l'aide du midazolam qui est un substrat référence de ce CYP. Les substrats du CYP3A sont des médicaments comme l'atorvastatine ou la prednisolone par exemple, mais aussi des substances endogènes telles que la progestérone ou la testostérone (92). L'induction du CYP3A est régulée par PXR, CAR et le récepteur aux glucocorticoïdes.

Le CYP3A5, qui est polymorphique, est lui aussi exprimé dans le foie. Une mutation a été caractérisée et démontre une expression protéique augmentée de CYP3A5.

4.2 Détermination des paramètres cinétiques du métabolisme d'un médicament

En général, dans les premières étapes de la caractérisation du métabolisme *in vitro* d'une molécule, l'estimation de l'affinité des CYPs pour la substance est déterminée à l'aide de paramètres cinétiques. Le modèle de cinétique enzymatique le plus souvent utilisé est celui de Michaelis-Menten qui est exprimé à travers l'équation :

$$V = (V_{\max} \cdot S) / K_m + S$$

ou K_m est une constante qui définit l'affinité de l'enzyme pour son substrat et qui est égale à la concentration de substrat qui est nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale ($V_{\max}$). Dans la plupart des cas, on estime que les concentrations de substrat cliniquement pertinentes ne dépassent pas cette valeur de K_m (93).

4.3 Outils *in vitro* pour la détermination de l'activité des CYPs

4.3.1 Foie isolé perfusé

Le foie isolé perfusé est reconnu comme le modèle le plus proche de la situation *in vivo* mais les foies humains disponibles pour de telles expériences sont rares et la plupart des essais réalisés ont donc été conduits sur des foies d'animaux. La procédure de perfusion sur un foie de rat a d'ailleurs été détaillée par Brauer et al. en 1959 (94). Le perfusat est réalisé avec du tampon Krebs-Henseleit ou des solutions sanguines diluées. L'utilisation de ce modèle est limitée car les foies d'animaux ne sont pas toujours représentatifs de la biotransformation hépatique humaine. De plus, c'est un modèle compliqué, qui nécessite une utilisation dans les 3 heures et qui n'est pas très reproductible (95).

4.3.2 Tranches fines de foie

Les tranches de foie sont également un bon modèle pour mesurer l'activité des CYPs car elles sont très représentatives de la situation *in vivo* en gardant l'expression des enzymes de phase I et II dans une architecture intègre avec l'ensemble des cellules et la préservation de toutes les liaisons et les espaces intercellulaires (96).

Comme pour le foie isolé perfusé, la grande limitation de cette technique est la faible disponibilité des foies humains pour la recherche. De plus, une grande variabilité en fonction du donneur et en fonction du temps au bout duquel les expériences sont réalisées a été observée (97).

4.3.3 Les microsomes hépatiques humains

Les microsomes de foie humain restent un des modèles les plus utilisés pour l'étude *in vitro* du profil métabolique des CYP et UGT. L'influence de CYPs spécifiques sur le métabolisme d'un médicament peut être étudiée en présence d'inhibiteurs spécifiques dans ce modèle. La popularité très étendue de ce modèle est certainement due à sa simplicité d'utilisation et à sa disponibilité.

Les microsomes hépatiques sont des vésicules du réticulum endoplasmique qui sont préparés par ultracentrifugations successives (figure 13) et contiennent ainsi les CYPs et l'UGT (98).

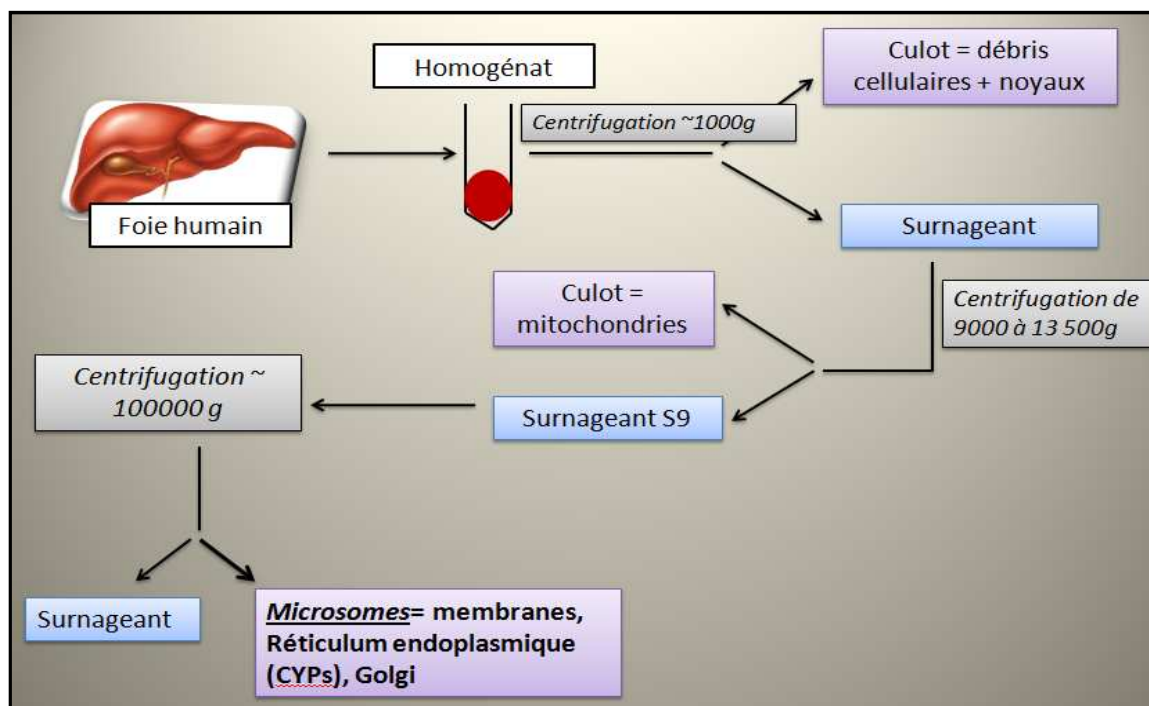


Figure 13. Schéma représentant les principales étapes de la préparation des microsomes de foie humain.

Un système de régénération du NADPH est nécessaire pour donner aux microsomes l'énergie nécessaire à l'activation des CYPs.

Les avantages de ce modèle sont aussi la facilité de préparation et la conservation possible à -80°C pendant plusieurs années.

Pour s'affranchir de la variabilité interindividuelle des microsomes, la plupart des études se font dans des microsomes « poolés » et des compagnies de biotechnologie ont développé des banques commerciales de microsomes provenant de différents donneurs.

La mesure de l'activité enzymatique se fait par la détermination des paramètres cinétiques tels que le V_m (vitesse maximale de production du métabolite) et le K_m (constante d'affinité pour l'enzyme, concentration de substrat pour laquelle la moitié de la vitesse maximale est atteinte). Ces paramètres sont mesurés en incubant la molécule à tester à différentes concentrations à un temps fixe (déterminé pour être dans une zone linéaire) et à une concentration de protéines donnée. L'équation de Michaelis-Menten décrite précédemment permet de calculer la vitesse de production du métabolite et de relier ces deux paramètres pharmacocinétiques.

Suite à la détermination de ces paramètres, pour caractériser les isoformes impliquées dans le métabolisme, la substance à tester est mise en présence d'inhibiteurs sélectifs des CYPs

avec les microsomes hépatiques humains. Les inhibiteurs les plus utilisés sont la furafylline pour le CYP1A2 (99), le sulphaphenazole pour le CYP2C9 (100), la quinidine pour le CYP2D6 (100) et le kétoconazole pour le CYP3A (101). Bien que moins sélectifs que les autres inhibiteurs sus-mentionnés, l'oméprazole et le nirvanol sont les inhibiteurs actuellement utilisés comme inhibiteurs du CYP2C19 (102, 103) alors que le CBP est utilisé pour inhiber le CYP2B6 (104). Le tableau ci-dessous résume les différentes substances substrats / inhibitrices des CYPs utilisées lors des expériences *in vitro* et *in vivo*.

CYP	Substrat	Inhibiteur
1A2	Caféine / Phénacétine	Furafylline
2B6	Bupropion	CBP
2C9	Flurbiprofène	Sulphaphenazole
2C19	Oméprazole / S-Méphénytoïne	Oméprazole / Nirvanol
2D6	Dextrométorphan	Quinidine
3A	Midazolam	Kétoconazole

De plus, des anticorps dirigés contre des CYPs spécifiques sont récemment apparus sur le marché et sont de plus en plus utilisés dans les études de métabolisme *in vitro*. Ils permettent d'apporter une confirmation de l'implication des CYPs principaux dans une voie métabolique. Ils sont effectivement des outils importants pour valider des résultats obtenus par d'autres méthodes, notamment lorsque des inhibiteurs sont considérés comme peu spécifiques.

Pour déterminer le potentiel inhibiteur d'une substance qui est en général traduit par l' IC_{50} (concentration d'inhibiteur provoquant une réduction de la moitié de la vitesse maximale de la production du métabolite) ou le K_i (concentration d'inhibiteur qui se lie à la moitié des sites enzymatiques disponibles) dans les études d'inhibition, des substrats spécifiques sont incubés avec la molécule à tester et les microsomes hépatiques.

Dans ces études, la constante d'inhibition est déterminée à l'aide de la représentation de Dixon suite à l'incubation de microsomes avec plusieurs concentrations du substrat et de l'inhibiteur (figure 14).

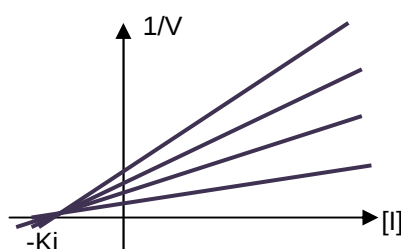


Figure 14. Représentation de Dixon permettant de déterminer la constante d'inhibition K_i .

Les substrats recommandés par l'Agence Européenne du Médicament pour l'étude du potentiel inhibiteur des CYPs sont : la phenacetine pour le CYP1A2, le bupropion ou l'efavirenz pour le CYP2B6, la warfarine ou le diclofenac pour le CYP2C9, la méphénytoïne pour le CYP2C19, le bufuralol pour le CYP2D6 et le midazolam pour le CYP3A (105). Le flurbiprofène et le dextrométorphan peuvent également être utilisés comme substrat du CYP2C9 et CYP2D6, respectivement (106, 107).

4.3.4 Les cytochromes recombinants

Des cytochromes recombinants sont également disponibles commercialement depuis plusieurs années. Ce sont des systèmes enzymatiques hétérologues dans lesquels une enzyme individuelle est produite dans le réticulum endoplasmique d'une cellule hôte eucaryote (108). Ces systèmes enzymatiques sont des outils très intéressants lors de la recherche ou de la confirmation de l'implication de CYPs dans le métabolisme d'une substance. Cependant, les CYPs étant isolés des autres enzymes hépatiques, la valeur prédictive de ces systèmes est débattue car la détermination de la contribution relative de l'isoforme en question sur le métabolisme du médicament *in vivo* n'est pas possible. Ces systèmes restent néanmoins très utiles pour confirmer des données obtenues avec des microsomes ou de tissu hépatique humain à l'état natif.

4.3.5 Hépatocytes primaires

Les hépatocytes primaires humains sont considérés comme le modèle « gold standard » pour l'étude du métabolisme des xénobiotiques et les études de cytotoxicité (109). Cependant, la disponibilité de plus en plus limitée de foies humains frais, la complexité de la procédure d'isolation de ces cellules, leur durée de vie limitée à quelques jours, la variabilité interindividuelle et le coût élevé de ce modèle sont des inconvénients de taille pour son utilisation à large échelle (110). Pour contrer ces limitations, des lignées cellulaires immortalisées dérivées du foie, disponibles facilement et phénotypiquement stables, ont vu le jour.

4.3.6 Les lignées cellulaires

Une des premières lignées de ce type, provenant de carcinome hépatocellulaire humain, est la lignée HepG2 qui est largement utilisée comme alternative aux cultures primaires d'hépatocytes (111). Cependant, les cellules HepG2 présentent une activité métabolique sensiblement plus faible que les hépatocytes primaires, ce qui peut limiter leur utilité dans les

études de métabolisme ou d'inhibition / induction des CYPs par exemple (112, 113). Aucun transcrit n'a été détecté pour les CYPs 2B6, 2C9, 2E1 et 3A4 dans les cellules HepG2 (114). Les lignées hépatiques cellulaires sont pour la plupart issues de tumeurs et ont une capacité de prolifération infinie mais elles ne sont pas très appropriée pour l'étude du métabolisme et de l'hépatotoxicité car elles expriment très peu les CYPs majeurs et les transporteurs (115).

La nouvelle lignée cellulaire HepaRG™ a été développée depuis le début des années 2000 (116) et son utilisation est en pleine expansion. Ces cellules proviennent d'un carcinome hépatocellulaire humain et ce modèle est composé de deux types cellulaires différents qui lui procure l'avantage d'une grande ressemblance avec les hépatocytes primaires au niveau de l'activité métabolique sans l'instabilité fonctionnelle liée au temps ni la variabilité interindividuelle associée à l'utilisation des cultures primaires (117). Les cellules de la lignée HepaRG™ ont la capacité de se différencier en cellules biliaires et hépatocytaires lorsqu'elles sont mises en présence de DMSO pendant 15 jours (figure 15) (118).

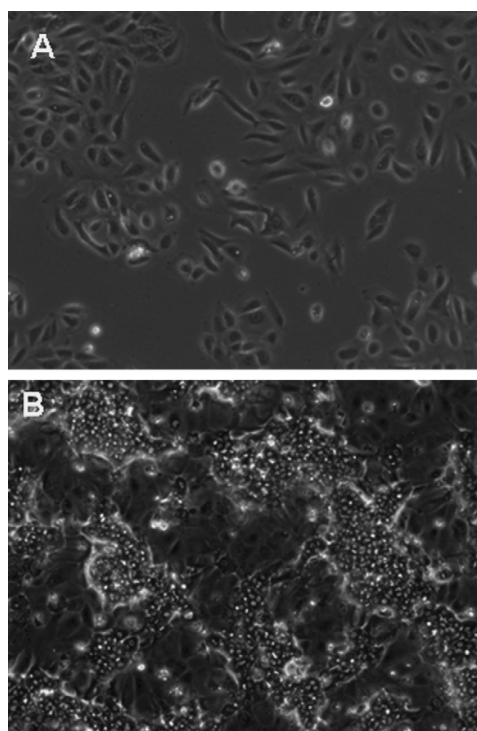


Figure 15. Photographies en contraste de phase des cellules HepaRG™. (A) cellules proliférantes indifférenciées après ensemencement à faible densité. (B) cellules cultivées pendant 15 jours en absence de DMSO puis 15 jours avec du DMSO ; Les cellules hépatocytaires avec des canalicules biliaires spécifiques sont entourées par les cellules de type biliaires caractérisées par un cytoplasme plus clair (109).

Les cellules ainsi différenciées contiennent plus de 50% de cellules épithéliales de type hépatocytes qui montrent une fonction hépatique préservée ainsi que l'expression des gènes pour différentes protéines spécifiques du foie comme les CYPs et les transporteurs du

métabolisme de phase II. Les cellules hepaRG™ expriment l'ARNm des CYPs à des niveaux comparables à ceux des hépatocytes primaires (115).

Les CYPs les plus exprimés dans les cellules hepaRG™ en présence de DMSO sont les CYP2E1, 2B6 et 3A4. Le CYP2C9 est très exprimé du fait de l'ajout d'hydrocortisone dans le milieu de culture, un glucocorticoïde connu pour induire le CYP2C9. Des taux faibles de CYP2D6 ont été remarqués et peuvent être dus au fait que le patient dont provient cette lignée serait métaboliseur lent du CYP2D6 (116).

Les enzymes de phase II jouent également un grand rôle dans la détoxification et l'activation de certains médicaments. Des niveaux d'ARNm de GST et UGT plus élevés ont été détectés dans les cellules hepaRG™ par rapport aux cellules HepG2, ce qui semble indiquer que les cellules différenciées maintiennent de bonnes activités des enzymes de phase II.

Durant cette thèse, les études d'inhibition dans les microsomes hépatiques humains et les cytochromes recombinants ont été utilisées pour étudier le métabolisme du clopidogrel et du prasugrel. Pour les études d'induction et particulièrement lors des études d'interaction entre les antiagrégants plaquettaires et les antirétroviraux, les expériences ont été menées sur les cellules HepaRG™ en complément des études sur les microsomes hépatiques.

Les études avec les microsomes hépatiques ont été réalisées à partir de morceaux de foies humains issus de la biobanque du laboratoire ou à l'aide de microsomes « poolés » commerciaux (BD GENTEST®).

Les cellules hepaRG™ ont été obtenues après la signature d'un « Material Transfer Agreement » entre le laboratoire et l'INSERM de Rennes. Les cellules indifférenciées proviennent de la société Biopredic (Rennes, France) et nous les avons cultivées au laboratoire afin de les exploiter dans les expériences de cette thèse mais aussi dans le but de les conserver à des passages précoces et de gérer cette lignée pour des expériences futures. La gestion de la lignée s'est faite sur le modèle suivant : (figure 16)

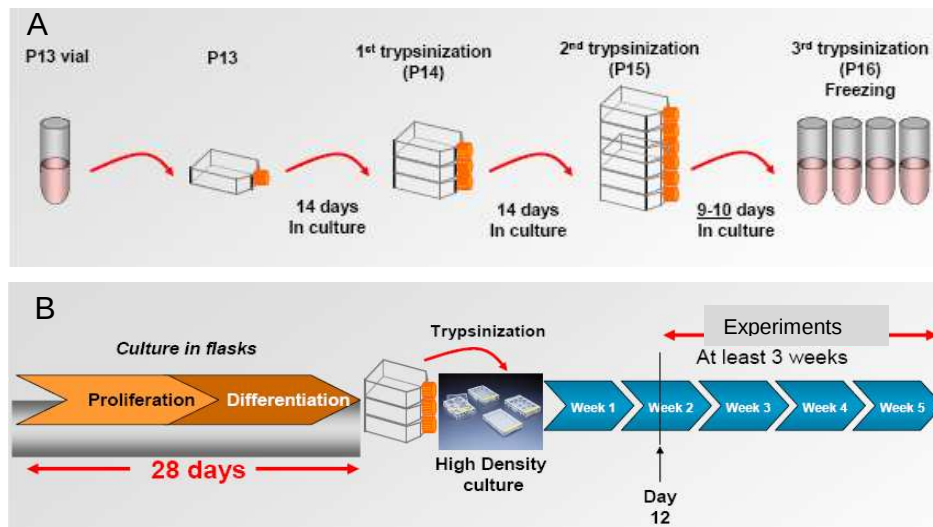


Figure 15. A.Schéma de culture des cellules pour l'entretien et la conservation de la lignée.
 B.Schéma de culture des cellules pour les expériences d'induction des cytochromes
 (adaptée de la documentation fournie par Biopredic International)

V. Les interactions médicamenteuses

Les effets indésirables médicamenteux sont à l'origine de 4 à 7% des hospitalisations en urgence (119). Les interactions néfastes y constituent quand à elles pour 30%. Elles interviennent la plupart du temps lors de l'introduction d'un nouveau traitement chez un patient. Elles posent de réels problèmes aux cliniciens, surtout chez des patients âgés ou des patients polymédiqués (personnes âgées, cancer, SIDA,...).

Les interactions médicamenteuses néfastes peuvent avoir des conséquences cliniques graves, conduisent à des investigations inutiles, accroissent les coûts de la santé, entachent la relation thérapeutique et peuvent également mener des médicaments à être retirés du marché pour des raisons de sécurité. D'un point de vue mécanistique, on divise les interactions médicamenteuses en interactions cinétiques et dynamiques.

5.1 Les interactions pharmacodynamiques

Les interactions pharmacodynamiques surviennent lorsque l'administration d'un médicament a un effet sur un autre médicament au niveau des récepteurs, des systèmes effecteurs ou des fonctions physiologiques mais sans modifier ses concentrations plasmatiques. Les deux principaux effets observés lors de telles interactions sont un antagonisme ou une réaction synergique. En effet, par exemple, lorsqu'il y a une compétition de deux médicaments pour le même récepteur, la deuxième substance ne peut plus accéder à son récepteur qui est occupé par la première molécule et il n'y aura donc pas d'effet de cette molécule au niveau clinique : c'est l'antagonisme. La synergie désigne une potentialisation des effets des deux médicaments qui peut conduire à un risque de toxicité aigu.

5.2 Les interactions pharmacocinétiques

Les interactions pharmacocinétiques sont liées aux propriétés physicochimiques des médicaments et peuvent survenir à n'importe quelle étape de la pharmacocinétique. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous sommes limités aux interactions survenant lors du métabolisme des médicaments et celles-ci seront ainsi plus détaillées dans les paragraphes suivants.

5.2.1 Absorption

Au niveau de l'absorption, certaines interactions peuvent se produire par une diminution ou une augmentation de l'activité de transporteurs comme la p-glycoprotéine qui peut perturber la cinétique de médicaments qui seraient substrats de ce même transporteur. Certains

médicaments peuvent aussi modifier le pH du tube digestif. Par exemple, un antiacide est contre-indiqué avec le kétoconazole, qui nécessite un pH acide pour être absorbé.

5.2.2 Distribution

Au niveau de la distribution, les interactions ont surtout lieu lors de la modification de la liaison aux protéines plasmatiques, ce qui déséquilibre le rapport forme libre/forme liée de la molécule. Par exemple, l'acénocoumarol est très fortement lié aux protéines plasmatiques et si une autre molécule entre en compétition au niveau des sites de liaison aux protéines, la fraction libre du médicament est augmentée et par conséquent son effet anticoagulant est augmenté. Cependant, les augmentations de concentrations plasmatiques sont souvent transitoires et les conséquences cliniques significatives de telles interactions sont rares.

5.2.3 Métabolisme

Une fois que les médicaments sont distribués, ils sont ensuite métabolisés et c'est à cette étape que les interactions répertoriées sont les plus nombreuses. En effet, les CYPs jouent un rôle très important dans le métabolisme de phase I des médicaments.

Plusieurs mécanismes peuvent avoir lieu pour provoquer des interactions médicamenteuses néfastes :

Inhibition enzymatique

La plupart des interactions médicamenteuses cliniquement significatives sont dues à une inhibition au niveau des CYPs. Les phénomènes d'inhibition enzymatique peuvent être classifiés en deux catégories : les inhibitions réversibles et irréversibles.

Inhibitions réversibles

-Lorsque deux molécules sont métabolisées par la même voie enzymatique, il y a une compétition qui se fait au niveau des sites de liaisons de l'enzyme. Cette forme d'inhibition est dite compétitive et dépend de l'affinité des substrats pour cette enzyme, de la demi-vie de la substance inhibitrice et de la concentration inhibitrice.

-Des inhibitions enzymatiques non-compétitives peuvent également avoir lieu ; dans ce cas, la substance inhibitrice se lie à la même enzyme que l'autre médicament mais sur un site de liaison différent, en produisant un changement de conformation de l'enzyme et une inactivation du CYP concerné. La concentration de substrat n'intervient pas dans ce type d'interaction.

-Le troisième type d'inhibition est dit incompétitif : l'inhibiteur forme un complexe avec le CYP, ce qui le rend inactif.

L'activité inhibitrice d'une substance peut se traduire par la constante d'inhibition K_i ou l' IC_{50} qui est la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de l'enzyme. Pour une inhibition réversible compétitive, l'équation de Michaelis-Menten devient :

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S] (1 + [I]/K_i)}$$

Un inhibiteur compétitif va ainsi augmenter le K_m sans avoir d'influence sur le V_{max} alors qu'un inhibiteur non compétitif va diminuer le V_{max} et n'influencera pas le K_m . Une inhibition incompétitive quant à elle va diminuer de la même manière le V_{max} et le K_m .

Une différence permettant de distinguer une inhibition réversible d'une inhibition irréversible est la perte d'activité dépendante du temps. En effet, la pré-incubation d'un inhibiteur irréversible en présence de l'enzyme avant l'addition du substrat amène à une perte d'activité de l'enzyme avec le temps.

Inhibitions irréversibles

Certaines substances contiennent des groupes fonctionnels qui peuvent être oxydés par les CYPs pour donner des réactifs intermédiaires qui conduisent à une inactivation de l'enzyme par l'altération de l'hème ou de la partie protéique ou les deux. Ces substances qui inhibent de manière irréversible les CYPs sont appelées inhibiteurs suicides. Ces réactions d'inactivation résultent en une perte d'activité du CYP de façon dose et temps-dépendante. L'activité des CYPs n'est alors retrouvée qu'après une nouvelle synthèse de CYP. Ceci est souvent à l'origine d'un délai entre l'arrêt d'un traitement qui inactive un CYP et la reprise d'un métabolisme normal.

La furafylline est par exemple un inhibiteur suicide du CYP1A2 : un réactif intermédiaire produit par la furafylline va se fixer de manière covalente à l'hème du CYP1A2.

Le ritonavir est un inhibiteur suicide du CYP3A. Une récente étude réalisée sur des volontaires sains a montré que le ritonavir inhibait le métabolisme du midazolam pendant au moins trois jours après l'arrêt du traitement (120). Une étude *in vitro* a mis en évidence les mécanismes d'inhibition du CYP3A par le ritonavir : c'est un inhibiteur irréversible qui peut déplacer les substrats de leur site actif, se lier au fer de l'hème, diminuer le potentiel redox et donc inhiber la réaction de réduction par la CYP reductase (121).

Le tableau ci-dessous montre les différents substrats et inhibiteurs spécifiques des CYPs que l'on peut utiliser pour les études d'interactions médicamenteuses *in vitro* et *in vivo* (adapté de (105)). (Les substances en italiques sont des composés pour lesquels le niveau de preuve n'est pas très élevé mais qui sont recommandés dans l'attente de nouvelles données).

	In vitro		In vivo	
	substrat	inhibiteur	substrat	inhibiteur
CYP1A2	phenacetine	furafylline	caféine, théophylline	furafylline
CYP2B6	efavirenz, bupropion	<i>ticlopidine</i>	<i>efavirenz</i> , bupropion	
CYP2C9	warfarine, diclofenac	sulphaphenazole	warfarine, tolbutamide	<i>fluconazole</i>
CYP2C19	mephenytoine	ticlopidine, loratadine	omeprazole	omeprazole, fluvoxamine
CYP2D6	bufuralol	quinidine	metoprolol, desipramine	quinidine, paroxetine, fluoxetine
CYP3A	midazolam, testosterone	ketoconazole, itraconazole	midazolam	itraconazole, ketoconazole, ritonavir, clarithromycin

Induction enzymatique

L'induction enzymatique est beaucoup moins observée que l'inhibition mais elle n'en reste pas moins cliniquement pertinente. Le mécanisme d'induction est souvent une augmentation du taux de transcription ou de traduction du gène codant pour le CYP conduisant à une synthèse plus importante de l'enzyme. Ceci induit une augmentation du métabolisme de l'autre médicament qui peut décroître son effet.

Par exemple, l'induction du CYP3A4 se fait via le PXR qui est un récepteur nucléaire exprimé principalement dans le foie, l'intestin et le colon et dont les ligands pharmaceutiques peuvent être la rifampicine ou le phénobarbital. Un autre récepteur nucléaire : le récepteur CAR qui est exprimé principalement dans le foie est capable d'induire le CYP2B6 et plus faiblement le CYP3A4. Ces deux récepteurs ont besoin d'une hétérodimérisation pour être ensuite capable de se lier à l'ADN.

Dans le cas d'une pro-drogue, l'induction d'un CYP impliqué dans la bioactivation de la substance en son métabolite actif, va augmenter la production de ce dernier et ainsi accroître l'effet pharmacologique ou la toxicité. L'induction est un processus relativement long car c'est un effet qui est produit en général au steady-state du médicament, après plusieurs jours de traitement.

Les interactions utiles

Fréquemment, les interactions médicamenteuses peuvent être recherchées car elles s'avèrent utiles en pratique clinique :

- Elles permettent d'améliorer la sécurité d'emploi en donnant deux doses faibles de molécules de la même classe pour potentialiser l'effet et augmenter la tolérance (association par exemple de deux antihypertenseurs). Le rapport bénéfice/risque est alors augmenté.
- Dans le cas de médicaments très onéreux, les interactions cinétiques peuvent permettre d'associer un inhibiteur du métabolisme hépatique de la ciclosporine par exemple pour diminuer les doses de traitement nécessaires.
- Un autre exemple est la thérapie antirétrovirale : chez les patients atteints du VIH, le ritonavir qui est un inhibiteur puissant du CYP3A (CYP impliqué dans le métabolisme de la plupart des autres médicaments antirétroviraux) est ajouté à de faibles doses comme booster des autres inhibiteurs de la protéase (ex : association lopinavir/ritonavir).

5.2.4 Elimination

Certains médicaments comme le méthotrexate, le tacrolimus ou les AINS peuvent être néphrotoxiques et diminuer l'élimination d'autres substances. Il peut aussi y avoir des interactions par compétition au niveau de l'élimination tubulaire : si deux médicaments ont une affinité pour le même transporteur, il y a compétition et la substance ayant la plus faible activité verra son élimination diminuée. D'autres interactions au niveau de l'élimination peuvent concerner des médicaments qui modulent le pH urinaire pouvant augmenter ou diminuer l'élimination d'autres molécules.

VI. Les antirétroviraux

a. Généralités

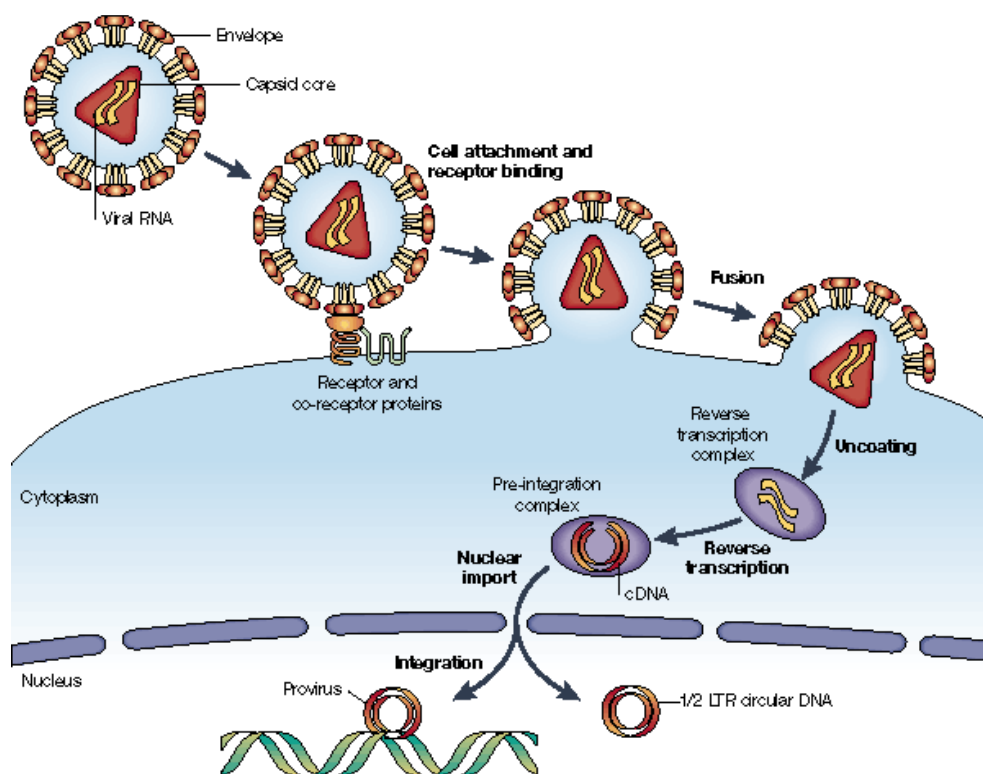
De 2002 à 2011, selon l'OFSP, 500 à 800 nouveaux cas de personnes atteintes du SIDA sont diagnostiquées chaque année en Suisse (105). Dans la majorité de ces infections, la transmission du VIH se fait par des rapports homosexuels (~48%), rapports hétérosexuels (~46%) ou par injection de drogues (~5%).

Les multithérapies anti-VIH ont permis de faire régresser le nombre de décès chez les personnes infectées par le VIH et ont contribué à augmenter la durée de vie de ces patients. Plus de 20000 personnes vivent avec le VIH en Suisse actuellement (122).

Le VIH est un rétrovirus mis en évidence au début des années 1980 par des équipes de recherche françaises et américaines. Lorsqu'un individu est infecté par ce virus, la destruction des lymphocytes T exprimant des récepteurs CD4 (cellules CD4+) à leur surface a lieu et le sujet devient immunodéficient.

Le cycle de réplication du VIH est le suivant (figure 17) :

- le virus VIH fusionne avec la cellule cible via le récepteur CD4+
- l'ARN, la transcriptase inverse, l'intégrase et d'autres protéines virales entrent dans la cellule.
- l'ADN viral est formé par transcription inverse.
- l'ADN viral est transporté à travers le noyau et il est intégré à l'ADN de la cellule cible.
- le nouvel ARN viral est considéré par la cellule comme l'ARN génomique et fabrique des protéines virales.
- les protéines et le nouvel ARN viral se déplacent vers la surface de la cellule et forment un nouveau virus VIH immature.
- Le virus devient mature grâce aux protéases.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 17. Cycle de réplication du VIH (123).

b. Les traitements

L'objectif principal d'un traitement anti-VIH est de maintenir la charge virale la plus faible possible par le blocage de la réplication virale. Plusieurs classes de traitements sont aujourd'hui disponibles et se différencient par l'étape de la réplication sur laquelle elles agissent :

6.2.1 Les inhibiteurs de la protéase

La protéase du VIH est composée de deux chaînes polypeptidiques et elle n'est active que sous forme dimérique. Elle a pour rôle de cliver différents précurseurs peptidiques viraux nécessaires à la formation de nouveaux virions grâce à la production de protéines structurales et fonctionnelles.

Les inhibiteurs de la protéase du VIH sont des peptidomimétiques qui se fixent sur le site actif de la protéase et l'empêchent de cliver ces peptides viraux, produisant ainsi des virions non matures donc inactifs (124). Ce sont des molécules très efficaces (notamment lorsqu'elles sont « boostées » par le ritonavir) qui ont permis une nette amélioration de la survie des patients infectés par le VIH mais qui s'accompagnent souvent d'effets

indésirables biologiques et cliniques conduisant au syndrome lipodystrophique (diabète, accumulation de graisses,...).

L'atazanavir a été mis sur le marché en 2004 en Suisse et a fait évoluer la classe des IP car une efficacité virologique et immunologique a été montrée en association au ritonavir par comparaison avec l'association lopinavir/ritonavir (125). Il a un profil lipidique favorable, ce qui en fait un traitement de choix chez les patients à fort risque de développer un syndrome lipodystrophique (126). Les enjeux dans le développement de nouveaux médicaments dans cette classe sont : la simplification du schéma thérapeutique pour favoriser l'observance, la diminution des effets indésirables et la meilleure compréhension des mécanismes de la réplication virale.

6.2.2 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Inhibiteurs nucléosidiques

Les NRTIs sont des prodrogues nécessitant une phosphorylation intracellulaire pour devenir actifs. Les NRTIs entrent en compétition avec les substrats de la transcriptase inverse (A, T, C, G) pour s'incorporer dans la chaîne d'ADN double brin. La réplication du virus est ainsi bloquée par l'inhibition de l'activité de la transcriptase inverse qui empêche la synthèse d'un nouvel ADN viral (127)

Inhibiteurs non nucléosidiques

Les NNRTIs inhibent également la transcriptase inverse du VIH mais de manière directe en se liant au site catalytique de l'enzyme.

6.2.3 Les inhibiteurs de fusion

Le seul inhibiteur de fusion disponible sur le marché est l'enfuvirtide, administré en injections sous-cutanées, qui empêche la fusion du VIH avec sa cellule cible, ce qui va bloquer la multiplication du virus. Cette classe de médicaments est encore en développement.

6.2.4 Les différents types d'associations de traitements

Les traitements anti-VIH se sont multipliés et les combinaisons ont commencé à être prescrites au début des années 1990s. Les recommandations actuelles lors de la mise en place d'un traitement antirétroviral sont une co-administration de deux inhibiteurs nucléotidique/ nucléosidique de la transcriptase inverse avec un troisième agent d'une autre

classe thérapeutique : inhibiteur de la protéase, inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse, inhibiteurs de l'intégrase ou antagonistes du récepteur CCR5.

Durant cette thèse, seuls certains de ces traitements très utilisés dans les multithérapies anti-VIH ont été étudiés pour leur intérêt dans les interactions médicamenteuses potentielles avec les antiplaquettaires: le ritonavir, le lopinavir, le darunavir, l'atazanavir, la nevirapine, l'etravirine et l'efavirenz.

VII. Métabolisme des thiénopyridines et interactions médicamenteuses

Résumé

Les antiagrégants plaquettaires de la famille des thiénopyridines comme le clopidogrel et le prasugrel sont des inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ à l'ADP qui se situe sur les plaquettes. Ils sont utilisés en combinaison avec l'aspirine pour prévenir les complications thrombotiques après un syndrome coronarien aigu ou la mise en place d'un stent.

Malgré leur très large utilisation et leur place prédominante dans la prévention de la récurrence cardiovasculaire, une grande variabilité de réponse interindividuelle a été remarquée avec ces molécules. Certaines études supposent que cette variabilité est due principalement à leur métabolisme.

Le clopidogrel et le prasugrel sont des pro-drogues c'est-à-dire qu'elles doivent être activées par le foie pour devenir pharmacologiquement actives. Cette bioactivation en leurs métabolites actifs se fait grâce aux CYPs. Malgré la transformation de 85% de la molécule mère de clopidogrel en un acide carboxylique inactif par des carboxylestérases, 15% du clopidogrel est transformé par un processus en deux étapes via les CYPs en 2-oxo-clopidogrel puis en métabolite actif qui est instable mais un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire.

Le prasugrel est plus puissant que le clopidogrel avec une meilleure biodisponibilité et une plus faible variabilité pharmacodynamique. Le prasugrel est en effet converti par les estérases en un composé intermédiaire (R-95913) lui-même activé par les CYPs par la suite. De nombreuses études cliniques ont démontré l'influence du polymorphisme du CYP2C19 sur l'activité antiagrégante du clopidogrel. Néanmoins, des interactions médicamenteuses provenant d'une influence sur l'activité du CYP2C19, comme l'interaction clopidogrel-inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), restent encore très controversées.

D'autres études ont également mis en évidence que les CYP3A et CYP1A2 étaient importants pour la bioactivation du clopidogrel et devaient donc être considérés comme des facteurs potentiels d'interactions médicamenteuses. La bioactivation du prasugrel est médiée principalement par les CYP3A et 2B6 et ainsi la question de possibles interactions médicamenteuses par la modulation de ces CYPs reste ouverte. L'objectif de cette revue était donc d'examiner de manière critique la littérature actuelle qui évaluait l'influence des facteurs génétiques et environnementaux qui pourrait affecter l'effet antiagrégant du clopidogrel et du prasugrel notamment au travers d'interactions médicamenteuses.

Article 1 : Impact of Genetic Polymorphisms and Drug–Drug Interactions on Clopidogrel and Prasugrel Response Variability.

V. Ancrenaz, Y. Daali, P. Fontana, M. Besson, C. Samer, P. Dayer and J. Desmeules. Impact of Genetic Polymorphisms and Drug–Drug Interactions on Clopidogrel and Prasugrel Response Variability. *Current Drug Metabolism*, 2010, 11, 667-677

Impact of Genetic Polymorphisms and Drug–Drug Interactions on Clopidogrel and Prasugrel Response Variability

V. Ancrenaz¹, Y. Daali^{1,3}, P. Fontana², M. Besson¹, C. Samer^{1,3}, P. Dayer¹ and J. Desmeules^{1,3,*}

¹Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Geneva University Hospitals, Switzerland; ²Division of Angiology and Haemostasis, Geneva University Hospitals, Switzerland; ³Swiss Centre for Applied Human Toxicology, University of Geneva, Switzerland

Abstract: Thienopyridine antiaggregating platelet agents (clopidogrel and prasugrel) act as irreversible P2Y₁₂ receptor inhibitors. They are used with aspirin to prevent thrombotic complications after an acute coronary syndrome or percutaneous coronary intervention. A large interindividual variability in response to clopidogrel and to a lesser extent to prasugrel is observed and may be related to their metabolism. Clopidogrel and prasugrel are indeed prodrugs converted into their respective active metabolites by several cytochromes P450 (CYPs). Besides clopidogrel inactivation (85%) by esterases to the carboxylic acid, clopidogrel is metabolized by CYPs to 2-oxo-clopidogrel (15%) and further metabolized to an unstable but potent platelet-aggregating inhibitor. Prasugrel is more potent than clopidogrel with a better bioavailability and lower pharmacodynamic variability. Prasugrel is completely converted by esterases to an intermediate oxo-metabolite (R-95913) further bioactivated by CYPs. Numerous clinical studies have shown the influence of CYP2C19 polymorphism on clopidogrel antiplatelet activity. Moreover, unwanted drug–drug pharmacokinetic interactions influencing CYP2C19 activity and clopidogrel bioactivation such as with proton pump inhibitors remain a matter of intense controversy. Several studies have also demonstrated that CYP3A4/5 and CYP1A2 are important in clopidogrel bioactivation and should also be considered as potential targets for unwanted drug–drug interactions. Prasugrel bioactivation is mainly related to CYP3A4 and 2B6 activity and therefore the question of the effect of drug–drug interaction on its activity is open. The purpose of this review is to critically examine the current literature evaluating the influence of genetic and environmental factors such as unwanted drug–drug interaction affecting clopidogrel and prasugrel antiplatelet activity.

Keywords: Clopidogrel, cytochrome P450, interaction, pharmacokinetic, pharmacodynamic, pharmacogenetic, platelet, prasugrel.

INTRODUCTION

Platelets play a key role in thrombus formation that occurs after atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome (ACS) or in a stent after percutaneous coronary intervention (PCI). Antiplatelet drugs like clopidogrel and prasugrel are second- and third-generation thienopyridines respectively that irreversibly inhibit the P2Y₁₂-adenosine diphosphate (ADP) receptor. Clopidogrel is widely used to reduce recurrence of atherothrombotic events in patients with recent myocardial infarction (MI), stroke, established peripheral arterial disease, or ACS [1, 2]. It was the second drug most sold worldwide (\$8.6 billion) in 2008 [3].

A high interindividual variability of the biological response to clopidogrel is observed in cardiovascular patients. Some patients treated with clopidogrel have test values close to untreated subjects. These patients are usually deemed “resistant” or “poor responders” to clopidogrel. There are different types of biological assays to assess the biological responsiveness to clopidogrel and the prevalence of poor responders is variable. The variable specificity of the assays regarding clopidogrel target accounts in part for the variability of the prevalence of poor responders. Indeed, it has been reported that 6–25% of patients are resistant to clopidogrel with various assays [4]. Light transmission aggregometry was considered as the gold standard for the evaluation of antiplatelet drug responsiveness until recently. However, the lack of standardization and the poor specificity in assessing P2Y₁₂ inhibition of this procedure belong to the drawbacks of this assay and new, more specific assays may be more suitable to monitor clopidogrel potency [5]. The clinical relevance of clopidogrel poor responsiveness was recently assessed in a meta-analysis: 15 studies were assessed, including 3960 patients, 25% of whom were considered as clopidogrel poor responders. The global relative risk (RR) for recurrent ischemic events in clopidogrel poor responders was 3.5 ([2.4–5.2], $p < 0.0001$) [6]. The etiology of the biologically poor responsiveness to

clopidogrel is probably multifactorial: Bonello–Palot *et al.* showed in a prospective study in 73 patients that high body mass index (BMI) ($p = 0.01$), diabetes mellitus ($p = 0.03$), ACS ($p = 0.02$), and CYP2C19*2 variant allele ($p = 0.04$) were associated with high on-treatment platelet reactivity after a 600-mg intake of clopidogrel [7]. These data were confirmed by a recent study that identified predictive factors of insufficient response to antiplatelet treatment in 760 patients undergoing elective coronary stent implantation after a 600 mg intake of clopidogrel. The CYP2C19*2 carrier status (OR: 2.74; 95% CI: 1.93–3.90), age (OR: 1.03; 95% CI: 1.01–1.05), diabetes mellitus (OR: 1.75; 95% CI: 1.19–2.56), and high body mass index (OR: 1.06; 95% CI: 1.02–1.11) were the main predictors for poor response to clopidogrel [8]. The CYPs necessary for the activation of the drug, and their level of expression and activity, seem to play a crucial role. Indeed, the FDA released a warning in March 2010 to inform healthcare professionals that: “effectiveness of Plavix depends on activation to an active metabolite by the cytochrome P450 (CYP) system, principally CYP2C19; poor metabolizers treated with Plavix at recommended doses exhibit higher cardiovascular event rates following ACS or PCI than patients with normal CYP2C19 function; tests are available to identify a patient’s CYP2C19 genotype and can be used as an aid in determining therapeutic strategy; consider alternative treatment or treatment strategies in patients identified as CYP2C19 poor metabolizers” [9].

Recently, attention was drawn on patients on the other end of the biological clopidogrel-response distribution curve (i.e., “high responders”). Indeed, these patients may be at higher risk of bleeding, and this association may be driven by an increased activity of CYPs, possibly through a genetic variant of the CYP2C19 gene [10, 11].

Along with CYPs activity, other causes of the variability of response to clopidogrel may include genetic and environmental factors affecting the absorption (P-glycoprotein), the activity of carboxylesterases and its binding to the platelet P2Y₁₂ receptor.

Prasugrel, a novel thienopyridine recently approved, has a lower biological interindividual variability than clopidogrel [12]. It has a better bioavailability and is metabolized to its pharmacologically active metabolite by other CYPs [13, 14]. Indeed, the different

*Address correspondence to this author at the Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Geneva University Hospitals, Rue Gabrielle Perret-Gentil 4, 1211 Geneva 14, Switzerland; Tel: 0041-(0)22 3829942; Fax: 0041-(0)22 3829945; E mail: Jules.Desmeules@hcuge.ch

CYPs involved in the metabolism of the two molecules could explain the differences in the interactions observed with clopidogrel or prasugrel, such as the recently discussed interaction with proton pump inhibitors (PPIs) [15].

The aim of this review was to describe the factors affecting the interindividual variability in response to the antiplatelet drugs clopidogrel and prasugrel with focus on pharmacogenetic factors and the clinically pertinent drug–drug interactions.

THIENOPYRIDINES IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR EVENTS

Ticlopidine was the first thienopyridine that was approved in the market, but the risk of neutropenia (1% of patients) and thrombotic thrombocytopenic purpura (0.02%) limited its use. Clopidogrel, with a better safety profile, has now largely supplanted ticlopidine. Although the CAPRIE study showed a small, but significant advantage of clopidogrel over aspirin in the secondary prevention of cardiovascular patients, thienopyridines are usually prescribed in combination with aspirin [16].

The benefit of the dual-therapy aspirin, clopidogrel, was evidenced in several large-scale trials that included cardiovascular patients within the full range of ACS (unstable angina, non-ST elevation myocardial infarction, and ST-elevation myocardial infarction) [17]. The clinical development of the third generation thienopyridine prasugrel was evaluated in association with aspirin.

The phase II randomized study JUMBO-TIMI 26 (Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally-Thrombolysis in Myocardial Infarction 26) has evaluated the safety profile of clopidogrel and prasugrel in 904 patients before a PCI and were randomized in four groups (clopidogrel 300mg LD or prasugrel 60mg LD +10mg/day or 60mg LD +15mg/day or prasugrel 40mg LD + 7.5mg/day). This study showed that the rate of minor bleedings was higher in patients with high doses of prasugrel and a dose-effect relation was demonstrated [18].

The double-blind randomized crossover study PRINCIPLE TIMI 44 (Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation–Thrombolysis in Myocardial Infarction 44) realised in 201 subjects with a planned PCI, showed that prasugrel allowed a better platelet aggregation inhibition than clopidogrel at both loading and maintenance doses in patients with stable coronary disease (LD: 78.4% vs. 31.8%; NNT=2.3 and MD:61.3% vs. 46.1%; NNT=6.6) [19].

The phase III study TRITON-TIMI 38 recently evaluated prasugrel in patients with ACS [20]. Although no difference was observed in terms of mortality in both the arms, prasugrel was associated with a relative decrease in the occurrence of ischemic cardiovascular events by 19% (odds ratio of 0.81, 95% confidence interval: 0.73–0.90). Most of the benefit was evidenced very early (<3 days) and maintained during the whole period of follow-up (6–15 months). However, an increased risk of bleeding, including fatal hemorrhage was observed with prasugrel treatment.

Contrary to situations of acute coronary artery injury, aspirin–thienopyridine combination therapy has been disappointing, so far, in other clinical settings. Both the MATCH trial that included patients with recent transient ischemic attack (TIA) or ischemic stroke and the CHARISMA trial that included cardiovascular patients at high risk, did not show any supplementary reduction in the cardiovascular events' composite endpoint and showed an increased risk of hemorrhagic complications, when compared to monotherapy (clopidogrel or aspirin alone). The ACTIVE-W trial showed the superiority of anticoagulation as compared to aspirin/clopidogrel dual therapy for the prevention of recurrence of ischemic stroke in patients with atrial fibrillation [21]. However, this dual antiplatelet therapy appeared to be superior than aspirin alone in patients with atrial fibrillation, who were not suitable for anticoagulation therapy with a significant 11% reduction in vascular events in those receiv-

ing clopidogrel as compared with placebo, but there was a 57% higher incidence of major and severe bleeding that have been reported [22]. To our knowledge, there is no trial evaluating prasugrel in stable cardiovascular patients. The SWitching AntiPlatelet Study (SWAP) study investigated the biological effect of the treatment switch from clopidogrel to prasugrel in 100 patients with acute coronary syndrome. The results showed that switching from clopidogrel to prasugrel is associated with a reduction in platelet function by one week when prasugrel is administrated at maintenance dose and by two hours with the administration of prasugrel loading dose [23].

Other studies are currently in progress to compare the efficacy of clopidogrel and prasugrel in acute settings: TaRgeted platelet Inhibition to cLarify the Optimal strateGy to medically managed Acute Coronary Syndromes, NCT00699998 (TRILOGY-ACS) is designed to test the hypothesis that the combination of aspirin and prasugrel is superior than the combination of aspirin and clopidogrel in the treatment of medically managed patients enrolled within 10 days after ACS. The Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus, NCT00642174 (OPTIMUS-3) is also in progress to compare the pharmacodynamic response to clopidogrel and prasugrel in patients with diabetes and coronary heart disease [24].

PHARMACOLOGY OF CLOPIDOGREL

Clopidogrel is a prodrug that requires to be metabolized to an active metabolite by CYPs to produce its antiaggregating effect. Inhibition of ADP-induced platelet aggregation reaches a plateau after 5 days of standard-dose therapy (75 mg/d clopidogrel) [25]. After acute vessel injury, such as coronary stenting, the onset of clopidogrel action can be brought up to 2–5 h by the administration of a loading dose (300 or 600 mg) [26]. From a pharmacodynamical point of view, the clopidogrel active metabolite irreversibly inhibits the P2Y₁₂ receptor on platelets, leading to the maintenance of a high platelet cAMP level and to the non-activation of GPIIb/IIIa receptor, and consequently the inhibition of platelet aggregation. Due to the irreversible inhibition of the P2Y₁₂ receptor, recovery of platelet function occurs within 3–5 days [27] and the platelet function returns to a normal level approximately one week after the last dose of clopidogrel [28].

From a pharmacokinetical point of view, clopidogrel is rapidly absorbed after administration. Maximum plasma concentration (C_{max}) of the clopidogrel active metabolite is obtained within the first hour with a C_{max} of 160 ng/ml and an area under the curve (AUC) of 267 ng.h/ml after a loading dose of 600 mg. From the healthy volunteers who received a loading dose of 300 mg clopidogrel and 75 mg daily during 7 days, it was found that the maximal concentration was around 60 ng/ml [29]. As shown in 2006 by Taubert *et al.*, using a Caco-2 cell model, clopidogrel is transported by the efflux transporter P-glycoprotein, which is a key factor in the intestinal absorption of clopidogrel and this reduces its bioavailability [30]. Von Beckerath *et al.* showed that a dose of 900 mg clopidogrel did not increase the pharmacological effect as compared to 600 mg [31].

Clopidogrel is mainly metabolized to an inactive carboxylic acid derivative (SR 26334) generated through hydrolysis (85%). Only 15% of clopidogrel is metabolized to a pharmacologically active metabolite through a two-step oxidation process via CYPs, after the metabolization to an intermediate molecule: 2-oxo-clopidogrel (Fig. 1).

The metabolism of clopidogrel is still not totally understood, even though the CYP3A4, CYP2C19, and CYP1A2 seem to be the most implicated.

A study first demonstrated the main implication of the CYP1A subfamily in clopidogrel metabolism by measuring platelet aggregation after the induction of various CYPs isoforms in rat liver microsomes [32].

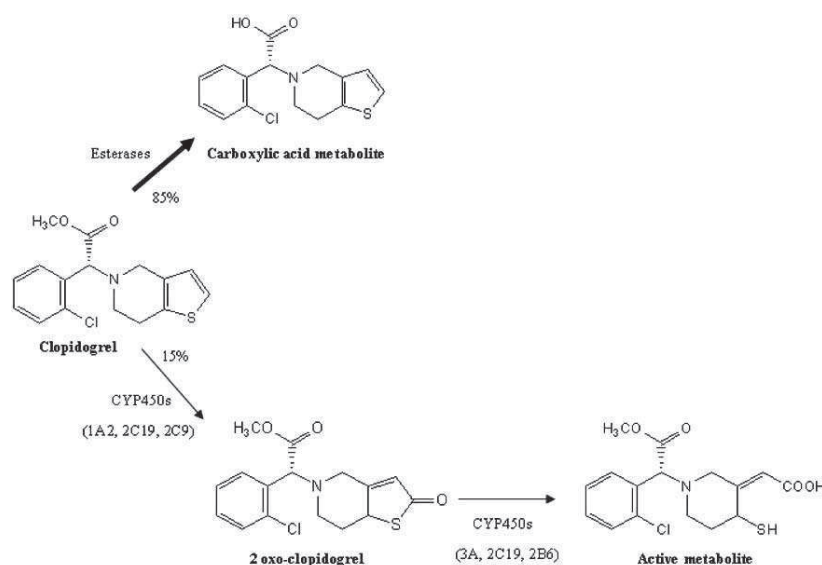


Fig. (1). Pathways of clopidogrel metabolism.

Farid *et al.* clearly established the role of CYP3A in a randomized controlled study in healthy subjects, where they demonstrated that ketoconazole, a potent CYP3A inhibitor, decreased the concentration of clopidogrel AM [33]. Another study identified CYP3A4 and CYP3A5 as the major CYPs involved in clopidogrel metabolism [34].

Lau *et al.* were among the first investigators demonstrating a drug-drug interaction that implicated clopidogrel. They showed that the addition of atorvastatin, (metabolized by CYP3A4) to clopidogrel, produced a dose-dependent reduction of the antiplatelet effect of clopidogrel in patients with a coronary stent. In another study, the same group showed an inverse correlation between platelet aggregation and CYP3A4 activity ($p=0.003$). These findings support the implication of CYP3A4 in the clopidogrel metabolism [35, 36].

In a recent *in vitro* study, Kazui *et al.* assessed the CYPs involved in clopidogrel metabolism using human microsomes and supersomes. CYP2C19 and CYP1A2 were involved mainly in the first step of oxidation from clopidogrel to 2-oxo-clopidogrel (44.9% and 35.8% respectively), whereas CYP3A4, CYP2B6 and CYP2C19 were implicated in the active metabolite production by 39.8%, 32.9% and 20.6%, respectively. Globally, CYP2C19 was involved in the two oxidative steps of clopidogrel metabolism, whereas CYP3A4 only contributed to the second oxidative step [37]. About 40% of the total drug is excreted in urine and 35–60% in feces [38].

INTERINDIVIDUAL VARIABILITY IN THE RESPONSE TO CLOPIDOGREL

Absorption

Clopidogrel absorption is mediated by the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp, MDR1). Using caco-2 cells, Taubert *et al.* showed in 2006, that clopidogrel is transported by the P-gp. They also investigated the influence of the C3435T (rs1045642) polymorphism of the ABCB1 gene coding for the MDR1 protein on plasma concentration of clopidogrel and its active metabolite. The genotype 3435TT was associated with a diminution of the concentration of the active metabolite of clopidogrel [30]. Simon *et al.* performed a pharmacogenetic study in myocardial infarction patients on clopidogrel and compared the clinical outcomes according to C3435T genotype. Individuals with the 3435TT genotype were at increased risk of recurrence of an ischemic events at one year

($p=0.04$) [39]. The association between the 3435TT genotype and ischemic event in patients treated with clopidogrel was further supported by the data of the TRITON trial. In this latter analysis, TT homozygotes had a 72% increased risk of the primary endpoint compared with CT/CC individuals (HR 1.72, 95% CI 1.22, .44, $p=0.002$) [40]. These *in vitro* and *in vivo* data suggest that a ABCB1 gene polymorphism plays a role in the interindividual variability of clopidogrel response.

Metabolism

Carboxylesterases Polymorphism

Carboxylesterases are important pharmacological determinants of drugs containing ester linkages such as clopidogrel and prasugrel. These antiplatelet agents are first hydrolyzed by esterases to an intermediate inactive metabolite (2-oxo) in the case of prasugrel and to an inactive carboxylic acid metabolite in the case of clopidogrel. CYPs are responsible for the further production of the active metabolites. In the case of clopidogrel, 85% of the drug is eliminated as an inactive carboxylic acid derivative.

The liver contains the highest carboxylesterase activity and expresses two major human carboxylesterases: HCE1 and HCE2. These enzymes exhibit a large interindividual variability in their expression and could be considered as a key step in the variability of the antiplatelet drugs response. HCE1 is found at particularly high concentrations in hepatic microsomes with levels nearly 50-fold higher than HCE2, based on quantitative immunoblotting data [41]. In addition to their expression in the liver, tissue-specific expression has been observed, HCE2 being expressed at relatively high levels in the small intestine, while HCE1 is not expressed in this tissue [42]. The involvement of the carboxylesterases HCE1 and HCE2 in aspirin and clopidogrel hydrolysis processes were assessed *in vitro*. It was demonstrated that liver microsomes hydrolyze aspirin and clopidogrel whereas intestinal microsomes hydrolyze aspirin only. The clopidogrel hydrolysis seems to be mainly mediated by HCE1 [43].

Like cytochromes P450, activity of carboxylesterases may be inhibited or induced by some drugs. In human primary hepatocytes, dexamethasone and phenobarbital were associated with a slight or moderate induction of HCE1 and HCE2 [44]. Moreover, *in vitro* data showed that carboxylesterases might be modulated by certain polycyclic aromatic hydrocarbons found in cigarette smoke [45]. Potential drug-drug interactions are therefore possible with clopidogrel

or prasugrel. Shi *et al.* showed in transfected cells with a cDNA construct encoding for HCE1 and in liver microsomes that the hydrolysis of oseltamivir, an antiinfluenza viral agent, was inhibited to as much as 90% in the presence of 50 μ M clopidogrel. This interaction decreased the therapeutic activity of oseltamivir [46].

However, to date, there is insufficient data to draw any conclusions regarding the impact of the interindividual variability of the carboxylesterases activity on the efficacy of antiplatelet drugs.

CYP2C19 Polymorphism

The impact of CYP2C19 genetic variant (CYP2C19*1/*2, rs4244285) on the biological response to clopidogrel was first described by Brandt *et al.* [47] followed by the publications of Hulot *et al.* [48] and Fontana *et al.* [49] who evaluated the association of the CYP2C19*2 allele with platelet function tests in clopidogrel-treated healthy subjects. Several pharmacokinetic and clinical studies further investigated the impact of CYP2C19 polymorphism on clopidogrel pharmacokinetic, pharmacodynamic and on clinical outcomes.

A retrospective analysis in 74 healthy subjects genotyped for different CYPs and receiving a 300mg clopidogrel loading dose showed that subjects carrying the loss-of-function CYP2C19*2 allele had a lower C_{max} of clopidogrel active metabolite ($p=0.02$), lower inhibition of platelet aggregation (0.003) and were more often defined as poor metabolizers ($p=0.03$) than the non carriers [14].

In 2008, a study in 24 healthy subjects assessed the effect of CYP2C19 genotype on the plasma concentration of clopidogrel and its antiplatelet effect. They showed that plasma levels of clopidogrel were higher in poor metabolizers than in heterozygous extensive metabolizers or homozygous extensive metabolizers ($p=0.008$). Poor metabolizers had a lower antiplatelet effect than heterozygous or homozygous extensive metabolizers ($p<0.001$). However a limitation of this study is that the plasma concentration of the active metabolite of clopidogrel was not measured. Indeed, clopidogrel plasma concentration may be not representative of plasma concentration of the active metabolite [50].

In a recent genome-wide association study (Pharmacogenomics of Antiplatelet Intervention, PAPI study), the CYP2C19*2 genotype accounts for 12% of the variation of clopidogrel response and addition of factors such as age, BMI and lipid levels almost doubles the variation of clopidogrel response that could be explained [51]. Thus, part of the variation of clopidogrel responsiveness is explained by the CYP2C19 variant, 10% by other known clinical factors and a major part by other poorly characterized factors, that include drug-drug interactions, body weight and possibly other genetic variants (ABCB1 for example). These data were further supported by a study in 760 cardiovascular patients; in this latter study, the CYP2C19*2 genotype accounted for only 5.2% of the antiplatelet response of clopidogrel as assessed with ADP aggregation after a 600-mg loading dose [8]. This is consistent with the wide variation of clopidogrel responsiveness in both carriers and non-carriers of the CYP2C19 variant allele: a significant proportion of CYP2C19*2 carriers have a low platelet response to ADP (adequate response to clopidogrel) while a significant proportion of patients with no mutated allele have a high platelet response to clopidogrel (clopidogrel resistance).

Assessing the impact of CYP2C19*2 and other loss of function genetic variants (*3) on clinical events was the next step. However, the influence and magnitude of risk of the CYP2C19 genotype have been inconsistent among studies. Two meta-analysis tried to summarize these data. A first analysis gathered data on more than 8000 cardiovascular patients treated with clopidogrel out of 7 studies and showed that the CYP2C19*2 allele was associated with major adverse cardiovascular events (MACE) (relative risk: 1.96, 95%CI: 1.14–3.37, $p=0.02$) [52]. The second analysis gathered data on more than 11000 patients (23 studies) and showed that the CYP2C19*2

allele was independently associated with an increase in the risk for MACE compared with noncarriers (9.7% vs. 7.8%; OR: 1.29; 95% CI: 1.12 to 1.49; $p<0.001$), with an excess of mortality (1.8% vs. 1.0%; OR: 1.79; 95% CI: 1.10 to 2.91; $p<0.019$; $n=6225$) and of stent thrombosis (2.9% vs. 0.9%; OR: 3.45; 95% CI: 2.14 to 5.57; $p<0.001$; $n=4905$). Although reduced CYP2C19 activity only moderately shifts the distribution of response to clopidogrel in CYP2C19*2 carriers, there is growing evidence that there could be a threshold level of platelet reactivity at which the risk of arterial thrombotic events substantially increases, which might explain why such a limited shift in population response could have an effect on the risk of recurrent arterial thrombosis [53].

Finally, since reduced CYP2C19 activity is associated with ischemic cardiovascular events in clopidogrel-treated patients, an increased activity conferred by other genetic variants such as the CYP2C19*17 allele (rs12248560) may be associated with an increased response to clopidogrel and bleeding events compared to noncarriers of this allele. This was indeed demonstrated in a recent study involving 1524 cardiovascular patients [54].

CYP3A4 and 3A5 Polymorphism

Results on the influence of an intronic polymorphism of the CYP3A4 gene (IVS10 + 12A) are conflicting. This genetic variant was found to be associated with clopidogrel responsiveness in 82 cardiovascular patients [55], while results on 94 healthy subjects did not show any association [49].

In 2008, Kim *et al.* demonstrated that the CYP3A5*3 genetic variant was not associated with a modulation of the effect of clopidogrel on platelet aggregation in 28 healthy subjects. Pharmacokinetics (clopidogrel and inactive metabolite concentrations in plasma) and pharmacodynamics (platelet aggregation) parameters of clopidogrel were shown to be similar in the three groups (CYP3A5*1/*1, CYP3A5*1/*3, and CYP3A5*3/*3) [56]. These latter results were confirmed in 162 healthy subjects and the CYP3A5*3 polymorphism was not associated with the occurrence of clinical events in the TRITON TIMI 38 trial [57].

The main drawback of pharmacogenetic studies involving CYP3A enzymes is the poor correlation between the polymorphisms of these enzymes and their activity. Indeed, Oneda *et al.* demonstrated a weak correlation between CYP3A phenotypes (with midazolam clearance test) and CYP3A genotypes (CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7 variants). In a meta-analysis from seven clinical trials, the correlation between CYP3A4/5 alleles and midazolam disposition was assessed. There was no difference in midazolam disposition between different genotypes, haplotypes and diploypes in the CYP3A cluster. The authors concluded that environmental factors explain the majority of CYP3A activity variations.

In contrast, a polymorphism of the P450 oxydoreductase (POR), an electron-donating flavoprotein that is necessary for the normal activity of all CYP450s, has been well correlated with CYP3A activity. Indeed, the POR*28 TT genotype was associated with a 1.6-fold increase in CYP3A activity compared with POR*28 C carriers ($p = 0.004$). More studies assessing the correlation between clopidogrel antiplatelet potency, CYP3A phenotype, and/or POR*28 SNPs are expected to specify the role of CYP3A in clopidogrel effects *in vivo* [58, 59].

CYP2C9 Polymorphism

Since CYP2C9 seems to play a role in clopidogrel bioactivation, the influence of CYP2C9 genetic variants on clopidogrel effect was also investigated. In 2007, Brandt *et al.* showed in healthy volunteers ($n=74$) receiving a loading dose of 300 mg clopidogrel that the presence of loss-of-function CYP2C9 alleles was correlated with poor response and low active metabolite concentrations of clopidogrel [60]. Harmsze *et al.* showed that CYP2C9*3 carriage was responsible for high platelet reactivity and poor response in 428 patients undergoing elective coronary stenting after maintenance or loading dose of clopidogrel [61].

P2Y₁₂ Polymorphism

Several polymorphisms of the gene coding for the P2Y₁₂ protein, target of thienopyridines, have been described. A haplotype associated with ADP-induced platelet aggregation in healthy subjects drew particular attention [62]. However, studies addressing the issue of a modulation of the biological effect of clopidogrel by variants of the P2Y₁₂ gene gave conflicting results [63], and trials addressing the issue of a clinical impact of genetic variants of the P2Y₁₂ receptor gave negative results [39].

Altogether, it seems unlikely that genetic variants of the P2Y₁₂ receptor have a major impact in modulating clopidogrel responsiveness. However, this view has been challenged recently [64].

PHARMACOLOGY OF PRASUGREL

Prasugrel is a new thienopyridine prodrug with a stronger platelet inhibition effect and less variability than clopidogrel [65]. The mean maximal concentration obtained of the active metabolite of prasugrel is around 500 ng/ml within 0.5 h after 60 mg oral administration [29]. In healthy volunteers receiving 60 mg prasugrel followed by a 7-days course of 10 mg daily, the mean maximal plasma concentrations were around 80 ng/ml [60]. The mechanism of action of prasugrel is identical to that of clopidogrel: prasugrel's active metabolite (R-138727) irreversibly inhibits the P2Y₁₂ receptor and thus decreases a main amplification pathway of platelet function. However, although the active metabolite of prasugrel inhibits the P2Y₁₂ receptor with the same potency as the active metabolite of clopidogrel [66], the greater antiplatelet effect of prasugrel is related to a more efficient generation of the active metabolite. While 85% clopidogrel is transformed by esterases into an inactive carboxylic acid, prasugrel is transformed by the carboxylesterases to form an inactive intermediate compound, which is further bioactivated by different CYPs [57] Fig. (2).

Rehmel *et al.* showed in an *in vitro* study that CYP3A is the main CYP involved in the bioactivation of prasugrel. Using recombinant CYPs, CYP3A produced the highest amount of active metabolite with a minor participation of CYP2B6, 2C9, 2C19, and 2D6. Moreover, *in vitro* addition of ketoconazole, a CYP3A specific inhibitor, reduced the formation of prasugrel active metabolite by 33–86% [67].

Brandt *et al.* assessed the impact of common polymorphism of CYP2C19 and CYP2C9 on the pharmacokinetic and pharmacody-

namic response to clopidogrel and prasugrel. They showed that the loss-of-function polymorphisms of both CYP2C19 and CYP2C9 induced a diminution of formation of the active metabolite of clopidogrel, but not prasugrel [60].

Mega *et al.* examined the association of the genetic variants of different CYPs with various cardiovascular outcomes in a cohort of 1466 patients with ACS included in the TRITON-TIMI 38 trial and treated with prasugrel. No association between different CYPs genotypes and risk of cardiovascular events like cardiovascular death, myocardial infarction, or stroke was observed. They also investigated the relation between CYPs genetic variants, plasma concentrations of active prasugrel drug metabolite, and platelet inhibition in response to prasugrel in 238 healthy subjects. No difference between carriers and noncarriers of reduced-function allele was observed in the response to prasugrel for any of the CYP genes tested [68].

DRUG-DRUG INTERACTIONS

Interactions Involving Clopidogrel

Clopidogrel is metabolized principally by CYP1A2, 2C9, and 2C19 to produce the intermediate metabolite and by CYP3A4, 2B6, and 2C19 for the formation of the active metabolite [37]. In 1994, Savi *et al.* showed that the CYP1A subfamily was mainly involved in the bioactivation of clopidogrel by measuring the antiplatelet effect of clopidogrel in rats [32]. The role of CYP1A2 was further supported by a study showing an increase antiplatelet effect of clopidogrel in 104 cardiovascular patients who were current smokers compared to 155 nonsmokers [69]. Finally, the results of a subgroup of the CLARITY-TIMI 28 trial involving only smokers with myocardial infarction showed that smoking, which induces CYP1A2, was associated with improved clinical outcomes such as myocardial infarction or urgent revascularization. Those who smoked more than one-half pack/day seem to have a far greater reduction in primary endpoint (composite of TIMI, flow grade 0 or 1, death or recurrent MI) ($p < 0.0001$). However, this study had a main limitation: the drugs taken by the patients that could interfere with clopidogrel response were not taken into account (statins, PPIs, etc) [70].

CYP2C19 is involved in the two-step bioactivation of clopidogrel. Consequently, drugs that inhibit or induce this CYP could potentially interfere with the clopidogrel metabolism. An interac-

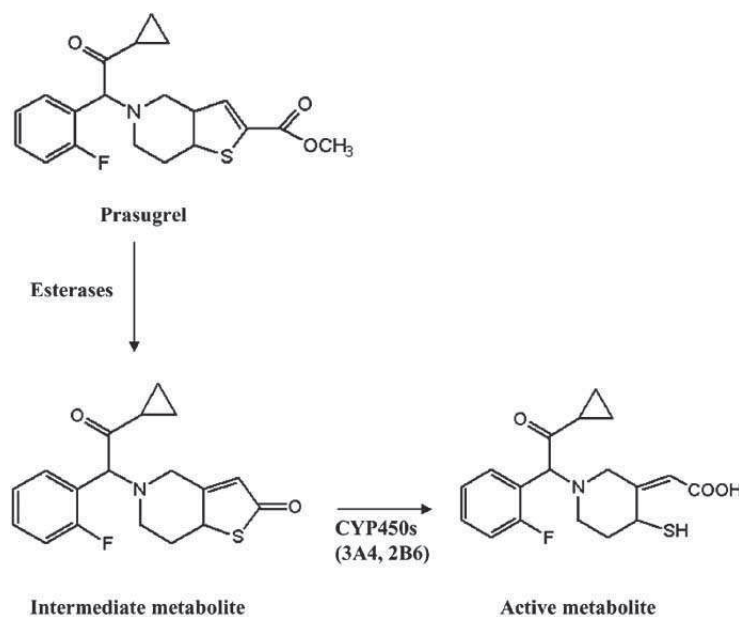


Fig. (2). Pathways of prasugrel metabolism.

tion was largely debated in recent literature between clopidogrel and PPIs. In fact, PPIs are often used with clopidogrel to prevent the increased risk of intestinal bleeding related to antiplatelet therapy.

The most used PPIs are omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, rabeprazole, and pantoprazole. All these show a similar efficacy in the reduction of the gastric acidity and are prescribed for similar indications [71]. Omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, and pantoprazole are mainly metabolized via CYP2C19 and partially by CYP3A4. Rabeprazole is mainly metabolized by a nonenzymatic sulfoxide reaction even if a low participation of CYP2C19 and CYP3A4 is observed [72].

Moreover, PPIs have various potencies to inhibit CYP2C19, and are therefore characterized by different inhibition constants (Table 1) [73].

Lansoprazole is the most potent inhibitor ($k_i=0.45 \mu\text{M}$), while pantoprazole is the weakest one ($k_i=69.4 \mu\text{M}$). Since the mean biological effect of clopidogrel is reduced in carriers of the loss-of-function CYP2C19 allele, phenotypic inhibition of CYP2C19 activity by PPIs could lead to a reduction of the clopidogrel antiplatelet effect.

Recent epidemiological case-control studies have suggested a clinically meaningful adverse drug-drug interaction between clopidogrel and PPIs. An epidemiologic case-control study in 8205 patients with ACS taking clopidogrel showed a 20.8% death or rehospitalisation for ACS incidence in patients with clopidogrel alone versus 29.8% in patients receiving clopidogrel and PPIs. The longer the patient was exposed to clopidogrel + PPIs, more were the adverse outcomes [74]. However, results might have been biased by the severity of the cardiac disease, co-morbidities, and/or co-medications. Furthermore, no distinction was made between the individual imputability of each of the different PPIs.

Juurlink *et al.* have conducted another epidemiologic case-control study in 13,636 patients taking clopidogrel following ACS. A significant association between readmission for MI and current use of PPI was observed. They also showed with all PPIs, except pantoprazole, a 40% increase in the risk of recurrent MI within 90 days of hospital discharge [75]. However, in this study, the groups were not balanced in terms of cardiovascular risk factors or co-medications that may have biased the results.

Gilard *et al.* have performed an *ex vivo* study on 124 patients with coronary stent, who received aspirin and clopidogrel. The *ex vivo* impact of omeprazole was a significant increase in the platelet reactivity index (PRI) derived from the VASP (vasodilator stimulated-phosphoprotein) assay – a specific test to evaluate thienopyridines response – from 39.8% to 51.4% for patients with clopidogrel alone, and clopidogrel with omeprazole after only one week of treatment [76].

In contrast, Siller-Matula *et al.* have investigated the effects of pantoprazole and esomeprazole on clopidogrel platelet inhibition. The *ex vivo* randomized study in 300 patients taking clopidogrel and investigating their coronary permeability a year after infarction showed no significant differences in PRI and whole blood-platelet aggregation (agg) in the group with clopidogrel alone (PRI=49%;

agg=41U), clopidogrel and esomeprazole (PRI=54%; agg=42U), or clopidogrel and pantoprazole (PRI=50%; agg=47U) ($p=0.382$) [77].

The only randomized trial (COGENT trial) addressing the clinical effect of the administration of clopidogrel with a PPI, allocated ACS patients to a combination of clopidogrel–omeprazole with a delayed-release formulation (CGT-2168) or to clopidogrel only. The trial was designed to assess whether PPIs reduce the incidence of gastro-intestinal bleeding while monitoring cardiovascular events as a clinical endpoint. The COGENT trial was terminated early due to financial reasons. Despite this early cessation (3627 patients included out of roughly 5000 planned), there was a significant reduction in the incidence of gastro-intestinal bleedings (relative risk [RR] = 0.55, 95% confidence interval [CI] 0.36–0.85), while there was no increase in cardiovascular events in the omeprazole group. These data seem reassuring, however the trial was underpowered to show a difference in cardiovascular events and the exposure to PPI was too short to draw any firm conclusion on the safety of a combined use of clopidogrel and omeprazole [78]. The Food and Drug Administration (FDA) has issued safety recommendations asking physicians to avoid the nonindicated prescription of PPI and to use in priority, when required, drugs that have less interaction with clopidogrel such as pantoprazole. Similar recommendations have been issued by the European Medicines Agency (EMA) for Europe, and the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA) for the United Kingdom.

The clinical studies assessing the interaction between clopidogrel and PPIs are thereby contradictory, and more randomized controlled trials are needed. At the Thrombocytopenic Cardiovascular Therapeutics (TCT) meeting, following the COGENT presentation, Bhatt said that if a physician is concerned about the fact that the release kinetics might be different [with currently available formulations of either agent] clopidogrel could be given in the morning and PPI at night [79]. Clopidogrel and PPIs having short half-life period, a 12-h delay between the administration of clopidogrel and omeprazole could be a therapeutic alternative, even though this hypothesis must be clinically confirmed.

A recent meta-analysis addressed the issue of the clinical impact of PPI use in cardiovascular patients [80]. PPI users (42% [$n=19614$]) displayed increased risk for MACE (21.8% vs. 16.7%; OR: 1.41; 95% CI: 1.34 to 1.48; $p<0.001$) and mortality (12.7% vs. 7.4%; OR: 1.18; 95% CI: 1.07 to 1.30; $p<0.001$; $n=23977$) compared with nonusers. However, cardiovascular risk significantly influenced the impact of PPI use. Indeed, the influence of PPI was highly heterogeneous across studies and may represent the fact that patients treated with PPIs are likely to be at higher risk for ischemic events. It is thus unclear how much PPI use is a marker of more severe morbid conditions and of higher risk for adverse outcomes.

CYP3A (3A4 and 3A5) substrates or inhibitors could also interact with clopidogrel as this CYP is crucial to the second step of clopidogrel bioactivation. For example, calcium channel blockers (CCBs) are substrates and inhibitors of CYP3A. Siller-Matula *et al.* assessed, in an observational study, the responsiveness to clopidogrel in 200 patients undergoing percutaneous coronary intervention with or without CCBs treatment. They showed that the presence of CCBs allowed an impaired clopidogrel response when

Table 1. Pharmacokinetic Parameters for the Inhibition of CYP2C19 (Cmax and Ki) by Different PPIs

Proton Pump Inhibitor	Cmax (μM)	Ki (μM) to CYP2C19
Omeprazole 20mg	EM= 1.6 $\pm$ 1.0 / PM= 3.1 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 0.8
Esomeprazole 40mg	EM= 5.2 / PM= 6.7	8.6 $\pm$ 1.0
Lansoprazole 30mg	EM= 2.2 $\pm$ 0.7 / PM= 4.8	0.45 $\pm$ 0.07
Pantoprazole 40mg	EM= 5.4 $\pm$ 1.4 / PM= 9.7	69.4 $\pm$ 9.2
Rabéprazole 20mg	EM= 1.2 $\pm$ 0.7 / PM= 1.7 $\pm$ 0.9	21.3 $\pm$ 2.8

measured by the VASP assay ($\text{PRI}=61\pm18\%$ vs. $48\pm21\%$ in patients with and without CCBs, respectively ($p=0.001$)). The rate of cardiovascular events (death from cardiovascular causes, nonfatal myocardial infarction, stent thrombosis, and revascularization) was found 3.9-fold higher in patients with CCBs treatment than in patients without CCBs. They also realized *in vitro* experiments by addition of CCBs in plasma samples from patients taking clopidogrel and they did not identify a significant diminution of PRI when compared with the control group [81]. Therefore, CCBs did not alter the platelet function directly, but could have interfered *in vivo* with clopidogrel via CYP3A by a competitive mechanism.

Statins are substrates of CYP3A, and some studies have assessed the possibility of interaction between clopidogrel and statins. Early *in vitro* studies assessed this potential interaction. Neubauer *et al.* measured the antiplatelet effect by flow cytometry in 47 patients with coronary disease and treated with clopidogrel (300 mg loading dose followed by 75 mg daily) with or without statin treatment. A pretreatment with statin diminished the antiplatelet effect of clopidogrel at 5 h after a loading dose ($43.3\pm19.0\%$ vs. $61.2\pm18.2\%$ in control group; $p=0.01$) and in the maintenance phase (48 h after a loading dose following by maintenance dose) ($58.9\pm21.0\%$ vs. $70.6\pm12.2\%$ in control group; $p=0.01$) [82]. Mach *et al.* compared the effect of different statins on the antiaggregating effect of clopidogrel in 21 healthy volunteers, who received clopidogrel with each statin during one week. The *ex vivo* platelet function was measured and the results showed that simvastatin 20 mg ($p=0.037$) and fluvastatin 80 mg ($p<0.01$) interfered with the antiaggregation produced by clopidogrel, whereas atorvastatin 20 mg, pravastatin 40 mg, and rosuvastatin 10 mg did not allow any change in platelet function with clopidogrel treatment [83]. Lau *et al.* assessed the effect of atorvastatin treatment on platelet activation in 44 patients on clopidogrel with coronary artery stent implantation and showed that atorvastatin attenuated dose-dependently the antiaggregating effect produced by clopidogrel (34 ± 23 , 58 ± 15 ($P<0.027$), 74 ± 10 ($P<0.002$), and 89 ± 7 ($P<0.001$) in the presence of clopidogrel and 0, 10, 20, and 40 mg of atorvastatin) [35]. Wenaweser *et al.* in a prospective study assessed the effect of atorvastatin and pravastatin on platelet aggregation in patients with or without (control) coronary stent thrombosis. These patients were treated by aspirin and clopidogrel and then by atorvastatin or pravastatin. They showed no impact of statins treatment on the effect of the dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel [84]. These data were confirmed by Trenk *et al.* who investigated the effect of statins on antiplatelet aggregation by clopidogrel 600 mg. They showed that simvastatin and atorvastatin neither changed the antiplatelet activity of clopidogrel nor the clinical outcomes associated with a reduced activity of clopidogrel [85]. Blagojevic *et al.* have realized a cohort study in 10,491 patients who were prescribed clopidogrel after a PCI, 43.5% of whom were receiving a statin. Cardiovascular events (death, myocardial infarction, unstable angina, repeat revascularization, or cerebrovascular events) were assessed. No association between the clopidogrel and CYP3A-metabolized statins group and an increase of adverse cardiovascular events was demonstrated [86]. These data suggest that statins do not influence clinical outcomes of such cardiovascular events in patients treated with clopidogrel, even though some early studies showed a decreased biological effect of clopidogrel in presence of statins treatment.

The reasons for these discrepancies are not clear and may be related to the multifactorial causes of the variability in the individual response to clopidogrel. As mentioned before, factors such as age, BMI or lipid levels may impact on the variability of clopidogrel responsiveness, together with several genetic variants of proteins involved in absorption or metabolism of the drug.

Ketoconazole, a potent CYP3A inhibitor, was used to assess the effect of CYP3A inhibition on clopidogrel pharmacodynamics in 18 healthy volunteers receiving 400mg ketoconazole or not (control)

with 300mg clopidogrel LD on day 1 and 75mg daily MD during 6 days. Ketoconazole significantly reduced the clopidogrel active metabolite exposure and the antiplatelet activity of clopidogrel. Therefore, clopidogrel active metabolite formation appears to strongly depend on CYP3A activity [87].

Clopidogrel and its 2-oxo metabolite also inhibited CYP2B6 *in vitro* ($K_i=0.72\pm0.33$ and 1.13 ± 0.20 , respectively) [88] whereas clopidogrel inhibited in a lesser extent CYP2C9 in another *in vitro* study [89]. However more clinical studies are needed to confirm an eventual drug–drug interaction between clopidogrel and CYP2B6 or CYP2C9 substrates.

Interactions Involving Prasugrel

Hagihara *et al.* compared the inhibitory potentials of some CYPs by ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel. They showed that ticlopidine inhibited all the CYPs tested (CYP2B6, 2D6, and 2C19), whereas clopidogrel only inhibited CYP2B6 and 2C19 and prasugrel did not inhibit any of those CYPs. Similarly, the active metabolites of clopidogrel and prasugrel had no inhibitory propensity. They concluded that prasugrel had a lower potential for drug–drug interaction than clopidogrel or ticlopidine [90].

This finding confirmed the results of Rehm *et al.* in an *in vitro* study in which they showed that the two major metabolites of prasugrel did not inhibit the CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A [67].

O'Donoghue *et al.* have investigated the possible interaction between prasugrel and PPIs in comparison with clopidogrel. They assessed the effect of the PPI prescription on the platelet function and clinical outcomes in patients with elective PCI. The inhibition of platelet aggregation was reduced by the concomitant use of clopidogrel and PPIs ($p=0.02$), whereas a modest difference ($p=0.054$) was observed for prasugrel. Moreover, no association was found between PPI concomitant prescription and cardiovascular death, stroke, or myocardial infarction and clopidogrel or with prasugrel [91].

The second step of prasugrel metabolism involves mainly CYP3A4 and CYP2B6. Therefore, relevant drug–drug interactions would have to be with drugs metabolized by these CYPs through a competitive mechanism, or with drugs that induce or inhibit these CYPs.

In a crossover randomized study, Farid *et al.* assessed the platelet aggregation in healthy volunteers receiving a loading dose (60 mg) followed by a maintenance dose (15 mg) of prasugrel with or without 400 mg ketoconazole (a potent inhibitor of CYP3A). Ketoconazole reduced the maximum plasma concentration of prasugrel active metabolite but neither had an impact on the exposure to prasugrel active metabolite nor on the antiplatelet effect of prasugrel [86]. This discrepancy may be related to the involvement of other minor metabolic enzymatic pathways (CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19) in prasugrel metabolism that may produce prasugrel active metabolite from prasugrel intermediate metabolite in the liver when CYP3A activity is reduced.

The effect of a CYP3A inducer, rifampicin (600 mg), was tested in healthy male volunteers taking prasugrel (LD=60 mg followed by 10 mg/day) by measuring the platelet inhibition and determining the active metabolite concentration. Rifampicin did not influence the production of prasugrel active metabolite, but reduced the inhibition of platelet aggregation after a maintenance dose ($p>0.001$ between prasugrel+rifampin group and control group, 24 h after the 6th day of prasugrel treatment). This inhibition could however be due to an artefact with the light transmission aggregometry method due to the coloration of rifampicin [92]. An interaction could therefore potentially occur with CYP3A inducers. However, more randomized controlled studies are needed to confirm these preliminary results.

Antiretrovirals are known to be strong CYP3A4 and 2B6 inhibitors and thus could interfere with prasugrel bioactivation by

inhibition of its metabolism mediated by these CYPs, and further studies should be realized to test this hypothesis.

CONCLUSIONS

Clopidogrel is a cornerstone in the prevention of ischemic events in patients with ACS and those undergoing PCI. However, there is interindividual variability of its biological potency in treated patients. This variability is partly explained by several factors, including genetic polymorphisms that have been recently studied; some variant alleles of CYPs were shown to be associated with the biological effect of clopidogrel and the CYP2C19*2 variant was associated with worse clinical outcomes in patients treated with clopidogrel. The P-gp transporter also seems to play a role in this variability. Even though these two components could explain part of the variability of the response to clopidogrel, other environmental and interindividual factors such as noncompliance, comorbidities, high BMI, increased platelet turnover, and up-regulation of metabolic pathways could play a role in this variability.

In waiting for randomized controlled studies investigating drug–drug interactions involving the different CYPs playing a role in clopidogrel metabolism, it seems reasonable to avoid potent CYPs inhibitors or inducers such as PPIs that inhibit CYP2C19, especially in high risk populations, and to prefer H₂ antagonists. The beneficial effect of a delay between clopidogrel and PPI intake remains to be established.

Prasugrel shows a better efficacy than clopidogrel to prevent cardiovascular events and seems to be less subjected to drug–drug interaction in comparison with clopidogrel, as shown with PPIs. Nonetheless, it also increases the risk of bleeding that needs to be taken into account before prescribing it. Therefore, the FDA recommends avoiding prasugrel prescription in some subgroups of patients: elderly, those with body weight < 60 Kg and those with a history of stroke or transient ischemic attack.

Tailored maintenance treatment based on each patient's individual biological response and/or genetic testing may be beneficial for the long-term prognosis to minimize ischemic and hemorrhagic events. The most relevant tests and cut-off values to define poor responsiveness to clopidogrel have to be further investigated, and special attention is required to avoid drug–drug interactions.

REFERENCES

- [1] Yusuf, S.; Zhao, F.; Mehta, S.R.; Chrolavicius, S.; Tognoni, G.; Fox, K.K. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N. Engl. J. Med.*, **2001**, *345*(7), 494-502.
- [2] Bertrand, M.E.; Rupprecht, H.J.; Urban, P.; Gershlick, A.H. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation*, **2000**, *102*(6), 624-629.
- [3] Laine, L.; Hennekens, C. Proton pump inhibitor and clopidogrel interaction: fact or fiction? *Am. J. Gastroenterol.*, **2010**, *105*(1), 34-41.
- [4] Snoep, J.D.; Hovens, M.M.; Eikenboom, J.C.; van der Bom, J.G.; Jukema, J.W.; Huisman, M.V. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am. Heart J.*, **2007**, *154*(2), 221-231.
- [5] Bouman, H.J.; Parlak, E.; van Werkum, J.W.; Breet, N.J.; ten Cate, H.; Hackeng, C.M.; ten Berg, J.M.; Taubert, D. Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel. *J. Thromb. Haemost.*, **2010**, *8*(3), 482-488.
- [6] Combescurre, C.; Fontana, P.; Mallouk, N.; Berdague, P.; Labruyere, C.; Barazer, I.; Gris, J.C.; Laporte, S.; Fabbro-Peray, P.; Reny, J.L. Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.*, **2010**, *8*(5), 923-933.
- [7] Bonello-Palot, N.; Armero, S.; Paganelli, F.; Mancini, J.; De Labriolle, A.; Bonello, C.; Levy, N.; Maillard, L.; Barragan, P.; Dignat-George, F.; Camoin-Jau, L.; Bonello, L. Relation of body mass index to high on-treatment platelet reactivity and of failed clopidogrel dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.*, **2009**, *104*(11), 1511-1515.
- [8] Hochholzer, W.; Trenk, D.; Fromm, M.F.; Valina, C.M.; Stratz, C.; Bestehorn, H.P.; Buttner, H.J.; Neumann, F.J. Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2010**, *55*(22), 2427-2434.
- [9] Plavix (clopidogrel bisulfate). Drug Label revised on 12th March 2010. on: 2nd september 2010; Available from: (http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/020839s0421.bl.pdf)
- [10] Cuisset, T.; Cayla, G.; Frere, C.; Quilici, J.; Poyet, R.; Gaborit, B.; Bali, L.; Morange, P.E.; Alessi, M.C.; Bonnet, J.L. Predictive value of post-treatment platelet reactivity for occurrence of post-discharge bleeding after non-ST elevation acute coronary syndrome. Shifting from antiplatelet resistance to bleeding risk assessment? *EuroIntervention*, **2009**, *5*(3), 325-329.
- [11] Sibbing, D.; Koch, W.; Gebhard, D.; Schuster, T.; Braun, S.; Stegherr, J.; Morath, T.; Schomig, A.; von Beckerath, N.; Kastrati, A. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*, **2010**, *121*(4), 512-518.
- [12] Hagihara, K.; Kazui, M.; Kurihara, A.; Yoshiike, M.; Honda, K.; Okazaki, O.; Farid, N.A.; Ikeda, T. A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel. *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, *37*(11), 2145-2152.
- [13] Jernberg, T.; Payne, C.D.; Winters, K.J.; Darstein, C.; Brandt, J.T.; Jakubowski, J.A.; Naganuma, H.; Siegbahn, A.; Wallentin, L. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur. Heart J.*, **2006**, *27*(10), 1166-1173.
- [14] Brandt, J.T.; Close, S.L.; Iturria, S.J.; Payne, C.D.; Farid, N.A.; Ernest, C.S., 2nd; Lachno, D.R.; Salazar, D.; Winters, K.J. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J. Thromb Haemost.*, **2007**, *5*(12), 2429-2436.
- [15] Small, D.S.; Farid, N.A.; Payne, C.D.; Weerakkody, G.J.; Li, Y.G.; Brandt, J.T.; Salazar, D.E.; Winters, K.J. Effects of the proton pump inhibitor lansoprazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel. *J. Clin. Pharmacol.*, **2008**, *48*(4), 475-484.
- [16] A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*, **1996**, *348*(9038), 1329-1339.
- [17] Fontana, P.; Reny, J.L. New antiplatelet strategies in atherothrombosis and their indications. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **2007**, *34*(1), 10-17.
- [18] Wiviott, S.D.; Antman, E.M.; Winters, K.J.; Weerakkody, G.; Murphy, S.A.; Behounek, B.D.; Carney, R.J.; Lazzam, C.; McKay, R.G.; McCabe, C.H.; Braunwald, E.; Investigators, J.-T. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y₁₂ antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation*, **2005**, *111*(25), 3366-3373.
- [19] Wiviott, S.D.; Trenk, D.; Frelinger, A.L.; O'Donoghue, M.; Neumann, F.J.; Michelson, A.D.; Angiolillo, D.J.; Hod, H.; Montalescot, G.; Miller, D.L.; Jakubowski, J.A.; Cairns, R.; Murphy, S.A.; McCabe, C.H.; Antman, E.M.; Braunwald, E. Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and

- Aggregation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 trial. *Circulation*, **2007**, *116*(25), 2923-2932.
- [20] Wiviott, S.D.; Braunwald, E.; McCabe, C.H.; Montalescot, G.; Ruzyllo, W.; Gottlieb, S.; Neumann, F.J.; Ardissino, D.; De Servi, S.; Murphy, S.A.; Riesmeyer, J.; Weerakkody, G.; Gibson, C.M.; Antman, E.M. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.*, **2007**, *357*(20), 2001-2015.
- [21] Investigators, A.W.G.o.t.A.; Connolly, S.; Pogue, J.; Hart, R.; Pfeffer, M.; Hohnloser, S.; Chrolavicius, S.; Yusuf, S. Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *Lancet*, **2006**, *367*(9526), 1903-1912.
- [22] Connolly, S.J.; Pogue, J.; Hart, R.G.; Hohnloser, S.H.; Pfeffer, M.; Chrolavicius, S.; Yusuf, S. Effect of clopidogrel added to aspirin in patients with atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.*, **2009**, *360*(20), 2066-2078.
- [23] Angiolillo, D.J.; Saucedo, J.F.; Deraad, R.; Frelinger, A.L.; Gurbel, P.A.; Costigan, T.M.; Jakubowski, J.A.; Ojeh, C.K.; Effron, M.B. Increased platelet inhibition after switching from maintenance clopidogrel to prasugrel in patients with acute coronary syndromes: results of the SWAP (SWitching Anti Platelet) study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2010**, *56*(13), 1017-1023.
- [24] Koo, M.H.; Nawarskas, J.J.; Frishman, W.H. Prasugrel: a new antiplatelet drug for the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Cardiol. Rev.*, **2008**, *16*(6), 314-318.
- [25] Thebault, J.J.; Kieffer, G.; Lowe, G.D.; Nimmo, W.S.; Cariou, R. Repeated-dose pharmacodynamics of clopidogrel in healthy subjects. *Semin. Thromb. Hemost.*, **1999**, *25* Suppl 29-14.
- [26] Cattaneo, M. ADP receptors: inhibitory strategies for antiplatelet therapy. *Drug News Perspect.*, **2006**, *19*(5), 253-259.
- [27] Price, M.J.; Coleman, J.L.; Steinhubl, S.R.; Wong, G.B.; Cannon, C.P.; Teirstein, P.S. Onset and offset of platelet inhibition after high-dose clopidogrel loading and standard daily therapy measured by a point-of-care assay in healthy volunteers. *Am. J. Cardiol.*, **2006**, *98*(5), 681-684.
- [28] Weber, A.A.; Braun, M.; Hohlfield, T.; Schwippert, B.; Tschöpe, D.; Schror, K. Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2001**, *52*(3), 333-336.
- [29] Payne, C.D.; Li, Y.G.; Small, D.S.; Ernest, C.S., 2nd; Farid, N.A.; Jakubowski, J.A.; Brandt, J.T.; Salazar, D.E.; Winters, K.J. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **2007**, *50*(5), 555-562.
- [30] Taubert, D.; von Beckerath, N.; Grimberg, G.; Lazar, A.; Jung, N.; Goesser, T.; Kastrati, A.; Schomig, A.; Schomig, E. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2006**, *80*(5), 486-501.
- [31] von Beckerath, N.; Taubert, D.; Pogatsa-Murray, G.; Schomig, E.; Kastrati, A.; Schomig, A. Absorption, metabolism, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial. *Circulation*, **2005**, *112*(19), 2946-2950.
- [32] Savi, P.; Combalbert, J.; Gaich, C.; Rouchon, M.C.; Maffrand, J.P.; Berger, Y.; Herbert, J.M. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb. Haemost.*, **1994**, *72*(2), 313-317.
- [33] Farid, N.A.; Payne, C.D.; Small, D.S.; Winters, K.J.; Ernest, C.S., 2nd; Brandt, J.T.; Darstein, C.; Jakubowski, J.A.; Salazar, D.E. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2007**, *81*(5), 735-741.
- [34] Clarke, T.A.; Waskell, L.A. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab. Dispos.*, **2003**, *31*(1), 53-59.
- [35] Lau, W.C.; Waskell, L.A.; Watkins, P.B.; Neer, C.J.; Horowitz, K.; Hopp, A.S.; Tait, A.R.; Carville, D.G.; Guyer, K.E.; Bates, E.R. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation*, **2003**, *107*(1), 32-37.
- [36] Lau, W.C.; Gurbel, P.A.; Watkins, P.B.; Neer, C.J.; Hopp, A.S.; Carville, D.G.; Guyer, K.E.; Tait, A.R.; Bates, E.R. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation*, **2004**, *109*(2), 166-171.
- [37] Kazui, M.; Nishiya, Y.; Ishizuka, T.; Hagiwara, K.; Farid, N.A.; Okazaki, O.; Ikeda, T.; Kurihara, A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab. Dispos.*, **2010**, *38*(1), 92-99.
- [38] Lins, R.; Broekhuysen, J.; Necciar, J.; Deroubaix, X. Pharmacokinetic profile of ¹⁴C-labeled clopidogrel. *Semin. Thromb. Hemost.*, **1999**, *25*(Suppl), 229-233.
- [39] Simon, T.; Verstuyft, C.; Mary-Krause, M.; Quteineh, L.; Drouet, E.; Meneveau, N.; Steg, P.G.; Ferrieres, J.; Danchin, N.; Beccquemont, L. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.*, **2009**, *360*(4), 363-375.
- [40] Mega, J.L.; Close, S.L.; Wiviott, S.D.; Shen, L.; Walker, J.R.; Simon, T.; Antman, E.M.; Braunwald, E.; Sabatine, M.S. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet*, **2010**, *376*(9749), 1312-1319.
- [41] Godin, S.J.; Crow, J.A.; Scollon, E.J.; Hughes, M.F.; DeVito, M.J.; Ross, M.K. Identification of rat and human cytochrome p450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides deltamethrin and esfenvalerate. *Drug Metab. Dispos.*, **2007**, *35*(9), 1664-1671.
- [42] Ross, M.K.; Crow, J.A. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **2007**, *21*(4), 187-196.
- [43] Tang, M.; Mukundan, M.; Yang, J.; Charpentier, N.; LeCluyse, E.L.; Black, C.; Yang, D.; Shi, D.; Yan, B. Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterified in the presence of ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, *319*(3), 1467-1476.
- [44] Zhu, W.; Song, L.; Zhang, H.; Matoney, L.; LeCluyse, E.; Yan, B. Dexamethasone differentially regulates expression of carboxylesterase genes in humans and rats. *Drug Metab. Dispos.*, **2000**, *28*(2), 186-191.
- [45] Nousiainen, U.; Torronen, R.; Hanninen, O. Differential induction of various carboxylesterases by certain polycyclic aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicology*, **1984**, *32*(3), 243-251.
- [46] Shi, D.; Yang, J.; Yang, D.; LeCluyse, E.L.; Black, C.; You, L.; Akhlaghi, F.; Yan, B. Anti-influenza prodrug oseltamivir is activated by carboxylesterase human carboxylesterase 1, and the activation is inhibited by antiplatelet agent clopidogrel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, *319*(3), 1477-1484.
- [47] Brandt, J.T.; Kirkwood, S.; Mukopadhyay, N. CYP2C19*2 polymorphism contributes to a diminished pharmacodynamic response to clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2006**, *47*, 380A.
- [48] Hulot, J.S.; Bura, A.; Villard, E.; Azizi, M.; Remones, V.; Goyenvalle, C.; Aiach, M.; Lechat, P.; Gaussem, P. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood*, **2006**, *108*(7), 2244-2247.
- [49] Fontana, P.; Hulot, J.S.; De Moerloose, P.; Gaussem, P. Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J. Thromb. Haemost.*, **2007**, *5*(10), 2153-2155.
- [50] Kim, K.A.; Park, P.W.; Hong, S.J.; Park, J.Y. The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel: a possible mechanism for clopidogrel resistance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2008**, *84*(2), 236-242.
- [51] Shuldiner, A.R.; O'Connell, J.R.; Bliden, K.P.; Gandhi, A.; Ryan, K.; Horenstein, R.B.; Damcott, C.M.; Pakyz, R.; Tantry, U.S.; Gibson, Q.; Pollin, T.I.; Post, W.; Parsa, A.; Mitchell, B.D.; Faraday, N.; Herzog, W.; Gurbel, P.A. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*, **2009**, *302*(8), 849-857.
- [52] Sofi, F.; Giusti, B.; Marcucci, R.; Gori, A.M.; Abbate, R.; Gensini, G.F. Cytochrome P450 2C19(*)2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J.*, **2010**, [Epub ahead of print].

- [53] Storey, R.F. Clopidogrel in acute coronary syndrome: to genotype or not? *Lancet*, **2009**, 373(9660), 276-278.
- [54] Sibbing, D.; Koch, W.; Gebhard, D.; Schuster, T.; Braun, S.; Stegherr, J.; Morath, T.; Schomig, A.; von Beckerath, N.; Kastrati, A. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*, **2010**, 121(4), 512-518.
- [55] Angiolillo, D.J.; Bernardo, E.; Ramirez, C.; Costa, M.A.; Sabate, M.; Jimenez-Quevedo, P.; Hernandez, R.; Moreno, R.; Escaned, J.; Alfonso, F.; Banuelos, C.; Bass, T.A.; Macaya, C.; Fernandez-Ortiz, A. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2006**, 48(2), 298-304.
- [56] Kim, K.A.; Park, P.W.; Park, J.Y. Effect of CYP3A5*3 genotype on the pharmacokinetics and antiplatelet effect of clopidogrel in healthy subjects. *N. Engl. J. Clin. Pharmacol.*, **2008**, 64(6), 589-597.
- [57] Mega, J.L.; Close, S.L.; Wiviott, S.D.; Shen, L.; Hockett, R.D.; Brandt, J.T.; Walker, J.R.; Antman, E.M.; Macias, W.; Braunwald, E.; Sabatine, M.S. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N. Engl. J. Med.*, **2009**, 360(4), 354-362.
- [58] Miao, J.; Jin, Y.; Marunde, R.L.; Kim, S.; Quinney, S.; Radovich, M.; Li, L.; Hall, S.D. Association of genotypes of the CYP3A cluster with midazolam disposition *in vivo*. *Pharmacogenomics J.*, **2009**, 9(5), 319-326.
- [59] Oneda, B.; Crettol, S.; Jaquenoud Sirot, E.; Bochud, M.; Ansermot, N.; Eap, C.B. The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity *in vivo* as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenet. Genomics*, **2009**, 19(11), 877-883.
- [60] Brandt, J.T.; Close, S.L.; Iturria, S.J.; Payne, C.D.; Farid, N.A.; Ernest, C.S., 2nd; Lachno, D.R.; Salazar, D.; Winters, K.J. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J. Thromb. Haemost.*, **2007**, 5(12), 2429-2436.
- [61] Harmsze, A.; van Werkum, J.W.; Bouman, H.J.; Ruven, H.J.; Breet, N.J.; Ten Berg, J.M.; Hackeng, C.M.; Tjoeng, M.M.; Klungel, O.H.; de Boer, A.; Deneer, V.H. Besides CYP2C19*2, the variant allele CYP2C9*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet. Genomics*, **2010**, 20(1), 18-25.
- [62] Fontana, P.; Dupont, A.; Gandrille, S.; Bachelot-Loza, C.; Reny, J.L.; Aiach, M.; Gaussem, P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*, **2003**, 108(8), 989-995.
- [63] von Beckerath, N.; von Beckerath, O.; Koch, W.; Eichinger, M.; Schomig, A.; Kastrati, A. P2Y12 gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **2005**, 16(3), 199-204.
- [64] Ford, N.F. Clopidogrel resistance: pharmacokinetic or pharmacogenetic? *J. Clin. Pharmacol.*, **2009**, 49(5), 506-512.
- [65] Wiviott, S.D.; Braunwald, E.; McCabe, C.H.; Montalescot, G.; Ruzyllo, W.; Gottlieb, S.; Neumann, F.J.; Ardissino, D.; De Servi, S.; Murphy, S.A.; Riesmeyer, J.; Weerakkody, G.; Gibson, C.M.; Antman, E.M. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.*, **2007**, 357(20), 2001-2015.
- [66] Sugidachi, A.; Ogawa, T.; Kurihara, A.; Hagihara, K.; Jakubowski, J.A.; Hashimoto, M.; Niitsu, Y.; Asai, F. The greater *in vivo* antiplatelet effects of prasugrel as compared to clopidogrel reflect more efficient generation of its active metabolite with similar antiplatelet activity to that of clopidogrel's active metabolite. *J. Thromb. Haemost.*, **2007**, 5(7), 1545-1551.
- [67] Rehm, J.L.; Eckstein, J.A.; Farid, N.A.; Heim, J.B.; Kasper, S.C.; Kurihara, A.; Wrighton, S.A.; Ring, B.J. Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, 34(4), 600-607.
- [68] Mega, J.L.; Close, S.L.; Wiviott, S.D.; Shen, L.; Hockett, R.D.; Brandt, J.T.; Walker, J.R.; Antman, E.M.; Macias, W.L.; Braunwald, E.; Sabatine, M.S. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation*, **2009**, 119(19), 2553-2560.
- [69] Bliden, K.P.; Dichiaro, J.; Lawal, L.; Singla, A.; Antonino, M.J.; Baker, B.A.; Bailey, W.L.; Tantry, U.S.; Gurbel, P.A. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2008**, 52(7), 531-533.
- [70] Desai, N.R.; Mega, J.L.; Jiang, S.; Cannon, C.P.; Sabatine, M.S. Interaction between cigarette smoking and clinical benefit of clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2009**, 53(15), 1273-1278.
- [71] Miner, P., Jr.; Katz, P.O.; Chen, Y.; Sostek, M. Gastric acid control with esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole, and rabeprazole: a five-way crossover study. *Am. J. Gastroenterol.*, **2003**, 98(12), 2616-2620.
- [72] Miura, M.; Satoh, S.; Tada, H.; Habuchi, T.; Suzuki, T. Stereoselective metabolism of rabeprazole-thioether to rabeprazole by human liver microsomes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2006**, 62(2), 113-117.
- [73] Li, X.Q.; Andersson, T.B.; Ahlstrom, M.; Weidolf, L. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab. Dispos.*, **2004**, 32(8), 821-827.
- [74] Ho, P.M.; Maddox, T.M.; Wang, L.; Fihn, S.D.; Jesse, R.L.; Peterson, E.D.; Rumsfeld, J.S. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA*, **2009**, 301(9), 937-944.
- [75] Juurlink, D.N.; Gomes, T.; Ko, D.T.; Szmitko, P.E.; Austin, P.C.; Tu, J.V.; Henry, D.A.; Kopp, A.; Mamdani, M.M. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ*, **2009**, 180(7), 713-718.
- [76] Gilard, M.; Arnaud, B.; Cornily, J.C.; Le Gal, G.; Lacut, K.; Le Calvez, G.; Mansourati, J.; Mottier, D.; Abgrall, J.F.; Bosch, J. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2008**, 51(3), 256-260.
- [77] Siller-Matula, J.M.; Spiel, A.O.; Lang, I.M.; Kreiner, G.; Christ, G.; Jilma, B. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am. Heart J.*, **2009**, 157(1), 148 e1-5.
- [78] Bhatt, D.L.; Cryer, B.L.; Contant, C.F.; Cohen, M.; Lanis, A.; Schnitzer, T.J.; Shook, T.J.; Lapuerta, P.; Goldschmidt, M.A.; Laine, L.; Scirica, B.M.; Murphy, S.A.; Cannon, C.P. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N. Eng. J. Med.*, **2010**, [Epub ahead of print].
- [79] Bhatt, D. The COGENT trial, in Transcatheter Cardiovascular Therapeutics (TCT) congress. Late Breaking Trials. San Francisco, USA, 21-25th September 2009.
- [80] Hulot, J.S.; Collet, J.P.; Silvain, J.; Pena, A.; Bellemain-Appaix, A.; Barthelemy, O.; Cayla, G.; Beygui, F.; Montalescot, G. Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2010**, 56(2), 134-143.
- [81] Siller-Matula, J.M.; Lang, I.; Christ, G.; Jilma, B. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2008**, 52(19), 1557-1563.
- [82] 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(19), 1744-1749.
- [83] Mach, F.; Senouf, D.; Fontana, P.; Boehlen, F.; Reber, G.; Daali, Y.; de Moerloose, P.; Sigwart, U. Not all statins interfere with clopidogrel during antiplatelet therapy. *Eur. J. Clin. Invest.*, **2005**, 35(8), 476-481.
- [84] Wenaweser, P.; Windecker, S.; Billinger, M.; Cook, S.; Togni, M.; Meier, B.; Haeblerli, A.; Hess, O.M. Effect of atorvastatin and pravastatin on platelet inhibition by aspirin and clopidogrel treatment in patients with coronary stent thrombosis. *Am. J. Cardiol.*, **2007**, 99(3), 353-356.
- [85] Trenk, D.; Hochholzer, W.; Frundi, D.; Stratz, C.; Valina, C.M.; Bestehorn, H.P.; Buttner, H.J.; Neumann, F.J. Impact of cytochrome P450 3A4-metabolized statins on the antiplatelet effect of a 600-mg loading dose clopidogrel and on clinical outcome in patients undergoing elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.*, **2008**, 99(1), 174-181.

- [86] Blagojevic, A.; Delaney, J.A.; Levesque, L.E.; Dendukuri, N.; Boivin, J.F.; Brophy, J.M. Investigation of an interaction between statins and clopidogrel after percutaneous coronary intervention: a cohort study. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, **2009**, *18*(5), 362-369.
- [87] Farid, N.A.; Payne, C.D.; Small, D.S.; Winters, K.J.; Ernest, C.S., 2nd; Brandt, J.T.; Darstein, C.; Jakubowski, J.A.; Salazar, D.E. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2007**, *81*(5), 735-741.
- [88] Nishiya, Y.; Hagihara, K.; Ito, T.; Tajima, M.; Miura, S.; Kurihara, A.; Farid, N.A.; Ikeda, T. Mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 2B6 by ticlopidine, clopidogrel, and the thiolactone metabolite of prasugrel. *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, *37*(3), 589-593.
- [89] Richter, T.; Murdter, T.E.; Heinkle, G.; Pleiss, J.; Tatzel, S.; Schwab, M.; Eichelbaum, M.; Zanger, U.M. Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *308*(1), 189-197.
- [90] Hagihara, K.; Kazui, M.; Kurihara, A.; Yoshiike, M.; Honda, K.; Okazaki, O.; Farid, N.A.; Ikeda, T. A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel. *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, *37*(11), 2145-2152.
- [91] O'Donoghue, M.L.; Braunwald, E.; Antman, E.M.; Murphy, S.A.; Bates, E.R.; Rozenman, Y.; Michelson, A.D.; Hautvast, R.W.; Ver Lee, P.N.; Close, S.L.; Shen, L.; Mega, J.L.; Sabatine, M.S.; Wiviott, S.D. Pharmacodynamic effect and clinical efficacy of clopidogrel and prasugrel with or without a proton-pump inhibitor: an analysis of two randomised trials. *Lancet*, **2009**, *374*(9694), 989-997.
- [92] Farid, N.A.; Jakubowski, J.A.; Payne, C.D.; Li, Y.G.; Jin, Y.; Ernest, I.C.; Winters, K.J.; Brandt, J.T.; Salazar, D.E.; Small, D.S. Effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel in healthy male subjects. *Curr. Med. Res. Opin.*, **2009**, *25*(8), 1821-1829.

Nouvelles données

Depuis la parution de cette revue, quelques nouvelles publications ont vu le jour concernant le métabolisme et les interactions médicamenteuses impliquant le clopidogrel et le prasugrel. Une grande controverse est apparue en 2011 avec la parution d'un article scientifique de Bouman *et al.* démontrant que la bioactivation du 2-oxo-clopidogrel en son métabolite actif se faisait non pas par l'intermédiaire des cytochromes mais par la paraoxonase-1 (PON1) (128). La PON1 est une estérase dépendante du calcium synthétisée dans le foie. La PON1 est connue pour hydrolyser quelques substrats comme les organophosphates, les esters acides carboxyliques ou encore les lactones (129). Elle hydrolyse les peroxydes des lipides et circule dans le plasma sous forme liée aux HDL (High Density Lipoprotein)(130).

Bouman *et al.* ont identifié la PON1 comme un contributeur majeur dans la bioactivation du 2-oxo-clopidogrel en métabolite actif. En incubant du 2-oxo-clopidogrel avec des microsomes hépatiques humains et du serum humain à activités PON1 équivalentes, la production de métabolite actif de clopidogrel n'était pas différente alors que le serum ne contient pas de CYPs. D'autres expériences ont également montré qu'en présence d'EDTA, un inhibiteur de la PON1, la production de métabolite actif était inhibée. Cependant, la limite de cette expérience *in vitro* est l'utilisation de concentrations de clopidogrel très supérieures aux concentrations attendues *in vivo* et très supérieures à celles utilisées dans les études qui ont déterminé le métabolisme du clopidogrel *via* les CYPs (131,132).

Les auteurs de cet article ont également réalisé une étude clinique pour vérifier leurs données et ont montré une différence dans le taux d'évènements cardiovasculaires chez des patients sous clopidogrel en fonction de leur polymorphisme au niveau du gène codant pour la PON1 : les patients possédant le variant PON1QR192 se retrouvaient plus dans le groupe thrombose que dans le groupe contrôle, indépendamment des polymorphismes des CYP2C19, 2C9, 3A4, 3A5 et ABCB1 qui étaient répartis de la même manière dans les deux groupes.

Cette grande étude *in vitro* / clinique a suscité un grand intérêt et de nombreux groupes de recherche menant des études cliniques sur des patients sous clopidogrel ont réalisé des tests génétiques afin de vérifier si l'implication de la PON1 pouvait apparaître dans leurs études.

Sur les études publiées jusqu'à maintenant, une seule a vu une significativité au niveau du polymorphisme de cette enzyme et une méta-analyse publiée récemment par Rény *et al.* met en évidence qu'il n'y a pas d'incidence du polymorphisme de la PON1 sur la réponse clinique au clopidogrel (133-142). En effet, tous ces groupes de recherche n'ont pas observé

de différence de réponse au traitement par le clopidogrel chez les patients présentant un polymorphisme de la PON1 (génotype Q192R) par rapport aux patients homozygotes pour le gène de la PON1. Ceci a été confirmé par notre étude *in vitro* réalisée à l'aide de microsomes hépatiques pour étudier l'implication de la PON1 dans le métabolisme du clopidogrel dans laquelle nous avons confirmé le rôle des CYPs et infirmé le rôle de la PON1 dans le métabolisme du clopidogrel (143).

Un article analytique a permis de mieux comprendre la confusion engendrée par ces résultats : le métabolite actif du clopidogrel possède un isomère inactif de forme *endo* qui serait formé par hydrolyse probablement via la PON1 alors que le métabolite actif de forme *cis* est lui formé par les CYPs (144). Etant donné que le métabolite inactif est beaucoup moins produit, cela expliquerait les concentrations de 2-oxo-clopidogrel élevées utilisées pour permettre de le détecter.

L'interaction entre le clopidogrel et les IPPs n'étant pas encore complètement clarifiée, quelques études ont été menées sur ce sujet dernièrement. Une étude randomisée, en crossover a été réalisée sur 160 volontaires sains portant le génotype CYP2C19*1/*1 qui ont pris pendant 9 jours le clopidogrel 75mg/j avec ou sans IPP. Tous les IPPs ont diminué la concentration maximale du métabolite actif du clopidogrel alors que seuls l'oméprazole (contrôle positif) et l'esoméprazole ont diminué l'AUC du métabolite actif du clopidogrel. L'esoméprazole a altéré l'effet pharmacodynamique du clopidogrel, mesuré par le VASP, alors que le lansoprazole et le dexlansoprazole n'a pas eu d'impact sur l'effet du clopidogrel (145).

Une étude *in vitro* menée sur des cytochromes recombinants a confirmé que l'inhibition du CYP2C19 par l'oméprazole ainsi qu'une inhibition du CYP3A4 étaient certainement responsables de l'interaction médicamenteuse observée en clinique. Cette étude a également montré que la famotidine, un antiacide non-IPP, ne semblait pas inhiber significativement le métabolisme du clopidogrel (146) et l'utilisation d'anti-H₂ comme la ranitidine, autorisée en Suisse pourrait donc être une alternative à l'utilisation des IPPs chez les patients sous clopidogrel.

Une autre étude d'importance a été publiée concernant la corrélation entre la pharmacodynamie et la pharmacocinétique du clopidogrel. En effet, chez des volontaires sains après administration d'une dose unique de clopidogrel 75mg, les auteurs ont mis en évidence une bonne corrélation entre l'AUC_{0-8h} du métabolite actif du clopidogrel et la réponse antiplaquettaire ($r^2=0.78$) ainsi qu'entre le génotype du CYP2C19 et les concentrations de métabolite actif et de la réponse antiplaquettaire. Cependant, aucune relation n'a été trouvée au niveau des paramètres pharmacocinétiques et

pharmacodynamiques du clopidogrel et le génotype de la PON1. Cette étude montre également la formation du métabolite actif *via* le CYP2C19 alors que la PON1 est responsable de la formation d'un isomère inactif, à des taux 20 fois moins élevés (147).

Une étude prospective visant à déterminer le lien entre la réactivité plaquettaire et les polymorphismes des CYP2C19, ABCB1 et PON1 a été menée chez des patients avec SCA en attente d'une angioplastie. Tous les patients ont reçu 250mg d'aspirine et 600mg de clopidogrel dans les 6 heures avant la mesure de l'agrégation par le VASP. Les patients ayant un VASP<50% étaient considérés comme des bons répondeurs et pour les patients résistants (VASP>50%) la dose était ajustée pour obtenir un VASP<50%. Si après 3 doses de charge, les patients ne répondaient toujours pas au traitement, ils étaient considérés en échec thérapeutique. Le polymorphisme du CYP2C19 a été associé à une réduction de l'inhibition plaquettaire après une dose de charge de clopidogrel alors que le polymorphisme de l'ABCB1 est associé à un échec de l'adaptation thérapeutique chez les mauvais répondeurs. Le polymorphisme de la PON1 n'était visiblement pas impliqué dans l'efficacité du clopidogrel (148).

Face à la prévalence très importante des maladies cardiovasculaires, les nombreux mécanismes différents mis en jeu, leur origine multifactorielle et la variété de traitements sur le marché, les futurs axes de recherche et développement sont donc principalement centrés sur la prévention, la recherche de nouvelles cibles pour de nouveaux médicaments ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires liés à ces pathologies.

Dans la suite de ce manuscrit nous parlerons essentiellement des voies métaboliques du clopidogrel et du prasugrel ainsi que l'interaction potentielle de ces agents thérapeutiques avec les antirétroviraux.

Références

1. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med*. 2007 Jun 7;356(23):2388-98.
2. WHO. Maladies cardio-vasculaires. September 2011 [17th June 2012]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/index.html>.
3. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004 Sep 11-17;364(9438):937-52.
4. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KA, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2003 Jan;24(1):28-66.
5. Fondation Suisse de Cardiologie. Available from: <http://www.campagne-tension-arterielle.ch/index.php?id=746&L=1>.
6. Steinberg D. At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1999 Jun;103(11):1487-8.
7. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):503-16.
8. Gibbs WJ, Fugate SE, Vesta KS. Optimal antithrombotic management of anticoagulated patients with a history of myocardial infarction. *Cardiol Rev*. 2004 Nov-Dec;12(6):327-33.
9. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001 Jul 17;104(3):365-72.
10. Yousuf O, Bhatt DL. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Oct;8(10):547-59.
11. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest*. 1975 Sep;56(3):624-32.
12. Catalano PM, Smith JB, Murphy S. Platelet recovery from aspirin inhibition in vivo; differing patterns under various assay conditions. *Blood*. 1981 Jan;57(1):99-105.
13. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002 Jan 12;324(7329):71-86.
14. Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW, Jolly SS, Joyner CD, Granger CB, et al. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial. *Lancet*. 2010 Oct 9;376(9748):1233-43.
15. Conley PB, Delaney SM. Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y12 receptor in thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2003 Sep;10(5):333-8.
16. Alquahtani AR and Moe GW. La résistance au clopidogrel. *Cardiologie, conférences scientifiques*. 2008 [cited June 2012 June 2012]; Available from: www.cardiologieconferences.ca.
17. Savi P, Labouret C, Delesque N, Guette F, Lupker J, Herbert JM. P2y(12), a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 May 4;283(2):379-83.
18. Sanofi-Aventis. Plavix. 75 et 300mg de clopidogrel: monographie de produit. 2012 [updated 5th April 2012; cited 2012 6th June 2012]; Available from: <http://products.sanofi.ca/fr/plavix.pdf>.
19. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combault J, Picard C, Maffrand JP, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost*. 2000 Nov;84(5):891-6.
20. Topol EJ, Schork NJ. Catapulting clopidogrel pharmacogenomics forward. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):40-1.
21. Tang M, Mukundan M, Yang J, Charpentier N, LeCluyse EL, Black C, et al. Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterified in the presence of ethyl alcohol. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Dec;319(3):1467-76.
22. Zhang H, Lau WC, Hollenberg PF. Formation Of The Thiol Conjugates And Active Metabolite of Clopidogrel By Human Liver Microsomes. *Mol Pharmacol*. 2012 May 14.
23. Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X. Pharmacokinetic profile of 14C-labeled clopidogrel. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25 Suppl 2:29-33.
24. Mehta SR, Bassand JP, Chrolavicius S, Diaz R, Eikelboom JW, Fox KA, et al. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2010 Sep 2;363(10):930-42.
25. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients

presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011 Dec;32(23):2999-3054.

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 Aug 16;345(7):494-502.

27. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005 Nov 5;366(9497):1607-21.

28. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, Lopez-Sendon JL, Montalescot G, Theroux P, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2005 Mar 24;352(12):1179-89.

29. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Apr 10;49(14):1505-16.

30. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*. 1996 Nov 16;348(9038):1329-39.

31. Williams ET, Jones KO, Ponsler GD, Lowery SM, Perkins EJ, Wrighton SA, et al. The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2. *Drug Metab Dispos*. 2008 Jul;36(7):1227-32.

32. Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol*. 2010 Feb;50(2):126-42.

33. Rehmel JL, Eckstein JA, Farid NA, Heim JB, Kasper SC, Kurihara A, et al. Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab Dispos*. 2006 Apr;34(4):600-7.

34. Dansette PM, Rosi J, Debernardi J, Bertho G, Mansuy D. Metabolic activation of prasugrel: nature of the two competitive pathways resulting in the opening of its thiophene ring. *Chem Res Toxicol*. 2012 May 21;25(5):1058-65.

35. Farid NA, Smith RL, Gillespie TA, Rash TJ, Blair PE, Kurihara A, et al. The disposition of prasugrel, a novel thienopyridine, in humans. *Drug Metab Dispos*. 2007 Jul;35(7):1096-104.

36. Lilly. E. Efient 10mg prasugrel: Summary of product characteristics. [updated 11th March 2011; cited 2012 6th June 2012]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/000984/WC500021971.pdf.

37. Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, Weerakkody G, Farid NA, Small DS, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J*. 2007 Jan;153(1):66 e9-16.

38. Payne CD, Li YG, Small DS, Ernest CS, 2nd, Farid NA, Jakubowski JA, et al. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007 Nov;50(5):555-62.

39. Jernberg T, Payne CD, Winters KJ, Darstein C, Brandt JT, Jakubowski JA, et al. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2006 May;27(10):1166-73.

40. Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ, Weerakkody G, Murphy SA, Behounek BD, et al. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y₁₂ antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation*. 2005 Jun 28;111(25):3366-73.

41. Wiviott SD, Trenk D, Frelinger AL, O'Donoghue M, Neumann FJ, Michelson AD, et al. Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 trial. *Circulation*. 2007 Dec 18;116(25):2923-32.

42. van Giezen JJ, Berntsson P, Zachrisson H, Bjorkman JA. Comparison of ticagrelor and thienopyridine P2Y₁₂ binding characteristics and antithrombotic and bleeding effects in rat and dog models of thrombosis/hemostasis. *Thromb Res*. 2009 Nov;124(5):565-71.

43. Husted S, van Giezen JJ. Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist. *Cardiovasc Ther*. 2009 Winter;27(4):259-74.

44. Teng R, Oliver S, Hayes MA, Butler K. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ticagrelor in healthy subjects. *Drug Metab Dispos*. 2010 Sep;38(9):1514-21.

45. Teng R, Butler K. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010 May;66(5):487-96.
46. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1045-57.
47. Cannon CP, Harrington RA, James S, Ardissino D, Becker RC, Emanuelsson H, et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. *Lancet*. 2010 Jan 23;375(9711):283-93.
48. Cayla G, Silvain J, O'Connor SA, Collet JP, Montalescot G. An evidence-based review of current anti-platelet options for STEMI patients. *Int J Cardiol*. 2012 Jun 16.
49. Navarese EP, De Servi S, Gibson CM, Buffon A, Castriota F, Kubica J, et al. Early vs. delayed invasive strategy in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation: a meta-analysis of randomized studies. *QJM*. 2011 Mar;104(3):193-200.
50. Biondi-Zoccai G, Lotrionte M, Agostoni P, Abbate A, Romagnoli E, Sangiorgi G, et al. Adjusted indirect comparison meta-analysis of prasugrel versus ticagrelor for patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2011 Aug 4;150(3):325-31.
51. Collier BS. Monitoring platelet GPIIb/IIIa antagonist therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999 Feb;10 Suppl 1:S81-6.
52. Kleiman NS. GP IIb/IIIa antagonists. Clinical experience and potential uses in cardiology. *Drugs R D*. 1999 May;1(5):361-70.
53. Brener SJ, Barr LA, Burchenal JE, Katz S, George BS, Jones AA, et al. Randomized, placebo-controlled trial of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with primary angioplasty for acute myocardial infarction. ReoPro and Primary PTCA Organization and Randomized Trial (RAPPORT) Investigators. *Circulation*. 1998 Aug 25;98(8):734-41.
54. Novel dosing regimen of eptifibatide in planned coronary stent implantation (ESPRIT): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2000 Dec 16;356(9247):2037-44.
55. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *Lancet*. 2002 Jul 27;360(9329):342-3.
56. Kushner FG, Hand M, Smith SC, Jr., King SB, 3rd, Anderson JL, Antman EM, et al. 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1;54(23):2205-41.
57. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*. 2008 Mar;99(3):466-72.
58. Gachet C, Aleil B. [The inter-individual variability of the response to clopidogrel]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005 Mar;98(3):216-25.
59. Aleil B, Meyer N, Cazenave JP, Mossard JM, Gachet C. High stability of blood samples for flow cytometric analysis of VASP phosphorylation to measure the clopidogrel responsiveness in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2005 Oct;94(4):886-7.
60. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost*. 1999 Sep;82(3):1145-52.
61. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003 Jul;59(3):295-302.
62. Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007 Jan;5(1):45-55.
63. Frere C, Cuisset T, Quilici J, Camoin L, Carvajal J, Morange PE, et al. ADP-induced platelet aggregation and platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2007 Oct;98(4):838-43.
64. Bonello L, Paganelli F, Arpin-Bornet M, Auquier P, Sampol J, Dignat-George F, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of postprocedural major adverse cardiovascular events. *J Thromb Haemost*. 2007 Aug;5(8):1630-6.

65. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol.* 2009 Feb 2;103(3 Suppl):20A-6A.
66. van Werkum JW, Harmsze AM, Elsenberg EH, Bouman HJ, ten Berg JM, Hackeng CM. The use of the VerifyNow system to monitor antiplatelet therapy: a review of the current evidence. *Platelets.* 2008 Nov;19(7):479-88.
67. van Werkum JW, van der Stelt CA, Seesing TH, Hackeng CM, ten Berg JM. A head-to-head comparison between the VerifyNow P2Y12 assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *J Thromb Haemost.* 2006 Nov;4(11):2516-8.
68. von Beckerath N, Pogatsa-Murray G, Wiecezorek A, Sibbing D, Schomig A, Kastrati A. Correlation of a new point-of-care test with conventional optical aggregometry for the assessment of clopidogrel responsiveness. *Thromb Haemost.* 2006 May;95(5):910-1.
69. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Marcucci R, Giglioli C, Antoniucci D, et al. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *J Thromb Haemost.* 2007 Sep;5(9):1839-47.
70. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem.* 1962 Apr;237:1375-6.
71. Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol.* 2006 Jun 25;124(1):128-45.
72. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, et al. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* 1987 Feb;6(1):1-11.
73. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 2002 Oct 12;360(9340):1155-62.
74. Williams RT. Hepatic metabolism of drugs. *Gut.* 1972 Jul;13(7):579-85.
75. Fishelovitch D, Shaik S, Wolfson HJ, Nussinov R. How does the reductase help to regulate the catalytic cycle of cytochrome P450 3A4 using the conserved water channel? *J Phys Chem B.* 2010 May 6;114(17):5964-70.
76. Isin EM, Guengerich FP. Substrate binding to cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Nov;392(6):1019-30.
77. Singh D, Kashyap A, Pandey RV, Saini KS. Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug Discov Today.* 2011 Sep;16(17-18):793-9.
78. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 2006;8(1):E101-11.
79. Lampe JW, King IB, Li S, Grate MT, Barale KV, Chen C, et al. Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis.* 2000 Jun;21(6):1157-62.
80. Kall MA, Clausen J. Dietary effect on mixed function P450 1A2 activity assayed by estimation of caffeine metabolism in man. *Hum Exp Toxicol.* 1995 Oct;14(10):801-7.
81. Hoffman SM, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Mohrenweiser HW. Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *J Mol Evol.* 1995 Dec;41(6):894-900.
82. Hesse LM, Venkatakrishnan K, Court MH, von Moltke LL, Duan SX, Shader RI, et al. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos.* 2000 Oct;28(10):1176-83.
83. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Jul;270(1):414-23.
84. Stresser DM, Kupfer D. Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-450 2B6. *Drug Metab Dispos.* 1999 Apr;27(4):517-25.
85. Code EL, Crespi CL, Penman BW, Gonzalez FJ, Chang TK, Waxman DJ. Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos.* 1997 Aug;25(8):985-93.
86. Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, et al. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics.* 2001 Jul;11(5):399-415.
87. Lewis DF. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics.* 2004 Apr;5(3):305-18.
88. Rosemary J, Adithan C. The pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: ethnic variation and clinical significance. *Curr Clin Pharmacol.* 2007 Jan;2(1):93-109.

89. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev.* 1988 Dec;40(4):243-88.
90. Dalen P, Dahl ML, Bernal Ruiz ML, Nordin J, Bertilsson L. 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther.* 1998 Apr;63(4):444-52.
91. Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Dec;299(3):825-31.
92. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:1-17.
93. Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol.* 2001 Nov;41(11):1149-79.
94. Brauer RW, Shill OS, Krebs JS. Studies concerning functional differences between liver regions supplied by the hepatic artery and by the portal vein. *J Clin Invest.* 1959 Dec;38:2202-14.
95. Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 Jun 15;189(3):233-46.
96. Lerche-Langrand C, Toutain HJ. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology.* 2000 Nov 16;153(1-3):221-53.
97. VandenBranden M, Wrighton SA, Ekins S, Gillespie JS, Binkley SN, Ring BJ, et al. Alterations of the catalytic activities of drug-metabolizing enzymes in cultures of human liver slices. *Drug Metab Dispos.* 1998 Nov;26(11):1063-8.
98. Pelkonen O, Kaltiala EH, Larmi TK, Karki NT. Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes. *Chem Biol Interact.* 1974 Sep;9(3):205-16.
99. Racha JK, Rettie AE, Kunze KL. Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 1A2 by furafylline: detection of a 1:1 adduct to protein and evidence for the formation of a novel imidazomethide intermediate. *Biochemistry.* 1998 May 19;37(20):7407-19.
100. Bourrie M, Meunier V, Berger Y, Fabre G. Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Apr;277(1):321-32.
101. Schmider J, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Shader RI. N-demethylation of amitriptyline in vitro: role of cytochrome P-450 3A (CYP3A) isoforms and effect of metabolic inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Nov;275(2):592-7.
102. Zhou Q, Zhou S, Chan E. Effect of omeprazole on the hydroxylation of warfarin enantiomers in human: in-vitro studies with liver microsomes and cDNA-expressed cytochrome P450 isozymes. *Curr Drug Metab.* 2005 Oct;6(5):399-411.
103. Suzuki H, Kneller MB, Haining RL, Trager WF, Rettie AE. (+)-N-3-Benzyl-nirvanol and (-)-N-3-benzyl-phenobarbital: new potent and selective in vitro inhibitors of CYP2C19. *Drug Metab Dispos.* 2002 Mar;30(3):235-9.
104. Korhonen LE, Turpeinen M, Rahnasto M, Wittekindt C, Poso A, Pelkonen O, et al. New potent and selective cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. *Br J Pharmacol.* 2007 Apr;150(7):932-42.
105. Agence Européenne du Médicament. Guideline on the investigation of Drug Interactions. 22 Avril 2010. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/05/WC500090112.pdf.
106. Tracy TS, Marra C, Wrighton SA, Gonzalez FJ, Korzekwa KR. Studies of flurbiprofen 4'-hydroxylation. Additional evidence suggesting the sole involvement of cytochrome P450 2C9. *Biochem Pharmacol.* 1996 Oct 25;52(8):1305-9.
107. Otten JN, Hingorani GP, Hartley DP, Kragerud SD, Franklin RB. An in vitro, high throughput, seven CYP cocktail inhibition assay for the evaluation of new chemical entities using LC-MS/MS. *Drug Metab Lett.* 2011 Jan;5(1):17-24.
108. Crespi CL, Penman BW. Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions. *Adv Pharmacol.* 1997;43:171-88.
109. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 2007 May 20;168(1):66-73.

110. Madan A, Graham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, Krueger LA, et al. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2003 Apr;31(4):421-31.
111. Sassa S, Sugita O, Galbraith RA, Kappas A. Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Feb 27;143(1):52-7.
112. Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 2003 Aug;31(8):1035-42.
113. Westerink WM, Schoonen WG. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro.* 2007 Dec;21(8):1592-602.
114. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouet S, Morel F, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* 2006 Jan;34(1):75-83.
115. Antherieu S, Chesne C, Li R, Camus S, Lahoz A, Picazo L, et al. Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* 2010 Mar;38(3):516-25.
116. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15655-60.
117. Lambert CB, Spire C, Claude N, Guillouzo A. Dose- and time-dependent effects of phenobarbital on gene expression profiling in human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Feb 1;234(3):345-60.
118. Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology.* 2007 Apr;45(4):957-67.
119. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ.* 2004 Jul 3;329(7456):15-9.
120. Katzenmaier S, Markert C, Riedel KD, Burhenne J, Haefeli WE, Mikus G. Determining the time course of CYP3A inhibition by potent reversible and irreversible CYP3A inhibitors using A limited sampling strategy. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Nov;90(5):666-73.
121. Sevrioukova IF, Poulos TL. Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 26;107(43):18422-7.
122. OFSP. Caractéristiques de l'épidémie de VIH/Sida en Suisse, 2011. Available from: http://www.bag.admin.ch/hiv_aids/12472/12480/12481/12484/index.html?lang=fr&sort=fa&superflex=1_2&filter_dms_thema=2&filter_dms_fix=85&filter_dms_jahre=2012.
123. Moore JP, Stevenson M. New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):40-9.
124. Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med.* 1998 Apr 30;338(18):1281-92.
125. Johnson M, Grinsztejn B, Rodriguez C, Coco J, DeJesus E, Lazzarin A, et al. Atazanavir plus ritonavir or saquinavir, and lopinavir/ritonavir in patients experiencing multiple virological failures. *AIDS.* 2005 Apr 29;19(7):685-94.
126. Nadler J. New anti-HIV protease inhibitors provide more treatment options. *AIDS Patient Care STDS.* 2003 Nov;17(11):551-64.
127. Piliero PJ. Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Sep 1;37 Suppl 1:S2-S12.
128. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med.* 2011 Jan;17(1):110-6.
129. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 May;11(5):412-9.
130. Marsillach J, Camps J, Ferre N, Beltran R, Rull A, Mackness B, et al. Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2009;9:3.
131. Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos.* 2003 Jan;31(1):53-9.
132. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2010 Jan;38(1):92-9.

133. Reny JL, Combescure C, Daali Y, Fontana P. Influence of the paraoxonase-1 Q192R genetic variant on clopidogrel responsiveness and recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2012 Apr 21.
134. Kreutz RP, Nystrom P, Kreutz Y, Miao J, Desta Z, Breall JA, et al. Influence of paraoxonase-1 Q192R and cytochrome P450 2C19 polymorphisms on clopidogrel response. *Clin Pharmacol.* 2012;4:13-20.
135. Pare G, Ross S, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, et al. Effect of PON1 Q192R genetic polymorphism on clopidogrel efficacy and cardiovascular events in the Clopidogrel in the Unstable Angina to Prevent Recurrent Events trial and the Atrial Fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for Prevention of Vascular Events. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012 Apr 1;5(2):250-6.
136. Hulot JS, Collet JP, Cayla G, Silvain J, Allanic F, Bellemain-Appaix A, et al. CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011 Oct 1;4(5):422-8.
137. Simon T, Steg PG, Becquemont L, Verstuyft C, Kotti S, Schiele F, et al. Effect of paraoxonase-1 polymorphism on clinical outcomes in patients treated with clopidogrel after an acute myocardial infarction. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Oct;90(4):561-7.
138. Lewis JP, Fisch AS, Ryan K, O'Connell JR, Gibson Q, Mitchell BD, et al. Paraoxonase 1 (PON1) gene variants are not associated with clopidogrel response. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Oct;90(4):568-74.
139. Campo G, Ferraresi P, Marchesini J, Bernardi F, Valgimigli M. Relationship between paraoxonase Q192R gene polymorphism and on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention. *J Thromb Haemost.* 2011 Oct;9(10):2106-8.
140. Fontana P, James R, Barazer I, Berdague P, Schved JF, Rebsamen M, et al. Relationship between paraoxonase-1 activity, its Q192R genetic variant and clopidogrel responsiveness in the ADRIE study. *J Thromb Haemost.* 2011 Aug;9(8):1664-6.
141. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Zolk O, Valina CM, Stratz C, et al. Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Aug 1;4(4):429-36.
142. Sibbing D, Koch W, Massberg S, Byrne RA, Mehilli J, Schulz S, et al. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J.* 2011 Jul;32(13):1605-13.
143. Ancrenaz V, Desmeules J, James R, Fontana P, Reny JL, Dayer P, et al. The paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro. *Br J Pharmacol.* 2012 Aug;166(8):2362-70.
144. Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. *Nat Med.* 2011 Sep;17(9):1040-1; author reply 2-4.
145. Frelinger AL, 3rd, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, Nigam A, et al. A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Apr 3;59(14):1304-11.
146. Ohbuchi M, Noguchi K, Kawamura A, Usui T. Different effects of proton pump inhibitors and famotidine on the clopidogrel metabolic activation by recombinant CYP2B6, CYP2C19 and CYP3A4. *Xenobiotica.* 2012 Jul;42(7):633-40.
147. Gong IY, Crown N, Suen CM, Schwarz UI, Dresser GK, Knauer MJ, et al. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur Heart J.* 2012 Feb 27.
148. Bonello L, Camoin-Jau L, Mancini J, Bessereau J, Grosdidier C, Alessi MC, et al. Factors associated with the failure of clopidogrel dose-adjustment according to platelet reactivity monitoring to optimize P2Y12-ADP receptor blockade. *Thromb Res.* 2012 Jul;130(1):70-4.

Chapitre 2 :

Etudes in vitro: Métabolisme du clopidogrel et du prasugrel et interactions médicamenteuses

Métabolisme du clopidogrel

Résumé

Cette étude de métabolisme *in vitro* du clopidogrel a été réalisée pour caractériser les différents CYPs impliqués dans les deux voies de métabolisation du clopidogrel. Une étude *in vitro/in vivo* réalisée par Bouman *et al.* a récemment montré que la deuxième étape du métabolisme du clopidogrel pouvait être dépendante uniquement d'une enzyme : la paraoxonase-1 (PON1) (1).

La paraoxonase-1 est une enzyme calcium-dépendante synthétisée dans le foie et c'est un élément biologique important pour les HDL. La PON1 contribue aux effets cardioprotecteurs des HDL en exerçant quelques activités anti-athérogéniques (2).

L'activité de la PON1 est mesurée en général avec le paraoxon ou le phénylacétate comme substrat. La PON1 hydrolyse certains substrats comme les organophosphates, les acides carboxyliques ou encore les lactones. Un polymorphisme très répandu et qui explique en grande partie la variabilité de l'activité paraoxonase dans le sérum a été remarqué pour la PON1 : le remplacement d'une glutamine par une arginine en position 192 (Q192R) (3).

Etant donné les résultats contradictoires entre l'étude de Bouman *et al.* et les résultats *ex vivo* de cohortes, nous avons étudié le rôle de la PON1 et des CYPs dans le métabolisme du clopidogrel *in vitro* à des concentrations cliniquement pertinentes en utilisant les substrats et inhibiteurs spécifiques de la PON1 dans nos incubations avec les microsomes de foie humain, les supersomes et la PON1 recombinante. Des microsomes commerciaux génotypés pour le CYP2C19 ont également été utilisés pour déterminer l'implication d'un polymorphisme génétique du CYP2C19 dans le métabolisme du clopidogrel. Le clopidogrel et ses métabolites ont été analysés et quantifiés par LC-MS-MS.

Les principaux résultats de cette étude ont été une diminution du métabolisme du clopidogrel lorsque deux allèles déficitaires du CYP2C19 sont présents, ce qui conforte une implication du CYP2C19 dans le métabolisme du clopidogrel.

De plus, aucun métabolisme du clopidogrel n'a été détecté en présence de serum humain qui contient la PON1 mais ne contient pas les CYPs, ni en présence de PON1 recombinante. Enfin, l'inhibition de la production du métabolite actif du clopidogrel a été observée avec les inhibiteurs des CYP3A, CYP2B6 et CYP2C19 alors que l'EDTA, un inhibiteur de la PON1, avait un effet inhibiteur plus faible.

Cette étude *in vitro* démontre donc que la contribution de la PON1 au métabolisme du clopidogrel à des concentrations cliniquement pertinentes reste limitée voir négligeable. De plus, nous avons confirmé le rôle important des CYP2C19, CYP2B6 and CYP3A dans le métabolisme du clopidogrel.

Article 2 : Paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro

V. Ancrenaz, J. Desmeules, R.James, P.Fontana, J-L. Reny, P. Dayer, Y. Daali. Paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro (2012). *British Journal of Pharmacology*; 166: 2362-2370.

RESEARCH PAPER

The paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel *in vitro*

V Ancrenaz¹, J Desmeules^{1,2}, R James³, P Fontana⁴, J-L Reny⁵, P Dayer^{1,2} and Y Daali^{1,2}

¹Clinical Pharmacology and Toxicology Service, Geneva University Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland, ²Swiss Center of Applied Human Toxicology, Geneva University, Geneva, Switzerland, ³Clinical Diabetology Unit, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland, ⁴Division of Angiology and Haemostasis, Geneva University Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland, and ⁵Division of General Internal Medicine, Geneva University Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland

Correspondence

Youssef Daali, Clinical Pharmacology and Toxicology Service, Geneva University Hospitals, Rue Gabrielle Perret-Gentil 4, 1211 Geneve 14, Switzerland. E-mail: youssef.daali@hcuge.ch

Keywords

clopidogrel; cytochrome P450; metabolism; paraoxonase-1; polymorphism

Received

12 December 2011

Revised

14 February 2012

Accepted

6 March 2012

BACKGROUND AND PURPOSE

Clopidogrel is a prodrug bioactivated by cytochrome P450s (CYPs). More recently, paraoxonase-1 (PON1) has been proposed as a major contributor to clopidogrel metabolism. The purpose of this study was to assess the relative contribution of CYPs and PON1 to clopidogrel metabolism *in vitro*.

EXPERIMENTAL APPROACH

Clopidogrel metabolism was studied in human serum, recombinant PON1 enzyme (rePON1), pooled human liver microsomes (HLMs), HLMs with the CYP2C19*1/*1 genotype and HLMs with the CYP2C19*2/*2 genotype. Inhibition studies were also performed using specific CYP inhibitors and antibodies. Clopidogrel and its metabolites were measured using LC/MS/MS method.

KEY RESULTS

PON1 activity was highest in the human serum and there was no difference in PON1 activity between any of the HLM groups. The production of clopidogrel's active metabolite (clopidogrel-AM) from 2-oxo-clopidogrel in pooled HLMs was approximately 500 times that in serum. When 2-oxo-clopidogrel was incubated with rePON1, clopidogrel-AM was not detected. Clopidogrel-AM production from 2-oxo-clopidogrel was lower in CYP2C19*2/*2 HLMs compared with CYP2C19*1/*1 HLMs, while PON1 activity in HLMs with both genotypes was similar. Moreover, incubation with inhibitors of CYP3A, CYP2B6 and CYP2C19 significantly reduced clopidogrel bioactivation while a PON1 inhibitor, EDTA, had only a weak inhibitory effect.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS

This *in vitro* study shows that the contribution of PON1 to clopidogrel metabolism is limited at clinically relevant concentrations. Moreover, CYP2C19, CYP2B6 and CYP3A play important roles in the bioactivation of clopidogrel.

Abbreviations

BMAP, 2-bromo-3'-methoxyacetophenone; CBP, 4-(4-chlorobenzyl) pyridine; clopidogrel-AM, clopidogrel active metabolite; CYP, cytochrome P450; HLMs, human liver microsomes; MAB, monoclonal antibody; PON1, paraoxonase-1; rePON, recombinant paraoxonase-1

Introduction

Clopidogrel, a thienopyridine derivative, is widely used as an antiplatelet agent (Quinn and Fitzgerald, 1999) for the secondary prevention of thrombosis in patients with acute coronary syndrome and stent implantation (Kolansky *et al.*, 2000). Clopidogrel is a prodrug mainly bioactivated by cytochrome P450s (CYPs). Approximately 85% of clopidogrel is transformed by hepatic carboxylesterase 1 into an inactive carboxylic acid while 15% is metabolized into an active metabolite in two steps. The first step consists of oxidation of the thiophene ring of clopidogrel to produce 2-oxo-clopidogrel. This is followed by the opening of the thiophene group of 2-oxo-clopidogrel, resulting in the pharmacologically active molecule (Savi *et al.*, 2000; Hagihara *et al.*, 2008; Gurbel *et al.*, 2009) (Figure 1).

After activation, the drug works by impeding the linkage of ADP to its platelet receptor. The thiol group links to the cysteine residue of the P2Y₁₂ ADP receptor with a disulfide bond. This reduces the ability of ADP to link to the receptor, inhibiting the activation of glycoprotein GIIb/IIIa complex, which normally initiates clot formation (Simon *et al.*, 2009).

Patients vary widely in their response to clopidogrel (Gurbel *et al.*, 2003; Ford, 2009) and a poor biological response has been repeatedly associated with an increased risk of recurrent ischaemic events (Combes *et al.*, 2010). This variability is probably multifactorial, including both genetic and environmental factors (Ancrenaz *et al.*, 2010). However, the level of expression and activity of the CYPs, necessary for the bioactivation of clopidogrel, seems to play a crucial role. CYP polymorphisms could explain part of the variability in response to clopidogrel (Mega *et al.*, 2009). Few

studies have assessed the complete clopidogrel metabolism, probably because of the chemical instability of the pharmacologically active metabolite. One study demonstrated the importance of the CYP1A subfamily in clopidogrel metabolism by measuring platelet aggregation after induction of various CYP isoforms in rat hepatic microsomes (Savi *et al.*, 1994). Using different inducers and inhibitors that modulate the anti-aggregating effect of clopidogrel, other studies have shown that CYP3A plays a role in clopidogrel metabolism (Lau *et al.*, 2003; 2004a). The involvement of CYP2C19 in clopidogrel metabolism has been suggested by recent pharmacogenetic studies showing that carriers of the *CYP2C19* loss of function alleles *CYP2C19*2* or **3* are often resistant to clopidogrel treatment (Hulot *et al.*, 2006; Fontana *et al.*, 2007; Ford, 2009; Shuldiner *et al.*, 2009). Moreover, clinical studies have shown that significant pharmacokinetic drug–drug interactions mediated by CYPs can occur, such as with proton pump inhibitors (Gilard *et al.*, 2008; Juurlink, 2009; Sibbing *et al.*, 2009). Kazui *et al.* assessed the function of CYP in clopidogrel metabolism *in vitro* and showed that CYP1A2, 2B6 and 2C19 are involved in the first step of clopidogrel metabolism, whereas CYP3A4, 2C9, 2C19 and 2B6 are principally involved in the second step (Kazui *et al.*, 2010).

Paraoxonase-1 (PON1) is a calcium-dependent esterase synthesized primarily in the liver and secreted into the blood, where it is associated with high-density lipoprotein particles (Mackness *et al.*, 1991). Recently, PON1 was proposed as an important contributor to the biotransformation of 2-oxo-clopidogrel into the clopidogrel-AM (Bouman *et al.*, 2011). However, *in vivo* studies did not confirm these findings, as polymorphisms responsible for loss of PON1 activity were not correlated with increased frequency of cardiovascular events

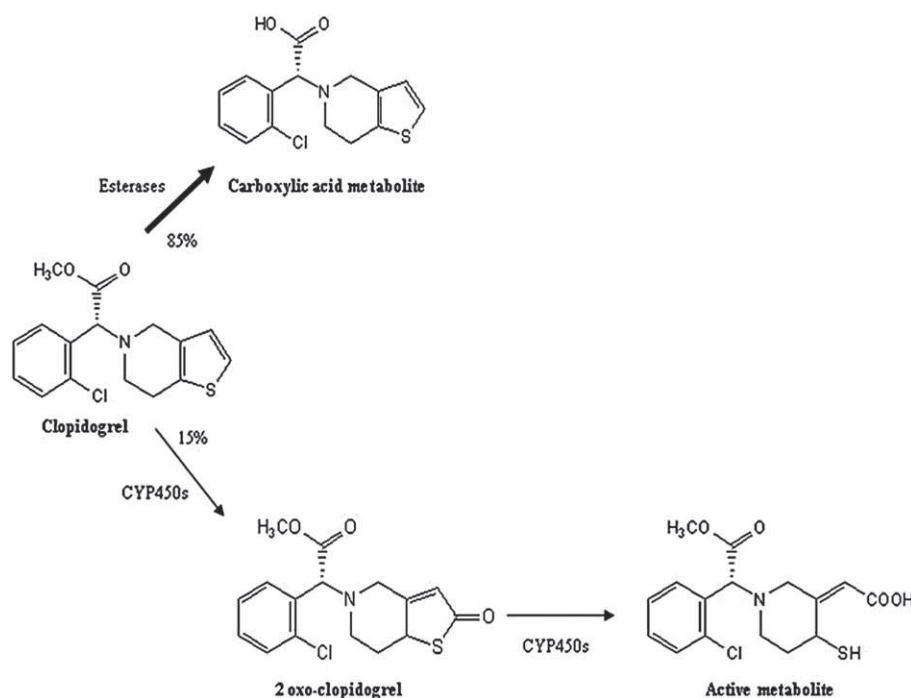


Figure 1

Pathways of clopidogrel metabolism.

in cohorts of cardiovascular patients treated with clopidogrel. Therefore, the involvement of PON1 in clopidogrel metabolism remains unclear (Fontana *et al.*, 2011; Hulot *et al.*, 2011; Sibbing *et al.*, 2011; Trenk *et al.*, 2011). A better understanding of clopidogrel metabolism is needed to predict drug–drug interactions and the responses of individual patients to clopidogrel treatment. We undertook this study to determine the relative involvement of CYPs and PON1 in the bioactivation of clopidogrel *in vitro*.

Methods

Reagents

Clopidogrel, ketoconazole, 2-bromo-3'-methoxyacetophenone (BMAP), omeprazole, 4-(4-chlorobenzyl)-pyridine (CBP) and the constituents of the NADPH-generating system (NADP⁺, isocitric acid, isocitrate dehydrogenase) were purchased from Sigma (Buchs, Switzerland). 2-Oxo-clopidogrel was purchased from Toronto Research Chemicals (North York, Canada). A derivative of clopidogrel-AM was purchased from Labforce (Nunningen, Switzerland). Furafllyline was obtained from Salford Ultrafine Chemicals and Research (Manchester, England); sulfaphenazole was donated by Ciba-Geigy (Basel, Switzerland) and quinidine sulfate was donated by the Pharmacy of the Geneva University Hospitals. HPLC grade acetonitrile, methanol and potassium phosphate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water was supplied by a Milli-Q RG purification unit from Millipore (Bedford, MA, USA).

All stock solutions were prepared in methanol at a concentration of 1 mg·mL⁻¹ and were stored at -20°C. The intermediate solutions were diluted from stock solutions with the incubation buffer.

Pooled HLMs and recombinant microsomes for CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 and 3A5 (supersomes) were purchased from BD Gentest (Basel, Switzerland).

Microsomes with low or high activity for CYP2C19 (CYP2C19*2/*2 or CYP2C19*1/*1 genotype, respectively) were purchased from Tebu Bio (Offenbach, Germany).

Determination of kinetic parameters of S-mephenytoin in genotyped CYP2C19 microsomes

S-Mephenytoin was used as probe for the determination of CYP2C19 activity. We incubated 0.5 mg protein·mL⁻¹ CYP2C19*1/*1 HLMs or CYP2C19*2/*2 HLMs with different concentrations of S-mephenytoin (0, 10, 20, 30, 50, 100, 150 and 250 µM) in 0.1 M potassium phosphate buffer at pH 7.4. Mixtures were pre-incubated for 3 min at 37°C before the reaction was initiated by the addition of the NADPH-generating system (1 mM NADP, 5 mM isocitrate, 5 mM MgCl₂ and 1 UI·mL⁻¹ isocitrate dehydrogenase in reaction buffer). After 40 min incubation at 37°C, the reaction was stopped with acetonitrile that contained 100 ng·mL⁻¹ OH-mephenytoin-D₃ as an internal standard. After centrifugation at 10 000× g for 3 min at room temperature, the supernatants were diluted 1:5 in the mobile phase before injection of 10 µL diluted sample into the LC/MS/MS.

Determination of kinetic parameters of clopidogrel in HLMs with CYP2C19*1/*1 and CYP2C19*2/*2 genotypes

The kinetic parameters for the production of both 2-oxo-clopidogrel from clopidogrel and the clopidogrel-AM from 2-oxo-clopidogrel were evaluated in CYP2C19*1/*1 HLMs and CYP2C19*2/*2 HLMs. Clopidogrel or 2-oxo-clopidogrel at increasing concentrations (0, 0.5, 1, 5, 10, 50 and 100 µM) in incubation buffer (0.1 M potassium phosphate, pH 7.4) was added to samples containing 0.5 mg protein·mL⁻¹ microsomes with 5 mM NaF to inhibit esterases activity and 5 mM glutathione for 3 min at 37°C. Then, we added the NADPH-generating system and incubated them for 30 min at 37°C. The reaction was stopped and the clopidogrel-AM was stabilized by adding 30 mM BMAP in acetonitrile. After centrifugation at 10 000× g for 3 min, supernatants were diluted 1:5 in the mobile phase before injection of 10 µL sample into the LC/MS/MS system.

Inhibition of clopidogrel metabolism by PON1 and CYP isoform-specific inhibitors

The metabolism of clopidogrel was investigated at 37°C under linear conditions. We prepared 0.5 mg microsomal protein·mL⁻¹ CYP2C19-genotyped HLMs suspensions in reaction buffer (0.1 M phosphate potassium at pH 7.4). Samples were pre-incubated for 3 min at 37°C with 10 µM clopidogrel or 2-oxo-clopidogrel, 5 mM NaF, 5 mM glutathione, reaction buffer and CYP-specific inhibitors.

The specific CYP inhibitors (Dierks *et al.*, 2001) used in this study were 3 µM ketoconazole for CYP3A, 3 µM quinidine for CYP2D6, 5 µM sulfaphenazole for CYP2C9, 30 µM furafllyline for CYP1A2, 50 µM omeprazole for CYP2C19 and 1 µM 4-(4-chlorobenzyl) pyridine for CYP2B6 (Korhonen *et al.*, 2007; Gallemann *et al.*, 2010). The PON1 inhibitor used in this study was 1 mM EDTA (Gonzalvo *et al.*, 1997). The reaction was initiated by the addition of 100 µL of NADPH-generating system and solutions were incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 30 mM BMAP in acetonitrile. Samples were then analysed as described previously.

Inhibition of clopidogrel metabolism in human liver microsomes by monoclonal antibodies against CYP450s

Pooled HLMs (100 µg protein) were pre-incubated with monoclonal antibody (MAB)-CYP3A4 or MAB-CYP2C19 (from 0 to 10 µL) in ice for 20 min. We then added 10 µM 2-oxo-clopidogrel and 0.1 M NADPH-generating system in phosphate buffer (pH 7.4). After incubation for 30 min at 37°C, the samples were analysed as described previously.

Incubations with recombinant paraoxonase-1

Recombinant paraoxonase (rePON1) was expressed in *Escherichia coli* and isolated as described previously (Deakin *et al.*, 2007). Isolated rePON1 was stored in Tris buffer (50 mM Tris, pH 7.8, 20 mM CaCl₂ and 0.05% Tergitol). rePON1 activity was tested with phenylacetate as substrate. We incubated 0.1 M 2-oxo-clopidogrel with rePON1 (0 – 100 µg) for 20 min

in Tris buffer (50 mM Tris, pH 7.8, with 2 mM CaCl_2). Sample analysis was performed as described previously.

Paraoxonase activity

Phenylacetate is a well-known specific substrate for PON1 (Eckerson *et al.*, 1983; Smolen *et al.*, 1991). PON1 activity was measured as described previously (Blatter Garin *et al.*, 1994). Incubations of serum, supersomes or microsomal fractions with 4 mM phenylacetate in Tris buffer were performed at room temperature.

PON1 activity is reported as $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ for serum and $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ of protein for microsomal fractions and was calculated from the molar absorptivity coefficient of the phenol produced ($1310\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). One unit of arylesterase activity was defined as $1\text{ }\mu\text{mol}$ phenylacetate hydrolyzed min^{-1} . In order to correct for spontaneous substrate breakdown, we simultaneously ran blanks.

LC/MS/MS parameters

LC/MS/MS data were obtained from an Agilent 1100 Series LS system (Palo Alto, CA, USA) coupled with an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, Concord, Canada). Chromatography was performed on a Phenomenex Kinetex C18 analytical column ($50\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $2.6\text{ }\mu\text{m}$; Torrance, CA, USA) preceded by a $0.5\text{ }\mu\text{m}$ KrudKatcher ultra in-line filter.

Mobile phase A contained water and mobile phase B contained acetonitrile. Initial conditions were 95:5 (v/v⁻¹) mobile phase A : B. Following sample injection ($10\text{ }\mu\text{L}$), elution was performed by means of a gradient from 5 to 90% mobile phase B over 3 min, followed by 5% mobile phase B, held for 7 min. The column was then re-equilibrated to initial conditions. Mobile phase flow rate was maintained at $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, and chromatography was performed at 20°C . The mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with positive ion electrospray ionization. The MRM transitions were $322.1\rightarrow 212.1$, $338.1\rightarrow 183.1$ and $504.1\rightarrow 354.1$ for clopidogrel, 2-oxo-clopidogrel and the clopidogrel-AM respectively.

Statistical analysis

The results are presented as means of triplicate results $\pm$ SD. Differences between means were determined by Student's independent *t*-tests using SPSS version 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Graphic representations of data were created using GraphPad Prism version 4.0 software (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Paraoxonase activity in supersomes, pooled HLMs, CYP2C19*1/*1 HLMs and CYP2C19*2/*2 HLMs

PON1 activity (mean $\pm$ SD) was $295 \pm 28.5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2.01 \pm 0.1\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, $1.99 \pm 0.04\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ and $2.0 \pm 0.04\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ in human serum, pooled HLMs, CYP2C19*1/*1 HLMs and

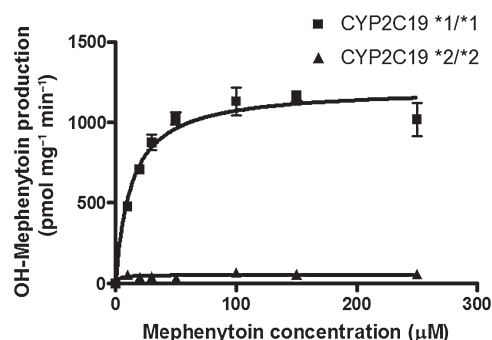


Figure 2

Kinetic analysis of OH-mephenytoin formation from mephenytoin in CYP2C19-genotyped human liver microsomes. Data are mean $\pm$ SD of three independent data points.

CYP2C19*2/*2 HLMs, respectively. No PON1 activity was detectable in any of the supersomes.

PON1 activity was high in serum and there was no difference in PON1 between any of the HLM groups.

CYP2C19 activity assessment in CYP2C19*1/*1 and CYP2C19*2/*2 HLMs

OH-mephenytoin from S-mephenytoin in CYP2C19*1/*1 HLMs was 20 times that in CYP2C19*2/*2 HLMs ($V_{\max} = 1212 \pm 31.3\text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$; CI95: 1147–1277 vs. $V_{\max} = 52.7 \pm 3.85\text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$; CI95: 44.7–60.7) as shown in Figure 2. These results confirm that there is a good correlation between genotype and CYP2C19 activity when S-mephenytoin is used as a probe drug.

Effect of the CYP2C19*2/*2 polymorphism on clopidogrel metabolism

Kinetic parameters of clopidogrel or 2-oxo-clopidogrel biotransformation were determined using HLMs genotyped for CYP2C19 (Figure 3). For both steps of the biotransformation of clopidogrel, $V_{\max}$ values were higher and K_m values were lower in CYP2C19*1/*1 HLMs than in CYP2C19*2/*2 HLMs. For the first step, CYP2C19*1/*1 HLMs had $V_{\max} = 2428 \pm 106.1\text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ and $K_m = 41.6 \pm 4.1\text{ }\mu\text{M}$, while CYP2C19*2/*2 HLMs had $V_{\max} = 2081 \pm 200.5\text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ and $K_m = 61.4 \pm 12\text{ }\mu\text{M}$. During transformation from 2-oxo-clopidogrel to clopidogrel-AM, $V_{\max}$ was higher and K_m was lower in CYP2C19*1/*1 HLMs than in CYP2C19*2/*2 genotype, respectively ($V_{\max} = 18.4 \pm 0.96\text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ vs. $4.1 \pm 0.08\text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; $K_m = 5.1 \pm 1.1\text{ }\mu\text{M}$ vs. $10.4 \pm 0.66\text{ }\mu\text{M}$). These findings imply that CYP2C19 played an important role in the two steps of the bioactivation of clopidogrel.

Effect of specific CYP-chemical inhibitors on clopidogrel metabolism

To assess the clopidogrel metabolic pathways, clopidogrel or 2-oxo-clopidogrel was incubated in the presence of specific CYP inhibitors (Figure 4). For the transformation of 2-oxo-clopidogrel to clopidogrel-AM, ketoconazole and CBP were the most potent inhibitors. Ketoconazole and CBP inhibited

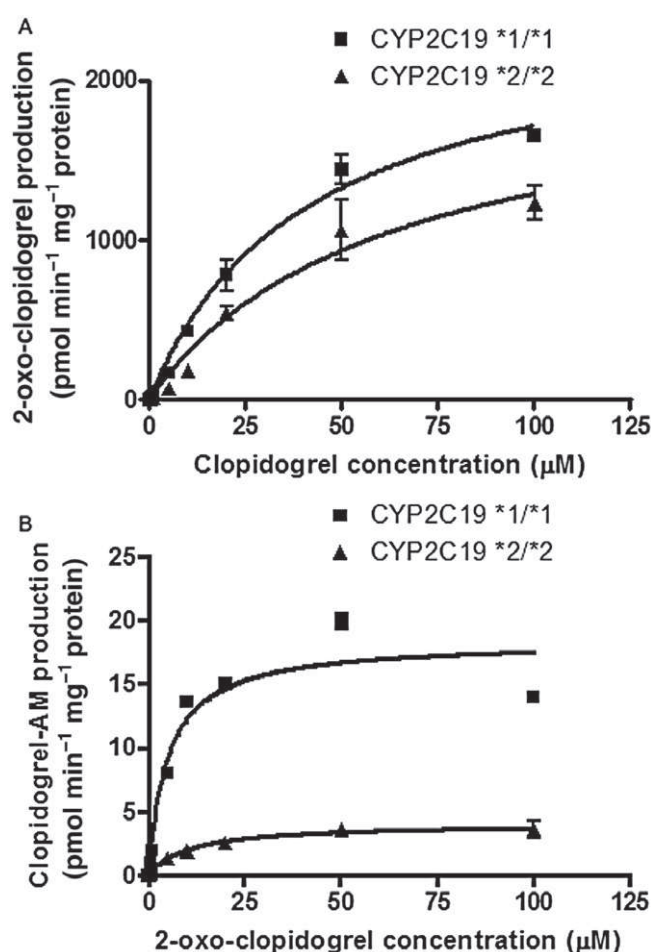


Figure 3

Kinetic analysis of 2-oxo-clopidogrel production from clopidogrel (A) and clopidogrel-AM production from 2-oxo-clopidogrel (B) in human liver microsomes (HLMs) with CYP2C19*1/*1 and CYP2C19*2/*2 genotypes. Data are mean $\pm$ SD of three independent data points.

clopidogrel-AM formation by $75 \pm 5\%$ and $72 \pm 4\%$, respectively, in pooled HLMs. Omeprazole and EDTA inhibited the second pathway by $69 \pm 9\%$ and $51 \pm 3\%$, respectively. For the transformation of clopidogrel to clopidogrel-AM representing the complete metabolic pathway, ketoconazole and CBP were also potent inhibitors with $82 \pm 0.7\%$ and $94 \pm 0.2\%$ inhibition, respectively. Omeprazole and sulfaphenazole inhibited this pathway by $55 \pm 5.8\%$ and $66 \pm 5.5\%$, respectively. EDTA inhibited the complete metabolism in pooled HLMs by $35 \pm 2\%$.

None of these CYP-specific inhibitors affected PON1 activity when tested with phenylacetate, whereas EDTA inhibited the production of phenol by $67 \pm 9\%$ (data not shown).

Effect of antibodies against CYP3A4 and CYP2C19 on 2-oxo-clopidogrel metabolism

The effect of MAB against CYP3A4 and CYP2C19 on the second step of clopidogrel metabolism was investigated in

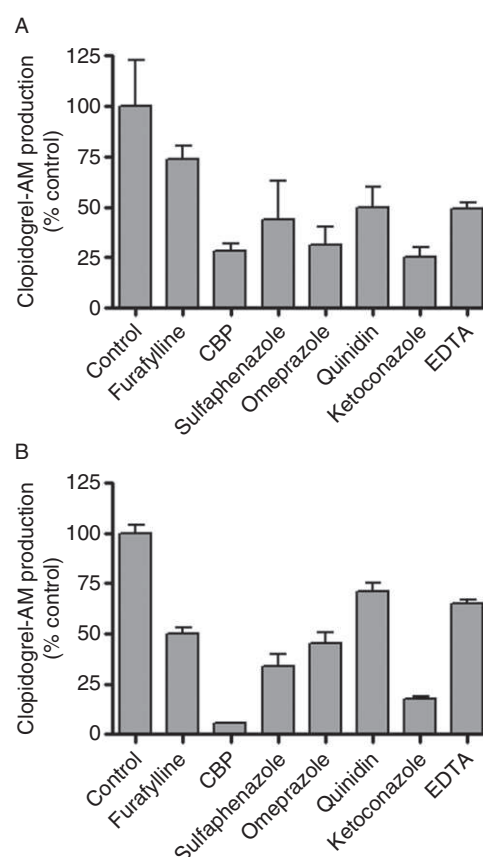


Figure 4

Inhibitory effects of cytochrome P450 (CYP) and paraoxonase (PON) inhibitors on the metabolic pathways from 2-oxo-clopidogrel to clopidogrel-AM (A) and from clopidogrel to clopidogrel-AM (B) in human liver microsomes (HLMs) with 10 μM clopidogrel or 10 μM 2-oxo-clopidogrel. Each column represents the mean $\pm$ SD of three independent data points.

pooled HLMs. When 10 μL of each MAB was incubated with 100 μg microsomal proteins and 0.1 M 2-oxo-clopidogrel, clopidogrel-AM production decreased by $9 \pm 3\%$ ($P < 0.05$) for MAB-CYP2C19 and $49 \pm 4\%$ ($P < 0.005$) for MAB-CYP3A4. This confirms that CYP2C19 and CYP3A4 are involved in the production of clopidogrel-AM from 2-oxo-clopidogrel, and that CYP3A4 is especially important in this process (Figure 5).

Clopidogrel and 2-oxo-clopidogrel metabolism in human liver microsomes and in human serum

Clopidogrel and 2-oxo-clopidogrel were incubated with human serum and HLMs. PON1 activity in serum was adjusted to that of the HLMs by an appropriate dilution in phosphate buffer, pH 7.4. We measured both 2-oxo-clopidogrel production from clopidogrel and clopidogrel-AM production from 2-oxo-clopidogrel. Clopidogrel metabolites from both steps were only produced at clinically relevant concentrations in HLMs. In the first step, 2-oxo-clopidogrel production from 100 μM clopidogrel in HLMs was more than

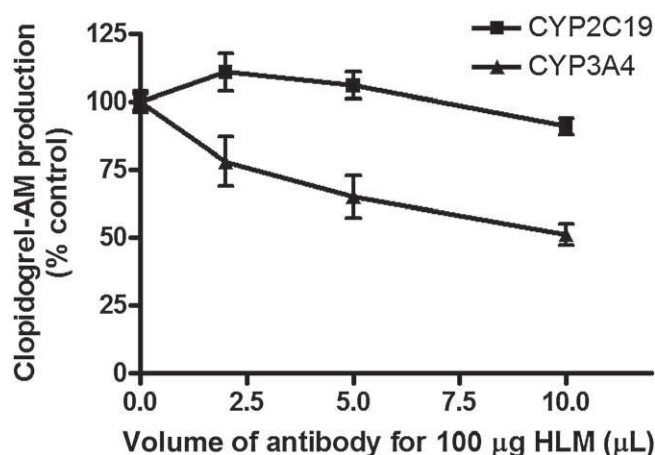


Figure 5

Active metabolite production from 2-oxo-clopidogrel 10 µM in human liver microsomes (HLM) incubated with increasing quantities of anti-CYP3A4 and anti-CYP2C19 antibodies. Data are mean $\pm$ SD of three independent data points.

180 times that in serum. Clopidogrel-AM production from 100 µM 2-oxo-clopidogrel in HLMs was about 500 times that in serum (Figure 6).

These data are consistent with the major involvement of CYPs in clopidogrel metabolism with a limited contribution of PON1.

2-Oxo-clopidogrel metabolism using recombinant PON1

PON1 activity of recombinant (re)PON1 was tested with phenylacetate as substrate and 2-oxo-clopidogrel was incubated with rePON1. Clopidogrel-AM was not detected in these conditions even though PON1 activity in rePON was very high (35 kU·mg⁻¹ protein) (Figure 7).

Discussion and conclusions

PON1 is unlikely to be involved in the bioactivation of clopidogrel. In fact, the amount of clopidogrel-AM was higher in CYP2C19*1/*1 HLMs than in CYP2C19*2/*2 HLMs, while PON1 activity was similar in both HLMs (Figure 3). Moreover, no significant clopidogrel-AM production was observed using human serum with high PON1 activity, nor was it produced when incubated with rePON1. When PON1 was inhibited by EDTA, only a weak inhibition of clopidogrel-AM production was observed. However, significant inhibition of clopidogrel-AM production was observed when CYP-specific inhibitors of CYP2B6, CYP3A and CYP2C19 were used. The involvement of CYP3A in clopidogrel metabolism was confirmed by a dose-dependent inhibition of clopidogrel-AM production with antibodies against CYP3A. With antibodies against CYP2C19, the inhibition of clopidogrel-AM production was seen only with a high dose of antibody. Kazui *et al.* reported that supersomes have different contributions to clopidogrel metabolism (Kazui *et al.*, 2010). In our study,

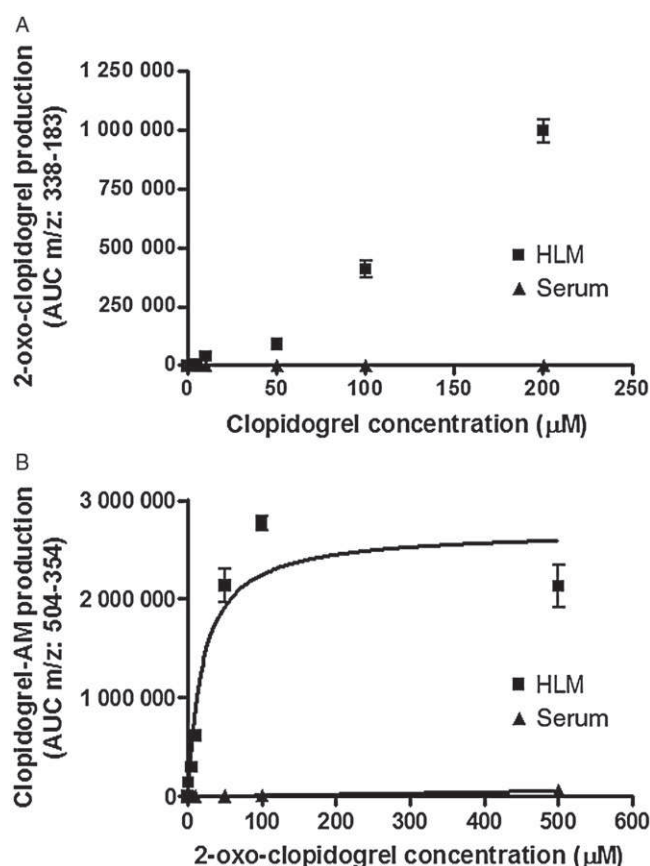


Figure 6

Kinetic analysis of 2-oxo-clopidogrel production from clopidogrel (A) and clopidogrel-AM production from 2-oxo-clopidogrel (B) in human serum and pooled human liver microsomes (HLMs) with adjusted paraoxonase 1 (PON1) activity. Data are mean $\pm$ SD of three independent data points.

similar data were obtained for the involvement of CYPs in clopidogrel metabolism whereas no PON1 activity was detected in the supersomes tested. Our results also contrast with a recent report of primary mediation of the second step of clopidogrel bioactivation by PON1 (Bouman *et al.*, 2011). Our data do agree, however, with other recent *in vitro* (Dansette *et al.*, 2011) and *in vivo* data (Fontana *et al.*, 2011; Hulot *et al.*, 2011; Sibbing *et al.*, 2011; Trenk *et al.*, 2011). For example, Hulot *et al.* found no significant association between PON1 Q192R or L55M and clopidogrel-AM formation or the antiplatelet response to clopidogrel by using a stereoselective method that provided good resolution between thiol isomers (Hulot *et al.*, 2011).

Furthermore, incubations of 2-oxo-clopidogrel with HLMs, in the absence of the NADPH required as a cofactor for CYP-dependent activities, led to the formation of the non-active clopidogrel metabolite isomer (Dansette *et al.*, 2011). In this study, PON1 was clearly involved in clopidogrel metabolism, but the resulting metabolite was a minor inactive isomer compared with the active metabolite produced by cytochromes P450. Two metabolic pathways were proposed for the opening of the thiolactone ring of 2-oxo-clopidogrel.

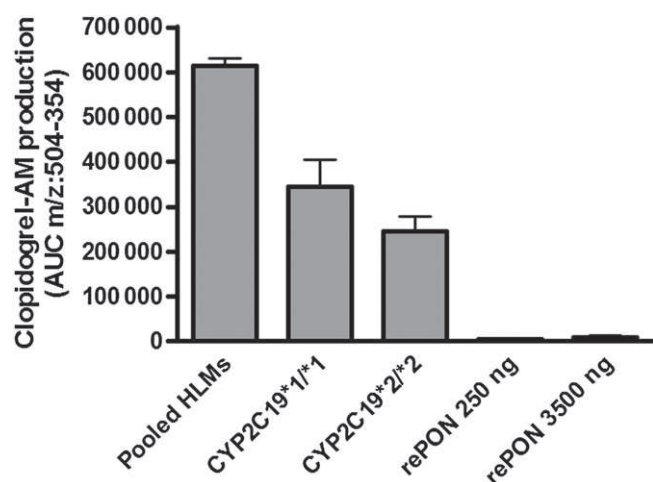


Figure 7

Comparison of the production of clopidogrel-AM in pooled human liver microsomes (HLMs), HLMs with CYP2C19*1/*1 and CYP2C19*2/*2 genotypes, and recombinant PON1 (rePON) at two different concentrations. Data are mean $\pm$ SD of three independent data points.

A major metabolic pathway was CYP450 dependant and leads to a cis thiol isomer whereas a minor pathway was the hydrolysis of 2-oxo-clopidogrel mediated probably by PON1 leading to the endo thiol isomer. Therefore, it is suggested that the analytical method used by Bouman *et al.* (2011) was not sufficiently selective to distinguish among the different isomers of the active metabolite, and that it preferentially detected the inactive metabolite produced by the PON1. Moreover, clopidogrel and 2-oxo clopidogrel concentrations used in the *in vitro* study from Bouman *et al.* were 10- to 100-fold higher compared with the commonly used concentrations *in vitro* (1–10 μ M), which probably allowed these authors to detect high levels of the inactive isomer from the PON1 enzyme. In our study, a non-stereoselective method was used for clopidogrel-AM determination. Therefore, the thiol isomers were not separated, which probably explains the weak inhibition observed with EDTA. In fact, EDTA inhibited the production of the minor non-active clopidogrel metabolite isomer induced by PON1.

Clinical differences between PON1 gene variants observed by Bouman *et al.* may be due to a clopidogrel-unrelated mechanism as suggested by Wheeler *et al.* (2004). In fact, PON1 plays an important role in atherogenesis by protecting low-density lipoprotein from oxidation, which may partly explain the trend towards an association of the PON1-Q192R variant with higher cardiovascular risk.

Drug-drug interactions involving CYPs, like those between clopidogrel and proton pump inhibitors, have been associated with a high risk of acute thrombotic events (Gilard *et al.*, 2008; Siller-Matula *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2009). Even though clopidogrel has been used for many years, its metabolism is not still completely understood. By exploring the decline in clopidogrel levels in plasma or by measuring the formation of 2-oxo-clopidogrel, initial investigations into

this topic have shown that different CYPs are involved in clopidogrel metabolism (Savi *et al.*, 1994; Clarke and Waskell, 2003).

However, these measures are only partly representative of its complete metabolism. Clopidogrel is mainly biotransformed by CYP3A4, 2C9, 2C19 and 2B6 to the pharmacologically active metabolite (Kazui *et al.*, 2010). Savi *et al.* have shown that the subfamily CYP1A is involved in the bioactivation of clopidogrel by measuring the anti-aggregating activity of clopidogrel (Savi *et al.*, 1994). We confirmed this latter finding by demonstrating that furafylline inhibited the metabolism of clopidogrel. The results of the CLARITY-TIMI 28-randomized clinical trial provided further evidence of CYP1A involvement in clopidogrel metabolism. This trial involved only smokers with myocardial infarction who were classified according to their smoking intensity. The results indicated that smoking, which induces CYP1A2, enhances the beneficial effect of clopidogrel on angiographic and clinical outcomes like myocardial infarction or urgent revascularization (Desai *et al.*, 2009). CYP3A was also described as a principal cytochrome involved in the metabolism of clopidogrel because of the dose-dependent inhibition of the anti-aggregating properties of clopidogrel on platelets in the presence of atorvastatin, a CYP3A substrate (Clarke and Waskell, 2003; Lau *et al.*, 2003).

We found CYP2C19 to be involved in both steps of clopidogrel bioactivation and this could explain the widely debated reports of interactions between clopidogrel and proton pump inhibitors. In the present study, the decrease in clopidogrel-AM production in HLMs with the CYP2C19*2/*2 genotype clearly demonstrated the involvement of CYP2C19 in clopidogrel bioactivation.

Using CYP specific chemical inhibitors in HLMs, we demonstrated that CYP3A plays an important role in clopidogrel metabolism as do CYP2B6 and CYP2C19. It is well known that there is no correlation between CYP3A4 and CYP3A5 alleles and enzymes activity. Indeed, Oneda *et al.* showed a weak correlation between CYP3A phenotypes, measured using midazolam as a substrate, and CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 variants. In a meta-analysis from seven clinical trials, the correlation between CYP3A4/5 alleles and midazolam disposition was assessed. There was no difference in midazolam disposition between different CYP3A4/5 genotypes. The authors concluded that environmental factors explain the majority of CYP3A activity variations. Therefore, a correlation between the response to clopidogrel and CYP3A activity should be performed by phenotyping with a specific probe drug such as midazolam (Oneda *et al.*, 2009).

Farid *et al.* (2007) showed a significant decrease in the AUC and C_{max} of the clopidogrel active metabolite (29% and 61%, respectively) during the maintaining dose in the presence of ketoconazole. Ketoconazole also reduced the inhibition of platelet aggregation by 28% and 33% during the loading and maintaining dose, respectively (Farid *et al.*, 2007). Moreover, Lau *et al.* have shown, by measuring the platelet aggregation, that the addition of the CYP3A4 substrate atorvastatin to clopidogrel produced a dose-dependent reduction of the anti-aggregating effect of clopidogrel in patients with a coronary stent ($P < 0.0001$) (Lau *et al.*, 2004a). In another study, the same group showed an inverse correlation between platelet aggregation and CYP3A4 activity

($P = 0.003$) (Lau *et al.*, 2004b). These data support an involvement of CYP3A in clopidogrel metabolism.

In the liver, CYP3A represents about 40% of all cytochromes and is also present in the intestine. Other important CYP families are CYP2C and CYP1A2 (Shimada *et al.*, 1994). Given the results observed for clopidogrel metabolism where CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 and CYP3A4/5 were the primary CYP involved, the effect of a deficiency, inhibition or induction of any one of these CYP might affect biological and clinical responses to clopidogrel.

In conclusion, we confirmed with this *in vitro* study that 2-oxo-clopidogrel is bioactivated mainly by CYP3A4/5, CYP2B6, and to a lesser extent by CYP2C19 and CYP2C9. No significant involvement of PON1 in the bioactivation of clopidogrel *in vitro* was observed at clinically relevant concentrations. In fact, the production of clopidogrel-AM in HLMS was more than 100 times that in serum and there was no observable production in rePON1. Moreover, the inhibition of clopidogrel metabolism by CYP-specific inhibitors is consistent with a predominant role of CYPs in its metabolism.

Acknowledgements

The authors would like to thank Sara Deakin for technical assistance.

Conflict of interest

None of the authors declare any conflict of interest.

References

- Ancrenaz V, Daali Y, Fontana P, Besson M, Samer C, Dayer P *et al.* (2010). Impact of genetic polymorphisms and drug-drug interactions on clopidogrel and prasugrel response variability. *Curr Drug Metab* 11: 667–677.
- Blatter Garin MC, Abbott C, Messmer S, Mackness M, Durrington P, Pometta D *et al.* (1994). Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J* 304: 549–554.
- Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C *et al.* (2011). Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* 17: 110–116.
- Clarke TA, Waskell LA (2003). The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 31: 53–59.
- Combescur C, Fontana P, Mallouk N, Berdague P, Labruyere C, Barazer I *et al.* (2010). Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 8: 923–933.
- Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D (2011). Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. *Nat Med* 17: 1040–1041. Author reply 1042–1044.
- Deakin S, Guernier S, James RW (2007). Pharmacogenetic interaction between paraoxonase-1 gene promoter polymorphism C-107T and statin. *Pharmacogenet Genomics* 17: 451–457.
- Desai NR, Mega JL, Jiang S, Cannon CP, Sabatine MS (2009). Interaction between cigarette smoking and clinical benefit of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 53: 1273–1278.
- Dierks EA, Stams KR, Lim HK, Cornelius G, Zhang H, Ball SE (2001). A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an *in vitro* cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 29: 23–29.
- Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 35: 1126–1138.
- Farid NA, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS 2nd, Brandt JT *et al.* (2007). Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther* 81: 735–741.
- Fontana P, Hulot JS, De Moerloose P, Gaussem P (2007). Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost* 5: 2153–2155.
- Fontana P, James R, Barazer I, Berdague P, Schved JF, Rebsamen M *et al.* (2011). Relationship between paraoxonase-1 activity, its Q192R genetic variant and clopidogrel responsiveness in the ADRIE study. *J Thromb Haemost* 9: 1664–1666.
- Ford NF (2009). Clopidogrel resistance: pharmacokinetic or pharmacogenetic? *J Clin Pharmacol* 49: 506–512.
- Galleman D, Wimmer E, Hofer CC, Freisleben A, Fluck M, Ladstetter B *et al.* (2010). *In vitro* characterization of sarizotan metabolism: hepatic clearance, identification and characterization of metabolites, drug-metabolizing enzyme identification, and evaluation of cytochrome p450 inhibition. *Drug Metab Dispos* 38: 905–916.
- Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G *et al.* (2008). Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *J Am Coll Cardiol* 51: 256–260.
- Gonzalvo MC, Gil F, Hernandez AF, Villanueva E, Pla A (1997). Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact* 105: 169–179.
- Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM (2003). Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 107: 2908–2913.
- Gurbel PA, Antonino MJ, Tantry US (2009). Recent developments in clopidogrel pharmacology and their relation to clinical outcomes. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5: 989–1004.
- Hagihara K, Nishiya Y, Kurihara A, Kazui M, Farid NA, Ikeda T (2008). Comparison of human cytochrome P450 inhibition by the thienopyridines prasugrel, clopidogrel, and ticlopidine. *Drug Metab Pharmacokinet* 23: 412–420.
- Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C *et al.* (2006). Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 108: 2244–2247.

- Hulot JS, Collet JP, Cayla G, Silvain J, Allanin F, Bellemain-Appaix A *et al.* (2011). CYP2C19 but not PON1 Genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. *Circ Cardiovasc Interv* 4: 422–428.
- Juurink DN (2009). Proton pump inhibitors and clopidogrel: putting the interaction in perspective. *Circulation* 120: 2310–2312.
- Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O *et al.* (2010). Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 38: 92–99.
- Kolansky DM, Klugherz BD, Curran SC, Herrmann HC, Magness K, Wilensky RL *et al.* (2000). Combination therapy with clopidogrel and aspirin after coronary stenting. *Catheter Cardiovasc Interv* 50: 276–279.
- Korhonen LE, Turpeinen M, Rahnasto M, Wittekindt C, Poso A, Pelkonen O *et al.* (2007). New potent and selective cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. *Br J Pharmacol* 150: 932–942.
- Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS *et al.* (2003). Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 107: 32–37.
- Lau WC, Carville DG, Bates ER (2004a). Clinical significance of the atorvastatin-clopidogrel drug-drug interaction. *Circulation* 110: e66–e67. Author reply e66–e67.
- Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG *et al.* (2004b). Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* 109: 166–171.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN (1991). Substrate specificity of human serum paraoxonase. *Biochem Soc Trans* 19: 304S.
- Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT *et al.* (2009). Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 360: 354–362.
- Oneda B, Crettol S, Jaquenoud Sirot E, Bochud M, Ansermot N, Eap CB (2009). The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenet Genomics* 19: 877–883.
- Quinn MJ, Fitzgerald DJ (1999). Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation* 100: 1667–1672.
- Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC, Maffrand JP, Berger Y *et al.* (1994). The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 72: 313–317.
- Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP *et al.* (2000). Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 84: 891–896.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 414–423.
- Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB *et al.* (2009). Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 302: 849–857.
- Sibbing D, Morath T, Stegherr J, Braun S, Vogt W, Hadamitzky M *et al.* (2009). Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost* 101: 714–719.
- Sibbing D, Koch W, Massberg S, Byrne RA, Mehilli J, Schulz S *et al.* (2011). No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J* 32: 1605–1613.
- Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B (2009). Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J* 157: 148. e1–5.
- Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N *et al.* (2009). Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 360: 363–375.
- Smolen A, Eckerson HW, Gan KN, Hailat N, La Du BN (1991). Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 19: 107–112.
- Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Zolk O, Valina CM, Stratz C *et al.* (2011). Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *Circ Cardiovasc Genet* 4: 429–436.
- Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J (2004). Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363: 689–695.

Etude d'interaction in vitro entre le prasugrel et le ritonavir

Résumé

Comme indiqué dans le chapitre précédent, le prasugrel est une pro-drogue transformée par les carboxylesterases hépatiques pour former un composé inactif intermédiaire qui est lui-même ensuite métabolisé par les CYPs 3A4 et 2B6 principalement.

L'étude du métabolisme *in vitro* du prasugrel a été réalisée durant cette thèse. Des incubations de prasugrel en présence de microsomes hépatiques humains et de CYPs recombinants (supersomes) ont été effectuées pour déterminer quels CYPs étaient les plus impliqués dans le métabolisme du prasugrel et pour déterminer si des interactions médicamenteuses étaient possibles avec cette nouvelle molécule.

La constante de Michaelis-Menten a été déterminée en incubant différentes concentrations de prasugrel dans les microsomes pendant 15 minutes. La valeur de K_m trouvée a été $110 \pm 23 \mu M$. Les résultats des expériences *in vitro* indiquent une participation majeure des CYP2B6 et CYP3A dans la bioactivation du prasugrel en son métabolite actif.

Le ritonavir est un antirétroviral utilisé aujourd'hui principalement comme booster des autres traitements antirétroviraux de part son action inhibitrice sur le CYP3A. Le ritonavir a également été décrit comme inhibiteur du CYP2B6 *in vitro*. Une interaction pharmacocinétique entre le prasugrel et le ritonavir *via* l'inhibition par le ritonavir des CYPs impliqués dans la bioactivation du prasugrel paraît donc possible.

Cette interaction pourrait mener à une diminution de la production du métabolite actif du prasugrel et par conséquent une réduction de l'effet antiagrégant plaquettaire du prasugrel.

Les interactions médicamenteuses néfastes sont une des raisons majeures d'effets indésirables ou d'inefficacité thérapeutique. Elles représentent environ 16% des hospitalisations pour effets indésirables et 1% de toutes les admissions à l'hôpital (1, 2).

Les interactions médicamenteuses sont classées en deux catégories: les interactions pharmacodynamiques entre deux molécules qui ont des effets pharmacologiques ou indésirables similaires et les interactions pharmacocinétiques qui dépendent des propriétés pharmacochimiques de la molécule et peuvent intervenir lors de l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'élimination. La majeure partie des interactions pharmacocinétiques cliniquement pertinentes ont lieu au niveau du métabolisme.

Le but de ce travail était donc d'évaluer *in vitro* l'interaction pharmacocinétique potentielle entre le prasugrel et le ritonavir à l'aide de microsomes hépatiques humains.

Article 3 : Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug–drug interaction in HIV patients

Y. Daali, V. Ancrenaz, M. Bosilkovska, P. Dayer, J. Desmeules. Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug–drug interaction in HIV patients (2011). *Metabolism Clinical and Experimental* ; 60 :1584-1589.

Available at www.sciencedirect.com

Metabolism

www.metabolismjournal.com

Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug–drug interaction in HIV patients

Youssef Daali*, Virginie Ancrenaz, Marija Bosilkovska, Pierre Dayer, Jules Desmeules

Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2011

Accepted 22 March 2011

ABSTRACT

Prasugrel is an antiplatelet prodrug used in patients with acute coronary syndrome. Prasugrel is mainly bioactivated by cytochromes P450 3A4/5 and CYP2B6. HIV patients are at risk of cardiovascular disease, and the protease inhibitor ritonavir is a potent inhibitor of these 2 CYPs. The aim of this in vitro study was to determine the impact of ritonavir in prasugrel metabolism. Human liver microsomes (HLMs) and recombinant microsomes were used to identify the enzymes responsible for the bioactivation of prasugrel. Prasugrel concentrations of 5 to 200 μ M were used for K_m determination. Inhibition by ritonavir was characterized using HLMs at concentrations of 0.1 to 30 μ M. Prasugrel active metabolite determination was performed with a validated liquid chromatography-mass spectrometry method. Using recombinant microsomes, prasugrel biotransformation was mainly performed by CYP2B6, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, and CYP3A5. With specific inhibitors of CYP3A, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19, active metabolite production was decreased by $38\% \pm 15\%$ with 4-(4-chlorobenzyl)pyridine (CYP2B6 inhibitor) and by $45 \pm 16\%$ with ketoconazole (CYP3A inhibitor). The K_m value for prasugrel metabolism in HLMs was determined to be 92.5 μ M. Ritonavir at 0.1 to 30 μ M was shown to be a potent dose-dependent inhibitor of prasugrel. In this in-vitro study, we found a potent inhibition of prasugrel bioactivation by ritonavir compared to the specific inhibitors of CYP3A and CYP2B6 due to the simultaneous inhibition of CYP2B6 and CYP3A by ritonavir. This finding suggests a potential significant drug–drug interaction between these two drugs.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular diseases constitute more than 10% of deaths in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients [1], and recent studies have shown that cardiovascular diseases were one of the most common complications observed in HIV-infected

patients [2,3]. An associative risk between HIV infection and coronary artery disease was suspected through an inflammatory process of atherosclerosis [4]. Moreover, metabolic side effects associated with antiretroviral therapy, including hypercholesterolemia, hyperglyceridemia and lipodystrophy syndrome, enhance the risk of cardiovascular events in HIV population [5].

Funding: This work was supported by the APSI Department of Geneva University Hospitals.

Disclosure statement: None of the authors declares any conflict of interest regarding this manuscript.

Author contributions: Youssef Daali: -Research design -Analytical methods -Data analysis -Writing manuscript Virginie Ancrenaz: -Conducted experiments -Analytical methods -Data analysis -Writing manuscript Marija Bosilkovska: -Conducted experiments -Data analysis Pierre Dayer: -Research design -Writing manuscript Jules Desmeules: -Research design -Data analysis -Writing manuscript.

* Corresponding author. Tel.: +41 (0)22 3795430; fax: +41 (0)22 3829945.

E-mail address: youssef.daali@hcuge.ch (Y. Daali).

0026-0495/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.metabol.2011.03.015

Cohort study compared acute myocardial infarction and cardiovascular events rates in HIV patients with non-HIV patients. It was observed that acute myocardial infarction rates were higher in HIV patients (relative risk [RR] = 1.75; $P < .0001$) with a higher frequency in women (12.71 vs. 4.88 to control, per 1000 person-years) [6]. Therefore, cardiovascular prevention is required in more than one-half of HIV-infected patients [7].

Ritonavir is an antiretroviral agent used in combination with other antiretroviral drugs in patients with HIV infection. Ritonavir is a peptidomimetic inhibitor of both HIV-1 and HIV-2 proteases, and is used as a booster to increase the plasma concentrations of other antiretroviral drugs by its potent CYP3A inhibition. It is known to both induce and inhibit CYP3A [8,9]. Ritonavir also showed an inhibitory potency for CYP2B6 [10].

Prasugrel is a thienopyridine antiplatelet agent recently commercialized and used for prevention of atherothrombotic events in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention [11]. Wiviott et al. showed in a TRITON-TIMI 38 trial that prasugrel treatment was associated with significantly reduced rates of ischemic events (9.9% vs. 12.1%, $P < .001$, number needed to treat [NNT] = 45) compared with clopidogrel. However, an increased risk of major bleeding, including fatal bleeding (RR = 0.4 vs. 0.1, $p = 0.002$, number needed to harm [NNH] = 333), was observed [12].

Prasugrel is a prodrug transformed by hepatic carboxylesterases to form an inactive intermediate compound, which is further bioactivated by different CYPs [13] (Fig. 1). Initial studies have suggested that CYP3A is the main CYP involved in the bioactivation of prasugrel. Using recombinant CYPs, CYP3A produced the highest amount of active metabolite (AM) with a minor participation of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6. Moreover, the presence of ketoconazole, a CYP3A inhibitor, reduced the formation of prasugrel AM by 33% to 86% [14]. However, in a crossover randomized study, Farid et al. assessed the platelet aggregation in healthy volunteers receiving a 60-mg LD or a 15-mg MD of prasugrel with or without 400 mg ketoconazole. Ketoconazole reduced the maximum plasma concentration of prasugrel AM, but did not affect its AUC nor the antiplatelet effect [15]. The reason for this contradiction may be related to the involvement of other minor metabolic pathways (CYP2B6, CYP2C9, and/or CYP2C19) in prasugrel bioactivation when CYP3A activity is reduced. Considering the absence of studies evaluating drug–drug interaction with a multiple CYP inhibitor such as ritonavir, we investigated the effect of ritonavir on prasugrel bioactivation in vitro.

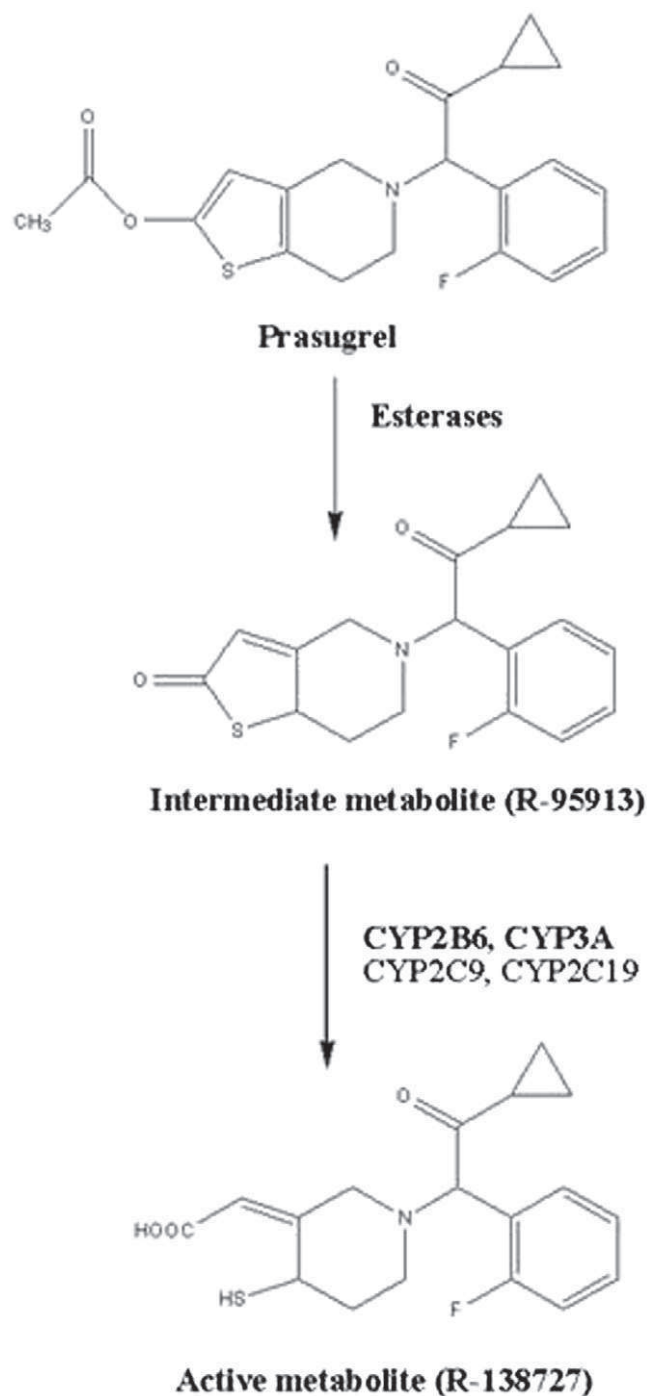


Fig. 1 – Structures of prasugrel, intermediate oxo-prasugrel metabolite, and prasugrel AM.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Human liver microsomes (HLMs) were purchased from BD Gentest. Prasugrel was obtained from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada). Furaflavone was obtained from Salford Ultrafine Chemicals and Research (Manchester, England). Sulfaphenazole was donated by Ciba-Geigy (Basel, Switzerland), and quinidine sulphate by the Pharmacy of

Geneva University Hospitals. Ketoconazole, 2-bromo-3-methoxyacetophenone (BMAP), omeprazole, 4-(4-chlorobenzyl)pyridine (CBP), and the constituents of the NADPH-generating system (NADP⁺, glucose-6-phosphate, and glucose-6-phosphate dehydrogenase) were purchased from Sigma (Buchs, Switzerland). High-performance liquid chromatography (HPLC) grade acetonitrile and methanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany), as were the phosphate potassium reagents used for the preparation of reaction buffer.

Ultrapure water was supplied by a Milli-Q purification unit from Millipore (Bedford, MA, US). All stock solutions were prepared in methanol at a concentration of 1 mg/mL and were stored at -20°C. The intermediate solutions were diluted from stock solutions with the reaction buffer.

2.2. Methods

2.2.1. Determination of the enzyme kinetic parameters for the formation of AM of prasugrel in recombinant CYP microsomes
The assays were performed with Supersomes of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5. Incubates contained CYP450 at 50 pmol/mL, prasugrel at varied concentrations (5, 20, 40, 80, 125, and 200 μ M), and glutathione 5 mM completed with potassium phosphate buffer until 50 μ L. After a preincubation of 3 min at 37°C, the reaction was initiated with a NADPH-generating system (NADP 0.4 mM, isocitrate 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, and isocitrate dehydrogenase 0.4 IU/mL in reaction buffer). Incubations were performed for 15 min at 37°C, and BMAP in acetonitrile was added to stop the reaction and to stabilize the AM of prasugrel. Clopidogrel at a final concentration of 0.1 μ g/mL was added as the internal standard (IS). The incubates were centrifuged for 10 min at 10 000 g and diluted 5-fold in the mobile phase before injection of 15 μ L in a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) system for analysis.

2.2.2. Determination of the enzyme kinetic parameters for the formation of AM of prasugrel in HLMs

All incubations were conducted under linear rate conditions. Incubates contained HLMs (0.5 mg protein/mL), prasugrel at concentrations of 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150, and 175 μ M, glutathione 5 mM, and potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Each sample was preincubated at 37°C for 3 min before addition of the NADPH-generating system (NADP 0.4 mM, isocitrate 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, and isocitrate dehydrogenase 0.4 IU/mL in reaction buffer) and incubated at 37°C for 15 min. After incubation, 15 mM BMAP in acetonitrile was added to each sample in ice to stop the reaction and to derivatize the thiol group of the prasugrel AM. Clopidogrel at a final concentration of 0.1 μ g/mL was added as the IS. The samples were then centrifuged for 3 min at 10 000 g, and each sample was diluted 5-fold in the mobile phase before injection of 15 μ L in the LC-MS system.

2.2.3 In vitro inhibition of bupropion metabolism by ritonavir

All incubations were conducted under linear rate conditions. The incubation mixtures containing microsomes (0.5 mg/mL), glutathione (5 mM), potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), ritonavir at varied concentrations and bupropion at 20, 100, 200 and 500 μ M were performed following the same procedure as described for the determination of the enzyme kinetic parameters in HLMs.

2.2.4 In vitro inhibition of prasugrel biotransformation using specific inhibitors or ritonavir in HLMs

All incubations were conducted under linear rate conditions. The incubation mixtures containing microsomes (0.5 mg/mL),

CYP-specific inhibitors or ritonavir at varied concentrations, prasugrel (10 μ M) glutathione (5 mM), and potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) were performed following the same procedure as described for the determination of the enzyme kinetic parameters in HLMs.

2.2.5. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LC-MS data were obtained from an Agilent 1100 Series LS system (Agilent, Palo Alto, US) coupled with an Esquire 3000 mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, PA, US). A SUPELCO C18 column (5 μ m $\times$ 2.1 mm $\times$ 150 mm, Waters Company, US) with a precolumn composed by the same stationary phase (5 μ m $\times$ 2.1 mm $\times$ 20 mm) were used. The LC conditions were ambient temperature and a 12-min gradient of A = ammonium formate at 20 mM and B = acetonitrile at 300 μ L/min with an injection volume of 15 μ L. Detection was performed using an electrospray source (ESI) in positive ionization mode with the following conditions: capillary = 4200 V, skimmer = 40 V, capillary exit = 136 V, trap drive = 40, lens 1 = -4 V, lens 2 = -55 V, nebulizer = 50 psi, dry gas = 10 L/min, and dry temperature = 350°C.

Quantification was performed in MS/MS mode using the following transitions: 332.1 $\rightarrow$ 177.1 for the intermediate oxo-prasugrel and 498.1 $\rightarrow$ 348.1 for the derivatized AM.

2.2.6. Data analysis

Each assay was performed in triplicate. The results are presented throughout as means of 3 values, and $\pm$ SD were calculated for each value. Kinetic parameters of prasugrel bioactivation were calculated according to the Michaelis-Menten equation (GraphPad Prism version 4, CA, US). Statistical differences were determined by Student's t-test, and the level of significance was set at * P < .05, ** P < .01, or *** P < .001.

3. Results

3.1. Identification of cytochromes involved in the bioactivation of prasugrel

The prasugrel AM formation over a range of prasugrel concentrations (5–175 μ M) was first determined in incubations containing HLMs. The apparent K_m value was 92.5 μ M (Fig. 2).

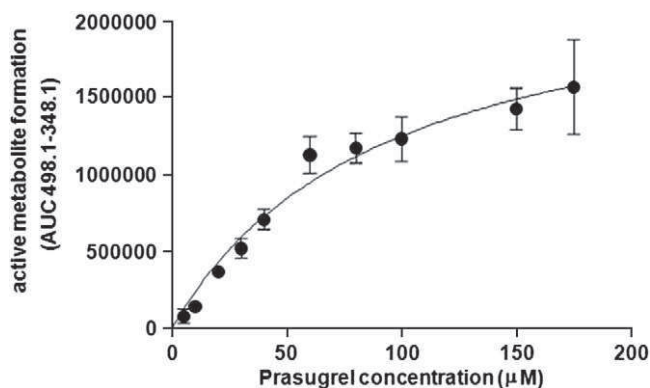


Fig. 2 – Michaelis-Menten presentation for the prasugrel AM formation versus the concentration of prasugrel in HLMs.

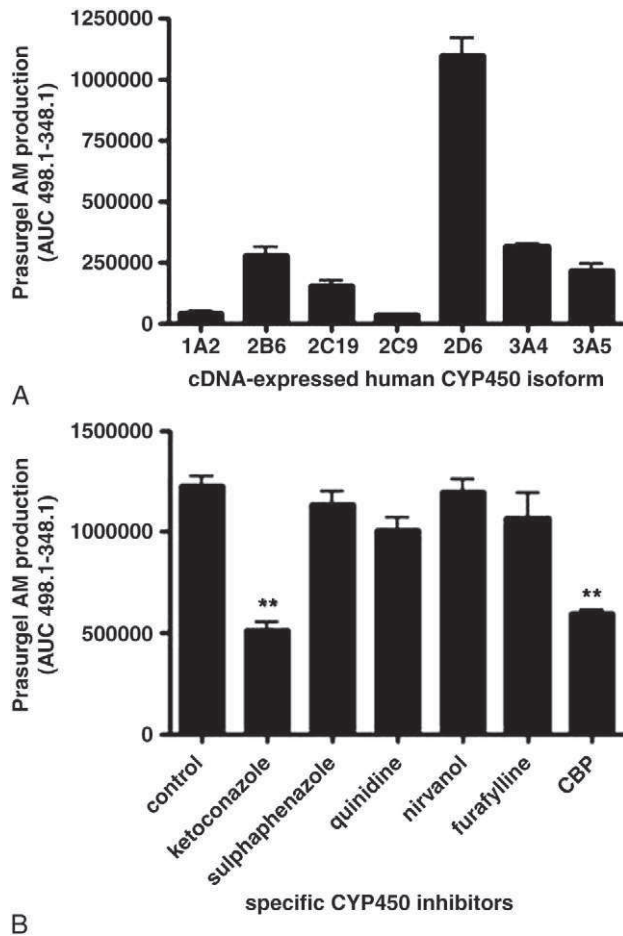


Fig. 3 – A. Prasugrel AM production mediated by cDNA-expressed CYPs. B. Effect of specific CYP450 isoform inhibitors on the production of the prasugrel AM in HLMs. ** $P < .01$.

Bioactivation of prasugrel using recombinant human supersomes was also evaluated after incubations containing $10 \mu\text{M}$ of prasugrel. The highest production of prasugrel AM was observed with CYP2D6, followed by CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5 and CYP2C19; neither CYP2C9 nor CYP1A2 seemed to be involved (Fig. 3A). CYP3A is the most abundant enzyme in the liver and intestine (40%), whereas CYP2C9 represents 20%; CYP2E1 and CYP1A2 each represent 10%; and CYP2B6, CYP2C19, and CYP2D6 are present at 5% mainly in the liver [16]. Thus, we can conclude that CYP3A4/5, CYP2B6 and CYP2D6 are the most important enzymes involved in prasugrel metabolism in recombinant human supersomes, with a lower participation of CYP2C19 and CYP2C9.

These results were also confirmed by using specific inhibitors of CYP1A2 (furafylline $30 \mu\text{M}$), CYP2B6 (CBP $1 \mu\text{M}$), CYP2D6 (quinidine $3 \mu\text{M}$), CYP2C9 (sulfaphenazole $5 \mu\text{M}$), CYP2C19 (nirvanol $2.5 \mu\text{M}$), and CYP3A4 (ketoconazole $3 \mu\text{M}$) to determine their effects on the formation of the AM from prasugrel ($20 \mu\text{M}$) [17]. Compared with the control, AM production decreased by $38 \pm 15\%$ in the presence of CBP (a CYP2B6 inhibitor) and by $45 \pm 16\%$ with ketoconazole (a CYP3A4/5 inhibitor). Inhibitors of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 did not show any significant effects on prasugrel metabolism (Fig. 3B).

3.2. Evaluation of the inhibition of prasugrel metabolism by ritonavir

As shown in Fig. 4, ritonavir from 0.1 to $30 \mu\text{M}$ was a dose-dependent inhibitor of each concentration of prasugrel tested (from 20 to $200 \mu\text{M}$). Prasugrel metabolism decreased by approximately 50% in the presence of $5 \mu\text{M}$ ritonavir. The latter is known to be a potent inhibitor of CYP3A using nifedipine oxidation ($\text{IC}_{50} = 0.07 \mu\text{M}$) and terfenadine hydroxylation ($\text{IC}_{50} = 0.14 \mu\text{M}$) as metabolic probes [18]. Further

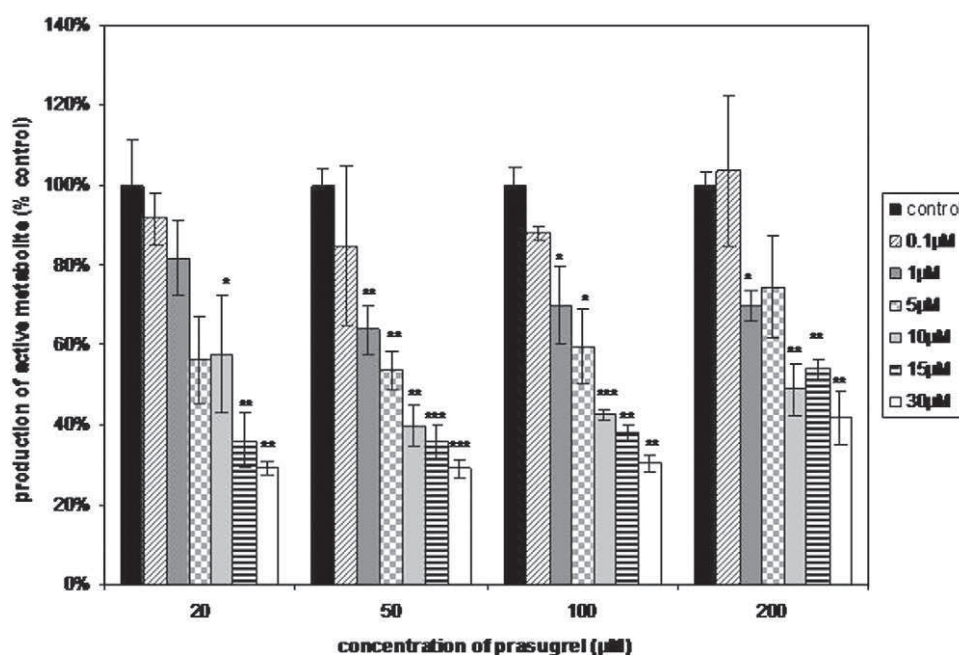


Fig. 4 – Effect of ritonavir (from 0 to $30 \mu\text{M}$) on the production of the prasugrel AM.

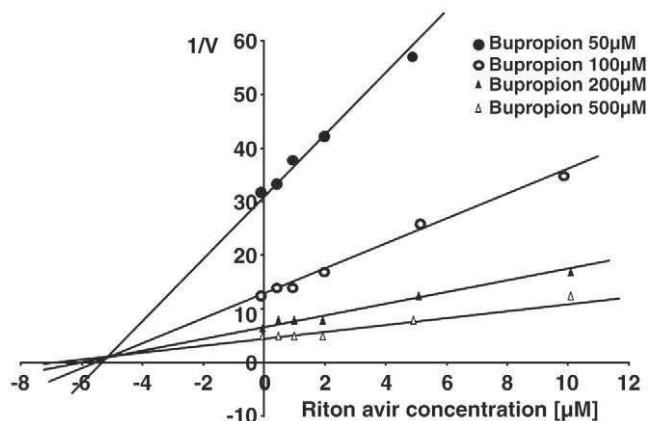


Fig. 5 – Representative Dixon plots for the inhibition of CYP2B6 catalysed bupropion hydroxylation by ritonavir.

evaluation of the effect of ritonavir on CYP2B6 activity using bupropion as a probe indicated that this enzyme was also inhibited by ritonavir ($K_i = 5 \mu\text{M}$) (Fig. 5). Hence, the 2 major metabolic pathways are simultaneously inhibited, enhancing the probability of a clinical drug–drug interaction between the 2 drugs.

4. Discussion

Bioactivation of prasugrel is mainly mediated by hepatic carboxylesterases and cytochrome P450 system. The apparent K_m value observed in our study using HLMs is 3-fold higher than the K_m determined previously [14]. In the Rehmel study, K_m was determined using the intermediate metabolite as a substrate, while in our study, prasugrel was used. Hence, the measured K_m includes the first step in which carboxylesterases are mainly involved.

Using recombinant human supersomes and specific inhibitors of studied CYPs, CYP2B6 and CYP3A4/5 were clearly identified as the main metabolic pathways involved in the bioactivation of prasugrel. Our data are in accordance with recent studies showing that prasugrel is mainly metabolized by CYP2B6 and CYP3A using HLMs and cDNA-expressed CYP isoforms [14,15,19].

After oral administration of a low dose of ritonavir (100 mg), plasma C_{max} was $1 \mu\text{g/mL}$ ($1.38 \mu\text{M}$), which is higher than the K_i for CYP3A and close to the K_i for CYP2B6 [20]. Moreover, considering the nonlinear pharmacokinetics of ritonavir, an increase in the administrated dose will increase plasma concentration in a nonproportional manner. After an oral dose of 300 mg, the C_{max} was $8.7 \mu\text{g/mL}$ ($12 \mu\text{M}$), which is higher than the IC_{50} for both CYP3A and CYP2B6. On the other hand, ritonavir is highly bound to plasma proteins (98%) and only its intra-hepatocyte free fraction is involved in the inhibition of CYP2B6 and CYP3A. Unfortunately, there is no data available measuring ritonavir free fraction on the hepatocyte which makes it extremely difficult to quantitatively evaluate extent of such interaction.

In a recent clinical drug–drug interaction study in which ketoconazole was coadministered with prasugrel, ketoconazole

reduced the C_{max} of the prasugrel AM but did neither affect its AUC nor the antiplatelet effect [21]. It must be noted that in this study, CYP2B6 was not inhibited and thus was able to potentially bioactivate prasugrel. In our study, CYP2B6 activity was also blocked by ritonavir, further reducing the bioactivation of prasugrel. In a recent pharmacogenetic study, common functional genetic variants of CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6, CYP3A5, and CYP1A2 did not affect active drug metabolite levels, inhibition of platelet aggregation, or clinical cardiovascular event rates in persons treated with prasugrel [22]. Here again, no data were available where two or more CYPs with deficient genetic variants were present. Moreover, it is widely accepted that the correlation between the genetic polymorphism of CYP3A and its activity is poor. In fact, in a recent study, Oneda et al. demonstrated a low correlation between a CYP3A phenotyping by midazolam test and CYP3A genotyping (CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7 variants) [23]. In a meta-analysis from 7 clinical trials where authors assessed the correlation between CYP3A4/5 alleles and midazolam disposition, there were no differences in midazolam disposition between different genotypes, haplotypes, or diplotypes in the CYP3A cluster [24].

Ritonavir is also known to induce metabolic enzymes after long-term use. A statistically significant decrease was observed in the ethinylestradiol AUC (–41%) and C_{max} (–32%) after 30 days of ritonavir administration [18]. However, ritonavir inhibited CYP3A and increased the AUC of oral oxycodone 3-fold after administration of 300 mg of ritonavir twice daily for 4 days to healthy volunteers [25]. Hence, clinical studies are needed to evaluate the effect of ritonavir on prasugrel pharmacokinetics after long-term use. However, HIV-infected patients usually receive a wide variety of drugs in addition to their antiretroviral drug therapy. Most of them interact actively with CYPs, leading to a considerable potential for pharmacokinetic drug interactions. Hence, a clinical evaluation of such interaction in this population is extremely difficult.

5. Conclusions

Our in vitro study demonstrated that ritonavir is a potent inhibitor of CYP3A and CYP2B6, the principal prasugrel bioactivation pathways, at a clinically significant concentration. Hence, drug–drug interactions between these two drugs should be considered when antiplatelet therapy using prasugrel is considered in HIV patients. However, more clinical studies are needed to confirm the in vitro data and to evaluate the effect of ritonavir after long-term use.

REFERENCES

- [1] Sabin CA, Worm SW, Weber R, et al. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet* 2008;371:1417–26.
- [2] Aboud M, Elgalib A, Pomeroy L, et al. Cardiovascular risk evaluation and antiretroviral therapy effects in an HIV cohort:

- implications for clinical management: the CREATE 1 study. *Int J Clin Pract* 2010;64:1252-9.
- [3] Satchell CS, Cotter AG, O'Connor EF, et al. Platelet function and HIV: a case-control study. *AIDS* 2010;24:649-57.
 - [4] Varriale P, Saravi G, Hernandez E, et al. Acute myocardial infarction in patients infected with human immunodeficiency virus. *Am Heart J* 2004;147:55-9.
 - [5] Grinspoon SK. Metabolic syndrome and cardiovascular disease in patients with human immunodeficiency virus. *Am J Med* 2005;118(Suppl):223S-8S.
 - [6] Triant VA, Lee H, Hadigan C, et al. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2506-12.
 - [7] Monsuez JJ, Charniot JC, Escaut L, et al. HIV-associated vascular diseases: structural and functional changes, clinical implications. *Int J Cardiol* 2009;133:293-306.
 - [8] Corti N, Heck A, Rentsch K, et al. Effect of ritonavir on the pharmacokinetics of the benzimidazoles albendazole and mebendazole: an interaction study in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:999-1006.
 - [9] Dumond JB, Vourvahis M, Rezk NL, et al. A phenotype-genotype approach to predicting CYP450 and P-glycoprotein drug interactions with the mixed inhibitor/inducer tipranavir/ritonavir. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87:735-42.
 - [10] Hesse LM, von Moltke LL, Shader RI, et al. Ritonavir, efavirenz, and nelfinavir inhibit CYP2B6 activity in vitro: potential drug interactions with bupropion. *Drug Metab Dispos* 2001;29:100-2.
 - [11] Duggan ST, Keating GM. Prasugrel: a review of its use in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention. *Drugs* 2009;69:1707-26.
 - [12] Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001-15.
 - [13] Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, et al. Biotransformation of prasugrel, a novel thienopyridine antiplatelet agent, to the pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010;38:898-904.
 - [14] Rehmel JL, Eckstein JA, Farid NA, et al. Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 2006;34:600-7.
 - [15] Farid NA, Smith RL, Gillespie TA, et al. The disposition of prasugrel, a novel thienopyridine, in humans. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1096-104.
 - [16] Peter Guengerich F. Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci* 1992;50:1471-8.
 - [17] Gallemann D, Wimmer E, Hofer CC, et al. In vitro characterization of sarizotan metabolism: hepatic clearance, identification and characterization of metabolites, drug-metabolizing enzyme identification, and evaluation of cytochrome p450 inhibition. *Drug Metab Dispos* 2010;38:905-16.
 - [18] Ouellet D, Hsu A, Qian J, et al. Effect of ritonavir on the pharmacokinetics of ethinyl oestradiol in healthy female volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:111-6.
 - [19] Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol* 2010;50:126-42.
 - [20] Sekar V, Spinosa-Guzman S, De Paepe E, et al. Pharmacokinetics of multiple-dose darunavir in combination with low-dose ritonavir in individuals with mild-to-moderate hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:343-50.
 - [21] Farid NA, Payne CD, Small DS, et al. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:735-41.
 - [22] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation* 2009;119:2553-60.
 - [23] Oneda B, Crettol S, Jaquenoud Sirot E, et al. The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19:877-83.
 - [24] Miao J, Jin Y, Marunde RL, et al. Association of genotypes of the CYP3A cluster with midazolam disposition in vivo. *Pharmacogenomics J* 2009;9:319-26.
 - [25] Nieminen TH, Hagelberg NM, Saari TI, et al. Oxycodone concentrations are greatly increased by the concomitant use of ritonavir or lopinavir/ritonavir. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:977-85.

Références

1. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):110-6.
2. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004 Feb 28;363(9410):689-95.
3. Costa LG, Richter RJ, Li WF, Cole T, Guizzetti M, Furlong CE. Paraoxonase (PON 1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomarkers*. 2003 Jan-Feb;8(1):1-12.
4. Wasserfallen J, Livio F, Buclin T, Tillet L, Yersin B, Biollaz J. Rate, type, and cost of adverse drug reactions in emergency department admissions. *Eur J Intern Med*. 2001 Sep;12(5):442-7.
5. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*. 2004 Jul 3;329(7456):15-9.

Chapitre 3 :

Etude clinique: interaction pharmacocinétique entre le prasugrel et le ritonavir chez le volontaire sain

Résumé

L'étude clinique présentée ci-dessous a été effectuée chez des volontaires sains. Dans le chapitre précédent, nous avons démontré une interaction cinétique entre le prasugrel et le ritonavir via une inhibition des CYP3A4/5 et CYP2B6. Le but de cette étude clinique était de confirmer l'existence de cette interaction pharmacocinétique *in vivo* entre le prasugrel et le ritonavir.

Pour cette étude, 10 volontaires sains ont été recrutés, ils ont tous complété l'étude et ont tous été inclus dans l'analyse.

Dans cette étude, nous avons utilisé une nouvelle technique de prélèvement sanguin qui est le prélèvement capillaire sur papier buvard. Cette technique est moins invasive pour les volontaires car elle ne nécessite qu'une piqûre au bout du doigt et elle est plus facile à mettre en œuvre lors de prises de sang répétées par exemple. Le prélèvement sur papier buvard connaît un véritable essor et de nombreuses études le démontrent comme étant une approche technique fiable pour la quantification des molécules et leurs métabolites. L'analyse du prasugrel et des métabolites a été effectuée par LC-MS-MS.

Un phénotypage individuel des CYPs impliqués dans le métabolisme du prasugrel a également été réalisé avant et après la prise du ritonavir, pour chaque volontaire afin de voir l'effet du ritonavir sur l'activité de ces CYPs.

Cette étude a permis de montrer que le ritonavir affecte le métabolisme du prasugrel en diminuant significativement la concentration de son métabolite actif. Une importante inhibition du CYP3A par le ritonavir a été confirmée en mesurant l'activité de ce CYP par le midazolam.

Article 4 : Pharmacokinetic interaction between prasugrel and ritonavir in healthy volunteers

V Ancrenaz, J Déglon, C Samer, C Staub, P Dayer, Y Daali, J Desmeules. Pharmacokinetic interaction between prasugrel and ritonavir in healthy volunteers. Article accepté pour publication dans le journal *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*.

Abstract

The new antiaggregating agent prasugrel is bioactivated by cytochromes P450 (CYP) 3A and 2B6. Ritonavir is a potent CYP3A inhibitor and was shown *in vitro* as a CYP2B6 inhibitor. The aim of this open-label crossover study was to assess the effect of ritonavir on prasugrel active metabolite (prasugrel-AM) pharmacokinetics in healthy volunteers.

Ten healthy male volunteers received 10mg prasugrel. After at least a week washout, they received 100mg ritonavir, followed by 10mg prasugrel 2 hours later. We used dried blood spot sampling method to monitor prasugrel-AM pharmacokinetics (C_{max} , $t_{1/2}$, t_{max} , AUC_{0-6h}) at 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 and 6 hours after prasugrel administration. A “cocktail” approach was used to measure CYP2B6, 2C9, 2C19 and 3A activities.

In the presence of ritonavir, prasugrel-AM C_{max} and AUC were decreased by 45% (Mean ratio: 0.55, CI95%: 0.37-0.73, $p = 0.008$) and 38% (Mean ratio: 0.62, CI95%: 0.52-0.71, $p = 0.001$), respectively, while $t_{1/2}$ and t_{max} were not affected. Midazolam metabolic ratio (MR) dramatically decreased in presence of ritonavir (6.7 ± 2.6 vs. 0.13 ± 0.07) reflecting an almost complete inhibition of CYP3A4, whereas omeprazole, flurbiprofen and bupropion MR were not affected.

These data demonstrate that ritonavir is able to block prasugrel CYP3A4 bioactivation. This CYP-mediated drug-drug interaction might lead to a significant reduction of prasugrel efficacy in HIV-infected patients with acute coronary syndrome.

Main text

Introduction and background

Prasugrel is a recently commercialized thienopyridine antiplatelet agent used to prevent atherothrombotic events in patients with acute coronary syndrome who are undergoing percutaneous coronary intervention. [1]

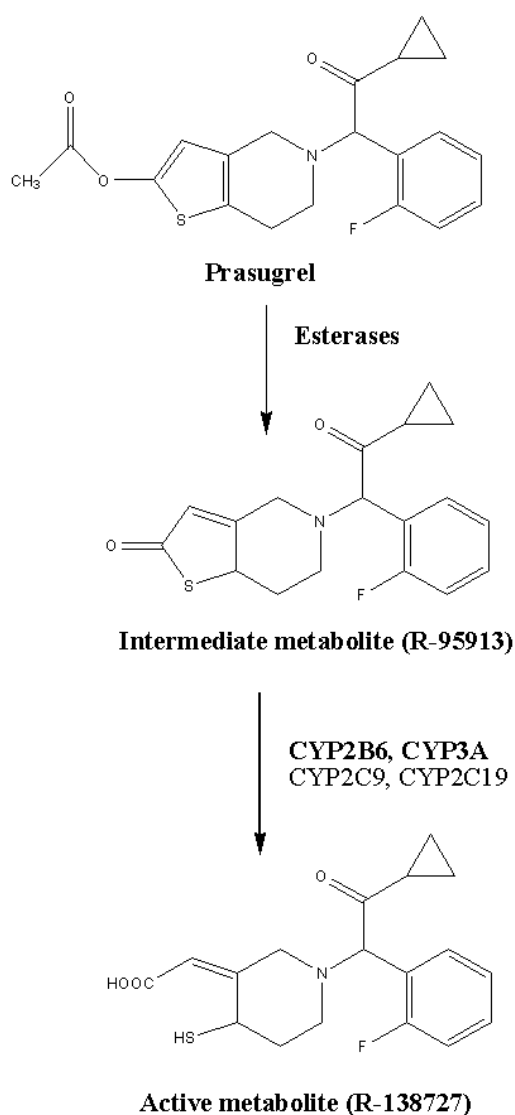


Figure 1. Metabolic pathways of the anti-aggregating agent prasugrel.

The active metabolite of prasugrel (Prasugrel-AM) is an irreversible inhibitor of ADP-P2Y₁₂ platelet receptors, explaining the anti-aggregating effect of prasugrel. This pro-drug is rapidly hydrolyzed by carboxylesterases into a thiolactone intermediate metabolite that is transformed by cytochromes P450 (CYP) into its pharmacologically active metabolite (Figure 1). CYP3A and CYP2B6 are primarily responsible for this transformation while CYP2C19 and

CYP2C9 are involved in a lesser extent. [2] CYP3A and 2B6 represent, respectively, 40% and 5% of the total cytochromes in the human liver and they are known to be involved in the oxidative metabolism of a wide range of drugs in clinical use. [3, 4] Consequently, *in vivo* interactions between prasugrel and other drugs affecting these CYPs are possible. The effects of some CYP inhibitors or inducers on prasugrel bioactivation have been assessed previously. For example, there was no change in prasugrel-AM formation or the inhibition of platelet aggregation when prasugrel was administered with ketoconazole (a CYP3A inhibitor), atorvastatin (a CYP3A substrate) or rifampicin (a CYP3A inducer). [5-7] These studies suggest that the production of prasugrel-AM is not altered by induction or inhibition of CYP3A. However, an *in vitro* study showed that prasugrel was mainly metabolized by CYP3A and CYP2B6 and simultaneous inhibition of these two pathways significantly decreased prasugrel bioactivation. Indeed, ritonavir was a potent inhibitor of prasugrel bioactivation in human liver microsomes, raising the possibility of a pharmacokinetic drug-drug interaction between ritonavir and prasugrel *in vivo*. [8] Such an interaction could reduce the efficacy of prasugrel. *In vivo* experiments are lacking to confirm these *in vitro* data in humans.

Ritonavir is an antiretroviral agent widely used as a pharmacokinetic booster in patients with HIV infection to increase the plasma concentrations of other antiretroviral drugs. In HIV patients with acute coronary syndrome, these two drugs could be largely prescribed concomitantly. Indeed, ritonavir is known to be a potent inhibitor of CYP3A and CYP2B6, and is a weaker inhibitor of CYP2C9. [8-12]

While blood volume is seldom a major limitation of clinical trials, the invasiveness of phlebotomy certainly is. Compared to classic venipuncture, dried blood spots (DBS) sampling is less invasive and can be easily performed. Additionally, when shipping and storing samples, DBS sampling eliminates the need for the dry ice, plasma separation and addition of anticoagulants that are required to maintain the viability of traditional blood samples. Regarding these benefits, DBS sampling has grown in popularity in the clinical and the pharmaceutical communities over the past decade. Recent publications demonstrated that DBS is a viable approach for the quantitative measurement of drugs and metabolites both in human and animal. [13-15]

In our study, we assess the potential pharmacokinetic interaction between ritonavir and prasugrel in healthy volunteers. The activities of the CYPs involved in prasugrel metabolism were also evaluated using a cocktail approach.

Material and Methods

Subjects

Inclusion criteria required that volunteers be healthy males between 18 and 60 years of age, have a body mass index between 18 and 25 kg/m², and be able to understand and read the French language. Candidates were ineligible if they were smokers, were hypersensitive to prasugrel, ritonavir or constituents of the tablets; consumed alcohol regularly; had concomitant disease; or used any drug or food such as grapefruit in the month prior to the study that can either affect or be metabolized by CYP3A, 2C19, 2B6, and 2C9. Volunteers who used drugs associated with an increased risk of bleeding in the 10 days preceding the start of the study were excluded, as were those with a familial history of clotting disorders, antecedent or hemorrhagic disease, a previous or active gastro-intestinal ulcer.

Study design

This open-label crossover study was conducted in 10 healthy volunteers at the clinical research unit of the Geneva University Hospitals. This study was conducted in accordance with Good Clinical Practice Guidelines and the Declaration of Helsinki. The Geneva University Hospital Ethics Committee and the Institutional Review Board Swissmedic approved the protocol before the study started. This clinical trial was registered at <http://www.clinicaltrials.gov> (NCT01346800). Written informed consent was obtained from each participant before the study started. Volunteers received a single oral dose of 10mg prasugrel on the first day. After at least one week, they received 100mg ritonavir followed by 10mg prasugrel 2 hours later. At each session, they also received a “micrococktail” containing 10mg bupropion, 5mg flurbiprofen, 2mg omeprazole and 0.1mg midazolam for phenotyping of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A, respectively, 1.5 hours after micrococktail administration. Adverse event were assessed during the study. Each individual participated in the study for approximately 3 weeks, from initial screening to the final session.

Analysis of DBS samples

Capillary blood samples for pharmacokinetic analysis were collected prior to and 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, and 6 h after the administration of a single dose of prasugrel. After a small finger prick using disposable lancet (BD Microtainer: Contact-Activated Lancet, United Kingdom), 5 µl of blood was spotted onto filter paper (Protein Saver 903 Card, Whatman)

that had been previously soaked with 20 µl of 2-bromo-3'-methoxyacetophenone (BMAP). This pretreatment allows the unstable thiol group in prasugrel-AM to form a disulfide bond with BMAP. Samples were stored at -20°C until analysis.

The DBS concentrations of prasugrel-AM, midazolam, omeprazole, bupropion and flurbiprofen were measured on a LC-MS/MS platform consisting of a 5500 QTtrap® triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer equipped with a Turbolon Spray™ interface (AB Sciex, Darmstadt, Germany) and an Ultimate 3000 RS pump (Dionex) as the LC system. Data were acquired and processed using Analyst software (version 1.5.1; AB Sciex).

Analytical method description

Before analysis, discs (i.d. 6mm) covering the entire DBS were punched out and placed in the bottom of individual LC vials containing a 300 µL inert insert (BGB Analytik, Germany). Samples were extracted by adding 100 µL of methanol containing 1 ng/mL derivatized prasugrel-AM-d₃ (Sirius Fine Chemicals, Germany). After 30 min, 5 µL of the supernatant was injected into the LC-MS/MS system.

The analytes were separated on a Kinetex Phenomenex (Brebühler, Switzerland) RP C18 column (50 x 2.1 mm, 2.6 µm particles i.d.) using a gradient elution mode running from water-acetonitrile 98:2, v/v to water-acetonitrile 10:90, v/v in 2 min. The total run time was 6 min, including column wash and equilibration. After electrospray ionization (ESI), MS/MS detection was carried out with multiple reactions monitoring (MRM) at unit resolution operating in dual mode (positive and negative) with a time settling of 65 msec.

The instrument parameters were manually optimized as follows: curtain gas: 20 psi; ion source gas 1 and 2 (GS1 and GS2): 30 and 40 psi, respectively; ion source voltage: 5000 V in positive ESI mode and -4500 V in negative ESI mode; temperature: 650°C; entrance potential (EP) and collision cell exit potential (CXP): 10 V in positive ESI mode and -10 V in negative mode. The MRM transitions of the analytes relevant to this study are summarized in Table 1.

Table 1. MRM parameters for the detection of prasugrel, prasugrel active metabolite, prasugrel active metabolite-d₃, midazolam, omeprazole, bupropion and flurbiprofen.

Compounds	Polarity	Q1 → Q3 (m/z)	CE (V)	DP (V)	Dwell time (msec)	LLQ (ng/ml)
Prasugrel	+	374→206	23	100	2	0.5
Prasugrel-AM ^a	+	498→348	28	100	2	0.5
Prasugrel-AM- d ₃ ^a	+	501→348	25	150	2	0.5
Midazolam	+	326→291	37	165	2	0.1
Omeprazole	+	346→198	19	66	2	0.5
Bupropion	+	240→131	30	80	2	0.5
Flurbiprofen	+	243→199	18	50	2	100
^a compounds derivatized with 2-bromo-3-methoxyacetophenone (BMAP), CE=collision energy; DP= declustering potential, LLQ= Lower Limit of Quantification.						

Validation

The method was fully validated according to the guidelines of the European Medicines Agency on validation of bioanalytical methods based on three non-consecutive days of testing.[16] A typical validation day consisted of 5 DBS calibrators (Cal) injected in duplicate (n = 2) and 4 DBS quality controls (QC) injected in quadruplicate (n = 4). Cal and QC DBS samples were prepared independently in the same way using fresh human EDTA-blood (supplied by the University Hospitals of Geneva). The calibration curves were linear over the standard concentration ranges of 0.1 - 50 ng/mL for midazolam; 0.5 - 250 ng/mL for prasugrel-AM, omeprazole, and bupropion; and 50 - 10,000 ng/mL for flurbiprofen. Based on these calibration curves, the trueness expressed as relative bias and the intermediate precision of the QCs were calculated. The values were within the expected criteria (±15%) for all the analytes. The selectivity of the method was investigated by injecting DBS pre-treated with BMAP obtained from the 10 volunteers recruited in the study. No interfering peaks were observed in the retention window of the analytes nor were there any matrix effects (< 15%). To ensure that the DBS specimens collected during the study could be shipped and stored at ambient temperature for a short period, the analytes stability was investigated over 30 days at three different temperatures (i.e., -20°C, +4°C, and room temperature). The assay showed that all compounds were stable at the tested temperatures, as back calculated

concentrations were comprised between 85 and 115% of the corresponding 1-day-old DBS samples. As no significant difference was observed between storage at room temperature and at -20°C, DBS cards could be collected, shipped and stored at ambient temperature. Moreover, reinjection of study DBS samples that were stored at -20°C for 6 months showed similar results to those previously obtained.

Phenotyping in plasma samples

A blood sample (~6ml) was obtained 1.5 h after administration of the “micrococktail” at each session for phenotyping. Blood samples were immediately centrifuged and the separated plasma was stored at -20°C until analysis. We used the validated extraction methods routinely used in our laboratory. Omeprazole, flurbiprofen, midazolam and their metabolites were extracted as described previously. [17] Bupropion was extracted by a liquid-liquid extraction procedure. All probes and their metabolites were analyzed by the LC-MS-MS method described in the previous section.

Statistics

Size calculation

To detect an inhibition of prasugrel-AM formation by ritonavir of at least 20% $\pm$ 10% with a power of 80% and α = 0.05, eight volunteers were needed. Two additional volunteers were recruited in case of subject withdrawal.

Analyses

The pharmacokinetic parameters of prasugrel-AM, midazolam, bupropion, flurbiprofen and omeprazole were calculated using a non-compartmental method by WinNonLin® version 5.2 (Pharsight, Mountainview, California, USA). All statistical tests were performed using SPSS version 17 (Chicago, Illinois, USA). According to regulatory guidelines, results were presented as the mean values ($\pm$ SD) or as mean ratios with 90% confidence intervals. The values for t_{max} were presented as median (range). The effect of ritonavir on the pharmacokinetic variables of prasugrel was estimated with the Wilcoxon signed rank test using SPSS version 17 (Chicago, Illinois, USA). All statistical tests were interpreted at the 5% significance level (two-sided).

Results

Subjects

Ten healthy male volunteers were enrolled in the study. Subjects were between 21 and 41 years of age with a mean ($\pm$ SD) of 26 ± 6 years. Volunteers ranged in height from 165 to 185 cm, weighed between 63 and 95 kg, and had a mean body mass index ($\pm$ SD) of 22.8 ± 2 kg/m². They were in good health, as determined by review of their medical history and physical examination. All 10 volunteers successfully completed the study. No adverse effects were reported during the study and all volunteers were included in the pharmacokinetic analysis. One volunteer was excluded from the evaluation of CYP2C19 activity because omeprazole and its metabolite were not detectable in his plasma and DBS.

Prasugrel pharmacokinetics

In comparison to prasugrel alone, AUC_{0-6h} and C_{max} decreased by 38.4% (mean ratio: 0.62, CI90: 0.54; 0.7, $p = 0.005$ 0.001) and 44.9% (mean ratio: 0.55, CI90: 0.4; 0.7, $p = 0.007$), respectively, when ritonavir was administered with prasugrel. However, ritonavir did not affect the time to reach maximum concentration (t_{max}) (median ratio: 1, CI90: 0.5; 2, $p = 0.73$) and half-life ($t_{1/2}$) (mean ratio: 0.94, CI90: 0.66; 1.22, $p = 0.53$) of prasugrel-AM (figures 2, 3 and table 2).

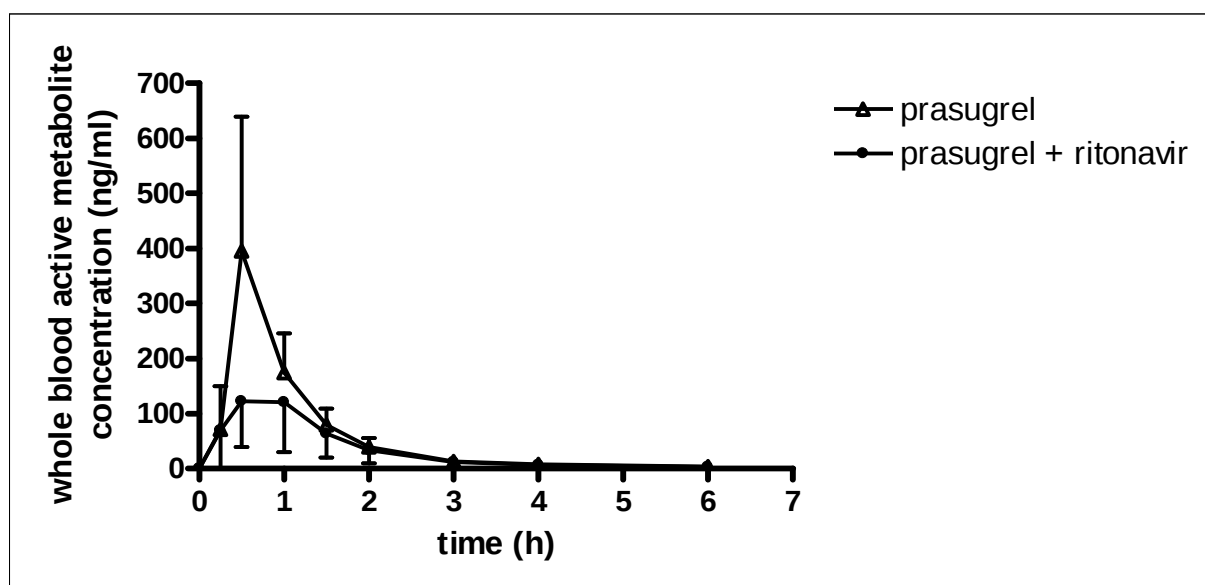


Figure 2. Mean ($\pm$ SD) whole blood concentrations for prasugrel's active metabolite in DBS following prasugrel alone (Δ) or prasugrel with ritonavir ($\bullet$). Values are shown as the mean $\pm$ SD.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of prasugrel active metabolite.					
	Prasugrel alone	Prasugrel + ritonavir	Ratio (prasugrel + ritonavir vs. prasugrel alone)	CI90	p value
t_{max} , h	0.5(0.5 - 1)	0.5 (0.25 – 1.5)	1	0.5-2	0.73
$t_{1/2}$, h	1.62 (0.54)	1.42 (0.66)	0.94	0.66-1.22	0.33
C_{max} , ng/ml	389.8 (226.2)	185.4 (83.1)	0.55	0.40-0.7	0.007
AUC, h.ng/ml	339.6 (144.7)	207.5 (91.1)	0.62	0.54-0.7	0.005
Values are presented as the means ($\pm$ SD) for $t_{1/2}$, C_{max} and AUC and as median (range) for t_{max} values or mean ratios (prasugrel + ritonavir vs. prasugrel alone) with 90% confidence intervals (CI90). t_{max} = time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$ =elimination half-life; C_{max} = maximal concentration; AUC=area under the concentration-time curve.					

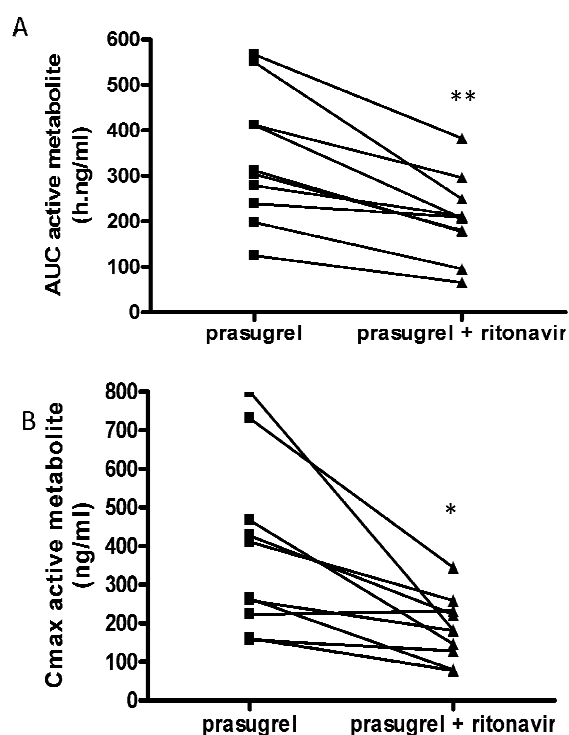


Figure 3. Effect of ritonavir on individual (A) AUC_{0-6h} or (B) C_{max} of the prasugrel active metabolite after administration of 10 mg prasugrel alone or 10 mg prasugrel with 100 mg ritonavir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Cytochrome P450 activities

Midazolam MR was $97.8 \pm 1.4\%$ lower after ritonavir administration compared to the values for prasugrel alone (Mean ratio: 0.022, CI90: 0.014; 0.03, $p = 0.005$). When ritonavir was co-administered with prasugrel, midazolam AUC_{0-6h} and C_{max} were 26 times and 6 times, respectively, the values obtained for prasugrel alone. Omeprazole MR (mean ratio: 0.92, CI90: -0.49; 1.35, $p = 0.59$), AUC_{0-6h} (mean ratio: 1.25, CI90: 0.94; 1.57, $p = 0.44$) and C_{max} (mean ratio: 1.54, CI90: 0.77; 2.32, $p = 0.44$) were not affected by ritonavir, and neither were flurbiprofen MR (mean ratio: 1.02, CI90: 0.78; 1.26, $p = 0.58$), AUC_{0-6h} (mean ratio: 0.95, CI90: 0.84; 1.05, $p = 0.44$) or C_{max} (mean ratio: 0.98, CI90: 0.82; 1.14, $p = 0.72$). Unexpectedly, bupropion MR (mean ratio: 1.02, CI90: 0.85; 1.19, $p = 0.88$), AUC_{0-6h} (mean ratio: 1, CI90: 0.93; 1.1, $p = 0.96$) and C_{max} (mean ratio: 1.03, CI90: 0.85; 1.21, $p = 0.96$) were not influenced by the coadministration of ritonavir and prasugrel (table 3 and figure 4).

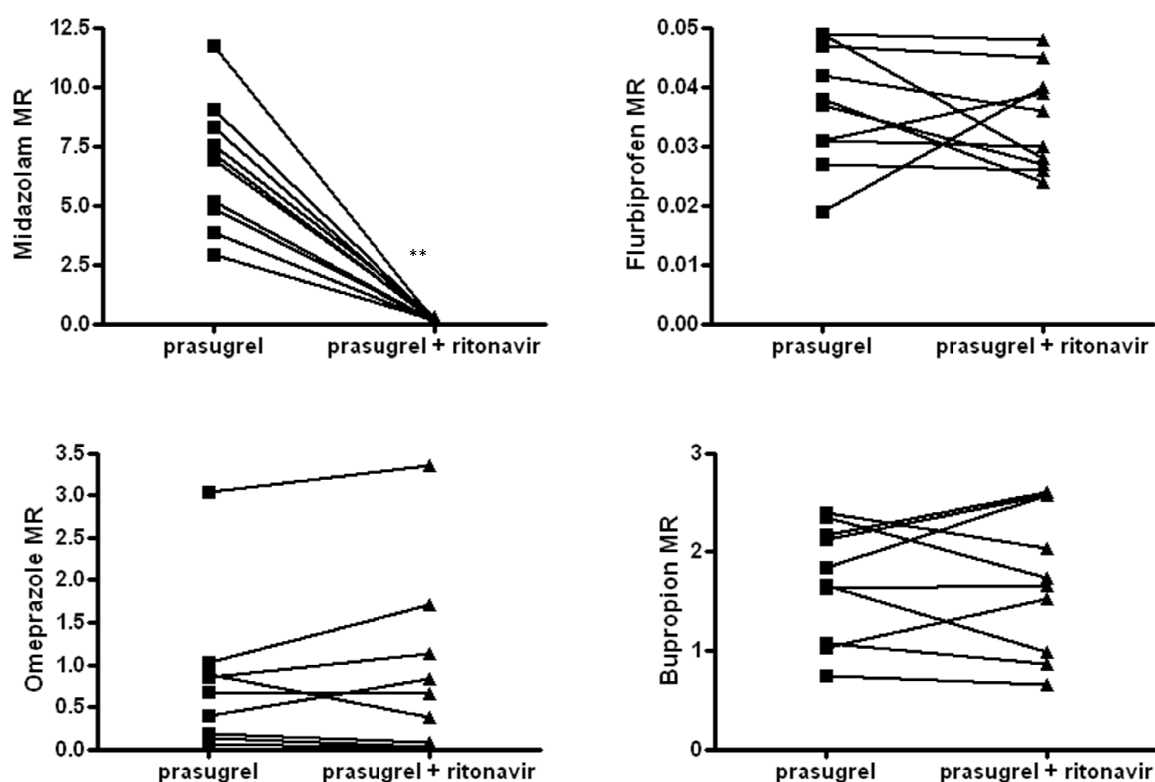


Figure 4. Effect of ritonavir on individual metabolic ratios of (A) midazolam, (B) flurbiprofen, (C) omeprazole, and (D) bupropion after administration of 10 mg prasugrel or 10 mg prasugrel with 100 mg ritonavir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Table 3. Pharmacokinetic parameters estimated from DBS analysis and metabolic ratios of midazolam, bupropion, omeprazole and flurbiprofen measured in plasma.

	Prasugrel alone	Prasugrel + ritonavir	Ratio	CI90	p value
Midazolam - C _{max}	0.17 (0.09)	0.75 (0.29)	6.1	(3.5; 8.7)	0.005
- AUC	0.31 (0.26)	2.53 (1.12)	26.5	(1.8 ; 51.3)	0.005
- Metabolic Ratio (OH midazolam / midazolam)	6.74 (2.64)	0.13 (0.07)	0.022	(0.014 ; 0.03)	0.005
Bupropion - C _{max}	20.9 (6.3)	21.5 (8.2)	1.03	(0.85 ; 1.21)	0.96
- AUC	49.1 (14.1)	49.3 (16.1)	1	(0.93 ; 1.1)	0.96
- Metabolic Ratio (OH bupropion / bupropion)	1.70 (0.59)	1.72 (0.73)	1.02	(0.85 ; 1.19)	0.88
Omeprazole - C _{max}	35.6 (32.1)	37.3 (32.5)	1.54	(0.77 ; 2.32)	0.44
- AUC	81.9 (96.5)	96.5 (111.9)	1.25	(0.94 ; 1.57)	0.44
- Metabolic Ratio (OH omeprazole / omeprazole)	0.92 (1.13)	1.1 (1.25)	0.92	(0.49; 1.35)	0.59
Flurbiprofen - C _{max}	1135.7 (684.4)	1095 (653.8)	0.98	(0.82 ; 1.14)	0.72
- AUC	3872.7 (2178.1)	3679.4 (2132.8)	0.95	(0.84 ; 1.05)	0.44
- Metabolic Ratio (OH flurbiprofen / flurbiprofen)	0.037 (0.01)	0.034 (0.008)	1.02	(0.78 ; 1.26)	0.58
Values are presented as the means (± SD) or mean ratios (prasugrel + ritonavir vs. prasugrel alone) with 95% confidence intervals (CI95). C _{max} = maximal concentration; AUC=area under the concentration-time curve.					

Discussion

This study shows that the prasugrel pharmacokinetics is significantly altered by ritonavir. In fact, ritonavir significantly decreased prasugrel-AM AUC_{0-6h} and C_{max} while t_{max} and $t_{1/2}$ were not affected.

As determined from a previous *in vitro* study, 38%-70% of the bioactivation of oxo-prasugrel to prasugrel-AM is performed by CYP3A4 and 2%-26% is performed by CYP2B6. [2] In the present study, ritonavir was used to investigate the effect of the inhibition of CYP3A and possibly other CYPs on the prasugrel-AM pharmacokinetics.

In the present study, ritonavir totally inhibited CYP3A4/5 activity as indicated by the decrease of more than 97% of midazolam MR and the increase of midazolam's AUC_{0-6h} to a level 26 times that of observed without ritonavir, and the increase of midazolam's C_{max} to a level 6 times that observed without ritonavir. These results agree with previous studies demonstrating that ritonavir is a very potent CYP3A inhibitor.[11, 18] A previous study assessing the effect of ketoconazole on prasugrel pharmacokinetics and pharmacodynamics demonstrated a decrease in prasugrel-AM C_{max} while AUC and platelet aggregation were not affected. [5] These contradictory results might be due to a higher CYP3A inhibition potential of ritonavir in comparison with ketoconazole. [19] In fact, ritonavir inhibited CYP3A more strongly than ketoconazole, as indicated by its increase of midazolam's AUC by a factor of 28.4 while ketoconazole increased it by a factor of 10-15. [18, 20, 21] The pharmacokinetic differences between the results of ketoconazole and ritonavir could be explained by the mechanism of inhibition of the CYP3A4 by these molecules: while ritonavir is a competitive and non-competitive irreversible inhibitor, ketoconazole is only a competitive reversible inhibitor of CYP3A4.

Regarding CYP2B6 activity, ritonavir did not significantly affect either bupropion or 5-hydroxybupropion pharmacokinetics. This may be explained by the high K_i (5 μM) value of CYP2B6, as it is higher than the expected ritonavir C_{max} after a 100mg dose (1-2 μM). [22] Higher concentrations of ritonavir might therefore be necessary to highlight any CYP2B6 inhibition measured through bupropion metabolism. Furthermore, omeprazole MR, flurbiprofen MR, and their pharmacokinetic parameters did not change after ritonavir treatment.

One limitation of this study was that ritonavir was administered as a single dose. Ritonavir is one of the most potent known inhibitors of CYP3A but may have an induction effect when administered long-term. [23] However, this remains controversial, because some *in vivo* studies have failed to demonstrate induction, instead reporting persistent CYP3A inhibition, even after long-term use. [24] The data obtained in our study are consistent with a pharmacokinetic drug-drug interaction between prasugrel and ritonavir *via* a potent inhibition

of CYP3A4/5. Pharmacodynamic measurements were not performed in this study as prasugrel was administered in single dose. Nevertheless, according to some studies, from a clinical point of view, decreases in prasugrel-AM production may be associated with lower platelet inhibition. [25, 26]

In conclusion, the inhibition of the bioactivation pathways of prasugrel by ritonavir mainly via CYP3A4/5 significantly affected prasugrel-AM pharmacokinetics. This study highlights the importance of very carefully considering drugs affecting CYPs that might be prescribed concomitantly with prasugrel. Prasugrel is metabolized mainly by the CYP3A isoform that is inhibited, for example, by imatinib, ketoconazole, and other antiretroviral drugs. CYP2B6, which is involved in the metabolism of prasugrel, also metabolizes other drugs such as methadone, cyclophosphamides and tramadol. Further PK/PD studies are needed to investigate the impact of these CYP-mediated drug-drug interactions on patients receiving prasugrel treatment and particularly in HIV patients with acute coronary syndrome simultaneously treated by prasugrel and ritonavir.

Acknowledgements

The authors wish to thank Jocelyne Chabert, Fabienne Doffey-Lazeyras and Mélanie Verdon for their help and assistance as well as the clinical research center of the Geneva University Hospitals. The clinical study was supported by the division of Anesthesiology, Pharmacology and Intensive Care, Geneva University Hospitals.

References

1. Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ, Weerakkody G, Murphy SA, Behounek BD, et al. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y₁₂ antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation* 2005;111:3366-73.
2. Rehmel JL, Eckstein JA, Farid NA, Heim JB, Kasper SC, Kurihara A, et al. Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 2006;34:600-7.
3. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:389-430.
4. Turpeinen M, Raunio H, Pelkonen O. The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Curr Drug Metab* 2006;7:705-14.
5. Farid NA, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS, 2nd, Brandt JT, et al. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:735-41.
6. Farid NA, Small DS, Payne CD, Jakubowski JA, Brandt JT, Li YG, et al. Effect of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel in healthy subjects. *Pharmacotherapy* 2008;28:1483-94.
7. Farid NA, Jakubowski JA, Payne CD, Li YG, Jin Y, Ernest IC, et al. Effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel in healthy male subjects. *Curr Med Res Opin* 2009;25:1821-9.
8. Daali Y, Ancrenaz V, Bosilkovska M, Dayer P, Desmeules J. Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug-drug interaction in HIV patients. *Metabolism* 2011.
9. Knox TA, Oleson L, von Moltke LL, Kaufman RC, Wanke CA, Greenblatt DJ. Ritonavir greatly impairs CYP3A activity in HIV infection with chronic viral hepatitis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;49:358-68.
10. Mathias AA, West S, Hui J, Kearney BP. Dose-response of ritonavir on hepatic CYP3A activity and elvitegravir oral exposure. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85:64-70.
11. Yeh RF, Gaver VE, Patterson KB, Rezk NL, Baxter-Meheux F, Blake MJ, et al. Lopinavir/ritonavir induces the hepatic activity of cytochrome P450 enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP1A2 but inhibits the hepatic and intestinal activity of CYP3A as measured by a phenotyping drug cocktail in healthy volunteers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42:52-60.
12. Hesse LM, von Moltke LL, Shader RI, Greenblatt DJ. Ritonavir, efavirenz, and nelfinavir inhibit CYP2B6 activity in vitro: potential drug interactions with bupropion. *Drug Metab Dispos* 2001;29:100-2.
13. Barfield M, Spooner N, Lad R, Parry S, Fowles S. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;870:32-7.
14. Beaudette P, Bateman KP. Discovery stage pharmacokinetics using dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;809:153-8.
15. Clark GT, Haynes JJ, Bayliss MA, Burrows L. Utilization of DBS within drug discovery: development of a serial microsampling pharmacokinetic study in mice. *Bioanalysis* 2010;2:1477-88.
16. Agency EM. Draft Guidelines on Validation of Bioanalytical Methods. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
17. Jerdi MC, Daali Y, Oestreicher MK, Cherkaoui S, Dayer P. A simplified analytical method for a phenotyping cocktail of major CYP450 biotransformation routes. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35:1203-12.

18. Greenblatt DJ, Peters DE, Oleson LE, Harmatz JS, MacNab MW, Berkowitz N, et al. Inhibition of oral midazolam clearance by boosting doses of ritonavir, and by 4,4-dimethyl-benziso-(2H)-selenazine (ALT-2074), an experimental catalytic mimic of glutathione oxidase. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:920-7.
19. Eagling VA, Back DJ, Barry MG. Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44:190-4.
20. Chien JY, Lucksiri A, Ernest CS, 2nd, Gorski JC, Wrighton SA, Hall SD. Stochastic prediction of CYP3A-mediated inhibition of midazolam clearance by ketoconazole. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1208-19.
21. Olkkola KT, Backman JT, Neuvonen PJ. Midazolam should be avoided in patients receiving the systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther* 1994;55:481-5.
22. Sekar V, Spinosa-Guzman S, De Paepe E, Stevens T, Tomaka F, De Pauw M, et al. Pharmacokinetics of multiple-dose darunavir in combination with low-dose ritonavir in individuals with mild-to-moderate hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:343-50.
23. Dixit V, Hariparsad N, Li F, Desai P, Thummel KE, Unadkat JD. Cytochrome P450 enzymes and transporters induced by anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors in human hepatocytes: implications for predicting clinical drug interactions. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1853-9.
24. Wyen C, Fuhr U, Frank D, Aarnoutse RE, Klaassen T, Lazar A, et al. Effect of an antiretroviral regimen containing ritonavir boosted lopinavir on intestinal and hepatic CYP3A, CYP2D6 and P-glycoprotein in HIV-infected patients. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:75-82.
25. Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, Weerakkody G, Farid NA, Small DS, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J* 2007;153:66 e9-16.
26. Payne CD, Li YG, Small DS, Ernest CS, 2nd, Farid NA, Jakubowski JA, et al. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:555-62.

Chapitre 4 :

Etude *in vitro* de l'interaction antiplaquettaires / antirétroviraux

Etude in vitro de l'interaction entre prasugrel / clopidogrel et les antirétroviraux à l'aide de microsomes hépatiques humains

Afin de vérifier le potentiel inhibiteur des antirétroviraux sur le métabolisme du prasugrel et du clopidogrel, nous avons sélectionné les antirétroviraux les plus utilisés en multithérapie. Des essais ont été réalisés en utilisant des microsomes humains pour compléter les données obtenues lors de l'étude d'interaction *in vitro* entre le prasugrel et le ritonavir détaillées dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Plusieurs concentrations de chaque antirétroviral ont ainsi été utilisées et mises en présence de microsomes et des inhibiteurs des récepteurs P2Y₁₂ à une concentration proche de leur K_m.

Matériel et méthodes

Microsomes hépatiques humains

Toutes les incubations ont été menées dans des conditions linéaires. Les incubations contenaient des HLMS (0.5mg protéines/mL), le prasugrel, le clopidogrel ou le 2oxo-clopidogrel à 30µM, du glutathion à 5mM, dans un tampon phosphate de potassium (0.1M, pH 7.4) en présence ou en absence d'agent antirétroviral à 1, 10 ou 50 µM. Chaque échantillon était pré-incubé à 37°C pendant 3 minutes avant l'ajout du système de régénération du NADPH (NADP 0.4 mM, isocitrate 2 mM, MgCl₂ 2 mM, et isocitrate dehydrogenase 0.4 IU/mL dans du tampon phosphate) puis les échantillons étaient incubés à 37°C pendant 15 minutes pour le prasugrel et 30 minutes pour le clopidogrel et le 2 oxo-clopidogrel. Après incubation, le BMAP à 15mM préparé dans l'acétonitrile a été ajouté dans tous les échantillons posés sur la glace afin de stopper la réaction et de stabiliser le groupe thiol des métabolites actifs du prasugrel ou du clopidogrel. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 3 minutes à 10000g et dilués 5 fois dans la phase mobile avant l'injection de 10 µL dans un système LC-MS-MS décrit ci-dessous.

Conditions LC-MS-MS

Les données LC-MS-MS ont été obtenues à partir d'un système HPLC Agilent 1100 (Agilent, Palo Alto, USA) couplé à un spectromètre de masse de type triple quadrupole API 4000 (ABSciex, Concord, Canada). La séparation des composés a été réalisée grâce à une colonne analytique Phenomenex Kinetex C18 (50 mm × 2.1 mm, 2.6 µm; Torrance, CA, USA) précédée d'un filtre KrudKatcher 0.5 µm.

La phase mobile était constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B). Les conditions initiales ont été établies à 95%(A)/5%(B) (v/v). Après l'injection de 10 µL d'échantillon, l'élution était réalisée par un gradient allant de 5 à 90% d'acétonitrile en 3 min suivi de 5% d'acétonitrile maintenu pendant 7min. La colonne était ensuite rééquilibrée aux conditions initiales jusqu'à la fin de l'analyse. Le débit constant était de 0.5ml/min et l'analyse était réalisée à 20°C.

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode SRM (selected reaction monitoring) avec une ionisation par électronébuliseur en mode positif. Les transitions SRM utilisées étaient 322→212, 338→183, 504→354, 374→206 et 498→348 avec un temps de mesure de 150 ms pour le clopidogrel, le 2-oxo-clopidogrel, le métabolite actif dérivatisé du clopidogrel, le prasugrel et le métabolite actif dérivatisé du prasugrel, respectivement.

Analyse statistique

Les données sont présentées sous forme de moyennes (±SD). Chaque valeur correspond à un puits différent. Pour l'analyse statistique, un test de t de Student a été réalisé et les valeurs de $p < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats et discussion

Suivant la figure 1, à une concentration de 10 μM , l'atazanavir, le darunavir et le lopinavir inhibent la deuxième voie de métabolisation du clopidogrel à $54 \pm 3.8\%$, $56\% \pm 1.6\%$ et $32\% \pm 7.1\%$ par rapport au contrôle, respectivement. Une inhibition dose-dépendante significative de la production de 2-oxo-clopidogrel est ainsi observée en présence des principaux inhibiteurs de la protéase: atazanavir et darunavir. Le lopinavir tend aussi à inhiber, bien que de manière non statistiquement significative, le métabolisme du 2-oxo-clopidogrel. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse, quant à eux, ne semblent pas avoir d'influence sur la deuxième voie CYP-dépendante du métabolisme du clopidogrel.

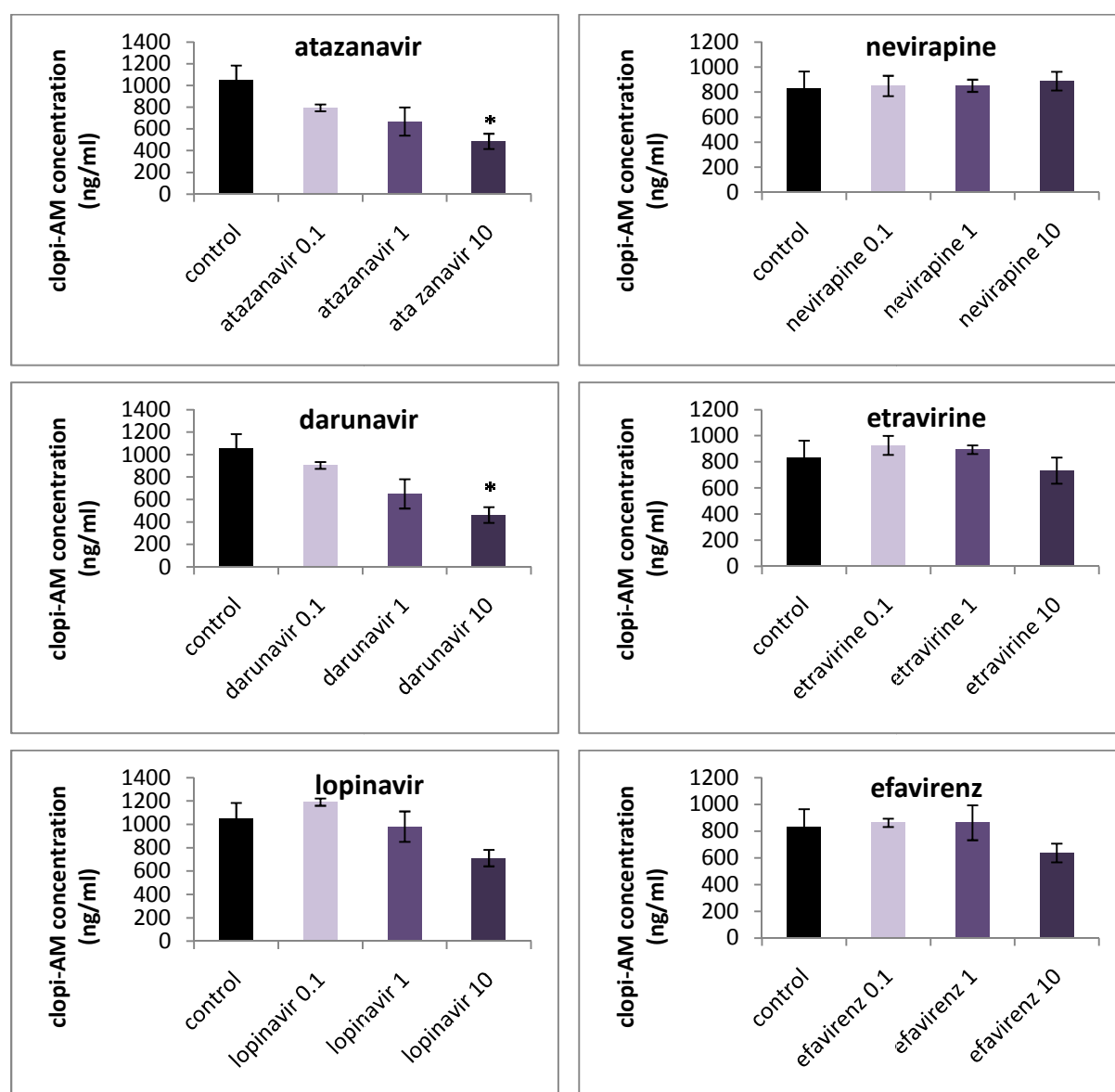


Figure 1. Production de métabolite actif de clopidogrel (moyenne $\pm$ SD) après incubation de 2-oxo-clopidogrel avec des microsomes hépatiques humains en absence ou en présence d'agents antirétroviraux à différentes concentrations (0.1, 1 et 10 μM). * $p < 0.05$.

Cette inhibition des cytochromes par les antirétroviraux se confirme avec les études menées sur le prasugrel (figure 2). En effet, l'atazanavir, le lopinavir et le darunavir diminuent de façon concentration-dépendante la production de prasu-AM ($64\% \pm 2.2\%$, $64\% \pm 1.4\%$ et $71\% \pm 4.7\%$ d'inhibition par rapport au contrôle, respectivement) alors que seuls l'etravirine et l'efavirenz inhibent ce métabolisme, à la plus forte concentration. La névirapine, comme pour le 2-oxo-clopidogrel, n'a pas d'effet sur la production de métabolite actif du prasugrel.

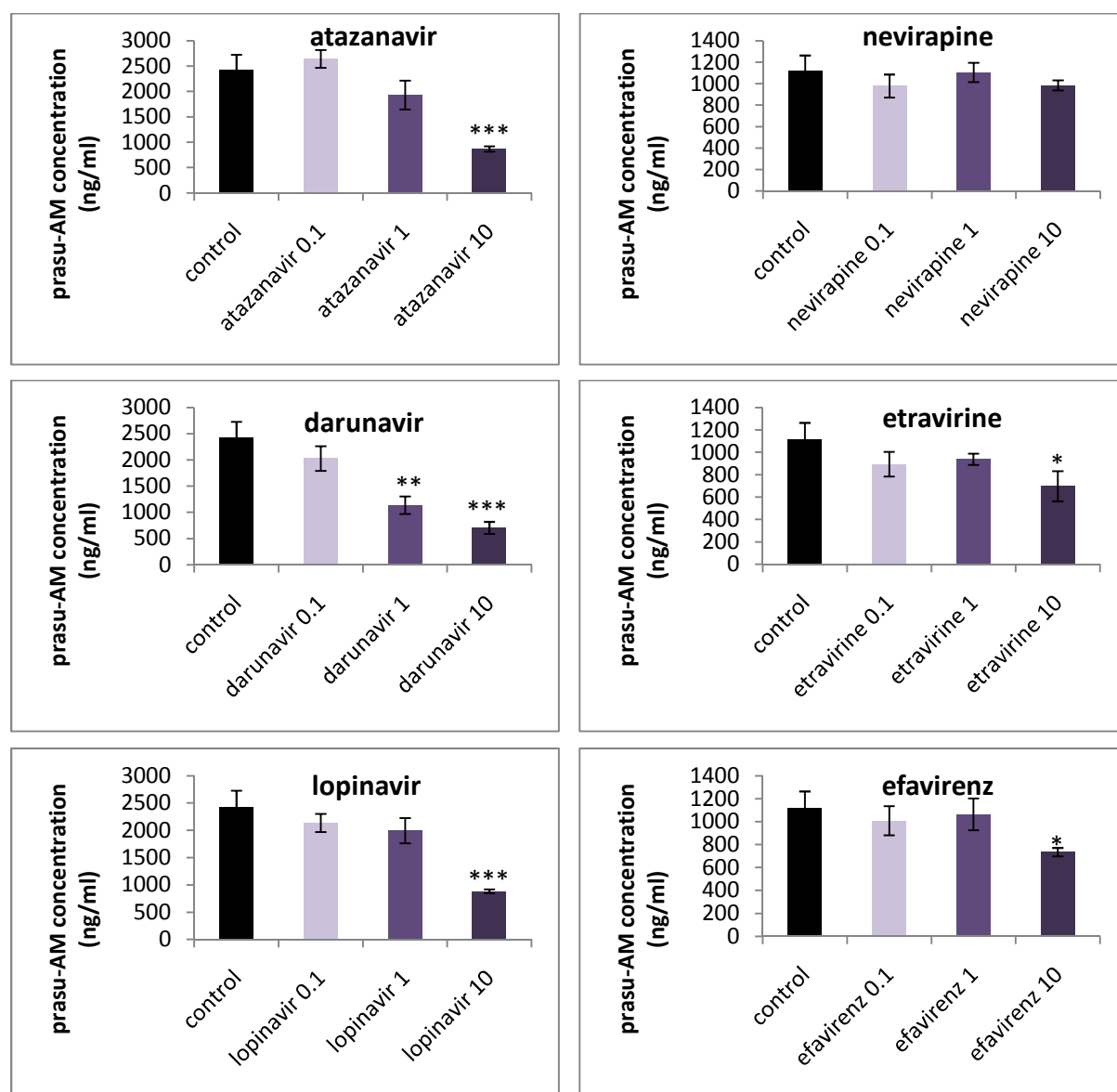


Figure 2. Production de métabolite actif de prasugrel (moyenne $\pm$ SD) après incubation de prasugrel avec des microsomes hépatiques humains en absence ou en présence d'agents antirétroviraux à différentes concentrations (0.1, 1 et 10 μ M). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Sachant que les concentrations plasmatiques maximales de ces substances observées au *steady-state* lors d'un usage thérapeutique sont de l'ordre de 5 à 15 μ M, une interaction médicamenteuse entre ces agents antirétroviraux (exceptée la névirapine) administrés en multithérapie et le clopidogrel ou prasugrel, utilisés ici à une concentration proche de leurs K_m , semble possible.

La différence de potentiel d'inhibition de ces antirétroviraux sur les deux molécules métabolismes pourrait s'expliquer par le fait que le prasugrel est métabolisé en une seule étape CYP-dépendante par les CYP3A4/5 et 2B6 alors que la deuxième étape de métabolisme du clopidogrel dépend des CYP3A4, 2C19, 2C9 et 2B6. En postulant que l'inhibition du métabolisme de ces deux molécules par les inhibiteurs de la protéase est due à l'inhibition du CYP3A4 par ces derniers, il est possible que dans le cas du clopidogrel, d'autres cytochromes impliqués plus faiblement dans le métabolisme prennent le relai pour former le métabolite actif en cas d'inhibition du CYP3A4.

Etude in vitro de l'interaction entre clopidogrel / prasugrel et les antirétroviraux à l'aide de la lignée cellulaire hepaRG™

Comme décrit ci-dessus, les inhibiteurs de la protéase semblent avoir un effet inhibiteur sur le métabolisme des inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ via l'inhibition du CYP3A. Cependant, les microsomes hépatiques humains ne permettent pas de prédire d'éventuelles inductions des CYPs par ces substances et les quelques études parues dans la littérature décrivent une induction du CYP3A4 par les antirétroviraux lors de leur utilisation à long terme. Afin de vérifier si une induction des CYPs par les antirétroviraux était effectivement possible, la culture d'une nouvelle lignée cellulaire hepaRG™ hépatique a été mise en place au laboratoire pendant la dernière partie de cette thèse. Le principal atout de cette lignée en comparaison à d'autres lignées disponibles depuis plus longtemps est la préservation des fonctions de la plupart des enzymes hépatiques et une expression des transporteurs et des CYPs très proche de celle des hépatocytes primaires (1). Dans un premier temps, la lignée a été commandée sous forme de cellules déjà différenciées qui nous ont permis de tester les substrats, les inhibiteurs et les inducteurs spécifiques des CYPs. Dans un deuxième temps, la lignée a été cultivée et entretenue et une partie a servi aux expériences décrites dans la suite de ce chapitre.

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules hepaRG™ ont été obtenues de la Société Biopredic® International, seul distributeur de cette lignée isolée à partir d'une tumeur de foie d'une patiente atteinte d'un hépatocarcinome par le groupe de Gillouzo *et al.* au début des années 2000. Les cellules ont été tout d'abord décongelées puis détachées par trypsinisation et ensemencées à une densité de $0.45 \cdot 10^6$ cellules différenciées/cm³. Les cellules ont été ensemencées dans un milieu de croissance fourni par Biopredic® composé de Williams' E, serum de veau fœtal, pénicilline 100 unités/ml, streptomycine 100 µg/ml, insuline 5 µg/ml, glutamine 2 mM et hydrocortisone hemisuccinate $5 \cdot 10^{-5}$ M. Après 2 semaines de croissance, les cellules étaient mises en présence du même milieu supplémenté avec 2% de DMSO nécessaire à la différenciation pendant 2 semaines (durée pour atteindre la confluence pour des cellules traitées au DMSO). Durant toute cette période, le milieu de culture était renouvelé tous les 2 à 3 jours. Les cellules étaient ensuite traitées à la trypsine et ensemencées sur des plaques de 24 puits pendant 12 jours avant d'être traitées pour les études d'induction.

Détermination de l'activité enzymatique

Pour la détermination des activités des CYPs, les cellules étaient incubées avec des substrats spécifiques en cocktail dilués dans du milieu sans rouge de phénol, sans serum et sans DMSO (phenacétine 10 μ M, bupropion 10 μ M, flurbiprofène 10 μ M, dextrometorphan 2 μ M, midazolam 5 μ M, mephenytoine 50 μ M) avant une incubation de 2h à 37°C, 5% CO₂. Pour les études d'induction, les cellules étaient mises en présence d'inducteurs connus des CYPs (rifampicine 10 μ M, omeprazole 50 μ M, phenobarbital 1mM) ou des antirétroviraux (1, 10 et 50 μ M) pendant 2 jours avant l'incubation du cocktail de substrats ou des antiplaquettaires (prasugrel 30 μ M, clopidogrel 30 μ M, 2-oxo-clopidogrel 30 μ M) pendant 2h comme décrit précédemment. Le milieu contenant les inducteurs était renouvelé tous les jours.

Extraction d'ARN et RT-PCR

L'ARN total a été extrait des cellules à l'aide du kit PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion, Life technologies). Les échantillons ont tout d'abord été lysés et homogénéisés en présence de guanidinium isothiocyanate, capable de protéger l'ARN des ARNases endogènes. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés, de l'éthanol a été ajouté et les échantillons étaient passés à travers des cartouches contenant une membrane en silice à laquelle venait se lier l'ARN. Les impuretés étaient ensuite éliminées par des lavages successifs et l'ARN purifié était ensuite élué avec de l'eau garantie sans ARNase. Une étape de transcription inverse de l'ARN à l'ADN a été ensuite réalisée en utilisant le SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit qui contient un inhibiteur de la ribonucléase, la transcriptase inverse SuperScript III®, du MgCl₂ et des amorces aléatoires dans un tampon optimisé pour la RT-PCR. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C avant utilisation pour RT-PCR.

Une RT-PCR pour le CYP3A4 a été réalisée avec le SYBR green PCR Master Mix et le StepOne Real Time PCR System. Les courbes d'amplification ont été lues grâce au logiciel StepOne software en utilisant une méthode comparative.

Analyse statistique

Les données sont présentées sous forme de moyennes ($\pm$ SD). Chaque valeur correspond à un puits différent. Pour l'analyse statistique, un test de t de Student a été réalisé et les valeurs de $p < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats et discussion

Activité enzymatique des CYPs

Tout d'abord, au niveau des tests effectués pour estimer les activités des CYPs dans les cellules, nous pouvons voir sur la figure ci-dessous une bonne activité des CYPs suivants : CYP1A2 avec un métabolisme de la phénacétine en paracétamol, CYP2C9 avec transformation du flurbiprofène en 4-OH-flurbiprofène, CYP3A4 avec le midazolam qui donne le métabolite 1-OH-midazolam. Cependant, une faible activité du CYP2D6 a été observée comme attendu selon la littérature étant donné que la patiente à l'origine de cette lignée présentait un polymorphisme au niveau du gène codant pour le CYP2D6. De manière plus inattendue, une faible activité des CYP2B6 et CYP2C19 a été décelée dans ces cellules. Ce résultat reste à investiguer car les études publiées sur cette lignée hepaRG® montrent une bonne activité du CYP2B6 et 2C19 avec l'utilisation des mêmes substrats : le bupropion à 10µM et la méphénytoïne à 50µM. La recherche d'autres raisons possibles à cette différence de résultats pourrait être discutée avec la société Biopredic®. De plus, de nouveaux substrats plus spécifiques de ces deux cytochromes ne sont pas encore disponibles et il reste donc difficile de mesurer de manière spécifique l'activité de ces CYPs.

Le pouvoir inductible des cellules a été évalué en les incubant avec des inducteurs spécifiques, comme indiqué sur la figure 3. La rifampicine et le phénobarbital qui sont connus pour être inducteurs des CYP2C9/2C19 et 3A4/5 ont effectivement induit le métabolisme du midazolam et du flurbiprofène mais la méphénytoïne, substrat utilisé pour mesurer l'activité du CYP2C19, n'a pas été influencée par ces inducteurs.

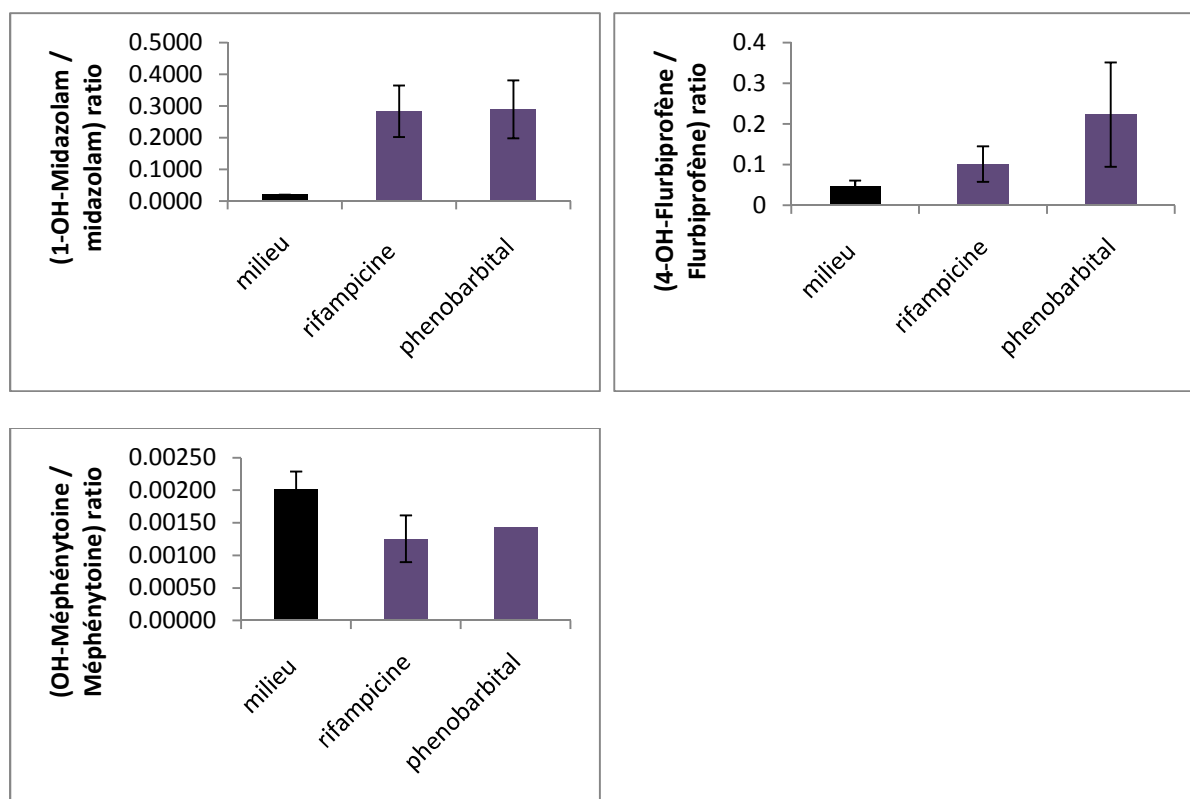


Figure 3. Effet des inducteurs connus sur les substrats de référence pour les CYP3A4, 2C9, 2C19. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ($\pm$ SD).

Le métabolisme des inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ n'a pas pu être observé lors de ces expériences et l'influence des antirétroviraux sur le métabolisme du clopidogrel et du prasugrel n'a donc pas été mise en évidence. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, l'instabilité des métabolites actifs du clopidogrel et prasugrel pourrait justifier le fait que l'on n'ait pas pu détecter ces derniers. De plus, il se peut que l'activité de certains cytochromes ait été trop faible pour métaboliser en grande partie le clopidogrel ou le prasugrel et de ce fait, les métabolites actifs étaient en trop faible quantité pour pouvoir être détectés avec notre méthode LC-MS-MS. D'après ces observations, les paramètres tels que le temps d'incubation ou le moment de l'ajout de l'agent de dérivation seront à optimiser au laboratoire afin de pouvoir visualiser les métabolites du prasugrel et du clopidogrel dans ces cultures cellulaires.

Cependant, en incubant les antirétroviraux avec le cocktail, nous avons pu observer leur effet sur les CYPs avec leurs substrats spécifiques. Même dans des conditions d'induction avec les cellules hepaRG™, on peut voir sur la figure 4 que les inhibiteurs de la protéase, excepté le darunavir, inhibent de façon concentration-dépendante la formation du 1-OH-midazolam, ce qui indique une inhibition du CYP3A par ces substances et confirme les données obtenues avec les microsomes. Une tendance à l'induction est plutôt observée avec les inhibiteurs de la transcriptase inverse lorsqu'ils sont administrés seuls, même si celle-ci n'est pas statistiquement significative.

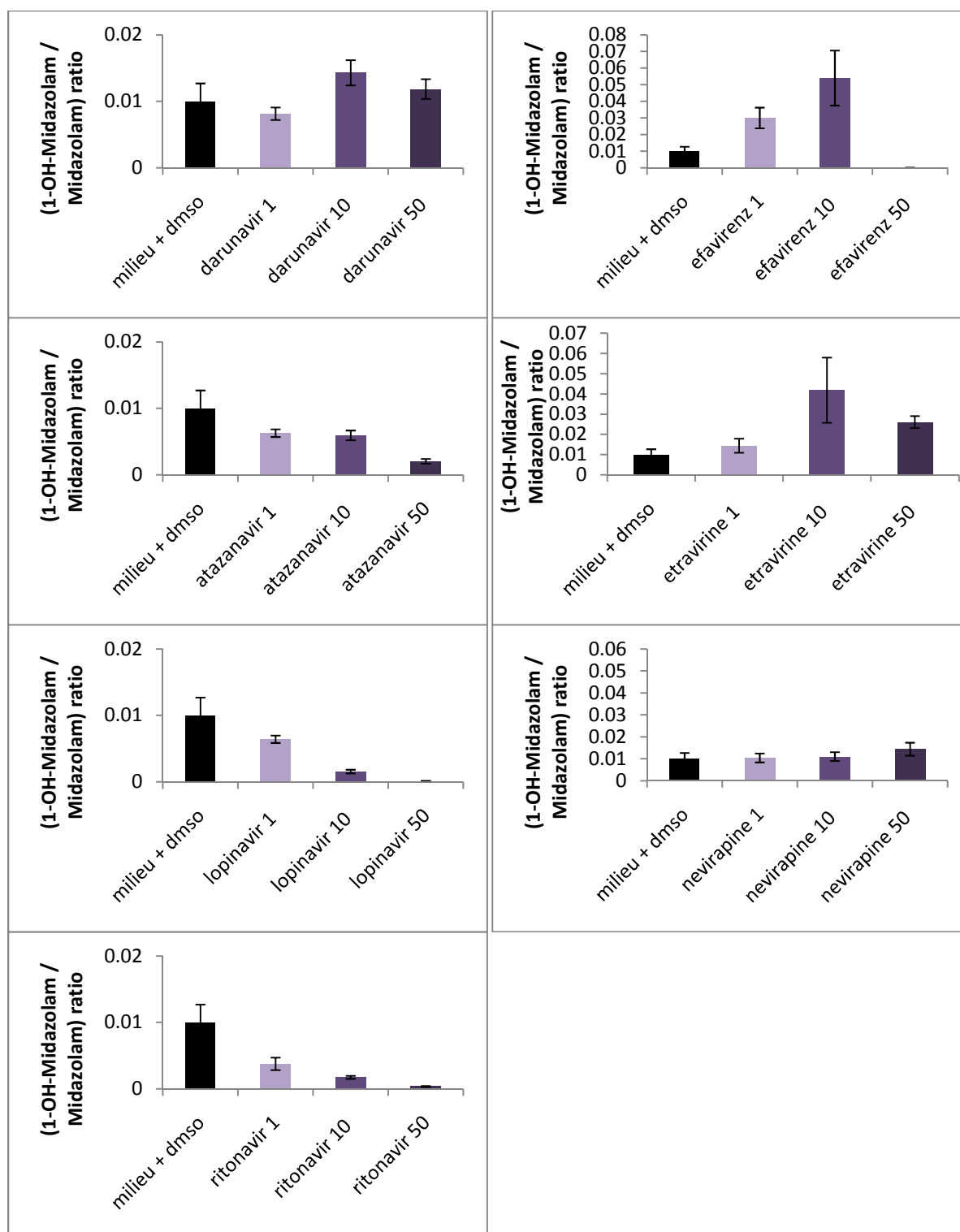
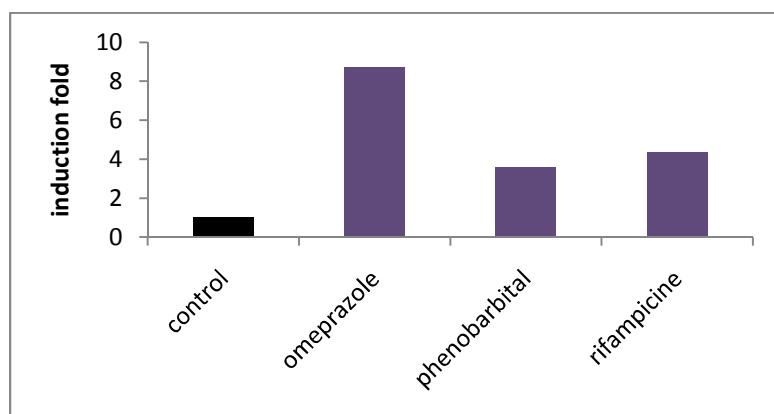


Figure 4. Rapport métabolique du midazolam en absence ou en présence des antirétroviraux utilisés à différentes concentrations (1, 10 et 50μM). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes (±SD).

Expression du CYP3A4 analysée par RT-PCR

Les expériences avec les cellules hepaRG™ ont été l'occasion de réaliser une quantification d'ARNm du CYP3A4 en présence des antirétroviraux (Figure 5B) et d'inducteurs spécifiques (rifampicine, oméprazole et phénobarbital) (Figure 5A).

A.



B.

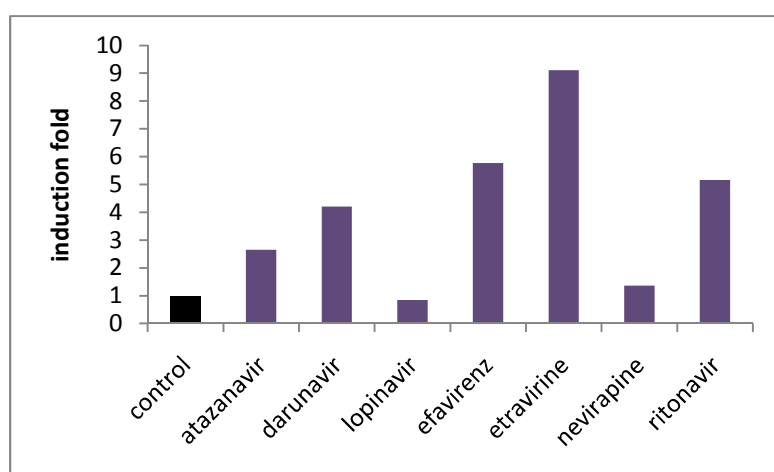


Figure 5. Etude comparative de l'expression du CYP3A4 entre le contrôle (milieu + 0.1% DMSO) et les inducteurs spécifiques (A) ou les antirétroviraux (B).

La figure 5A montre que l'expression du cytochrome CYP3A4 dans les cellules hepaRG™ est induite par le phénobarbital et la rifampicine qui sont des inducteurs connus des CYPs. L'oméprazole a également induit le CYP3A4, ce qui était moins attendu étant donné qu'il est connu pour induire le CYP1A2 à hautes concentrations. Sur la figure 5B, on peut également voir une induction de la transcription du gène codant pour le CYP3A4 avec tous les antirétroviraux, excepté le lopinavir.

Ces données confirment la complexité des interactions médicamenteuses avec les agents antirétroviraux due en partie à l'équilibre entre inhibition et induction des CYPs. Ceci confirme des données de la littérature qui n'ont pas pu établir de corrélation entre activité et niveau d'expression des CYPs et qui soulignent la difficulté de prévoir des interactions médicamenteuses avec ces types de traitements utilisés en multithérapie (2) (3). Suite à des recherches *in vitro* indiquant une possibilité d'interaction avec les antirétroviraux, les études cliniques randomisées contrôlées restent à l'heure actuelle le *gold standard* pour se rendre compte de l'ampleur d'une interaction médicamenteuse et de l'importance d'une inhibition ou d'une induction des CYPs au niveau clinique.

En conclusion, même si l'étude d'interaction entre les antirétroviraux et les antiagrégants plaquettaires n'a pu être complètement élucidée et ce de manière directe, les études d'induction avec les substrats et les inducteurs/inhibiteurs spécifiques des CYPs ont pu confirmer l'interaction pharmacocinétique potentielle entre les inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ et les inhibiteurs de la protéase ainsi que l'intérêt de cette lignée. Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence une bonne activité des CYP1A2/ 3A4 et 2C9 ainsi qu'une faible activité des CYP2D6 et 2C19 avec cette lignée alors que des études d'activité des CYPs sur la lignée HepG2 ont montré que seule une activité du CYP1A2 était préservée alors que les autres activités présentent des activités beaucoup plus faibles qui ne permettent pas d'étudier les inductions et inhibitions des CYPs. De plus, les expériences avec les substrats des CYPs montrent une inhibition du métabolisme du midazolam, un substrat du CYP3A4, par les inhibiteurs de la protéase alors que les inhibiteurs de la transcriptase inverse semblent ne pas avoir de réelle influence sur les CYPs. Ces résultats confirment ainsi les données obtenues avec les microsomes et permettent de confirmer l'intérêt des études cliniques futures pour investiguer l'impact d'une co-administration avec les thérapies anti-VIH et les inhibiteurs des récepteurs P2Y₁₂ sur l'efficacité clinique de ces derniers.

Références

1. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 2007 May 20;168(1):66-73.
2. Yanakakis LJ, Bumpus NN. Biotransformation of the antiretroviral drug etravirine: metabolite identification, reaction phenotyping, and characterization of autoinduction of cytochrome P450-dependent metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2012 Apr;40(4):803-14.
3. Mugundu GM, Hariparsad N, Desai PB. Impact of ritonavir, atazanavir and their combination on the CYP3A4 induction potential of efavirenz in primary human hepatocytes. *Drug Metab Lett.* 2010 Jan;4(1):45-50.

Chapitre 5 :

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse fait suite à des observations cliniques qui émettaient un doute sur l'efficacité des antiagrégants chez les patients ayant une activité réduite des cytochromes hépatiques nécessaires à la bioactivation du clopidogrel: tout d'abord, quelques articles présentant les résultats d'études cliniques mettaient en évidence une interaction possible entre le clopidogrel et les IPPs. Une grande variabilité de réponse aux antiplaquettaires et notamment au clopidogrel avait également été remarquée et posait un problème de prise en charge des patients nécessitant ce type de traitement contre la récurrence d'événements cardiovasculaires. Ceci a permis de mettre en avant un manque de données concernant le métabolisme du clopidogrel. En effet, malgré une commercialisation du Plavix® (clopidogrel) dès 1999, les outils à disposition n'ont permis d'étudier en détail le métabolisme du clopidogrel seulement à la fin des années 2000. Malgré la mise sur le marché récente du prasugrel, la place du clopidogrel dans la prévention de la récurrence des événements cardiovasculaires reste très importante.

La première partie de cette thèse est composée d'une introduction et d'une revue de la littérature qui s'est intéressée à tous les éléments qui pourraient intervenir dans une variabilité de réponse au traitement par des inhibiteurs des récepteurs P2Y₁₂ des plaquettes ou être impliqués dans les interactions médicamenteuses mettant en jeu ces derniers. Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de décès dans les pays développés et les médicaments tels que les inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ sont ainsi très étudiés car ils sont des « blockbusters » potentiels comme l'a été le clopidogrel jusqu'en 2009, année de sa perte de brevet.

Dans un deuxième temps, le métabolisme du clopidogrel a été étudié au laboratoire et les résultats ont été publiés après avoir complété l'étude *in vitro* de caractérisation des cytochromes impliqués dans les deux voies métaboliques avec des données sur la possible intervention de la PON1 dans cette bioactivation. L'implication des cytochromes a été confirmée avec une prévalence des CYPs 2B6, 2C19 et 3A4 dans la bioactivation du clopidogrel. Les expériences *in vitro* que nous avons réalisées ont été confortées par des données cliniques de la littérature et nous ont permis d'infirmer le rôle de la PON1 dans la deuxième étape du métabolisme du clopidogrel. En effet, dans les plus grandes études cliniques réalisées sur des patients prenant le clopidogrel, le polymorphisme génétique correspondant à une activité PON1 diminuée ne montrait pas de corrélation avec une réponse plus faible au traitement par les inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂.

Enfin, on peut noter à cette occasion les progrès effectués au niveau du développement de méthodes analytiques car le groupe de Dansette *et al.* a dernièrement permis de mettre en évidence deux isomères du métabolite actif du clopidogrel dont l'un est actif et formé par les CYPs alors que l'autre, formé par la PON1, est inactif. Ceci expliquerait les résultats de la

première étude de Bouman *et al.* sur l'implication de la PON1 dans le métabolisme car les auteurs n'auraient mesuré que le métabolite inactif.

Malgré les nombreuses études réalisées sur ce sujet, le problème de variabilité de réponse au clopidogrel n'est pas encore complètement élucidé. L'origine de cette variabilité est multifactorielle, ce qui rend plus difficile l'anticipation d'une mauvaise réponse au traitement et complexifie ainsi la prise en charge thérapeutique des patients. En effet, le génotype CYP2C19*2, l'âge et l'obésité pourraient expliquer seulement 22% de cette variabilité alors que l'influence d'autres facteurs reste inconnue. Le génotypage systématique du CYP2C19 chez tous les patients prenant le clopidogrel a été proposé mais la variabilité de réponse expliquée par ce polymorphisme étant estimée à environ 10%, le rapport coût-efficacité de cette approche préventive reste à déterminer.

Dans la continuité de ce travail *in vitro*, le métabolisme du prasugrel a été étudié et la prédominance des CYP3A4 et CYP2B6 dans son métabolisme nous a amené à réfléchir sur de possibles interactions médicamenteuses. En effet, ces inhibiteurs des récepteurs P2Y12 sont très prescrits et souvent administrés de manière simultanée avec d'autres médicaments. Un traitement nous a particulièrement intéressés: le ritonavir. Cet agent antirétroviral est un des éléments prépondérant des multi-thérapies anti-VIH car il est utilisé comme « booster » des autres antirétroviraux. Il est effectivement connu pour être un fort inhibiteur du CYP3A, cytochrome qui métabolise entre autres les différents inhibiteurs de la protéase utilisés dans les thérapies anti-VIH. Une étude *in vitro* montrait également le ritonavir comme un potentiel inhibiteur du CYP2B6. Une interaction pharmacocinétique entre le prasugrel et le ritonavir semblait donc probable. Grâce à de nombreuses avancées dans le domaine des traitements anti-VIH ces dernières années, les patients infectés par le VIH ont vu leur durée de vie se prolonger et font désormais partie de la population à risque de faire des événements cardiovasculaires d'autant plus que les traitements antirétroviraux augmentent certains facteurs de risque cardiovasculaires. Etant donné la pertinence clinique d'une interaction médicamenteuse entre le prasugrel et le ritonavir, nous avons décidé de vérifier cette hypothèse à travers le plan d'expérience présenté ci-dessous.

Tout d'abord, les expériences *in vitro* réalisées à l'aide de microsomes, de supersomes, d'inhibiteurs spécifiques des CYPs et d'anticorps dirigés contre les CYPs nous ont permis de valider le principe avec des résultats montrant une nette inhibition de la production de métabolite actif de prasugrel en présence du ritonavir.

Pour confirmer cette interaction *in vivo*, une étude clinique a ensuite été réalisée chez des volontaires sains pour suivre les paramètres pharmacocinétiques du prasugrel en absence et en présence de ritonavir en dose unique, ainsi que l'effet du ritonavir sur l'activité des

cytochromes. Une inhibition quasi-complète de l'activité du CYP3A a été observée à travers une très grande diminution de la production du 1-OH-midazolam après traitement par le ritonavir. C'est au travers de cette inhibition du CYP3A que le ritonavir a également diminué de manière significative la concentration maximale et l'aire sous la courbe du métabolite actif du prasugrel. En effet, tous les volontaires inclus dans l'étude ont présenté une diminution de la production de métabolite actif de prasugrel en présence de ritonavir.

Une corrélation entre la production de métabolite actif et la réponse pharmacodynamique ayant été démontrée récemment, on peut donc s'attendre à une réponse clinique du prasugrel diminuée (effet antiagrégant moindre) en présence de ritonavir.

Lors de cette étude, on soulignera l'utilisation de la méthode « Dried Blood Spot ». Cette technique a été développée en premier lieu dans le diagnostic de la phénylcétonurie chez les nouveau-nés en leur faisant un prélèvement de quelques gouttes de sang au niveau du talon. Depuis, l'utilisation du papier buvard s'est répandue à bien d'autres applications et notamment elle est utile comme alternative à une prise de sang classique dans les essais cliniques par exemple. Elle présente l'avantage d'être moins invasive qu'une prise de sang car la quantité de sang prélevée au bout du doigt est de 5 ou 10 μ l seulement. De plus, la préparation des échantillons est plus rapide et les papiers buvards peuvent se stocker à température ambiante sans affecter la stabilité des composés et le transport des échantillons sanguins est donc facilité. Cette technique a également eu l'avantage dans notre étude de pouvoir prétraiter les papiers buvards avec l'agent de dérivation (BMAP) pour stabiliser le métabolite actif du prasugrel instantanément lors du dépôt de sang sur le papier. Néanmoins, cette technique doit être couplée à une détection très sensible qui permette d'analyser des quantités faibles de composés pharmaceutiques. Dans notre étude, une méthode analytique a été développée en LC-MS et nous a permis de détecter les inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ et leurs métabolites respectifs. Des études de comparaison ont désormais montré une bonne corrélation entre les résultats obtenus à partir de plasma de patients par rapport aux résultats obtenus à partir du DBS, ce qui en fait une technique de choix dans les études pharmacocinétiques comme celle réalisée durant ce travail de thèse.

Les résultats positifs de cet essai clinique ouvrent des perspectives intéressantes pour continuer les recherches sur cette interaction médicamenteuse et sur les interactions médicamenteuses avec les inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ en général.

Une dernière partie de ce travail fait suite à quelques études cliniques qui allaient dans le sens d'une induction du CYP3A par les médicaments anti-VIH. Nous nous sommes donc intéressés à une possible induction des CYPs par ces substances *in vitro*. Le potentiel

d'induction des CYPs par des molécules ne pouvant être étudié dans les études *in vitro* avec les microsomes, une lignée cellulaire hepG2 décrite dans la littérature comme référence après les hépatocytes primaires a été testée et ne montrait pas de bons résultats au niveau de l'activité des CYPs. Une nouvelle lignée (hepaRG®) disponible depuis quelques années seulement a donc été mise en place au laboratoire durant cette thèse.

Les études préliminaires réalisées à l'aide des cellules hepaRG® montrent des résultats intéressants avec une diminution nette concentration-dépendante de l'activité du CYP3A4 par les inhibiteurs de la protéase et une forte induction de la transcription du gène du CYP3A4 par les NNRTI. La confirmation de ces résultats est nécessaire en réalisant des répliques de ce plan d'expériences ou encore des investigations complémentaires telles que la mesure du taux protéique de CYP3A4 dans les échantillons contenant les antirétroviraux. Malheureusement, l'influence des antirétroviraux sur les antiplaquettaires n'a pas pu être déterminée, possiblement à cause de paramètres expérimentaux qu'il reste à investiguer et à mettre au point pour réussir à détecter les métabolites actifs du prasugrel et du clopidogrel.

Pour conclure, tous ces résultats réunis vont dans le sens d'une interaction entre les inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ et les thérapies anti-VIH. Pour confirmer ces données, des recherches *in vitro* continueront autour des interactions avec les inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂. Sur le plan clinique, ce travail se poursuivra par une étude observationnelle dont le but sera de rechercher si les patients de la SwissCohort (cohorte suisse de patients infectés par le VIH) qui sont simultanément sous inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ et sous multi-thérapie anti-VIH ont une réponse au clopidogrel ou prasugrel diminuée. Une deuxième étude clinique multicentrique pourrait être réalisée chez des patients infectés par le VIH qui nécessitent la mise en place d'un traitement par inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ avec un groupe contrôle de patients non séropositifs atteints de pathologie coronarienne. Le critère de jugement principal serait alors la réponse pharmacodynamique des inhibiteurs des récepteurs plaquettaires P2Y₁₂ à travers la mesure de la réactivité plaquettaire grâce au VASP ou au Verify Now.

Chapitre 6:

Annexes

1/ Protocole « Chronopharmacology and risk of interaction between clopidogrel and omeprazole in healthy volunteers »

2/ Editorial du journal *Metabolism*

3/ Carte actualisée des interactions médicamenteuses avec les CYPs et édition 2011 du journal *Pharmaflash*

4/ Posters

1/ Protocole de l'étude clinique: chrono-pharmacologie et risque d'interaction entre le clopidogrel et l'oméprazole chez les volontaires sains

Résumé

Dans le cadre de cette thèse, un protocole d'étude clinique qui a donné lieu à une demande de financement au Fonds National Suisse de la Recherche a été rédigé suite à la controverse concernant l'interaction entre le clopidogrel et les IPPs dans la littérature. En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montraient une diminution de la production de métabolite actif du clopidogrel en présence d'oméprazole ainsi qu'une diminution de son effet antiagrégant. Cette interaction serait liée à l'inhibition du CYP2C19, impliqué dans la bioactivation du clopidogrel, par l'oméprazole. De nouvelles études sont venues contredire ces résultats en démontrant que l'oméprazole n'avait pas d'effet notoire sur le clopidogrel. Dans ce contexte et étant donnée la demi-vie courte des IPPs et du clopidogrel, une administration différée du clopidogrel et de l'oméprazole aurait pu permettre de contrecarrer l'éventuelle interaction décrite entre ces deux substances. Un dessin d'étude randomisée contrôlée en crossover sur des volontaires sains a été imaginé et a donné lieu au protocole présenté ci-dessous. Le projet n'a malheureusement pas pu avoir lieu jusqu'ici en raison d'un manque de financement qui a été justifié par une étude parue peu de temps après l'écriture du protocole par un autre groupe de recherche qui a montré qu'une administration différée n'empêchait pas l'interaction observée entre le clopidogrel et l'oméprazole. Cependant, dans cette étude les doses d'oméprazole administrées (80mg) étaient plus importantes que celles couramment utilisées en pratique (20-40mg) et auraient pu masquer un effet bénéfique d'une administration différée des deux médicaments à cause d'une inhibition prolongée des CYPs par une haute dose d'oméprazole. Cette étude reste donc en suspens faute de financement mais son intérêt est réel car la question de l'interaction entre le clopidogrel et l'oméprazole reste à élucider et l'avantage d'une administration différée reste à déterminer.

Protocole

Chronopharmacology and risk of interaction between clopidogrel and omeprazole in healthy volunteers

Sponsor

Pr Pierre Dayer, MD
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva.

Principal Investigator

Pr Jules Desmeules, MD
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Swiss Centre for Human Applied Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva.
Email: Jules.Desmeules@hcuge.ch / Tel: (0)223829942

Co-Investigators (alphabetic order)

Virginie Ancrenaz
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Marie Besson, MD
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Jocelyne Chabert
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Youssef Daali, Pharm D, PhD
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Prof Pierre Dayer, MD
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Pierre Fontana, MD
Division of angiology and haemostasis,
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Marianne Gex-Fabry, PhD
Division of Adult Psychiatry, Department of Psychiatry
Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland

Pr Denis Hochstrasser, MD
Division of Laboratory Medicine, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Alain Matthey, MD
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Michela Rebsamen, PhD
Division of Laboratory Medicine, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Michel Rossier, PhD
Division of Laboratory Medicine, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Dr Caroline Samer, MD
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology, Swiss Centre for Applied Human Toxicology
Geneva University Hospitals, Geneva

Study Products

clopidogrel (Plavix®, 300mg et 75mg, ATC B01AC04)
omeprazole (Antramups®, 20mg ATC A02BC01)

SYNOPSIS

Sponsor	Pr P. Dayer, Geneva University Hospitals						
Name of the finished product	PLAVIX® (Sanofi Aventis) / ANTRAMUPS® (Astra Zeneca)						
Name of the active substance	clopidogrel / omeprazole						
Study title	Chronopharmacology and risk of interaction between clopidogrel and omeprazole in healthy volunteers						
Investigators	Principal Investigator : Pr J.Desmeules Investigators : V. Ancrenaz, Dr M. Besson, Dr J.Chabert, Dr Y. Daali, Pr P. Dayer Dr P. Fontana, Dr M. Gex-Fabry, Pr D. Hochstrasser, Dr A. Matthey, Dr M. Rebsamen, Dr M. Rossier, Dr C. Samer. Geneva University Hospitals						
Study centre	Service of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital, Geneva						
Study period	March 2010-October 2012						
Objectives	Background Due to the increased risk of bleeding in patients on dual antiplatelet therapy, concomitant gastrointestinal ulcer prophylaxis with a proton pump inhibitor (PPI) is frequently prescribed. Data from recent studies show that PPIs, which are extensively metabolized by CYP2C19 and CYP3A4, may decrease the antiplatelet activity of clopidogrel by blocking its bioactivation. We believe that the interaction between clopidogrel and PPIs occurs principally via an inhibition of CYP2C19. In our clinical study, we will test a 12 hours time delay interval between clopidogrel and omeprazole administration. Due to their short half-lives and the reversible inhibition of CYP2C19, no interaction is expected and the efficacy of the antiplatelet drug clopidogrel should remain intact. Objectives Primary : to assess if a distinct and rational 12h chrono-pharmacological delayed administration of clopidogrel and omeprazole prevents the expected adverse drug-drug interaction between these two drugs in selected healthy subjects. Secondary : to verify if the interaction between clopidogrel and omeprazole is a pharmacokinetic interaction via CYP2C19. Moreover, the influence of CYP2C19 genotype and predicted phenotype on the antiaggregant effect of clopidogrel will be assessed. The sensitivity of each CYP2C19 phenotypic group to the interaction between clopidogrel and omeprazole will be assessed. An hypothesis is that Heterozygous group could be more sensitive to omeprazole inhibition.						
Methodology	Phase I stratified randomized crossover trial						
Number of subjects	250						
Selection criteria	Inclusion criteria: healthy volunteers between 18-50 years; with a BMI between 18 and 25; understanding, speaking and reading French language. Non-inclusion criteria: subjects with familial bleeding disorders, with co-medications, smokers.						
Test product Dose Route of administration	<table> <tr> <td>clopidogrel</td><td>omeprazole</td></tr> <tr> <td>75mg</td><td>20mg</td></tr> <tr> <td>oral</td><td>oral</td></tr> </table>	clopidogrel	omeprazole	75mg	20mg	oral	oral
clopidogrel	omeprazole						
75mg	20mg						
oral	oral						
Duration of treatment	45 days						
Measures	Outcome I: Platelet aggregation: Platelet Reactivity Index (VASP method) Outcomes II : Pharmacokinetic of clopidogrel (LC-MS analytical method) CYP1A2/3A4/2C19 phenotypes CYP2C19 genotype						
Efficacy evaluation	VASP method (platelet function)						
Statistical Methods	Analyses of variance models for repeated measures						

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

L'athérosclérose est une pathologie très répandue se développant suite à une altération des artères par des dépôts graisseux au niveau de leurs parois. Les plaquettes jouent un rôle primordial dans la mise en place et les complications des lésions athérotrombotiques et les médicaments antiplaquettaires sont en première ligne dans le traitement de l'athérosclérose. Le clopidogrel est largement utilisé comme agent antiagrégant plaquettaire. Seul ou associé à l'aspirine, cette molécule a prouvé son efficacité dans la prévention des événements athérotrombotiques en réduisant la formation de thrombose après la mise en place d'un stent coronaire. Des millions de patients dans le monde reçoivent ce traitement couplé à l'aspirine à la suite d'un infarctus du myocarde ou après la pose d'un stent. Ces dernières années, le clopidogrel représentait le deuxième médicament le plus vendu dans le monde.

Etant donné le risque de saignement augmenté chez les patients sous bithérapie antiagrégante plaquettaire, un traitement contre l'ulcère gastro-intestinal comme les inhibiteurs de la pompe à protons (IPPs), est souvent prescrit de manière concomitante.

De récentes études montrent que les IPPs, inhibiteurs puissants du CYP2C19 (sauf pantoprazole), peuvent engendrer une diminution de l'activité du clopidogrel en bloquant sa bio-activation.

Le clopidogrel est une pro-drogue transformée par différents cytochromes P450 en métabolite actif très instable par un processus en deux étapes. Le CYP2C19 est impliqué dans les deux étapes de la biotransformation du clopidogrel et de récentes études cliniques confirment un impact majeur du polymorphisme du CYP2C19 sur la variabilité de la réponse au clopidogrel.

Il semble que l'interaction probable entre le clopidogrel et les IPPs soit principalement expliquée par l'inhibition du CYP2C19 par les IPPs. Dans notre essai clinique, nous testerons l'intérêt de laisser un intervalle de temps de 12h entre la prise des deux médicaments chez des volontaires sains entre 18 et 50 ans non fumeurs (< 5 cigarettes/j), avec un indice de masse corporelle (IMC) entre 18 et 25. En effet, le clopidogrel et l'oméprazole (IPP de choix pour cette étude) possèdent des demi-vies très courtes (1-2h) et l'inhibition du CYP2C19 par les IPPs est réversible, ainsi aucune interaction ne devrait être observée avec une administration décalée et l'effet antiagrégant du clopidogrel devrait être maintenu chez les métaboliseurs normaux pour le CYP2C19.

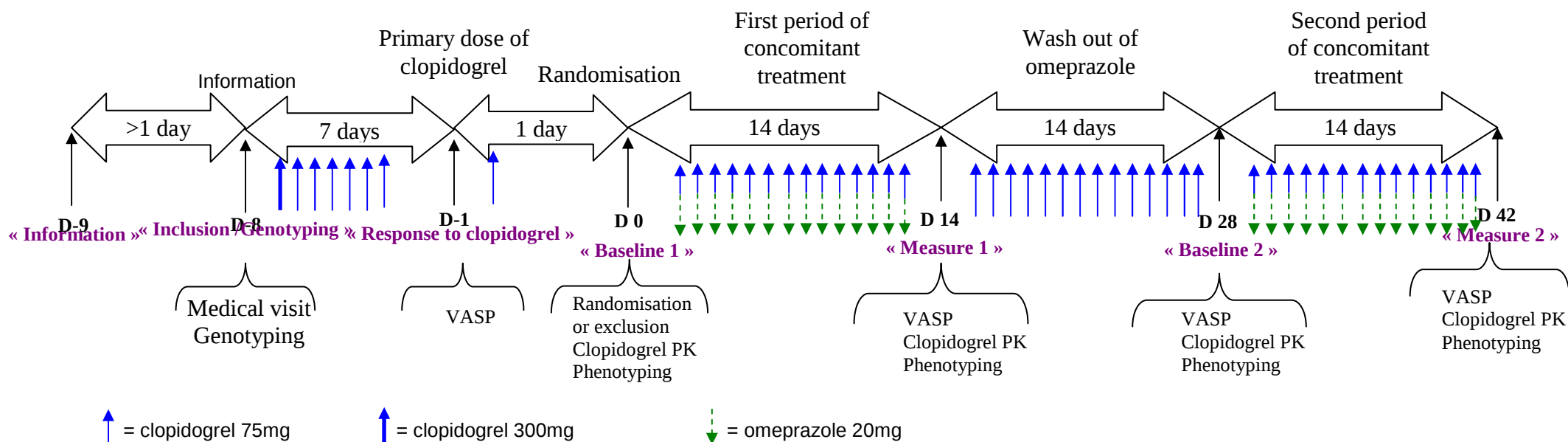
Dans cette étude randomisée en contrôle croisé, les volontaires seront préalablement stratifiés suivant leur génotype du CYP2C19 et leur réponse au clopidogrel. Seuls les bons répondeurs au clopidogrel seront inclus pour la randomisation des deux phases de traitement (la prise simultanée ou décalée des deux médicaments).

Chaque volontaire suivra ainsi un traitement d'une semaine de clopidogrel, temps optimal pour déterminer son indice de réactivité plaquettaire (IRP), et s'il est bon répondeur, il suivra alors deux périodes consécutives de traitement clopidogrel+oméprazole en prise simultanée ou décalée (selon randomisation). Ces deux périodes seront entrecoupées par une période de « wash out » avec du clopidogrel seul. Après chaque période de traitement, la réactivité plaquettaire sera mesurée (méthode VASP), l'activité des principaux cytochromes impliqués dans le métabolisme du clopidogrel sera évaluée et une analyse pharmacocinétique du clopidogrel et son métabolite actif seront réalisées.

Cette étude pourrait permettre de souligner l'importance de la chrono-pharmacologie dans la prévention des interactions médicamenteuses pharmacocinétiques impliquant des médicaments à courtes demi-vies, de vérifier la présence d'une interaction entre le clopidogrel et l'oméprazole en fonction du génotype du CYP2C19, de voir l'effet du traitement en particulier de l'oméprazole sur l'activité des principaux cytochromes : CYP1A2, CYP2C19 et CYP3A (microdoses de substrats types : oméprazole, midazolam et café) et d'analyser la pharmacocinétique du clopidogrel et de son métabolite actif.

STUDY FLOWCHART

Time	D-9	D-8	D-1	D0	D14	D28	D42
Visit	Visit 0	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	Visit 5	Visit 6 (termination)
Action	Information	Medical visit Genotyping	VASP	Exclusion or Randomisation Clopidogrel PK Phenotyping	VASP Clopidogrel PK Phenotyping	VASP Clopidogrel PK Phenotyping	VASP Clopidogrel PK Phenotyping Termination interview
Treatment				Clopidogrel 75mg+ omeprazole 20mg 12h-shifted or simultaneously	Clopidogrel 75mg	Clopidogrel 75mg+ omeprazole 20mg 12h-shifted or simultaneously	



STUDY SCHEME

Day-9 (visit)	Information
Day-8(visit)	Medical visit Blood sample for genotyping Inclusion
Day -7	Clopidogrel 300mg
Days -7 to -1	Clopidogrel 75mg
Day -1 (visit)	Blood sample for VASP
Day 0 (visit)	Clopidogrel 75mg Randomisation Blood sample for clopidogrel PK 0.1mg midazolam 2 mg omeprazole 1 cup of coffee Blood sample for phenotyping
Day 1-14	Clopidogrel 75mg morning + omeprazole 20mg evening OR Clopidogrel 75mg morning + omeprazole 20mg morning
Day 14(visit)	Blood sample for VASP Blood sample for clopidogrel PK 0.1mg midazolam 2 mg omeprazole 1 cup of coffee Blood sample for phenotyping
Day 15-28	Clopidogrel 75mg morning
Day 28 (visit)	Blood sample for VASP Blood sample clopidogrel PK 0.1mg midazolam 2 mg omeprazole 1 cup of coffee Blood sample for phenotyping
Day 29-42	Clopidogrel 75mg morning + omeprazole 20mg evening OR Clopidogrel 75mg morning + omeprazole 20mg morning
Day 42 (visit)	Blood sample for VASP Blood sample for clopidogrel PK 0.1mg midazolam 20 mg omeprazole 1 cup of coffee Blood sample for phenotyping Termination interview

ABBREVIATIONS

ADP	Adenosine DiPhosphate
ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Event
ATP	Adenosine TriPhosphate
ASA	AcetylSalicylic Acid
BMI	Body Mass Index
CAPRIE	Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events
CRF	Case Report Form
CURE	Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events
CYP	Cytochrome P450
DNA	DesoxyriboNucleic Acid
EDTA	Ethylene DiamineTetraacetic Acid
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
ICH	International Conference on Harmonisation
MFI	<i>Median Fluorescence Intensity</i>
MI	Myocardial Infarction
PCR	Polymerase Chain Reaction
P-gp	P-glycoprotein
PGE1	<i>ProstaGlandin E1</i>
PK	PharmacoKinetics
PPI	<i>Proton Pump Inhibitors</i>
PRI	Platelet Reactivity Index
RRR	Relative Risk Reduction
SAE	Serious Adverse Event
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SUSAR	Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction
VASP	VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein

BACKGROUND

Fundamentals

Atherosclerosis is a widespread disorder involving various arterial territories: cerebral, myocardial and lower limb arteries. Platelets play a key role in the pathogenesis and the complications of atherosclerotic lesions and antiplatelet drugs are part of the first-line treatment for atherothrombosis (Fontana 2007). Clopidogrel is widely used as an anti-aggregating platelet agent. Alone or associated with aspirin (ASA), this drug has proven its efficacy (Zambahari 2007) in preventing atherothrombotic events (Yusuf 2001) by reducing the incidence of coronary artery stent thrombosis (Steinhubl 2007).

Millions of patients around the world receive this drug in addition to ASA after a myocardial infarction or the placement of a coronary stent (Juurlink 2009). In the last year, clopidogrel was the drug with the second-largest sales volume worldwide.

Due to the increased risk of bleeding in patients on dual antiplatelet therapy, concomitant gastrointestinal ulcer prophylaxis with a proton pump inhibitor (PPI) is frequently prescribed. Data from recent studies show that PPIs, which are extensively metabolized by CYP2C19 and CYP3A, may decrease the antiplatelet activity of clopidogrel by blocking its bioactivation.

The negative drug interaction observed between PPIs and clopidogrel could be attributed to the inhibition of CYP2C19 by PPIs. In fact, clopidogrel is a prodrug metabolised in two sequential steps by various CYPs to a chemically very instable metabolite and potent platelet anti-aggregating agent. CYP2C19 is involved in the two-steps of the bioactivation of clopidogrel and recent clinical studies confirm a major potential clinical impact of the inhibition of CYP2C19 on the variability of response to clopidogrel.

Very few studies have adequately assessed this interaction in-vitro and monitored the blood decrease of the active clopidogrel metabolite in the presence of PPIs. This is probably due to its chemical instability and the absence of sensitive and accurate analytical methods for its determination. Moreover, no pharmacokinetic data of this active metabolite were conducted in the existing clinical studies where drug-drug interactions related to clopidogrel were assessed.

We believe that the interaction between clopidogrel and PPIs occurs principally via an inhibition of CYP2C19. In our clinical study, we will test a 12 hours time delay interval between clopidogrel and omeprazole administration. Due to their short half-lives and the reversible inhibition of CYP2C19 by omeprazole, no interaction is expected between clopidogrel and omeprazole when administrated with a 12 hours time delay interval. Therefore, the efficacy of the antiplatelet drug clopidogrel should remain intact in CYP2C19 normal metabolizers.

Clopidogrel

Clopidogrel is widely used as an anti-aggregating platelet agent. Alone or associated with aspirin (ASA), this drug has proven its efficacy (Zambahari 2007) in atherothrombotic events (Yusuf 2001) by reducing the incidence of coronary artery stent thrombosis (Steinhubl 2007). Millions of patients around the world receive this drug in addition to ASA in case of coronary stent or myocardial infarction

(Juurlink 2009). In the last years, clopidogrel was the drug with the second-largest sales volume worldwide.

However, a considerable inter-individual variability was observed in the platelet inhibitory response of patients under clopidogrel prescription. This observation is called “clopidogrel resistance” (Gurbel 2003). 4% to 30% of patients involved in the studies have been classified as “non responders” (platelet inhibition <10%) (Snoep 2007) (Umerura 2008).

This non response to clopidogrel was studied and some hypotheses were purposed: the mechanism of clopidogrel resistance could be caused by extrinsic mechanism like inappropriate dosing of clopidogrel or drug-drug interactions involving CYP3A4 and CYP2C19 but the interindividual variability may be due to intrinsic mechanisms like polymorphisms of P2Y12 and CYP2C19 genes or ABCB1 genotype-related differences in functional P-gp expression.

From a pharmacokinetic point of view, clopidogrel is a pro-drug which requires a transformation into an active metabolite by CYPs to produce its anti-aggregating effect. Clopidogrel's active metabolite structure was first established by Savi et al. and Pereillo et al. (Savi 2000; Pereillo 2002). Clopidogrel is a prodrug metabolised by various CYPs. The majority (85%) of clopidogrel is transformed by esterases to an inactive carboxylic acid while the other 15% is metabolized by CYP450s to the active metabolite in two steps: the thiophene ring of clopidogrel is first oxidized to 2-oxo-clopidogrel. The thiophene group is then opened to form the carboxylic acid and the thiol group of the active molecule which is very unstable but a very potent platelet aggregating inhibitor (Figure 1).

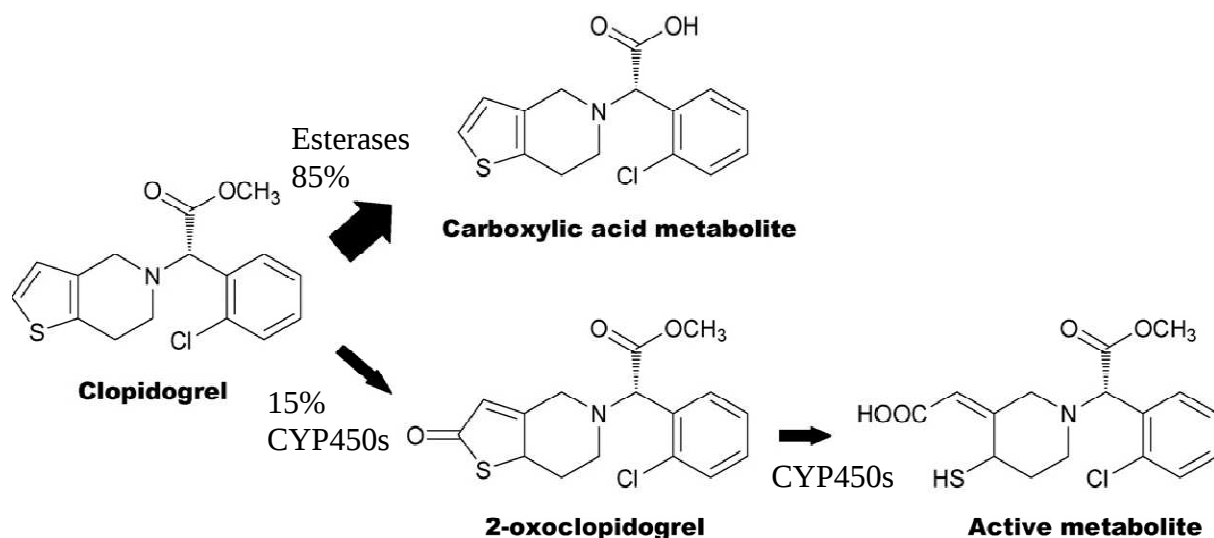


Figure 1. Pathways of metabolism of clopidogrel (Takahashi 2008).

The metabolism of clopidogrel is still not completely understood, even though some CYPs such as CYP1A2, CYP3A and CYP2C19 seem predominantly involved. Few studies assessed clopidogrel metabolism, mainly because of the instability of the active metabolite which is rapidly cleared in the plasma.

However, a first study has demonstrated the main implication of the CYP1A subfamily in clopidogrel metabolism by measuring the platelet aggregation after the induction of various P450 isoforms in rat liver microsomes (Savi 1994).

The role for CYP3A was clearly, although indirectly, established by Farid et al. in a randomized controlled study in healthy subjects. They demonstrated that ketoconazole, a potent CYP3A inhibitor, decreased the concentration of the clopidogrel metabolite but the proportion and the step of metabolism in which these cytochromes are implicated have still to be determined (Farid 2007). Lau et al. have shown, by measuring the ex-vivo platelet aggregation, that modulation of CYP3A by inhibitors and/or inducers, allowed a statistical and dose-dependant modulation of the anti-aggregating effect of clopidogrel confirming the importance of CYP3A activity in clopidogrel metabolism (Lau 2003, 2004).

From a pharmacogenetic point of view, Geisler et al. have investigated the platelet aggregation after administration of 600mg of clopidogrel to 237 patients with coronary infarction genotyped for CYP2C19 and CYP3A4 (Geisler 2008). They have shown that CYP2C19*2 allele was associated with an increase in residual platelet aggregation and this CYP2C19 variant could therefore predict a poor responsiveness to clopidogrel treatment. Umurera et al. have demonstrated that CYP2C19 pharmacogenomic status was also a key factor for the formation of the active metabolite of clopidogrel in 47 genotyped healthy subjects after administration of 300mg of clopidogrel (Umurera 2008).

Epidemiologic case controlled studies corroborate these *ex-vivo* results and have shown the importance of CYP2C19 polymorphism in clopidogrel efficacy. Sibbing et al. have demonstrated an increase of stent thrombosis risk in patients carrying mutant CYP2C19 alleles despite a loading dose of 600mg of clopidogrel (Sibbing 2009).

Moreover, in a cohort of 2208 subjects, Simon et al. have shown that patients with CYP2C19 loss-of-function alleles and acute coronary syndromes treated with clopidogrel presented a significantly higher rate of cardiovascular events (Simon 2009). Mega et al. have tested in a prospective randomized controlled trial, the association between functional genetic variants in CYP2C19 genes, plasma concentration of active metabolite and platelet inhibition in response to clopidogrel in 162 healthy subjects. They showed that subjects carrying at least one reduced-function allele for the CYP2C19 gene had a relative reduction of 32.4% of active metabolite plasma concentration vs. non carriers ($p<0.001$) as well as a reduction of maximal platelet aggregation in response to clopidogrel ($p<0.001$).

In a second cohort of 1477 patients with acute coronary syndrome, they examined the association between the same genetic variants and cardiovascular events. The results demonstrated that the carriers had a 53% increase of cardiovascular causes related death (12.1% vs. 8% for the wild-type patients; $p=0.01$) and a 3 times higher risk of stent thrombosis (2.65 vs. 0.8%; $p=0.02$) (Mega 2009).

These indirect experimental and clinical epidemiological evidences (Umurera 2008, Geisler 2008) (Sibbing 2009, Simon 2009) strongly underline that CYP2C19 genetics and activity are determinant for the efficacy of clopidogrel.

In a recent genome-wide association study (Pharmacogenomics of Antiplatelet Intervention, PAPI study), the 2C19*2 genotype accounted for 12% of the variation of clopidogrel response and the addition of factors such as age, BMI and lipid levels almost doubled the variation of clopidogrel response (Shuldiner 2009). Thus, part of the variation of clopidogrel responsiveness is explained by the CYP2C19 variant, 10% by other known clinical factors and a major part by other poorly characterized factors, that include drug-drug interactions, body weight and possibly other genetic

variants (ABCB1 for example). This is consistent with the wide variation of clopidogrel responsiveness in both carriers and non-carriers of the CYP2C19 variant allele: a significant proportion of CYP2C19*2 carriers have a low platelet response to ADP (adequate response to clopidogrel) while a significant proportion of patients with no mutated allele have a high platelet response to clopidogrel (clopidogrel resistance).

Proton Pump Inhibitors (PPIs)

PPIs are prescribed for non ulcer dyspepsia, reflux oesophagitis, gastroesophageal reflux disease, gastric ulcers. PPIs are prodrugs. After oral administration, they are absorbed and distributed through blood to the gastric parietal cells where, in the acidic medium; they are transformed into active sulphonamide derivatives which irreversibly inhibit the proton pump by binding covalently to sulphhydryl group of H⁺/K⁺ ATPase.

PPIs are actively metabolized in the liver by CYPs and although both CYP3A4 and CYP2C19 are involved in their metabolism, the major pathway is catalyzed by CYP2C19 (Desta 2002, Lim 2005, Chaudhry 2008).

Since the mean biological effect of clopidogrel is reduced in carriers of the loss-of-function CYP2C19 allele, phenotypic inhibition of CYP2C19 activity by PPIs could lead to a reduction of clopidogrel antiplatelet effect.

The most used PPIs are omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, rabeprazole and pantoprazole. All have shown a similar efficacy in the reduction of the gastric acidity and are prescribed for similar indications (Miner 2003). Omeprazole, esomeprazole, lansoprazole and pantoprazole are mainly metabolised by CYP2C19 and partially by CYP3A.

Rabeprazole is mainly metabolised by a non enzymatic sulfoxide reaction even if a low participation of CYP2C19 and CYP3A4 was observed (Miura 2006). Unlike all the other PPIs, pantoprazole is only a weak inhibitor of CYP2C19 but a strong inhibitor of CYP2C9.

PPIs are often used with clopidogrel to prevent the increased risk of intestinal bleeding due to clopidogrel treatment (Mega 2009).

Interaction

Recent epidemiological case controlled studies have suspected a clinically meaningful adverse drug-drug interaction between clopidogrel and PPIs. An epidemiologic case control study in 8205 patients with acute coronary syndrome (ACS) taking clopidogrel showed an increase in the incidence of death or rehospitalisation for ACS (20,8% for patients with clopidogrel alone vs. 29,8% for patients receiving clopidogrel and PPIs) and the longer the patient was exposed to clopidogrel + PPIs the more adverse outcomes were observed (Ho 2009). However, results might have been biased by the severity of the cardiac disease, co-morbidities and/or co-medications. Furthermore no distinctions were made between the individual imputabilities of the different PPIs.

Juurlink et al. have conducted another epidemiologic case-control study on 13636 patients taking clopidogrel following ACS. A significant association between readmission because of myocardial infarction (MI) and current use of PPI was observed. They also showed with all PPIs, except maybe pantoprazole, a 40% increase risk of recurrent MI within 90 days of hospital discharge (Juurlink 2009).

Gilard et al. have realised an *ex-vivo* study on 124 patients with coronary stent who received aspirin and clopidogrel. The *ex-vivo* impact of omeprazole showed that omeprazole significantly increased the Platelet Reactivity Index (PRI) from 39.8% to 51.4% in patients with clopidogrel alone and clopidogrel with omeprazole, respectively, after only one week of treatment (Gilard 2008).

In contrast, Siller-Matula et al., have for the first time investigated the effects of pantoprazole and esomeprazole on clopidogrel platelet inhibition. An *ex-vivo* randomized study in 300 patients investigating their coronary permeability a year after infarction and taking clopidogrel showed no differences in PRI and platelet aggregation (agg) in the group with clopidogrel alone (PRI=49%; agg=41U), clopidogrel and esomeprazole (PRI=54%; agg=42U) or clopidogrel and pantoprazole (PRI=50%; agg=47U) (Siller-Matula 2009).

The preliminary results of these two *ex-vivo* studies need to be confirmed with well-designed clinical trials. The impact of each individual PPI needs to be distinguished. The metabolism of clopidogrel needs furthermore to be investigated in further details.

Study Rationale

Due to the increased risk of bleeding in patients on dual antiplatelet therapy, concomitant gastrointestinal ulcer prophylaxis with a proton pump inhibitor is frequently prescribed. A current report of the American health authorities also reviewed the last publications on this subject and showed an urgent need of more studies on the influence of genetic factors and other drugs on the efficacy of clopidogrel.

Data from recent studies show that PPIs, which are extensively metabolized by CYP2C19 and CYP3A4, may decrease the antiplatelet activity of clopidogrel by blocking its bioactivation. We believe that the interaction between clopidogrel and PPIs occurs principally via an inhibition of CYP2C19 which impedes the clopidogrel bioactivation. In our clinical study, we will test a 12 hours time delay interval between clopidogrel and omeprazole administration.

Because of their short half-lives and the reversible inhibition of CYP2C19, the interaction that occurs during their simultaneous administration should be abolished with this 12h delay so that the efficacy of the antiplatelet drug clopidogrel should remain intact at least in CYP2C19 normal metabolizers. The dose of 300mg followed by 75mg/day is chosen as usually performed in the clinical practice: after a coronary stent placement, to have a fast optimal anti-aggregating effect, the dose of 300mg is advocated the first day with a maintenance dose of 75mg the following days.

This clinical trial will be the first to investigate the possible interaction between clopidogrel and omeprazole with shifts in chrono-administration in healthy male volunteers. This trial could help re-evaluate the concomitant use of these two drugs in clinical practice and could lead to a better understanding of this interaction's mechanism and clopidogrel bioactivation which is still not completely elucidated.

Pharmacokinetics of the active metabolite as well as of clopidogrel will also be characterized in order to get a quantitative measurement of the degree of the bioactivation's inhibition.

This clinical trial will be conducted in healthy volunteers and not patients for ethical reasons. Patients with coronary heart diseases may not benefit from the clopidogrel treatment because of the interaction with omeprazole leading to reduced efficacy of clopidogrel and increased risks of cardiovascular

events. Moreover, in trials investigating drug-drug interactions, healthy volunteers allow a better interpretation of results in avoiding the interferences due to co-medications or co-morbidities which are often present in patients with cardiovascular diseases.

Some studies yet have studied clopidogrel in healthy volunteers without any side effect: Cadroy et al. have compared the efficacy of the treatment clopidogrel (75mg)+ASA(75mg) compared with dypiramide (200mg)+ASA (25mg) in 23 healthy volunteers during two 10-day periods separated by 14 days of wash-out. They noted that the treatments were well tolerated without serious adverse effects (some epistaxis, gingival bleedings or bruises occurred) (Cadroy 2005). Mach et al. have investigated the effect of the co-administration of different statin treatments with clopidogrel: the 21 healthy volunteers were receiving clopidogrel 75mg/day for 10 weeks and no adverse effects were observed (Mach 2004). Fontana et al. have assessed the biological effect of clopidogrel and aspirin in 96 healthy subjects after a 1-week course of aspirin 100 mg day followed by a 1-week course of clopidogrel (300 mg on day 1, then 75 mg day) in two phases with a washout period of 14 days. They did not observe any adverse effect due to clopidogrel treatment during the study (Fontana 2006). Chen et al. have conducted in 12 volunteers a 2-phase crossover randomized trial where volunteers received a loading dose of 300mg clopidogrel + 75mg the following 3 days and 40mg omeprazole the fourth day. No clinically undesirable symptoms were found throughout all the study (Chen 2009).

OBJECTIVES

The aim of this randomized, crossed over-controlled study is to assess if a distinct 12h chronopharmacological delayed administration of clopidogrel and omeprazole prevents the expected adverse drug-drug interaction between these two drugs given simultaneously in selected CYP2C19 healthy subjects.

STUDY DESIGN

Overall description

Phase I stratified randomized crossover trial.

Healthy male volunteers will be stratified according to CYP2C19 genotype (Group 1: *1/*1,*1/*17; Group 2: *1/*2, *1/*3, *2/*2,*3/*3,*2/*3,*17/*2,*17/*3) since CYP2C19 genetic polymorphism strongly influences clopidogrel bioactivation. All the included volunteers will then receive a loading dose of 300mg clopidogrel followed by 75mg/day during 6 days to assess their response to clopidogrel treatment. The responders to clopidogrel tested with VASP in each CYP2C19 genotype group will then be randomly assigned to receive two different regimens of clopidogrel + omeprazole (either simultaneously or 12h shifted). A total of 4 sub-groups will therefore be obtained (Figure 2).

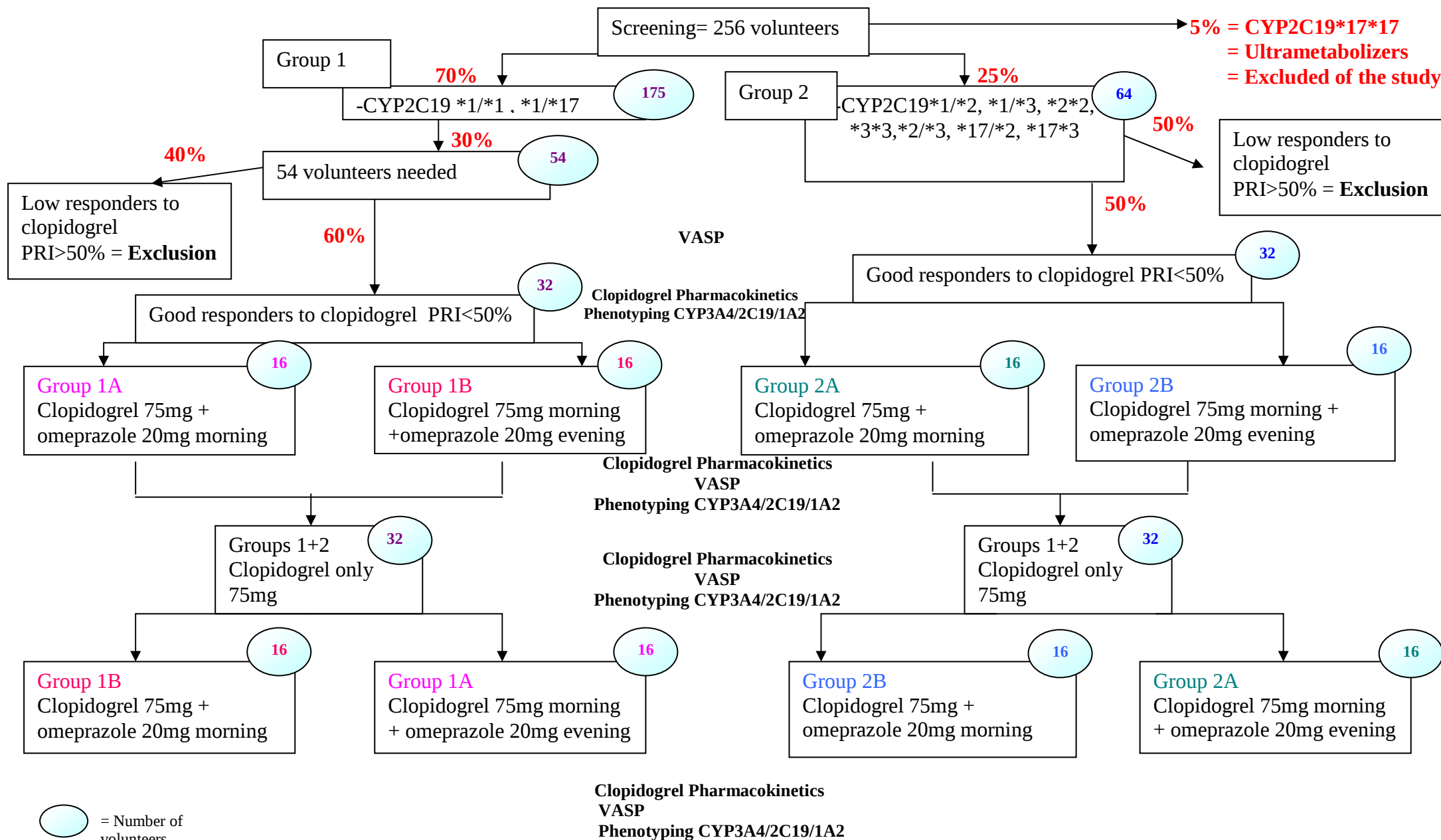
The tested hypotheses are:

- if the interaction between clopidogrel and omeprazole is related to a common metabolic pathway, the CYP2C19, a shifted and delayed administration of both drugs could help avoiding the unwanted drug-drug interaction observed with simultaneous administration and

thus maintain the anti-aggregating effect of clopidogrel knowing that both drugs have short half-lives (approximately 1 hour).

- the risk of drug-drug interaction might be more prevalent in individuals carrying a CYP2C19 deficient allele that slows the enzyme activity.

250 healthy male volunteers will be screened in order to obtain a 80% statistical power and a 5% alpha risk according to the expected variability of the main objective (difference of at least 11% between the PRI) (Gilard 2008). See section 10.1 (statistics) for more details.



After the first medical visit, a genotyping will be realised to select the subjects according to their genotypes for CYP2C19. The first group will include volunteers carrying two CYP2C19 functional alleles and « good responders » (with a PRI <50%) after the first step of clopidogrel alone, to decrease the possibility of reduced effectiveness of clopidogrel due to a loss-of-function CYP2C19 polymorphism or an inter-individual variability of clopidogrel response. The second group will be composed of subjects with at least one defective allele (CYP2C19*2 or CYP2C19*3). CYP2C19*17/*17 genotyped subjects (~5% of the Caucasian population) corresponding to ultra-rapid metabolizers will be excluded from the study.

All the volunteers will receive a loading dose of 300mg of clopidogrel followed by 75mg/day during 6 days to obtain the basic values of PRI (Fontana 2007). Good responders to clopidogrel treatment will continue the study.

In the shifted intake of clopidogrel and omeprazole arms, subjects will take one tablet of 20mg omeprazole in the evening + one tablet of clopidogrel 75mg the following morning. In the simultaneous intake arms, the subjects will simultaneously take both tablets of clopidogrel 75mg and of omeprazole 20mg in the morning. A re-labelling with the mention: “use for research only”, with the expiry date, the lot number, etc. will be done for the drugs taken at home by the volunteers.

Blood samples will be taken after each treatment period in order to measure platelet aggregation by VASP method, plasma concentrations of clopidogrel and its active metabolite and CYPs activity (CYP1A2, CYP3A, and CYP2C19). These tests will be done after each period of treatment and, in order to assess if all the patients returned to their basic values between the two treatments to ensure the absence of carry over effect, these tests will be also measured after the “wash-out” period of 14 days with clopidogrel alone. Periods of 14 days are chosen for practical reasons to have regular visits and to avoid the individual variability in the time of platelet turn-over.

Primary and secondary endpoints

The primary endpoint will be to assess whether a distinct and rational 12h chrono-pharmacological delayed administration of clopidogrel and omeprazole prevents the expected adverse drug-drug interaction between these two drugs if given simultaneously in selected CYP2C19 healthy subjects.

The secondary endpoints will be to characterize the mechanism of the interaction between clopidogrel and omeprazole, and to confirm the impact of the CYP2C19 variability. Moreover, the influence of the CYP2C19 genotype and predicted phenotype on the antiaggregant effect of clopidogrel will be assessed.

Randomisation

This study will be a phase I stratified randomized crossover trial. Randomization will take place after informed consent has been provided and baseline measurements have been performed (genotyping, response to clopidogrel screening). A randomization by block of 8 will be realised and an intermediate analysis is planned after the inclusion of 32 subjects. The stratification procedure will be implemented as follows. Stratification for CYP2C19 genotype will ensure that the numbers of participants receiving

each treatment sequence will be balanced within each stratum. Blocking within strata will ensure an approximate balance of the numbers in each group at any time during the trial.

Compliance

The Pharmacist/ Investigator will perform a Drug Accountability Form included in the CRF in which the following information will figure:

- Volunteer's code
- Visit n°
- Expiry date
- Lot n°
- Date of allocation to the volunteer for each visit and number of tablets delivered
- Date and content of return by the volunteer for each visit
- Comments
- Investigator's firm

Study duration for subjects, stopping rules and procedures for breaking codes

Random sequence generation will be performed for each stratum using a random-number table. The sequence list as well as block size will remain concealed from investigators. Treatment allocation will proceed through a series of sequentially numbered opaque, sealed envelopes, containing cards labelled "simultaneous then 12h-shifted" or "12h-shifted then simultaneous". The study will last 49 days (Figure 2).

Data collected in the CRF

All the randomization data will be recorded directly on the CRF and will be considered as source data. A list of all randomized participants will be kept, with the date of inclusion and the date and reason for dropout if applicable.

STUDY POPULATION

Inclusion criteria

Healthy male volunteers aged from 18 to 50 years old with a Body Mass Index between 18 and 25 will be recruited who will be able to give their consent and who will understand and read French language.

Non-inclusion criteria

The volunteers who will present one of the following criteria will not be included in the study:

- smoker
- hypersensitivity to clopidogrel or omeprazole active substances or constituents
- concomitant disease
- drug or food (grape fruit) which can affect the CYP3A,1A2,2C19 activities

- drugs associated with an increase of bleeding risk: aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs, steroids and serotonin reuptake inhibitors (in the last 10 days before the start of the study)
- bleeding familial history or antecedent or haemorrhagic troubles
- previous gastro-intestinal ulcer or active ulcer
- pre-existing hematologic troubles

The homozygous volunteers for CYP2C19*17*17 will be excluded from the study.

Withdrawal criteria

If a patient withdraws from the study, the results will not be taken into account and another patient will be included in the study following the previous criteria.

Selection and recruitment procedures

The volunteers will be recruited among students of medical or pharmaceutical sciences faculties. To avoid problems with induction or inhibition of some cytochromes the BMI will have to be between 18 and 25 and the volunteer a non smoker (<5 cigarettes/day). The recruitment procedures will be achieved through announce approved by the Ethical Committee of the University Geneva Hospitals.

STUDY TREATMENTS

Clopidogrel (Plavix®)

Clopidogrel irreversibly modifies the platelets and it takes a platelet renewal period around 10 days for a return up to a normal function.

Clopidogrel must be bio-activated in order to play its anti-aggregating role (Savi 2000).

It also inhibits the platelet aggregation from other agonists in neutralizing the ADP- induced platelet activity amplification.

The currently recommended dose is 75 mg/day. Indeed, the consecutive administration of 75 mg of clopidogrel per day was traduced by an important ADP-induced platelet inhibition from the first day of treatment. Also, at the steady state, the dose of 75 mg daily allowed to obtain a median inhibition rate of 40 to 60%.

The efficacy of clopidogrel was demonstrated by the following studies:

The CAPRIE study (Caprie Committee, 1996) included patients with myocardial infarction or cardiovascular ischemic event or symptomatic peripheral arterial disease and compared aspirin with clopidogrel; the rate of cardiovascular events was diminished by 8.7% (RRR) with clopidogrel *versus* aspirin. Clopidogrel has therefore been approved in the prevention of atherothrombotic events since 1998. The CURE study (Fox 2004), realised in patients with acute coronary syndrome, compared a treatment of aspirin alone versus aspirin+clopidogrel. This study showed that clopidogrel was associated with a 20% reduction (RRR) of occurrence of cardiovascular death, myocardial infarction or stroke. In 2003, clopidogrel was also indicated in association with aspirin for the treatment of unstable angina or non Q-wave myocardial infarction.

Pharmacokinetic properties

After repeated oral doses of 75mg, clopidogrel is fast absorbed. The plasmatic rates of the unchanged molecule are very low and lower than the limit of quantification after the second hour following the intake.

From a metabolic point of view, clopidogrel is oxidized by CYP2C19, 2B6 and 1A2 to 2-oxo-clopidogrel which is an intermediate metabolite that is further metabolized into the active thiol metabolite of clopidogrel mainly by CYP2C19 and 3A4 (Figure 1). (Savi 2000, Kazui 2009). The major circulating metabolite of clopidogrel is the carboxylic acid compound produced by esterases which completely lacks antiaggregant activity.

The maximal concentration of the active metabolite is seen 1 hour after administration.

Single oral daily dose of clopidogrel 75mg in one tablet.

Side effects

The most frequent side effects observed are haemorrhagic troubles (8.6%), hypertension (4.3%) and headache (7.6%). The prolongation of the bleeding time under clopidogrel has to be considered in case of urgent surgery or injury. In case of elective surgery, clopidogrel treatment should be stopped at least 10 days before the surgery. Other common troubles are purpuric disorders or rash, hypercholesterolemia, gastrointestinal disorders such as abdominal pain, constipation, diarrhoea, arthralgia or backache. Some rare cases of agranulocytosis were also observed.

Erythema multiforme, thrombotic thrombocytopenic purpura, drug-induced disorders of liver and hepatitis are rare as well as anaphylaxis and intracranial haemorrhage. Other disorders such as non-cardiogenic pulmonary oedema, gastrointestinal ulcer, liver function tests abnormal, hepatotoxicity or epidural hematoma can also occur. (Micromedex®).

Omeprazole (Antramups®)

Omeprazole (5-methoxy-2-[[[4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridinyl] methyl] sulfinyl]-1H-benzimidazole) is the most currently used PPI (Figure 3). It was chosen because as previously described, it was shown to be the most potent PPI to produce drug-drug interaction with clopidogrel, reducing its antiaggregating effect (*ex-vivo* studies). Moreover, it is a widely prescribed PPI because it was the first in the market and generic drugs with lower cost are produced.

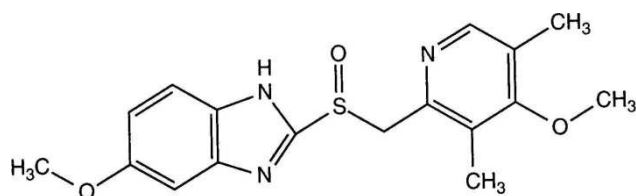


Figure 3. Chemical structure of omeprazole

Omeprazole is a strong specific inhibitor of the proton pump of parietal cell. Omeprazole is concentrated in the acid medium of secretor canalicules of the parietal cell and is transformed into its

active form. At the parietal cell level, omeprazole allows a blockade of the H⁺/K⁺ ATPase (Lorentzon, 1985) and both inhibits strongly the basal and stimulated acid secretion.

Clinical trials have shown that omeprazole was highly effective for the treatment of duodenal or gastric ulcer, reflux esophagitis and Zollinger–Ellison syndrometripole therapy regimen with omeprazole, amoxicillin and clarithromycin is now widely accepted for *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradication (Lind, 1999).

Pharmacokinetic properties

Omeprazole is unstable in acidic media which is the reason why an acid resistant formulation was developed for oral use with enteric-coated tablets. Omeprazole is normally absorbed after 3-6 hours in the small intestine. The systemic bioavailability after a single dose is 35% (Ching et al.1991) and 60% after repeated doses. Omeprazole is strongly bound to plasmatic proteins (95%). The distribution volume is 0.3 l/kg in healthy volunteers and similar values were measured in patients with renal failure. Omeprazole is mainly metabolized by hepatic CYP450s. The main metabolite is 5-hydroxyomeprazole (Abello 2000) which is formed principally by CYP2C19 whereas omeprazole sulfone is mainly produced by CYP3A4. The half life of omeprazole is around 1 hour. After a unique dose, the metabolites of omeprazole are mainly eliminated in the urine (80%) and the rest in the bile and faeces.

Side effects

Omeprazole common side effects are abdominal pain (2.4 to 5.4%), diarrhoea (3 to 3.7%) and headache (2.9 to 6.9%).

Rare serious effects can occur such as pancreatitis, hepatotoxicity, bone fracture, osteoporosis-related, hip fracture, rhabdomyolysis or interstitial nephritis (Micromedex®).

Midazolam (Dormicum®)

Midazolam is a benzodiazepine used as an hypnotic. The half-life of midazolam is around 1hour. Its bioavailability is 30-50%. Midazolam is strongly bound to plasmatic proteins (97%).

Midazolam is metabolized mainly by CYP3A4.

In this study, midazolam is used as substrate for the CYP3A4 phenotyping. In some rare cases, midazolam has been associated with hypersensitivity reactions, agitation or aggressiveness. However, the low dose (0.1 mg) administrated for this application (100 fold lower than therapeutic dose), will ensure there will be none of the pharmacological nor side effects generally observed with benzodiazepines».

Drug accountability

The drugs used will be bought at the Pharmacy of the Geneva University Hospitals and the storage, the labelling and the distribution will be insured by the pharmacists of the Division of Clinical pharmacology and Toxicology. At visit 2, “inclusion and genotyping”, the volunteer will receive one tablet of Plavix® 300mg and one box of Plavix® 75mg for the first step of the study. After the genotyping result, if the volunteer is not included in the study, he has to go to the Clinical Research Centre to the explanation of the genotyping results and to return the drugs at the same time (inform consent, page 2).At visit 4 “baseline 1”, the boxes of Plavix® 75mg and Antramups® 20mg will be

distributed up to the next step and will be return at the visit 5. At visit 5 “measure 1” and visit 6 “baseline 2”, the same procedure will be applied: the drugs will be delivered and returned by the volunteer at the next visit (inform consent, page 3).

Therefore, after each step of the study, the volunteers should return the boxes of drugs at the Clinical Research Centre to the pharmacist/investigator who will account the content of the boxes and complete the Drug Accountability Form included in the CRF. The boxes full or empty will be return to the Pharmacy of the Geneva Hospitals for destruction.

EVALUATION CRITERIA

Platelet Function

After each period of treatment, clopidogrel responsiveness will be evaluated by measuring the phosphorylation status of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP assay). The VASP assay is a specific method to monitor the biological effect of clopidogrel on its target (the platelet ADP receptor P2Y₁₂) (Aleil 2005, Schwarz 1999). P2Y₁₂ is a G_i-coupled receptor that mediates a reduction of the platelet cyclic adenosine monophosphate (cAMP) by adenylate cyclase inhibition. A low level of cAMP leads to a reduction in the activation of specific protein kinases which can no longer phosphorylate VASP. VASP phosphorylation can easily be measured by quantitative flow cytometry and the VASP phosphorylation/dephosphorylation ratio reflects P2Y₁₂ inhibition by clopidogrel.

Results will be expressed as a platelet reactivity index (PRI, %) calculated from the mean fluorescence intensity (MFI) of blood samples (30 µl of whole blood out of a 2.7ml citrated tube) incubated with PGE1 alone or with both PGE1 and ADP simultaneously (Figure 4), using the following formula:

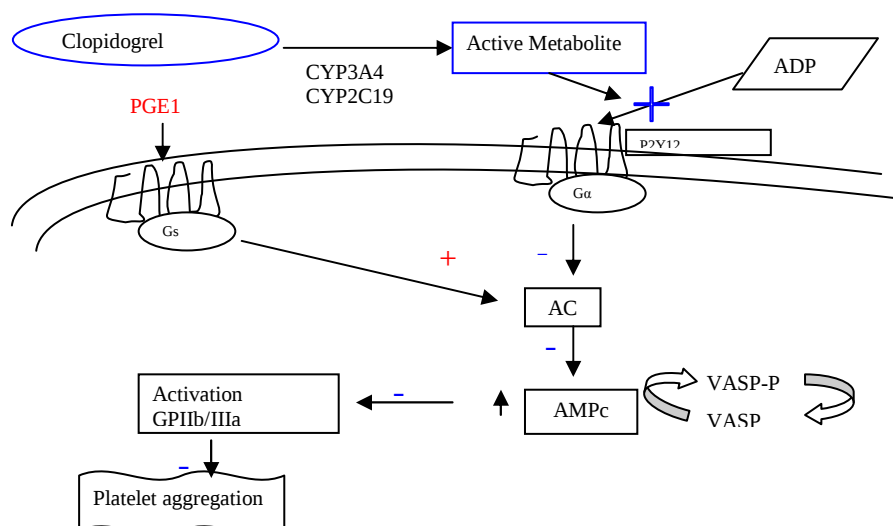
$$PRI = ((MFI_{PGE1}) - (MFI_{PGE1+ADP})) / (MFI_{PGE1}) \times 100.$$


Figure 4. Description of the VASP assay. In the conditions described, the VASP phosphorylation status is tightly related to P2Y₁₂ blockage and thus reflects the inhibitory activity of clopidogrel.

Genotyping

Genomic DNA will be extracted from 200 μ l of whole blood using the QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN, Hombrechtikon, Switzerland).

Three single nucleotide polymorphisms (SNP) of the *CYP2C19* gene will be determined, *CYP2C19*2* (c.681G>A), *CYP2C19*3* (c.636G>A) and *CYP2C19*17* (g.-806C>T).

For *CYP2C19*2* and *CYP2C19*3* a single multiplex PCR will be performed in order to amplify two DNA fragments, each containing one of the two SNPs to analyse. Identification of the allelic variants is achieved by combining two different formats of sequence-specific fluorescent probes (LightMix, TIB MOLBIOL, Berlin, Germany). The first is a unique hybridization probe, complementary to the DNA sequence surrounding and including the SNP of interest, which is labelled with fluorescein and a non-fluorescent quencher (SimpleProbe). When the probe hybridizes to its target, quenching is reduced and a green fluorescent signal can be detected by the LightCycler (Roche, Rotkreuz, Switzerland) when fluorescein is excited. For the second SNP a pair of FRET-probes is used: an anchor probe labelled with fluorescein that binds to the sequence upstream the SNP and a sensor probe labelled with LC-Red640 that hybridizes to the SNP sequence, leaving a gap of 1-5 nucleotides between the two probes. Only when the two probes are hybridized to their target sequence and therefore the dyes are closed to each other, FRET is possible. Excitation of fluorescein will result in red fluorescence emission from the LC-Red640 dye that is detected by the LightCycler. For both, the SimpleProbe and the FRET-probes, genotype is determined by melting curve analysis obtained by gradually increasing temperature and monitoring the decrease in fluorescence reflecting probe detachment from its target. The more stable the hybridization between the probe and the target sequence, the higher the melting temperatures (T_m). The substitution of one nucleotide (SNP) in the mutant sequence results in a decrease in the measured T_m compared to the non-mutated sequence.

The *CYP2C19*17* polymorphism will be determined using a commercially available TaqMan® SNP genotyping assay (C_469857_10, Applied Biosystems, Warrington, UK). Twenty-five μ l reactions will be performed using pre-designed PCR primers and two TaqMan® MGB probes (FAMTM and VIC® dye-labelled), one complementary to the sequence containing the normal nucleotide and the other to the one containing the variant nucleotide (SNP). TaqMan probes are labelled at their 5'-end with a fluorophore and at the 3'-end with a quencher. Excitation of a native probe doesn't result in fluorescence emission since the quencher absorbs all the emitted energy. During the elongation step of the PCR, the probe, bound to its complementary target, is degraded by the 5'-exonuclease activity of the Taq polymerase leading to the separation of the fluorophore from the quencher resulting in fluorescence emission. In contrast, in the presence of a mismatch, no fluorescence is detected since the probe is detached from the target sequence by polymerase keeping quencher and fluorophore closed to each other. Allelic discrimination is achieved quantifying the emitted fluorescences by the Lightcycler detection system.

Phenotyping

A micrococktail approach will be used for the assessment of the phenotypic activity of the CYPs involved in the metabolism of clopidogrel (CYP1A2, 3A and 2C19). Standardized validated oral microdoses of probes will be administrated to volunteers during the visits 3, 4, 5 and 6 (Daali Y 2007). For CYP1A2, a cup of coffee or a glass of Coca cola (about 100 mg of caffeine) will be used. For CYP3A and CYP2C19, 0.1 mg of midazolam and 2 mg of omeprazole will be used respectively. A single venous blood sample (6mL) and a capillary whole blood sample (5µl) from a finger will be obtained 90 minutes after drug administration into tubes with EthyleneDiamineTetraAcetic acid (EDTA) anticoagulant, centrifuged at 2800 rpm and the plasma will be stored at -20°C until analysis. The three CYPs activities will be assessed by specific plasma drug/metabolite concentrations ratios.

Pharmacokinetics of clopidogrel and its active metabolite

The last day of each period of the study, after the intake of 75 mg of clopidogrel, a kinetic curve of the clopidogrel and its active metabolite will be realised for all the patients.

The subject will come at the clinical investigation centre and will take 75mg clopidogrel. Blood samples of 3-4ml will be taken in EDTA tubes (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) before the administration of clopidogrel for the following 3 hours (t= 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, and 3 hours).

After the blood sample collection, a derivatization agent will be added to stabilize the active metabolite and the blood will be centrifuged at 2500 rpm during 30 min. Plasma samples (1ml) will be purified by solid-phase extraction in C8 columns (Bond Elut, Varian Inc) after preconditioning with 1 ml of methanol and 1 ml of purified water. Then the columns will be washed with 1 ml of formic acid 0.1% followed by 1 ml of 50mM of aqueous ammonium acetate solution and the analytes will be eluted by 1 ml of methanol and evaporated before a redissolution in 200µl of a methanol/formic acid mix (2/3;v/v).

The analysis will be performed by an Agilent 1100 series LC system (Agilent, Palo Alto, USA) coupled with an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) using a Discovery C18 column (150mm x 2,1mm ID, particle size 5µm) from SUPELCO (Bellefonte, PA, USA) preceded by a guard column with the same stationary phase (20mm x 2,1mm x 5µm) at ambient temperature. A linear gradient will be applied with a mobile phase composed of A: formic acid 0.1% and B: methanol (35:65) with a flow rate of 200µl/min. The mass spectra will be obtained by electrospray ionization in positive mode detection with the following optimized parameters: capillary voltage, 4200V; skimmer, 40V; dry gas, 11l/min; dry temperature: 350°C. The observed transitions for clopidogrel will be m/z 322-212 and for the active metabolite: m/z 504-354.

DATA COLLECTION AND MANAGEMENT

Source data

The CRF (Case Report Form) will contain all the source data necessary for the study. For example, these data will be original registering, clinical data, and laboratory report. If monitoring, audit or inspection are realised, the principal investigator will allow free access to these source data.

CRF

The Case Report Form is an investigator file, written for each patient, which contains all the data necessary to the progress and the analysis of the study including the safety data.

In this study, the following data will be directly collected in the CRF, and considered as source documents:

- Demography: age, ethnic origin
- Clinical exam: weight, size, Body Mass Index, blood pressure
- Inclusion or non-inclusion criteria
- CYP2C19 genotype
- Platelet aggregation measures (VASP method)
- Hours of drug intakes, time of blood sample, plasmatic concentration of clopidogrel and its metabolite
- CYP2C19, CYP3A and CYP1A2 phenotypes
- Drug Accountability Form
- Adverse drug events including SAE and SUSARs

Each page will include the subject's number and each visit will be dated and signed by the investigator like all the modifications.

Documents storage and keeping

The data will be collected in the CRF. The data will be also registred in a data bank by an Electronic Data Capture system "Sinatras": a web application with a data bank MS SQL Server 2005. This system allows a fast access to the data and all the informations about the study and quality insurance is immediately available. The access will be secured and only the co-investigators or persons authorized by the principal investigator will have access to the data to ensure the better confidentiality.

The investigators will keep the data of the study 10 years after the end of the study in a closed and safe place.

The list of subject's identification will be kept during a sufficient time to allow the necessary medical follow-up when appropriate.

In the inform consent, the volunteers will be able to choice if they want to know their genotype and phenotypes or not.

ADVERSE EVENTS MANAGEMENT

Definitions

An adverse event (AE) is defined as any adverse change from the patient's baseline condition. An adverse event does not necessarily have a causal relationship with the study treatment. A serious adverse event (SAE) as defined by ICH is any untoward medical occurrence that at any dose meets any of the following conditions:

- Results in death

-Is life-threatening (the subject was at risk of death at the time of the event. It does not refer to an event which hypothetically might have caused death if it were more severe)

-Requires or prolongs hospital stay significantly

-Results in persistent or significant disability/incapacity

-Is a congenital anomaly/birth defect

-Is an important medical event

Important medical events are those that may not be immediately life threatening, but are clearly of major clinical relevance. They may jeopardize the subject, and may require an intervention to prevent one of the other serious outcomes noted above.

A suspected unexpected serious adverse reaction (SUSAR) is defined as a serious adverse event that is not expected (not described before or known with a lower frequency) and which the causation with the study product is established with an imputability at least possible.

Adverse events collection and grading

A detailed description of any adverse event will be entered in the CRF, including its intensity graded on a three-point scale (mild, moderate, severe), the action undertaken for this event, the investigator's assessment of the relationship of the event to treatment and the outcome. All adverse events encountered during the clinical trial will be followed up until the event is either resolved or adequately explained.

The nature of the SAE (expected or unexpected) as well as the relationship between the SAE and the study drug (imputability) will be assessed in order to define whether it is a Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR) or not.

AE reporting

Reports of all SAE will be submitted to the Ethics Committee and SwissMedic within 15 days for the SUSAR (as soon as possible for the death and within 7 days). The non-SUSAR SAE will be reported via annual reports.

Follow-up of AE

In case of detected adverse effect, the volunteer will be treated as appropriate. If the treatment is not compatible with the study protocol, the subject will be excluded from the study and the randomization procedure will be broken.

QUALITY CONTROL AND ASSURANCE

Monitoring

Throughout the study, a monitoring will be realised to verify the good application of the study protocol and the concordance between the source data and the CRF, the modifications of the CRF and the collection of the adverse effects.

Audit and inspection

In case of an audit or inspection by the regulatory authorities, the investigator will have to allow the authorized persons to:

- visit the study local, installations and used material;
- meet all the persons involved from near and far in the study;
- have a direct access at the study documents and source data;
- see all the documents related to the study.

STATISTICS

Number of subjects

The sample size was estimated on the basis of a previous study conducted by Gilard et al. (Gilard 2008). In a double blind placebo-controlled trial, subjects received aspirin (75 mg/day) and clopidogrel (loading dose, followed by 75 mg/day) and were randomized to receive either omeprazole (20 mg/day) or placebo for 7 days. Platelet phosphorylated-VASP expressed as a platelet reactivity index (PRI) at day 7 was 39.8% (SD 15.4) and 51.4% (SD 16.4) respectively in the placebo and omeprazole groups ($p < 0.0001$).

Assuming that the present study aims to detect a similar 10% difference in PRI between groups with simultaneous and 12h-shifted omeprazole administration (SD 10% since non-responders are excluded), sample size analysis indicates that 16 volunteers per group are needed (80% statistical power; 5% alpha risk).

The frequency of CYP2C19*1*2, CYP2C19*1*3, CYP2C19*2*2 or CYP2C19*3*3, CYP2C19*2/*3, CYP2C19*17/*2, CYP2C19*17*3 genotypes in the population is approximately 25% and among them, 50% of good responders to clopidogrel are expected. The recruitment of $32/(0.25*0.5)=256$ subjects would allow the inclusion of 32 carriers of at least one CYP2C19 defective allele and good responders to clopidogrel. The frequency of wild type genotype expected in the population is approximately 70% and among them 60% of clopidogrel good responders are expected. The recruitment of $32/(0.7*0.6)=76$ subjects would be sufficient to include 32 wild type homozygotes and good clopidogrel responders. Thus, about 250 volunteers will have to be screened for the whole study.

Data analysis

The anti-aggregating effect of clopidogrel measured by the VASP assay (primary endpoint) will be analyzed to assess differences according to treatment and genotype using multiple repeated analyses of variance (ANOVA). Treatment will be included as a within-subject factor. Treatment sequence and genotype group will be included as between-subject factors. Possible interactions between these factors will be investigated. According to its distribution, the dependent variable (PRI) will be transformed if appropriate (log-transformation or other).

In vitro variability in the response of antiplatelet drugs will be investigated using descriptive statistics and usual parametric and non-parametric tests. All statistical tests will be interpreted at the 5% significance level (two-sided).

ETHICS

Good clinical practice

This study will be guided in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki, the ICH guidelines for the Good Clinical Practices, the law on therapeutic products, the “ordonnance sur les essais cliniques de produits thérapeutiques”. The investigators will be responsible of the strict enforcement of the protocol during the study.

Ethical Committee

The study protocol, the documents for the patients, the investigator's list will be submitted to the Ethical Committee (departments Neuclid, Apsi, Surgery), University Hospitals, Geneva. During the study, the investigators will have the obligation to submit at the EC each modification of all the documents, the study progression, the SAE and all important information about the investigated products.

Inform and content

When the investigators will have identified a subject who can participate to the study, the aim, the development, and the explanations will be exposed in words easy to understand. In order to be included in the study, the volunteers must have read the information letter in detail and signed the consent form. Withdrawal from the study is possible whenever desired by the volunteers without consequences or explanation. The volunteers will receive a compensation of 450 Swiss francs for the whole study but that will depend on the number of days passed in the study:

- after the visit 1, all volunteers will receive 25-CHF;
- after the visit 2, the volunteers will receive 25-CHF;
- at each visit 3, 4, 5 and 6, the volunteers will receive 100-CHF.

Confidentiality

The study data collected in the CRF will be anonymous and the volunteers will be identified with a study number. Only the investigators actively involved in the study will be able to know the subject's identity. The subjects will be informed that their personal data could be presented to the regulatory authorities confidentially and in order to verify the application of the ethical principles of the Good Clinical Practice in this research protocol. In case of publication, the results will be expressed in a collective manner and none patient will be identifiable.

The results obtained from genotyping will be communicated to the volunteers if they wish and they will decide in the consent form if the blood sample will be kept with reversible anonymization, irreversible anonymization or destroyed.

All information obtained during the study will be kept confidential.

PUBLICATION POLICY

The data obtained from this study will be subject to publication. After obtaining the agreement by the Ethical Committee and Swissmedic, this clinical trial will be registered on the international register of clinical trials (www.clinicaltrials.gov), in accordance with the requirements of the international committee of editors of medical reviews.

FINANCING AND INSURANCE

Funds

A request of funds has been asked to the Swiss National Science Foundation for this study.

Insurance

The promoter is a member of the University Geneva Hospitals so a special insurance will be contracted to cover all the damages which could arise in this study.

REFERENCES

- Abelö A, Andersson TB, Antonsson M, Naudot AK, Skånberg I, Weidolf L. Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2000;28: 966-72.
- Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heintz A, Gachet C. Flow citometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 85-92.
- Cadroy Y, Thalamas C, Sakariassen K, Boneu B. Superior efficacy of clopidogrel plus acetylsalicylic acid compared with extended-release dipyridamole plus acetylsalicylic acid in preventing arterial thrombogenesis in healthy volunteers. *Thromb Res.* 2005; 116(4):293-300.
- CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329–39.
- Chaudhry AS, Kochlar R, Kohli KK. Genetic polymorphism of CYP2C19 & therapeutic response to proton pump inhibitors. *Indian J Med Res* 2008; 127: 521-530.
- Chen BL, Chen Y, Tu JH, Li YL, Zhang W, Li Q, Fan L, Tan ZR, Hu DL, Wang D, Wang LS, Ouyang DS, Zhou HH. Clopidogrel inhibits CYP2C19-dependent hydroxylation of omeprazole related to CYP2C19 genetic polymorphisms. *J Clin Pharmacol.* 2009; 49(5):574-81.
- Ching MS, Mihaly GW, Angus PW, Morgan DJ, Devenish-Meares S, Yeomans ND, Smallwood RA. Oral bioavailability of omeprazole before and after chronic therapy in patients with duodenal ulcer. *Br J Clin Pharmacol.* 1991 Feb;31(2):166-70.
- Daali Y, Samer C, Eap CB, Rebsamen M, Rossier M, Dayer P, Desmeules J. Micro-cocktail validation for CYP3A and CYP2D6 assessment using a low dose of midazolam (0.075 mg) and dextromethorphan (2.5 mg). *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2007; 81:S77-S77.
- Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 913-58.
- Farid NA., Payne CD., Small DS., Winters KJ., Ernest CS., Brandt JT., Darstein C., Jakubowski JA., Salazar DE. Cytochrome P450 inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2007; 81: 735-741.
- Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P. Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. *J Thromb Haemost.* 2006; 4(4):813-9.

- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny J-L, Aiach M, Gaussem P. Adenosine Diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects P2Y₁₂. *Circulation* 2003;108: 989-995.
- Fox KA.A., Mehta SR.; Peters R, Zhao F, Lakkis N, Gersh BJ, Yusuf S. Benefits and Risks of the Combination of Clopidogrel and Aspirin in Patients Undergoing Surgical Revascularization for Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events (CURE) Trial. *Circulation* 2004;110:1202-1208.
- Geisler T., Schaeffeler E., Dippon J., et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 1251-1259.
- Gilard M, Arnaud B, Cornily J-C, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, Mansourati J, Mottier D, Abgrall J-F, Boschat J. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin, the randomized, double blind (OCLA study). *JACC* 2008; 51: 256-260.
- Gilard M, Cornily J-C, Boschat J. Initial assessment of clinical impact of a drug interaction between clopidogrel and proton pump inhibitors. *JACC* 2008; 52: 1037-1038.
- Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003; 107: 2908-2913.
- Ho PM, Maadox TM, Wang L, and al. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA* 2009; 301: 937-944.
- Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, Szmitko PE, Austin PC, Tu JV, Henry DA, Kopp A, Mamdani MM. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ*.2009: 180(7).
- Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos*. 2009
- Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, AR Tait, Carville DG, Guyer KE, Bates ER. Atorvastatin Reduces the Ability of Clopidogrel to Inhibit Platelet Aggregation: A New Drug–Drug Interaction. *Circulation* 2003: 107; 32-37.
- Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DGM, Guyer KE, Tait AR, Bates ER. Contribution of Hepatic Cytochrome P450 3A4 Metabolic Activity to the Phenomenon of Clopidogrel Resistance. *Circulation* 2004;109:166-171.
- Lim PWY, Goh KL, Wong BCY. CYP2C19 genotypes and the PPIs- focus on rabeprazole. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: S22-8.
- Lind T, Mégraud F, Unge P, Bayerdörffer E, O'morain C, Spiller R, Veldhuyzen Van Zanten S, Bardhan KD, Hellblom M, Wrangstadh M, Zeijlon L, Cederberg C. The MACH2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology* 1999;116:248-53.
- Lorentzon P, Eklundh B, Brändström A, Wallmark B. The mechanism for inhibition of gastric (H⁺ + K⁺)-ATPase by omeprazole. *Biochim Biophys Acta*. 1985;817:25-32.
- Mach F, Senouf D, Fontana P, Boehlen F, Reber G, Daali Y, de Moerloose P, Sigwart U. Not all statins interfere with clopidogrel during antiplatelet therapy. *Eur J Clin Invest*. 2005; 35(8):476-81.
- Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 2009;360:354-62.
- Miner P Jr, Katz PO, Chen Y, Sostek M. Gastric acid control with esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole, and rabeprazole: a five-way crossover study. *Am J Gastroenterol*. 2003 Dec;98(12):2616-20.
- Miura M, Satoh S, Tada H, Habuchi T, Suzuki T. Stereoselective metabolism of rabeprazole-thioether to rabeprazole by human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006 ;62:113-7
- 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.
- 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;84:891-896.

- Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, Pollin TI, Post W, Parsa A, Mitchell BD, Faraday N, Herzog W, Gurbel PA. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy, *JAMA* 2009;302:849-57.
- Sibbing D., Stegherr J., Latz W., Koch W, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *European Heart Journal* 2009; 1-7.
- Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *American Heart Journal* 2009: 157; 148.e1-148.e5.
- Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, Steg G, Ferrieres J, Danchin N, Becquemont L. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009; 360: 363-375.
- Snoep JD, Hovens MMC, Eikenboom JCJ, Van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2007;154:221-231.
- Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, and coll. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JACC* 2007; 51: 256-260.
- Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flux cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets: definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *J Thromb Haemost* 1999; 82: 1145-1152.
- Takahashia M, Pangb H, Kawabatac K, A. Faridd N, Kuriharaa A. Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; 48: 1219–1224.
- Umerura K, Furuta T, Kondo K. The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an active metabolite of clopidogrel in healthy subjects. *J Thromb Haemost* 2008;6:1439-1441.
- 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.
- Zambahari R, Kwok OH, Javier S, Mak KH, Piyamitr S, Tri Ho HQ, Hwang JJ, Suryawan R, Chow WH. Clinical use of clopidogrel in acute coronary syndrome. *Int J Clin Pract* 2007; 61: 473-481.

2/ Editorial du journal “Metabolism”

Available at www.sciencedirect.com

Metabolism

www.metabolismjournal.com

Editorial

Drug-drug interactions in HIV medicine: a not so simple and straightforward road to the future

Ritonavir is a well-known antiretroviral that has been extensively used in HIV therapeutics over the last 15 years. It is one of the first protease inhibitors to be developed and used in HIV-1 medicine. It is now rarely—if ever—used for its antiretroviral activity because it is associated with significant metabolic adverse effects such as hyperlipidemia [1,2]. On the other hand, ritonavir continues to be frequently used for its boosting effects in the plasma levels of other HIV drugs [3] by means of potent inhibition of both liver cytochromes and efflux transport proteins [4]. The downside is that numerous adverse interactions are possible when ritonavir is concomitantly used with other medications, and may even lead to potentially serious and/or life-threatening adverse events [5–7].

In this issue of the journal, Daali et al [8] report on the potential of a yet new interaction between ritonavir and the new antiplatelet prodrug prasugrel. Using recombinant microsomes, Daali et al found a potent inhibition of prasugrel bioactivation by ritonavir compared with other specific inhibitors of CYP3A and CYP2B6. This was attributed to the simultaneous inhibition of the aforementioned enzymes by ritonavir. This finding suggests a drug-drug interaction between these 2 medications that could prove to be clinically significant and needs to be studied further.

The problem of drug-drug interactions has become the subject of intense research in HIV therapeutics over the last decade. Various closely interdependent factors may affect the variability in the pharmacokinetics of an antiretroviral drug, including (a) medication-related factors (eg, other concomitantly administered medications, formulation of drug) and (b) host-related factors (such as age, sex, genetic factors, liver or other chronic disease, and environmental stimuli, like alcohol or nicotine exposure as well as dietary or nutritional habits). As an example, the dose of maraviroc (a new antiretroviral drug that acts through receptor inhibition) needs to be decreased if a liver enzyme inhibitor like ritonavir is used, or increased if a liver enzyme inducer like efavirenz (a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor) is used [9]. In addition, antiretroviral compliance has become one of the major issues in maintaining adequate viral and immunological control in HIV-1-infected patients. Over the last decade, there has been an increasing effort to simplify medicinal regimens and dosing schedules. However, patients frequently receive combinatorial regimens

of medications belonging to at least 2 different classes of antiretrovirals even when initiating antiretroviral treatment [10]. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the various regimens used in HIV subjects are complex and lead to significant drug-drug interactions that are a very important part of day-to-day modern HIV management. The drugs effects in complex regimens may be very difficult to predict [11]. Efforts have been made to identify predictors of such interactions [12], and clinicians use specific web databases that describe potential or already published interactions between antiretrovirals and other regimens [13].

The therapeutic management of HIV-1-infected patients is further complicated by the need to manage other comorbidities that arise within the life span of HIV-infected patients. The HIV population with the advent of new drugs is increasingly getting older. The aging process is associated, on its own, not only with other comorbidities but also with important changes in the pharmacokinetics of various drugs [14,15]. Moreover, potential drug-drug interactions between antiretrovirals and other medications are increasingly examined at the specific disease level. Drug-drug interactions may not only have implications for the specific patient being treated at a given time but also have important public health implications such as in the case of malaria and HIV coinfection in Africa [16].

Metabolic issues as well as cardiovascular disease have emerged as important medical issues in the management of HIV-infected patients [17–19]. Novel therapeutic strategies for the HIV-associated metabolic syndrome are increasingly reported [20,21]. Preventive strategies have been implemented to address the metabolic syndrome observed in HIV patients and delay cardiovascular disease progression [22,23]. Prasugrel has been recently approved for use in patients with acute coronary syndromes undergoing primary coronary intervention to prevent thrombotic events [24]. Over the next years, it is anticipated that increasing numbers of HIV-1-infected patients will suffer from coronary heart disease and will undergo primary coronary intervention as a response to an emergent cardiac event [25–27]; such patients may require the new antiplatelet prodrug prasugrel as an antithrombotic agent and to prevent the recurrence of an ischemic event after the placement of stents in the coronary arteries. If such a patient is on a ritonavir-containing regimen and based on the findings of Daali et al, the serum concentrations of the active metabolite

(s) of prasugrel may be decreased, leading to a subtherapeutic effect. Nevertheless, it is difficult, given the early stage of current knowledge, to state with certainty whether ritonavir will definitely have a clinically important interaction with prasugrel in a significant number of patients. Although studies like the one by Daali et al are extremely important in understanding the potential interactions of various medications at the cellular level, more work should be done to elucidate and quantify clinically significant interactions at the patient level.

All pharmaceutical companies doing HIV research evaluate candidate drugs both at the preclinical and at the early clinical study level and attempt to characterize the metabolic profile of the medications including specific transporters and the enzymes involved in compound degradation. Such studies usually target the adequacy of antiviral drug levels as a factor critical in maintaining viral control. Phase I to III studies sometimes fail to recognize relatively rare but significant interactions that are eventually described during postmarketing studies. The complexity of the drug development process increases with the use of regimens that include medications prescribed for other comorbidities. Thus, significant toxicity issues arising from such interactions may not be discovered at all until an astute clinician identifies them. The outcome would of course be much better if, on the basis of pharmacology concepts, one would be aware of potential interactions and thus be watchful. The case of ritonavir serves as a good example of the numerous intricate difficulties in assessing such effects during drug development.

The future of drug-drug interaction studies goes beyond the basic research level. Carefully structured in vivo studies to examine dosing of drugs used for other conditions concomitantly with new antiretrovirals are both difficult and costly to perform. However, there are increasing reports of clinical studies in healthy volunteers such as 2- or 3-way crossover studies that evaluate the issue of drug-drug interactions for combinatorial regimens that include ritonavir and other medications [28]. The authors should be commented for continuing their research with a clinical protocol, details of which are already available (at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01346800>). Nevertheless, basic science approaches such as the ones presented in the study by Daali et al establish the necessary background for clinical studies and push the way forward.

Sotirios Tsiodras
Fourth Department of Internal Medicine
Attikon University Hospital
University of Athens Medical School, Athens, Greece
E-mail address: tsiodras@med.uoa.gr

Christos S. Mantzoros
Division of Endocrinology
Diabetes, and Metabolism
Beth Israel and Deaconess Medical Center
Harvard Medical School
Harvard School of Public Health
Boston, MA, USA

0026-0495/\$ – see front matter
© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:[10.1016/j.metabol.2011.05.022](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.05.022)

REFERENCES

- [1] Tsiodras S, Mantzoros C, Hammer S, Samore M. Effects of protease inhibitors on hyperglycemia, hyperlipidemia, and lipodystrophy: a 5-year cohort study. *Arch Intern Med* 2000;160:2050-6.
- [2] Leow MK, Addy CL, Mantzoros CS. Clinical review 159: human immunodeficiency virus/highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: clinical presentation, pathophysiology, and therapeutic strategies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1961-76.
- [3] Merry C, Barry MG, Mulcahy F, et al. Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with ritonavir in HIV-infected patients. *AIDS* 1997;11:F29-33.
- [4] Foisy MM, Yakiwchuk EM, Hughes CA. Induction effects of ritonavir: implications for drug interactions. *Ann Pharmacother* 2008;42:1048-59.
- [5] Burman W, Orr L. Carbamazepine toxicity after starting combination antiretroviral therapy including ritonavir and efavirenz. *AIDS* 2000;14:2793-4.
- [6] Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 2000;38:41-57.
- [7] Cheng CH, Miller C, Lowe C, Pearson VE. Rhabdomyolysis due to probable interaction between simvastatin and ritonavir. *Am J Health Syst Pharm* 2002;59:728-30.
- [8] Daali Y, Ancrenaz V, Bosilkovska M, Dayer P, Desmeules J. Ritonavir inhibits the two main prasugrel bioactivation pathways in vitro: a potential drug-drug interaction in HIV patients. *Metabolism*. 2011 May 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21550074.
- [9] Abel S, Jenkins TM, Whitlock LA, Ridgway CE, Muirhead GJ. Effects of CYP3A4 inducers with and without CYP3A4 inhibitors on the pharmacokinetics of maraviroc in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65(Suppl 1): 38-46.
- [10] Daar ES, Tierney C, Fischl MA, et al. Atazanavir plus ritonavir or efavirenz as part of a 3-drug regimen for initial treatment of HIV-1: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2011;154:445-56.
- [11] Fletcher CV, Acosta EP, Cheng H, et al. Competing drug-drug interactions among multidrug antiretroviral regimens used in the treatment of HIV- infected subjects: ACTG 884. *AIDS* 2000;14:2495-501.
- [12] Patel N, Abdelsayed S, Veve M, Miller CD. Predictors of clinically significant drug-drug interactions among patients treated with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-, protease inhibitor-, and integrase-based antiretroviral regimens. *Ann Pharmacother* 2011;45: 317-24.
- [13] Serrano Lopez de Las Hazas JI. Drug interactions of new antiretroviral drugs. *Farm Hosp* 2011;35:36-43.
- [14] Noble RE. Drug therapy in the elderly. *Metabolism* 2003;52: 27-30.
- [15] Manfredi R. HIV disease and advanced age: an increasing therapeutic challenge. *Drugs Aging* 2002;19: 647-69.
- [16] Fehintola FA, Akinyinka OO, Adewole IF, Maponga CC, Ma Q, Morse GD. Drug interactions in the treatment and chemoprophylaxis of malaria in HIV infected individuals in sub Saharan Africa. *Curr Drug Metab* 2011;12:51-6.
- [17] Tsiodras S, Perelas A, Wanke C, Mantzoros CS. The HIV-1/HAART associated metabolic syndrome—novel adipokines, molecular associations and therapeutic implications. *J Infect* 2010;61:101-13.

- [18] Magkos F, Mantzoros CS. Body fat redistribution and metabolic abnormalities in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy: novel insights into pathophysiology and emerging opportunities for treatment. *Metabolism* 2011;60:749-53.
- [19] Dimock D, Thomas V, Cushing A, et al. Longitudinal assessment of metabolic abnormalities in adolescents and young adults with HIV-infection acquired perinatally or in early childhood. *Metabolism* 2011;60:874-80.
- [20] Magkos F, Brennan A, Sweeney L, et al. Leptin replacement improves postprandial glycemia and insulin sensitivity in human immunodeficiency virus-infected lipotrophic men treated with pioglitazone: a pilot study. *Metabolism* 2010 [Epub ahead of print; Nov 15].
- [21] Sekhar RV, Patel SG, D'Amico S, et al. Effects of rosiglitazone on abnormal lipid kinetics in HIV-associated dyslipidemic lipodystrophy: a stable isotope study. *Metabolism* 2011;60: 754-60.
- [22] Lundgren JD, Battegay M, Behrens G, et al. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines on the prevention and management of metabolic diseases in HIV. *HIV Med* 2008;9: 72-81.
- [23] Fiorenza CG, Chou SH, Mantzoros CS. Lipodystrophy: pathophysiology and advances in treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:137-50.
- [24] Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001-15.
- [25] Ren X, Triletskaya M, Kwan DM, Nguyen K, Shaw RE, Hui PY. Comparison of outcomes using bare metal versus drug-eluting stents in coronary artery disease patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Cardiol* 2009;104:216-22.
- [26] Boccardo F. Cardiovascular complications and atherosclerotic manifestations in the HIV-infected population: type, incidence and associated risk factors. *AIDS* 2008;22(Suppl 3): S19-26.
- [27] Segev A, Cantor WJ, Strauss BH. Outcome of percutaneous coronary intervention in HIV-infected patients. *Catheter Cardiovasc Interv* 2006;68:879-81.
- [28] Dingemans J, van Giersbergen PL, Patat A, Nilsson PN. Mutual pharmacokinetic interactions between bosentan and lopinavir/ritonavir in healthy participants. *Antivir Ther* 2010;15:157-63.

3/ Carte actualisée des interactions médicamenteuses avec les CYPs et édition 2011 du journal Pharmaflash

Interactions médicamenteuses impliquant la famille des cytochromes P450

L'objectif de cet article de Pharma-Flash est d'actualiser le tableau des interactions médicamenteuses pharmacocinétiques potentielles impliquant les cytochromes P450.

La carte plastifiée qui y est jointe intègre la littérature expérimentale et clinique sur le sujet; le tableau interactif publié sur le site www.pharmacoclin.ch renvoie aux références de base ayant servi à la détermination des cytochromes impliqués.

Les données contenues sur la carte des CYP doivent être perçues comme un outil pratique permettant une appréciation qualitative du degré d'interaction. Elles invitent le prescripteur à modifier le choix ou la posologie d'un médicament ou simplement à intensifier le suivi d'un traitement. Bien que l'information concernant les voies métaboliques soit régulièrement mise à jour sur le site internet, ce secteur est en plein développement et l'information ne se veut donc pas exhaustive. La version imprimée est publiée annuellement et offerte aux abonnés à Pharma-Flash.

Interactions médicamenteuses

Les interactions médicamenteuses non dépistées constituent une source majeure d'accidents ou d'échecs thérapeutiques particulièrement lors d'une polymédication. Elles causent un tiers des hospitalisations liées à des effets indésirables, 4-7% des hospitalisations en urgence ¹ et 1% de toutes les admissions à l'hôpital. ² Chez la personne âgée, leur prévalence constitue un des problèmes majeurs de prescription au sein des institutions. ³ Les conséquences cliniques qui leur sont liées sont cependant souvent méconnues, génèrent des attitudes thérapeutiques inappropriées et contribuent parfois à ce que des médicaments soient retirés du marché.

Une interaction médicamenteuse découle de l'association d'au moins deux médicaments, dont les effets indésirables se potentialisent ou dont l'effet thérapeutique s'oppose.

Certains médicaments posent un risque particulier d'interactions médicamenteuses, tels ceux dont la marge thérapeutique est étroite et l'efficacité sujette à une grande variabilité interindividuelle. Certaines situations accentuent ce risque, telles la sensibilité accrue aux effets indésirables médicamenteux due à l'âge ou la polymédication. Certaines affections, dont l'insuffisance rénale ou l'insuffisance hépatique, sont susceptibles de modifier les paramètres pharmacocinétiques des médicaments et donc d'augmenter les risques d'effets indésirables liés aux interactions médicamenteuses. ⁴

L'introduction d'un nouveau médicament nécessite d'anticiper le risque en tenant compte tant des propriétés pharmacologiques de chaque médicament que des diverses caractéristiques du patient (poids, âge, comorbidités, fonctions rénale ou hépatique, etc.). L'arrêt d'un médicament peut également avoir des conséquences pharmacocinétiques importantes sur les autres: la suppression d'un inducteur enzymatique ralentira l'élimination des médicaments qui empruntaient les mêmes voies métaboliques et dont les effets seront alors accentués.

Enfin, en cas d'association de substances à risques d'interactions médicamenteuses, le patient doit être informé des risques et de la surveillance à appliquer ; il lui sera recommandé d'éviter l'automédication.

Mécanismes d'Interactions

On distingue deux grandes catégories de mécanismes d'interactions: pharmacocinétique et pharmacodynamique.

Les interactions **pharmacodynamiques** mettent en cause des médicaments ayant des propriétés ou des effets indésirables communs. Il est souvent aisé d'anticiper, de dépister et de prédire les interactions qui découlent du mode d'action pharmacologique des médicaments. Ainsi, l'augmentation du risque hémorragique en cas de prise concomitante d'acénocoumarol et d'aspirine est un exemple d'interaction pharmacodynamique, du fait de

l'effet anticoagulant de l'acénocoumarol couplé à l'effet antiaggrégant plaquettaire de l'aspirine.

Les interactions **pharmacocinétiques** dépendent des propriétés physicochimiques propres à chaque médicament. Elles interviennent à différents stades du devenir du médicament dans l'organisme (absorption, distribution, métabolisation, excrétion). Dépister une interaction d'ordre pharmacocinétique impose de connaître la cinétique précise de chacun des médicaments. Des interactions néfastes sont décrites pour chacune des étapes de la pharmacocinétique.

Les recherches effectuées ces dernières années ont permis une meilleure compréhension des systèmes enzymatiques qui influencent le devenir des médicaments dans l'organisme, ainsi que des polymorphismes génétiques impliqués dans certaines étapes clés. La connaissance de ces derniers permet de mieux appréhender les variabilités interindividuelles observées ces dernières années. Schématiquement, pour être éliminé de l'organisme, un médicament doit subir des transformations qui augmentent son hydrosolubilité, facilitant son élimination principalement par les urines.

Les cytochromes humains ont été classifiés systématiquement en familles et sous-familles sur la base de leur séquence d'acides aminés. Les familles sont indiquées par l'abréviation du cytochrome P450 (CYP), suivie d'un chiffre (ex. : CYP2). Les membres d'une même famille ont 40% de similitude. Les enzymes partageant plus de 55% d'homologie de séquence sont incluses dans une même sous-famille, laquelle est indiquée par une lettre qui suit le chiffre de la famille (ex. : CYP2D). L'isoenzyme spécifique est codée par un second chiffre après la lettre (ex. : CYP2D6). Deux étapes principales de métabolisation des médicaments facilitent leur élimination.

Les cytochromes P450 jouent un rôle déterminant en contribuant au métabolisme oxydatif (phase I) de nombreux médicaments. Les conjugaisons par d'autres enzymes, telles que les glutathion-S-transferases (GST), la catéchol O-méthyl transférase (COMT) ou les glucuronyltransférases constituent les réactions de phase II. Outre les enzymes, certains transporteurs jouent un rôle important dans la biodisponibilité des médicaments et dans certaines interactions médicamenteuses. Le transporteur le plus étudié est la glycoprotéine P (Pgp), localisée au niveau de sites anatomiques stratégiques assurant le transport hors de la cellule d'une grande variété de molécules endogènes et exogènes. Plusieurs médicaments sont capables d'inhiber (ex : amiodarone) ou d'induire (ex : rifampicine) l'activité de la Pgp, altérant ainsi la cinétique des médicaments substrats de ce transporteur.

Cytochromes P450

Les cytochromes P450 constituent un système enzymatique qui métabolise plus de 80% des médicaments. Le terme "P450" remonte aux années 1960 et vient du fait que ces hémoprotéines (fer) absorbent la lumière de façon maximale à 450 nm.⁵ Trois familles de cytochromes P450 et une douzaine de sous-familles, actuellement identifiées chez l'homme,⁶ sont impliquées dans le métabolisme des médicaments.⁷⁻¹⁰ On les trouve principalement dans les hépatocytes mais aussi dans l'intestin grêle, les reins, les poumons, le cerveau, etc. Les cytochromes ont une certaine spécificité de substrats. Les interactions médicamenteuses au niveau des cytochromes P450 résultent de l'administration concomitante d'une substance (appelée *substrat*, tableau I) métabolisée par une isoenzyme et d'une autre substance qui emprunte la même voie métabolique mais qui a, elle, la propriété d'inhiber ou d'induire l'isoenzyme (tableau II et III). Les médicaments *substrats* deviennent donc les "victimes" des *inducteurs* ou des *inhibiteurs* et c'est l'effet thérapeutique augmenté ou diminué de la molécule "victime" qui doit être surveillé. Il est par ailleurs possible, mais moins bien documenté, que des interactions de compétition surviennent entre deux substrats de la même isoenzyme.

Polymorphisme génétique

La vitesse de transformation des molécules par les cytochromes est également influencée par des facteurs génétiques. On observe ainsi dans des populations des réactions ralenties, accélérées ou qui conduisent à la formation de métabolites différents. Ceci peut s'expliquer

par l'activité modifiée d'une enzyme spécifique suite à des mutations dans les gènes correspondants. Cette particularité enzymatique fait que l'organisme réagit à un médicament d'une façon qualitativement et quantitativement différente. On parle alors de polymorphisme, notamment lorsqu'existent deux phénotypes facilement reconnaissables (les métaboliseurs lents et rapides) avec une fréquence supérieure à 1%.

Les cytochromes P450 de la famille 2 tels que le CYP2C9, 2C19 et 2D6 sont sujets à des polymorphismes et illustrent bien l'influence de la génétique sur les concentrations et les effets des médicaments. Des tests génétiques sont disponibles mais restent réservés à des situations cliniques où l'on observe une résistance ou des effets indésirables inattendus à des posologies usuelles.

Les conséquences pharmacologiques dépendent de la substance impliquée: chez un métaboliseur lent, une molécule transformée en métabolite inactif verra son effet prolongé, alors qu'un promédicament, qui doit être métabolisé pour devenir actif, verra son effet retardé et/ou diminué. C'est le cas de la codéine, qui doit être métabolisée en morphine pour exercer une activité pharmacologique: les métaboliseurs lents du CYP2D6 sont résistants à ses effets alors que les ultra-rapides réagissent de façon marquée à de très petites doses. Près de 10% de la population caucasienne sont déficients en CYP2D6 et métabolisent lentement les substrats de cette enzyme, contre environ 10% qui possèdent un phénotype de métaboliseur ultra-rapide à la suite d'une amplification génétique.¹¹ Approximativement 2% des Européens, mais 20% des Asiatiques, sont des métaboliseurs lents du CYP2C19¹². A l'autre extrême, des métaboliseurs ultra-rapides du CYP2C19 ont été récemment documentés au sein d'une fraction non négligeable des populations asiatiques.¹³ Ils pourraient montrer des résistances inhabituelles aux thérapeutiques impliquant des inhibiteurs de la pompe à protons comme l'oméprazole ou certains antidépresseurs.

La variabilité de l'activité du CYP2C9 est également gouvernée par le génotype et moins de 10% des Caucasiens ont une activité ralentie.

Tableaux des substrats, des inhibiteurs et des inducteurs

Les substrats, les inhibiteurs et les inducteurs des cytochromes P450 les plus significatifs en clinique sont regroupés dans les trois tableaux figurant sur la carte plastifiée jointe, mise à jour des versions publiées précédemment.¹⁴⁻¹⁶

L'utilisation de *deux teintes* différentes signale des nuances, une case **foncée** signifiant une voie métabolique majeure, une inhibition ou une induction puissante selon le tableau, une case **claire** indiquant une voie métabolique mineure, une inhibition ou une induction modérée. Nous rendons le lecteur attentif à l'influence des polymorphismes génétiques sur les cytochromes 2C9, 2C19 et 2D6. Si le polymorphisme d'un individu est connu, le tableau permet d'identifier les substrats qui seront concernés par son particularisme. Ainsi, un métaboliseur lent du CYP2C9 élimine plus lentement certains anticoagulants oraux (coumarines), antidiabétiques oraux (sulfamides), antiépileptiques (phénytoïne), analgésiques (AINS) ou antihypertenseurs (sartan).

Un *point d'exclamation* (!) signifie que la molécule est transformée en un métabolite potentiellement important pour l'effet pharmacologique ou la toxicité et dont la demi-vie est parfois différente de celle de la molécule-mère.

Comment utiliser les tables ?

1. Cherchez si les molécules prises par le patient (ou que vous souhaitez prescrire) se trouvent dans le tableau des inhibiteurs ou des inducteurs.
2. Si oui, cherchez les autres médicaments pris par le patient (ou que vous voulez prescrire) dans le tableau des substrats.
3. Comparer les cases foncées et claires des molécules inhibitrices/inductrices à celles des molécules substrats.

Une interaction est possible lorsqu'une molécule substrat passe par le même isoenzyme qu'une molécule inhibitrice ou inductrice. L'interaction sera d'autant plus probable que les cases sont foncées ou que le substrat est métabolisé uniquement par le(s) cytochrome(s) commun(s).

Il est normal de trouver certaines molécules dans plusieurs tableaux. Une molécule inhibitrice peut également devenir une "victime" ou avoir un effet inhibiteur sur un cytochrome et inducteur sur un autre, le topiramate par exemple.

Voici trois exemples de raisonnements à partir des tableaux.

L'*acénocoumarol*, un anticoagulant, est principalement métabolisé par le CYP2C9, et secondairement par les CYP1A2 et CYP2C19. L'*amiodarone*, un antiarythmique, est un inhibiteur puissant du CYP2C9. Leur association se traduira par une réduction marquée de l'élimination de l'*acénocoumarol*, dont les doses devront être réduites sous peine d'élévation de l'INR et donc d'un risque hémorragique.¹⁷ A l'arrêt de l'inhibiteur, les cytochromes retrouvent leur fonctionnalité d'origine après l'élimination de cette substance. Pour l'*acénocoumarol*, cela demande quelques jours et reflète la demi-vie de la molécule. En revanche, la *phénytoïne*, un antiépileptique, est un inducteur puissant du CYP2C9 et du CYP2C19. Son administration concomitante à celle de l'*acénocoumarol* conduit à une métabolisation accrue de ce dernier, ce qui nécessite un ajustement des doses. L'arrêt de la *phénytoïne* s'accompagne d'un retour progressif, deux semaines environ, à la normale de l'activité du CYP2C9. De même, en début de traitement, l'interaction apparaît progressivement en raison du temps nécessaire à fabriquer de nouveaux cytochromes (liaison à un récepteur nucléaire qui régule l'expression du cytochrome).

Le *rivaroxaban* (Xarelto), un nouvel anticoagulant oral, a été inclus sur la carte des interactions (Tableau 1 - substrats). Les autorités sanitaires européennes lui ont récemment délivré une autorisation de mise sur le marché, dans la seule indication de prévention des événements thromboemboliques veineux chez l'adulte après chirurgie orthopédique de la hanche et du genou.¹⁸ Cet inhibiteur direct du facteur Xa est un substrat majeur du CYP3A4. Le *kétoconazole*, un antifongique, est un inhibiteur puissant du CYP3A4. L'association de ces deux médicaments se traduira par une diminution du métabolisme du *rivaroxaban* et donc une augmentation de sa concentration plasmatique, accentuant ainsi le risque hémorragique.

Le *clopidogrel*, un antiagrégant plaquettaire largement utilisé en cas de syndrome coronarien aigu notamment, est une prodrogue qui doit par conséquent subir une biotransformation par les cytochromes P450 3A et 2C19 principalement pour aboutir à un métabolite pharmacologiquement actif. Les *antirétroviraux* tels que le ritonavir par exemple sont des inhibiteurs puissants du CYP3A4. Si ces deux médicaments se voient associés, l'inhibition du CYP3A4, impliqué dans le métabolisme du *clopidogrel*, par le ritonavir provoquerait une diminution de l'activité antiagrégante du *clopidogrel* car il ne pourrait plus se transformer totalement en son métabolite actif.

Carte dynamique des interactions accessible sur internet

Une version électronique de la carte des interactions médicamenteuses liées aux cytochromes P450 est disponible sur le site internet du Service de Pharmacologie et Toxicologie Cliniques des HUG (www.pharmacoclin.ch), sous la rubrique : "centre d'information thérapeutique et de pharmacovigilance > outils > carte dynamique des interactions médicamenteuses et CYP". En cliquant sur les cases d'intérêt, cet outil permet d'accéder à la référence PubMed qui documente l'information en question, ainsi qu'aux principaux paramètres pharmacocinétiques, incluant les constantes d'affinité et d'inhibition pour les substrats et les inhibiteurs. Ces derniers paramètres sont issus d'analyses cinétiques *in vitro* utilisant des microsomes hépatiques humains ou des cytochromes humains recombinants. Le K_m (en μM) est la constante d'affinité du substrat pour l'enzyme, ou constante de dissociation à l'équilibre du complexe substrat-enzyme, dérivée de l'équation de Michaelis-Menten.¹⁹ Il s'agit de la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de formation du métabolite est égale à la moitié de la vitesse maximale. Ainsi, plus le K_m du substrat sera faible, plus l'affinité pour l'enzyme sera élevée. Le K_i (en μM) est la constante d'inhibition, égale à la concentration de l'inhibiteur se liant à la moitié des sites enzymatiques disponibles, à l'équilibre et en l'absence de substrat. Plus le K_i de l'inhibiteur sera faible, plus l'inhibition sera marquée. Les valeurs de K_i devraient être interprétées en regard des concentrations plasmatiques de médicament et de la fraction libre dans le plasma et les hépatocytes. Les données de concentrations libres dans les hépatocytes étant rarement disponibles, une

estimation peut être effectuée en se basant sur la concentration plasmatique libre. En effet, une inhibition enzymatique serait significative lorsque cette valeur est proche du K_i .

Interactions significatives

La prescription de médicaments à marge thérapeutique étroite doit inciter à vérifier les interactions. L'état de la fonction hépatique et rénale, de même que le génotype du patient, influencent l'importance des interactions.

Effet de classe

Au sein d'une même classe de médicaments, les voies métaboliques d'élimination sont généralement similaires. Ainsi, la plupart des AINS ne sont pas décrits sur la carte mais quasiment tous passent par le CYP2C9. Une réflexion par analogie est raisonnable lorsque l'on ne retrouve pas le substrat sur la carte. Toutefois, certaines molécules échappent à cette règle: l'azithromycine n'est pas un inhibiteur du CYP3A4 et la pravastatine n'est pas un substrat significatif du CYP3A4, par exemple.

Que retenir ?

La connaissance de la relation entre un médicament et les cytochromes P450 (substrat, inhibition, induction) permet une meilleure anticipation des interactions médicamenteuses pharmacocinétiques qui peuvent s'avérer cliniquement significatives. Les tableaux présentés sur la carte, régulièrement mis à jour, représentent une aide importante pour le dépistage d'interactions métaboliques parfois difficiles à identifier en pratique.

Références :

1. Wasserfallen. Eur J Intern Med. 2001; 12(5): 442.
2. Pirmohamed. BMJ 2004 ; 329 : 15.
3. Tulner. Drugs Aging. 2008 ; 25(4) : 343.
4. Prescrire, Le Guide 2008. 2007; 27(290) : 1-208.
5. Omura. J Biol Chem 1964 ; 239 : 2370.
6. Nelson. Pharmacogenetics 1996 ; 6: 1.
7. Guengerich. In cytochrome P450 structure, mechanism and biochemistry, ed Ortiz de Montellano, Plenum Press, 1995 ; 473.
8. Gonzalez. TIPS 1992; 13: 346.
9. Desmeules. Oxford textbook of hepatology, 2nd ed, Oxford Univ Press 1999 ; 145.
10. Guengerich. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1999 ; 39 : 1.
11. Pharma-Flash 1997 ; 24 : 9.
12. Bonnabry. Med Hyg 1997 ; 55 : 834.
13. Sarah. Clin Pharmacol Ther 2006 ; 79 : 103.
14. Pharma-Flash 2002 ; 29 : 13.
15. Pharma-Flash 2005 ; 32 : 21.
16. Pharma-Flash 2006; 33 : 4.
17. Ohyama. Br J Clin Pharmacol 2000; 49: 244.
18. Xarelto: Summary of products characteristics.
19. Wienkers. Nat Rev Drug Discov 2005 ; 4 : 825.

INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES, CYTOCHROMES P450 ET P-GLYCOPROTEINE (Pgp)

	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp	
acénocoumarol										felbamate											pantoprazole									
acide méfénamique										félodipine											paracétamol									
acide valproïque										fentanyl											paroxétine									
agomelatine										fexofénadine											phénobarbital									
alfentanil										finastéride											phenprocoumone									
alprazolam										flécaïdine											phénytoïne									
amiodarone										fluoxétine											pioglitazone									
amitriptyline										flurbiprofène											piroxicam									
amlodipine										fluvastatine											prasugrel									
apixaban										fluvoxamine											prednisolone									
aripiprazole										fosamprenavir											proguanil									
artéméter										galantamine											prométhazine									
atazanavir										géfítinib											propafénone									
atomoxétine										gestodène											propofol									
atorvastatine										glibenclamide											propranolol									
bisoprolol										gliclazide											quétiapine									
bortézomib										glimépiride											quinidine									
bosentan										granisétron											quinine									
bromocriptine										halopéridol											ranitidine									
buprénorphine										hydrocodone											rabéprazole									
bupropion										ibuprofène											réboxétine									
caféine										ifosfamide											répaglinide									
carbamazépine										imatinib											rifabutine									
carvédilol										imipramine											rispéridone									
célécoxib										indinavir											ritonavir									
celiprolol										irbésartan											rivaroxaban									
chlorphéniramine										isradipine											saquinavir									
ciclosporine										itraconazole											saxagliptine									
citalopram										kétoconazole											sertraline									
clarithromycine										lansoprazole											sildénafil									
clobazam										letrozole											simvastatine									
clomipramine										lévomépromazine											sirolimus									
clonazépam										lidocaïne											sorafénib									
clopidogrel										lopéramide											sufentanil									
clozapine										lopinavir											sulfaméthoxazole									
codéine										loratadine											sunitinib									
colchicine										losartan											tacrolimus									
cortisol										luméfántrine											tadalafil									
cyclophosphamide										maprotiline											tamoxifène									
dabigatran										médroxyprogestérone											tamsulosine									
darunavir										méfloquine											ténoxicam									
dasatinib										méloxicam											terbinafine									
désogestrel										méthadone											terféndine									
dexaméthasone										méthylprednisolone											testostérone									
dextrométhorphan										métoprolol											THC									
diazépam										miansérine											théophylline									
diclofénac										midazolam											ticagrelor									
dienogest										mifépristone (RU486)											timolol									
digoxine										mirtazapine											tizanidine									
dihydrocodéine										moclobémide											tolbutamide									
dihydroergotamine										modafinil											toltérodine									
diltiazem										montélukast											torasémide									
diphénhydramine										naproxène											tramadol									
docétaxel										natéglidine											trazodone									
donépézil										nébivolol											triazolam									
dronédarone										nelfinavir											trimipramine									
duloxétine										névrapine											tropisétro									
dutastéride										nifédipine											vardénafil									
ecstasy (MDMA)										nilotinib											venlafaxine									
efavirenz										nimodipine											vérapamil									
ergotamine										nitrendipine											vinblastine									
erlotinib										noréthistérone											vincristine									
érythromycine										nortriptyline											voriconazole									
ésoméprazole										olanzapine											warfarine									
éthanol										oméprazole											zafirlukast									
éthinyloestradiol										ondansétro											zolmitriptan									
éthosuximide										oxybutynine											zolpidem									
étoposide										oxycodone											zopiclone									
étravirine										paclitaxel											zuclopenthixol									

voie conduisant à un métabolite actif

!

voie métabolique majeure

voie métabolique mineure

voie conduisant à un métabolite actif !

voie métabolique majeure

voie métabolique mineure

Tableau 1: Substrats des cytochromes P450 et de la Pgp

	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp	
acide valproïque										éthinyilestradiol											montélukast									
amiodarone										étravirine											natéglidine									
ananas										felbamate											néfazodone									
atazanavir										flécaïnide											nelfinavir									
bortézomib										fluconazole											nifédipine									
bupropion										fluoxétine											nilotinib									
célécoxib										fluvastatine											nitrendipine									
chardon marie (silibinine)										fluvoxamine											norfloxacine									
chloroquine										fosamprénavir											oméprazole									
chlorthromazine										géfitinib											pantoprazole									
ciclosporine										gemfibrozil											paroxétine									
cimétidine										gestodène											prasugrel									
ciprofloxacine										grapefruit, orange de Séville											prométhazine									
citalopram										halopéridol											propafénone									
clarithromycine										imatinib											quétiapine									
clomipramine										indinavir											quinidine									
clopidogrel										irbésartan											réboxétine									
curcuma										isoniazide											régliasse									
darunavir										itraconazole											rispéridone									
dasatinib										kétoconazole											ritonavir									
désogestrel										lansoprazole											roxithromycine									
dihydralazine										lévomépromazine											saquinavir									
diltiazem										lopinavir											sertraline									
diphénhydramine										losartan											simvastatine									
dipyridamole										luméfantrine											sorafénib									
disulfirame										méthadone											sulphamethoxazole									
doxycycline										méthylprednisolone											terbinafine									
dronédarone										métoclopramide											topiramate									
duloxétine										métronidazole											venlafaxine									
efavirenz										miconazole											vérapamil									
erlotinib										moclobémide											vinblastine									
érythromycine										modafinil											voriconazole									
ésoméprazole																					zafirlukast									

Tableau 2. Inhibiteurs des cytochromes P450 et de la Pgp

inhibiteur puissant

inhibiteur modéré

Tableau 2. Inhibiteurs des cytochromes P450 et de la Pgp

inhibiteur puissant

inhibiteur modéré

	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4/5	Pgp	
bosentan										isoniazide											oxcarbazépine									
carbamazépine										lansoprazole											phénobarbital									
cyclophosphamide										légumes (chou, brocoli)											phénytoïne									
dexaméthasone										méprobamate											primidone									
efavirenz										métamizole											rifabutine									
éthanol										millepertuis											rifampicine									
étravirine										modafinil											ritonavir									
felbamate										névirapine											tabac (goudrons)									
ifosfamide										oméprazole											topiramate									

<

Tableau 3. Inducteurs des cytochromes P450 et de la Pgp

inducteur puissant

inducteur modéré

Inhibition

Cytochromes : L'impact dépend de **a)** importance relative de la voie d'élimination inhibée par rapport à la clairance totale; **b)** présence ou non de métabolites actifs et **c)** concentrations d'inhibiteur. A l'arrêt du traitement inhibiteur, l'activité du CYP retourne progressivement à la normale (4 demi-vies).

Exemples: l'**amiodarone** inhibe fortement l'activité du CYP2C9 ; associée à l'**acénocoumarol**, substrat du CYP2C9, elle en ralentira l'élimination, d'où un risque d'hémorragie justifiant une adaptation posologique et un suivi INR rapproché. La **fluoxétine** inhibe fortement l'activité du CYP2D6 ; associée à la **codéine**, elle peut en abolir l'efficacité (! signifie que la codéine génère un métabolite actif, la morphine).

P-glycoprotéine : L'impact dépend de l'affinité du substrat pour ce transporteur, de la concentration et de la puissance de l'inhibiteur.

Exemple: la **ciclosporine** inhibe fortement l'activité de la Pgp. Associée à l'**indinavir**, substrat de la Pgp, elle entraînera une augmentation de sa biodisponibilité.

Induction

Cytochromes : L'impact dépend de **a)** importance relative de la voie d'élimination induite par rapport à la clairance totale, **b)** présence ou non de métabolites actifs et **c)** concentrations d'inducteur. A l'arrêt du traitement inducteur, l'activité du CYP retourne progressivement à la normale (> 2 semaines après disparition de l'inducteur dans le sang). Exemple: Le **millepertuis** induit progressivement et puissamment l'activité du CYP3A4. Il accélérera fortement l'élimination de l'**éthinyilestradiol**, substrat majeur du CYP3A4, et l'effet contraceptif ne sera plus assuré ; il faudra donc prévoir un autre mode de contraception.

P-glycoprotéine : L'impact dépend de l'affinité du substrat pour ce transporteur, de la concentration et la puissance de l'inducteur. Comme pour les CYP, l'activité de la Pgp retourne progressivement à la normale à l'arrêt du traitement inducteur (> 2 semaines après disparition de l'inducteur dans le sang). Exemple: la **rifampicine** induit fortement l'activité de la Pgp. Associée au **rivaroxaban**, substrat de la Pgp, elle entraînera une diminution de sa biodisponibilité.

Des tableaux dynamiques régulièrement mis à jour et comprenant davantage de molécules sont accessibles sur le site www.pharmacoclin.ch, rubrique Centre d'informations thérapeutiques et de pharmacovigilance > outils > carte dynamique des interactions médicamenteuses et CYP

4/ Posters

In vitro characterization of the clopidogrel bioactivation pathways by cytochromes P450 and potential drug-drug interactions

Ancrenaz V.¹, Daali Y.¹, Samer C.¹, Besson M.¹, Fontana P.²,

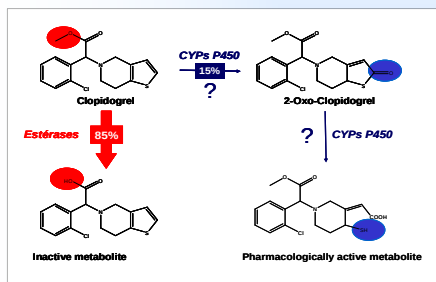
Dayer P.¹, Desmeules J.¹

¹Clinical Pharmacology & Toxicology, ²Angiology and Haemostasis, Geneva University Hospitals, Switzerland



Introduction

Clopidogrel is a **pro-drug** that needs to be activated by cytochromes P450 (CYPs) in **two steps** to form a pharmacologically active metabolite.

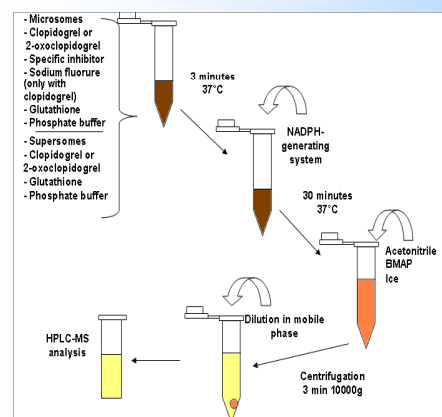


The aim of our work was to **characterize the CYPs isoforms involved in the bioactivation of clopidogrel** as well as their respective importance in the bioactivation process.

Methods

1. In vitro tests

Clopidogrel metabolism was investigated *in vitro* in **human liver microsomes** and **cDNA-expressed human CYPs**.



The specific CYP450 isoforms inhibitors used were :

CYPs	Specific inhibitor	Concentration of inhibitor
1A2	Furaflyline	10µM
2B6	4-(4-chlorobenzyl)pyridine (CBP)	1µM
2C19	Omeprazole	50µM
2C9	Sulphaphenazole	10µM
2D6	Quinidine	10µM
3A	Ketoconazole	10µM

2. Analytical method [1]

LC-MS: Agilent 1100 series coupled with a mass spectrometer Esquire 3000.

Column: C18 XTerra® (5µm x 2.1 x 50mm)

Flow: 0.3ml/min

Mobile phase: formic acid 0.1% / acetonitrile with linear gradient

Detection: MRM 322-212 for clopidogrel
338-183 for 2-oxo-clopidogrel
504-354 for active metabolite

Reference

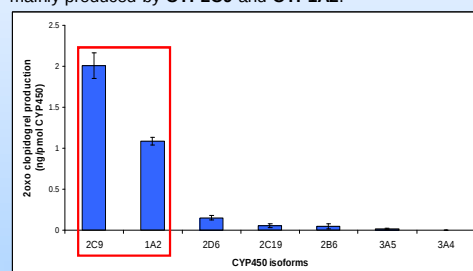
[1] Takahashi M, Pang H, Kawabata K, Farid NA, Kurihara A. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(4):1219-24.

Results

1. 2-oxo-clopidogrel formation

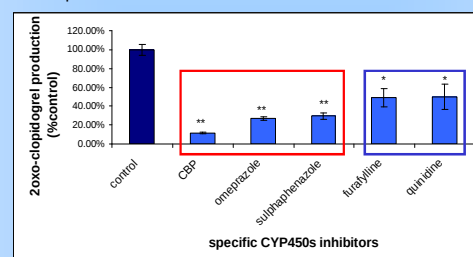
Supersomes

Clopidogrel intermediate metabolite (2-oxo-clopidogrel) was mainly produced by **CYP2C9** and **CYP1A2**.



Microsomes

The inhibitions of 2-oxo-clopidogrel production by **CYP2B6**, **CYP2C19**, **CYP2C9**, **CYP1A2** and **CYP2D6** blockade were of importance with a respective 88.2% ± 1%, 73.3% ± 2.2%, 70.7% ± 3.3%, 50.6% ± 9.7% and 50.1% ± 13.7% inhibition as compared to control.

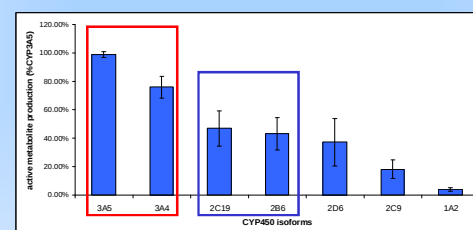


2. Active metabolite formation

2.1. From 2-oxo-clopidogrel

Supersomes

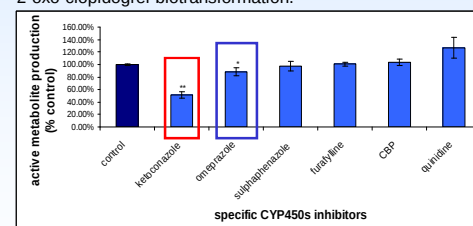
The cytochromes producing the highest quantity of active metabolite were **CYP3A4/5**, followed by **CYP2C19** and **CYP2B6** in a lower amount.



Microsomes

Ketoconazole 10 µM (**CYP3A** inhibitor) was a potent inhibitor of clopidogrel bioactivation, with a 51.8% ± 4.6% inhibition of clopidogrel active metabolite production in comparison with control.

Omeprazole 50 µM (**CYP2C19** inhibitor) had a lower influence on the active metabolite production (17.7% ± 2.5%). All the other tested CYP450s inhibitors had no impact on 2-oxo-clopidogrel biotransformation.



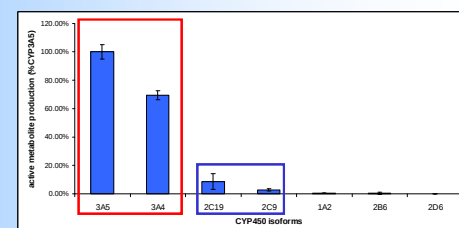
Conclusions

- **CYP3A** and **CYP2C19** are 2 key enzymes involved in the bio-activation of clopidogrel and its step-down metabolism.
- **CYP1A2** and **CYP2C9** contribute substantially to the first step while **CYP3A4** is most important in the second step of clopidogrel bioactivation.
- Genetic polymorphisms and/or drug-drug interactions via the **CYP3A**, **CYP2C9** or **CYP2C19** should be taken into account during clopidogrel therapy.
- Further clinical studies are needed to help to better predict these unwanted drug-drug interactions.

2.2. From clopidogrel

Supersomes

The biotransformation of clopidogrel into the active metabolite was mainly dependent on **CYP3A4/5** activity whereas **CYP2C19** and **CYP2C9** exerted a lower influence.

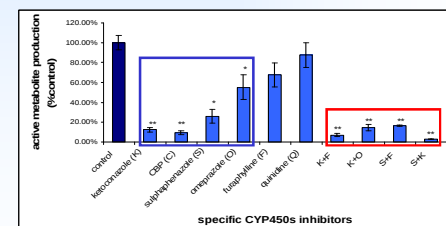


Microsomes

Ketoconazole alone inhibited the active metabolite production by 87.5% ± 2.1% as compared to control. **CBP** and **sulphaphenazole** also inhibited the active metabolite production by 90.3% ± 1.9% and 74.1% ± 6.8%, respectively.

Omeprazole inhibited the active metabolite production by 54.8% ± 12.3%.

When ketoconazole was co administrated with omeprazole, furaflyline or sulphaphenazole, the active metabolite production was almost completely abolished with production reduced by 85.5% ± 3.1%, 92.8% ± 1.4%, and 97% ± 0.2% respectively.



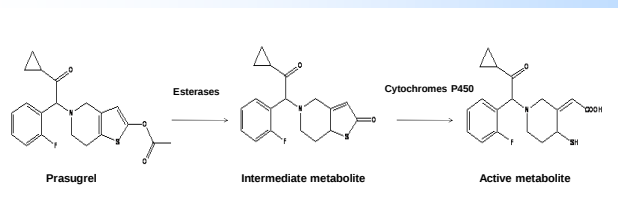


1. Introduction

Prasugrel is an antiplatelet prodrug used in patients with acute coronary syndrome [Figure 1]. Prasugrel is mainly bioactivated by CYP3A and CYP2B6. HIV patients are at higher risk for developing cardiovascular disease. Protease inhibitors such as ritonavir are also potent inhibitors of these two CYPs and could therefore impair clopidogrel efficacy.

The aim of this *in vitro* study was to verify the CYPs involved in the prasugrel metabolism and to evaluate the potential interaction between ritonavir and prasugrel using human liver microsomes (HLM) and supersomes.

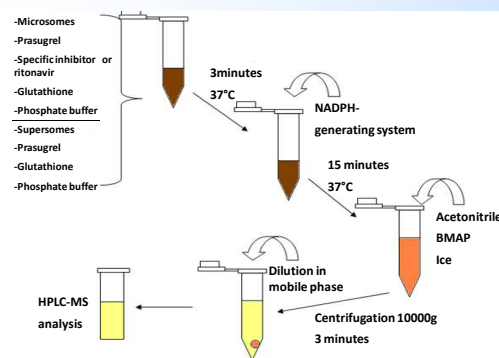
Figure 1. Pathways of prasugrel metabolism



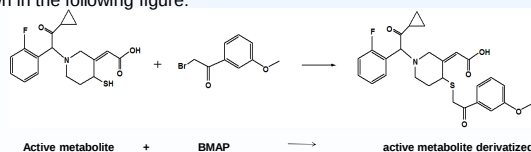
2. Methods

2.1. *In vitro* tests

Prasugrel metabolism was investigated *in vitro* in **human liver microsomes** and **cDNA-expressed human CYPs**.



Prasugrel active metabolite was unstable and needed to be derivatized by 2-bromo-3'-methoxyacetophenone (BMAP) to be detectable by HPLC-MS methods, as shown in the following figure:



Concentrations of the specific CYP450 isoforms inhibitors:

CYPs	Specific inhibitor	Concentration of inhibitor
1A2	Furafylline	30μM
2B6	4-(4-chlorobenzyl)pyridine (CBP)	1μM
2C19	(+)-N-3-benzyl-nirvanol	2.5μM
2C9	Sulphaphenazole	5μM
2D6	Quinidine	3μM
3A	Ketoconazole	3μM

2.2. Analytical method

LC-MS: Agilent 1100 series coupled with a mass spectrometer Esquire 3000.

Column: C18 XTerra® (5μm x 2.1 x 50mm)

Flow: 0.3ml/min

Mobile phase: ammonium formate + formic acid 0.1% / acetonitrile with linear gradient

Detection: MRM 332-177 for intermediate metabolite of prasugrel
498-348 for active metabolite of prasugrel

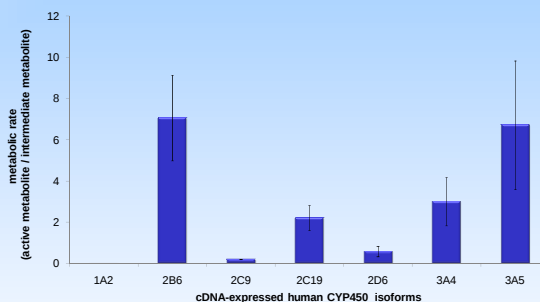
3. Results

3.1. Prasugrel metabolism

Identification of cytochromes involved in the bioactivation of prasugrel

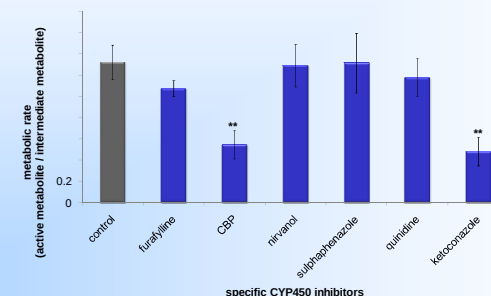
Bioactivation of prasugrel using cDNA-expressed human CYPs was evaluated with incubations containing 10 μM of prasugrel. The highest production of prasugrel active metabolite was observed with CYP2B6, followed by CYP3A4/5 and CYP2C19; neither CYP2C9, CYP2D6 nor CYP1A2 seemed to be involved [Figure 2].

Figure 2. Prasugrel active metabolite production (presented as a metabolic rate) mediated by cDNA-expressed CYPs.



These results were also confirmed by using specific inhibitors of CYP1A2 (furafylline), CYP2B6 (CBP), CYP2D6 (quinidine), CYP2C9 (sulphaphenazole), CYP2C19 (nirvanol), and CYP3A (ketoconazole) to determine their effects on the formation of the active metabolite from prasugrel (10 μM). Compared with the control, active metabolite production decreased by 38% ± 15% in the presence of CBP and by 45% ± 16% with ketoconazole. Inhibitors of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 did not show any significant effects on prasugrel metabolism [Figure 3].

Figure 3. Effect of specific CYP450 isoform inhibitors on the production of the prasugrel AM in HLMs. **p < 0.01



These results indicated that prasugrel is mainly metabolized by CYP2B6 and CYP3A using HLMs and cDNA-expressed CYP isoforms.

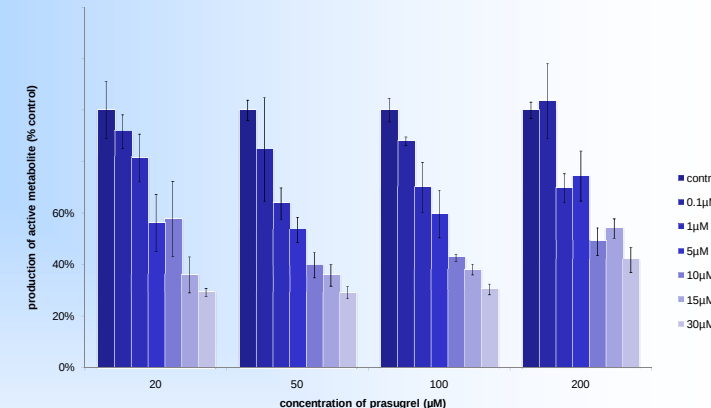
3.2. Prasugrel-ritonavir interaction

Evaluation of the inhibition of prasugrel metabolism by ritonavir

As shown in Figure 4, ritonavir from 0.1 to 30 μM inhibited the production of prasugrel active metabolite dose-dependently.

Prasugrel metabolism decreased by approximately 50% in the presence of 5 μM ritonavir.

Figure 4. Effect of ritonavir (from 0 to 30 μM) on the production of prasugrel active metabolite.



4. Conclusions

- ✓ Prasugrel is mainly bioactivated by CYP2B6 and CYP3A4/5.
- ✓ Ritonavir is a potent inhibitor of prasugrel bioactivation *in vitro* at clinically tested concentrations.
- ✓ Drug-drug interactions between ritonavir and prasugrel should be considered when antiplatelet therapy using prasugrel is considered in HIV patients.
- ✓ More clinical studies are needed to confirm the *in vitro* data and to evaluate the effect of ritonavir after long-term use.

PON1 is not the major bioactivation metabolic pathway of clopidogrel *in vitro*

V. Ancrenaz¹, J. Desmeules¹, R. James², P. Dayer¹, Y. Daali¹

¹Clinical Pharmacology & Toxicology, Geneva University Hospitals, Switzerland

²Department of internal medicine, Geneva University Hospitals, Switzerland



1. Introduction

Clopidogrel is an antiplatelet prodrug used in patients with acute coronary syndrome. Clopidogrel is mainly bioactivated by cytochromes P450 (CYPs). Recently, paraoxonase-1 (PON1) was proposed as an important contributor to the biotransformation of 2-oxo-clopidogrel into the clopidogrel active metabolite (clopidogrel-AM).

We undertook this study to determine the relative involvement of CYPs and PON1 in the bioactivation of clopidogrel *in vitro*.

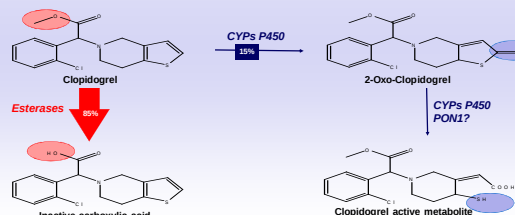
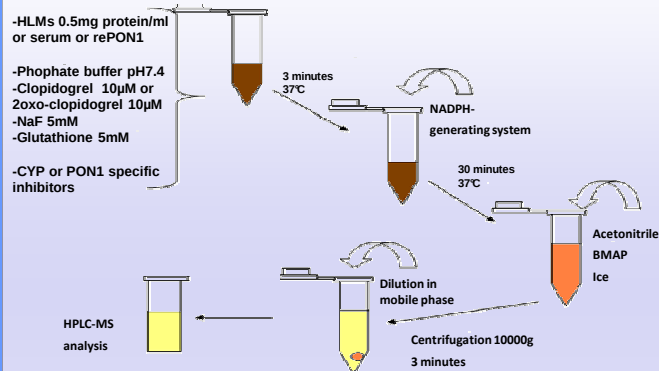


Figure 1. Clopidogrel metabolism pathways

2. Methods

2.1. *In vitro* experiments

Clopidogrel metabolism was investigated in human liver microsomes (HLMs) with CYP2C19*1/*1 or *2/*2 genotypes, in pooled HLMs incubated with inhibitors specific for CYPs and PON1, in serum as well as in recombinant PON1. The experiments were conducted as follows:



Concentrations of the specific CYP450 isoforms and PON1 inhibitors:

Specific inhibitor	Concentration of inhibitor
CYP1A2	Furafylline 30µM
CYP2B6	4-(4-chlorobenzyl)pyridine (CBP) 1µM
CYP2C19	Omeprazole 50µM
CYP2C9	Sulphaphenazole 5µM
CYP2D6	Quinidine 3µM
CYP3A	Ketoconazole 3µM
PON1	EDTA 1mM

2.2. Analytical method

LC-MS-MS: Agilent 1100 series coupled with a API 4000 triple quadrupole mass spectrometer.

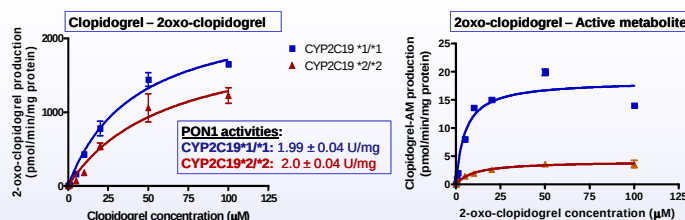
Column: Phenomenex Kinetex C18 analytical column (50 mm × 2.1 mm, 2.6 µm)

Mobile phase: water 95% / acetonitrile 5% with linear gradient.

Detection: MRM 322.1→212.1, 338.1→183.1, and 504.1→354.1 for clopidogrel, 2-oxo-clopidogrel and the clopidogrel-AM, respectively.

3. Results

3.1. Effect of CYP2C19*2/*2 polymorphism on clopidogrel metabolism



	CYP2C19*1/*1	K _m (µM)	CYP2C19*2/*2	K _m (µM)
Clopidogrel -> 2-oxo-clopidogrel	2428 ± 106.1	41.6 ± 4.1	2081 ± 200.5	61.4 ± 12
2-oxo-clopidogrel -> active metabolite	18.4 ± 0.96	5.1 ± 1.1	4.1 ± 0.08	10.4 ± 0.66

Figure 2. Kinetic parameters of 2-oxo-clopidogrel production from clopidogrel and clopidogrel-AM production from 2-oxo-clopidogrel in HLMs with CYP2C19*1/*1 and CYP2C19*2/*2 genotypes.

✓ For both steps of the biotransformation of clopidogrel, V_{max} values were higher and K_m values were lower in CYP2C19*1/*1 HLMs than in CYP2C19*2/*2 HLMs.

✓ PON1 activity was similar in both HLMs.

✓ These findings imply that CYP2C19 played an important role in the two steps of the bioactivation of clopidogrel.

3.2. Effect of CYP and PON1 inhibitors on clopidogrel metabolism

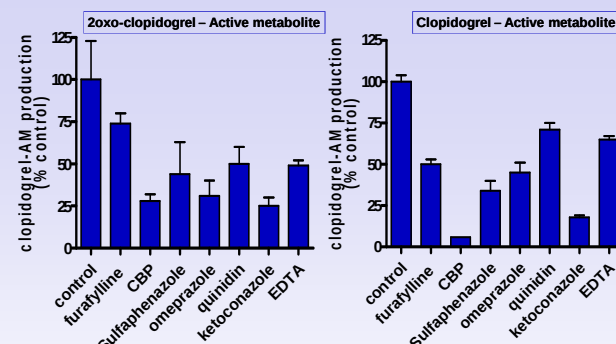


Figure 3. Inhibitory effects of CYP and PON1 inhibitors on the metabolic pathways from 2-oxo-clopidogrel to clopidogrel-AM (A) and from clopidogrel to clopidogrel-AM (B) in HLMs with 10 µM clopidogrel or 10 µM 2-oxo-clopidogrel.

✓ Ketoconazole, CBP, omeprazole and EDTA inhibited the second pathway by 75 ± 5%, 72 ± 4%, 69 ± 9% and 51 ± 3%, respectively.

✓ In the complete metabolic pathway, ketoconazole and CBP were most potent inhibitors with 82 ± 0.7% and 94 ± 0.2% inhibition, respectively.

✓ Omeprazole and sulphaphenazole inhibited clopidogrel metabolism by 55 ± 5.8% and 66 ± 5.5%, respectively.

✓ EDTA inhibited the complete clopidogrel metabolism by 35 ± 2%.

3.3. Clopidogrel active metabolite production in HLMs and in serum

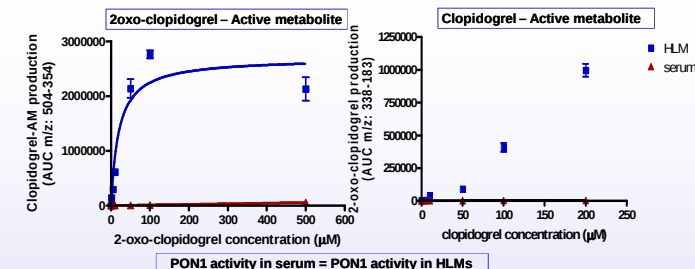


Figure 4. Kinetics of 2-oxo-clopidogrel production from clopidogrel and clopidogrel-AM from 2-oxo-clopidogrel in human serum and pooled HLMs with adjusted PON1 activity.

✓ In the first step, 2-oxo-clopidogrel production from 100 µM clopidogrel in HLMs was more than 180 times that in serum.

✓ Clopidogrel active metabolite production from 100 µM 2-oxo-clopidogrel in HLMs was about 500 times that in serum.

✓ Clopidogrel metabolites from both steps were only produced in HLMs, at clinically relevant concentrations.

3.4. Clopidogrel active metabolite production from 2-oxo-clopidogrel in HLMs, CYP2C19-genotyped HLMs and rePON1

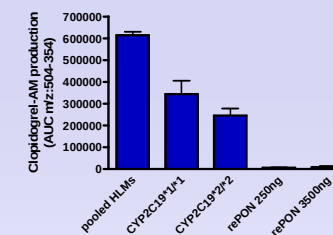


Figure 5. Comparison of the production of clopidogrel-AM in pooled HLMs, HLMs with CYP2C19*1/*1 and CYP2C19*2/*2 genotypes, and recombinant PON1 at 2 different concentrations.

✓ Clopidogrel active metabolite was almost not detected in rePON1 even though PON1 activity in rePON was very high (35 kU/mg protein).

4. Conclusions

✓ Clopidogrel was mainly bioactivated by CYPs with a limited contribution by PON1.

✓ Active metabolite was more produced in CYP2C19*1/*1 than in CYP2C19*2/*2. CYP2C19 contributed to both clopidogrel metabolic pathways.

✓ PON1 inhibitor did not inhibit clopidogrel metabolism and rePON1 did not produce clopidogrel metabolites.

Dual cytochrome P450 3A and 2B6 inhibition affects prasugrel pharmacokinetics in healthy volunteers

V Ancrenaz¹, J Déglon^{2,3}, C Samer¹, C Staub^{2,3}, P Dayer^{1,3}, Y Daali^{1,3}, J Desmeules^{1,3}

¹Clinical Pharmacology & Toxicology, Geneva University Hospitals, Switzerland

²Unit of Toxicology, University Center of Legal Medicine, Geneva, Switzerland

³Swiss Centre for Applied Human Toxicology



INTRODUCTION

Prasugrel is a new antiplatelet prodrug used in patients with acute coronary syndrome. Prasugrel is mainly bioactivated by cytochromes P450 (CYP) 3A and CYP2B6. Protease inhibitors such as ritonavir are potent inhibitors of these two CYPs and could therefore impair with prasugrel efficacy.

The aim of this phase 1 clinical trial was to evaluate the potential pharmacokinetic interaction between ritonavir and prasugrel and to assess the impact of ritonavir on CYPs *in vivo*.

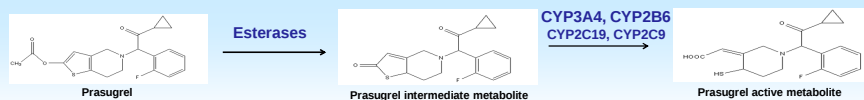


Figure 1. Prasugrel metabolic pathways (Rehmel et al., Drug Metabolism and Disposition, 2006)

METHODS

This study was approved by the institutional ethical committee, notified to the Swiss Agency for therapeutic products (Swissmedic) and conducted according to the Good Clinical Practices.

1/ Study design

Ten male volunteers received a single oral dose of prasugrel (10mg) on the first day. At least after one week of washout, they received 100mg ritonavir followed by 10mg prasugrel 2 hours later. At each session, they also received a "micrococktail" of probe drugs containing 10mg bupropion, 5mg flurbiprofen, 2mg omeprazole and 0.1mg midazolam to allow the phenotyping of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A, respectively.

2/ Phenotyping

A blood sample (~6ml) was obtained 1.5 h after administration of the "micrococktail" at each session for phenotyping. Blood samples were immediately centrifuged. We used the validated extraction methods routinely used in our laboratory. Pharmacokinetics of all probes and their metabolites were measured using Dried Blood Spot (DBS) samples and analyzed by LC-MS-MS.

3/ Prasugrel and metabolites determination using Dried Blood Spot

Capillary blood samples were collected prior to and 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, and 6 h after the administration of prasugrel. After a small finger prick using disposable, 5 µl of blood was spotted onto filter paper previously soaked with 20 µl of 2-bromo-3-methoxyacetophenone. Samples were extracted by adding 100 µL of methanol containing 1 ng/mL derivatized prasugrel-AM-d₃. After 30 min, 5 µL of the supernatant was injected into the LC-MS/MS system.



Figure 2. Pharmacokinetic analyses of prasugrel and its metabolites from DBS sampling.

4/ LC-MS/MS conditions

The concentrations of prasugrel active metabolite were measured on a LC-MS/MS platform consisting of a 5500 QTrap® triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer equipped with a Turbolon Spray™ interface (AB Sciex, Darmstadt, Germany) and an Ultimate 3000 RS pump (Dionex) as the LC system. Data were acquired using Analyst 1.5.1 software.

5/ Statistics

Pharmacokinetic parameters of prasugrel active metabolite, midazolam, bupropion, flurbiprofen and omeprazole were calculated using a non-compartmental method by WinNonLin® version 5.2 (Pharsight, Mountainview, California, USA). All statistical tests were performed using SPSS version 17 (Chicago, Illinois, USA). Results were presented as the mean values (± SD) or as mean ratios with 95% confidence intervals. All statistical tests were interpreted at the 5% significance level (two-sided).

CONCLUSIONS

✓ The inhibition of the main bioactivation pathways of prasugrel, using ritonavir as a model drug, had a significant impact on prasugrel-AM pharmacokinetics.

✓ Potential drug-drug interaction between prasugrel and inhibitors of CYP3A and 2B6 have to be very carefully considered.

RESULTS

Subjects were aged between 21 and 41 years (mean ± SD : 26 ± 6 years). Volunteers had a mean body mass index (± SD) of 22.8 ± 2 kg/m². All volunteers successfully completed the study. No adverse effects were reported during the study and all volunteers were included in the pharmacokinetic analysis. One volunteer was excluded from the evaluation of CYP2C19 activity because omeprazole and its metabolite were not detectable.

1/ Pharmacokinetics of prasugrel active metabolite

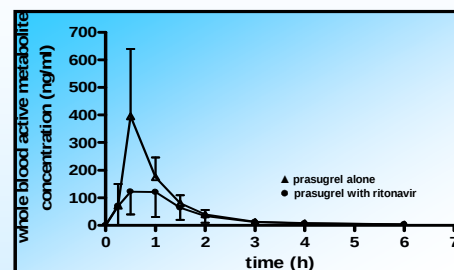


Figure 3. Mean (± SD) whole blood concentrations for prasugrel-AM in DBS following prasugrel alone or prasugrel with ritonavir.

	Prasugrel alone	Prasugrel + ritonavir	Ratio	CI95	p value
AUC _{0-6h} (h.ng/ml)	339.6 (144.7)	207.5 (91.1)	0.62	0.52-0.71	<0.001**
C _{max} (ng/ml)	389.8 (226.2)	185.4 (83.1)	0.55	0.37-0.73	0.008**
t _{max} (h)	0.65 (0.24)	0.70 (0.40)	1.20	0.70-1.60	0.73
t _{1/2} (h)	1.62 (0.54)	1.42 (0.66)	0.94	0.59-1.29	0.44

Table 1. Pharmacokinetic parameters of prasugrel-AM following the administration of 10 mg prasugrel or 10mg prasugrel + 100mg ritonavir.

✓ In comparison to prasugrel alone, AUC_{0-6h} and C_{max} decreased by 38% and 45%, respectively, when ritonavir was administered with prasugrel.

✓ Ritonavir did not affect the time to reach maximum concentration (t_{max}) and half-life time (t_{1/2}) of prasugrel-AM.

2/ Impact of ritonavir on CYP activities

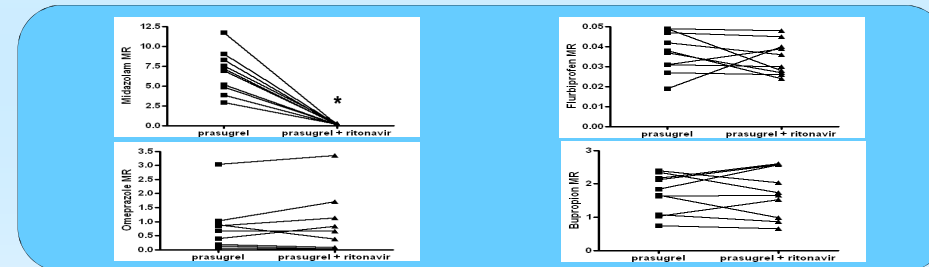


Figure 4. Effect of ritonavir on individual metabolic ratios of midazolam, flurbiprofen, omeprazole, and bupropion after administration of 10 mg prasugrel or 10 mg prasugrel with 100 mg ritonavir.

	Prasugrel alone	Prasugrel + ritonavir	Ratio	CI95	p value
Midazolam					
AUC _{0-6h} (h.ng/ml)	0.31 (0.26)	2.5 (1.1)	26.5	-4 - 6	<0.001**
C _{max} (ng/ml)	0.17 (0.10)	0.75 (0.29)	6.1	2.9 - 9.3	<0.001**
Metabolic ratio	6.7 (2.6)	0.13 (0.07)	0.02	0.01 - 0.03	<0.001**
Omeprazole					
AUC _{0-6h} (h.ng/ml)	81.9 (96.5)	96.5 (111.9)	1.2	0.86 - 1.64	0.26
C _{max} (ng/ml)	35.6 (32.1)	37.3 (32.5)	1.5	0.58 - 2.51	0.72
Metabolic ratio	0.92 (1.1)	1.1 (1.3)	1.5	-0.16 - 3.11	0.40

Table 2. Effect of ritonavir on the kinetic parameters of midazolam, flurbiprofen, omeprazole, and bupropion after administration of 10 mg prasugrel or 10 mg prasugrel with 100 mg ritonavir.

✓ After ritonavir administration, midazolam MR decreased while midazolam AUC and C_{max} increased.

✓ The metabolics ratios, AUC_{0-6h} and C_{max} of omeprazole, flurbiprofen and bupropion were not affected by ritonavir.

The authors have no conflict of interests to declare regarding this work. The clinical study was financed by the division of Anesthesiology, Pharmacology and Intensive Care and supported by the Clinical Research Centre, Geneva University Hospitals.

