

ANNÉE 2016

N° 048

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 26/10/2016

Par *Andreas Perrier-Cornet*

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Résistance à l'aspirine dans les syndromes myéloprolifératifs

Président : Pr. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie

Membres du jury : Pr. Eric LIPPERT, Professeur d'Hématologie
Dr. Jean-Christophe IANOTTO, Praticien Hospitalier
Dr. Hubert GALINAT, Praticien Hospitalier

ABREVIATIONS

AA : Acide arachidonique

AAS : Acide acétylsalicylique (aspirine)

ADP : Adénosine Di-Phosphate

COX-1/COX-2 : Cyclooxygénases-1/2

JAK2 : Janus Kinase 2

LTA : Light-Transmission Aggregometry ou Agrégométrie sur plasma riche en plaquettes

MEA : Multiple Electrode Aggregometry ou Agrégométrie en sang total

PX1 : Patient cytoréduit ou non sous 1 prise par jour d'aspirine faible dose

P1y : Patient non cytoréduit sous 1 ou 2 prise(s) par jour d'aspirine faible dose

PX2 : Patient cytoréduit ou non sous 2 prises par jour d'aspirine faible dose

P2y: Patient cytoréduit sous 1 ou 2 prise(s) par jour d'aspirine faible dose

PV : Polyglobulie de Vaquez

SMP : Syndromes myéloprolifératifs

TE : Thrombocytémie essentielle

TXB2 : Thromboxane B2

SOMMAIRE

A. Introduction.....	1
1. Les syndromes myéloprolifératifs.....	1
2. Complications thrombo-emboliques et hémorragiques des SMP.....	3
3. Aspirine : généralités et indications dans les SMP.....	5
4. Résistance à l'aspirine.....	7
5. Méthodes biologiques d'évaluation de la résistance à l'aspirine.....	10
B. Rationnel.....	19
C. Objectifs du travail.....	22
D. Bibliographie.....	23
E. Article.....	27
1. Abstract.....	28
2. Introduction	29
3. Material and Methods	30
4. Results	33
5. Discussion and perspectives	42
6. Conclusion	46
7. Acknowledgments.....	46
8. Bibliography	47
9. Supplemental Data	49

A. Introduction

1. Les syndromes myéloprolifératifs

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des hémopathies myéloïdes malignes clonales de la cellule souche hématopoïétique, associées à une hyperproduction de cellules myéloïdes matures. On distingue la leucémie myéloïde chronique (LMC) caractérisée par la translocation t(9;22) et sa conséquence moléculaire, le gène de fusion *BCR-ABL1* (Break point cluster region – Abelson), et les SMP « *BCR-ABL* négatifs » non LMC (**Figure 1**). Les SMP non LMC, plus communément dénommés SMP, comprennent la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP) et des formes rares ou atypiques, comme le syndrome hyperéosinophilique ou la leucémie à polynucléaires.

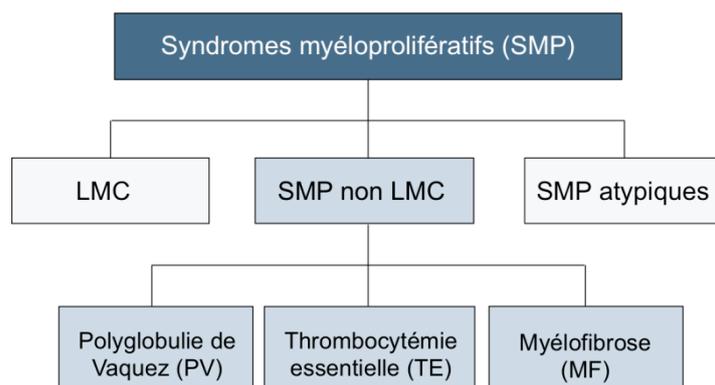


Figure 1. Classification OMS 2008 des syndromes myéloprolifératifs (SMP) chroniques non leucémie myéloïde chronique (LMC). On distingue la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose, qui peut être primitive (MFP), post-TE ou post-PV (1).

La PV est caractérisée par une prolifération clonale du tissu myéloïde prédominant sur la lignée érythrocytaire, entraînant une polyglobulie. La TE retrouve une prolifération préférentielle de la lignée mégacaryocytaire entraînant une thrombocytose. On observe dans la myélofibrose une hyperplasie des lignées granulocytaire et mégacaryocytaire associée à une fibrose de la moelle osseuse.

Après une période proliférative au niveau sanguin, on observe des cytopénies périphériques liées à l'insuffisance médullaire. L'âge médian au diagnostic est de 60 ans pour la PV et TE, et de 65 ans pour la MF. Les SMP constituent un ensemble de pathologies hétérogènes sur le plan clinique.

PV, TE et MFP sont des maladies rares, dont les incidences sont respectivement de 3 à 5/100 000 habitants par an pour la PV, 1 à 2,5/100 000 habitants pour la TE et 1/100 000 habitants pour la MFP.

La PV et la TE sont des hémopathies le plus souvent indolentes avec une survie de l'ordre de 90% à 5 ans. La myélofibrose a un pronostic plus défavorable avec une médiane de survie comprise entre 24 et 60 mois.

Les SMP présentent des risques évolutifs, pouvant aller jusqu'à l'acutisation en leucémie aigüe myéloïde. Le risque d'évolution des TE en PV est compris entre 5 et 15%, celui de transformation des TE et PV en MF est également de 5 à 10%. Dans la TE, la transformation leucémique a été évaluée à 2,5% à 10 ans (2). Le risque cumulé de transformation dans la PV est de 15% à 20 ans. Pour la MFP, on estime le risque de transformation à 15%. Les SMP peuvent être compliqués par des événements thrombotiques qui constituent la principale cause de morbi-mortalité loin devant la progression fibrotique ou la transformation leucémique. Ce point sera traité dans une partie dédiée.

Des anomalies moléculaires responsables de ces SMP ont été décrites. Actuellement, trois mutations sont considérées comme initiatrices dans les SMP. En 2005, l'identification de la mutation initiatrice JAK2V617F dans l'exon 14, apporte une réelle avancée dans la compréhension de la physiopathologie des SMP ; en effet, on retrouve cette mutation dans 90% des PV et plus de la moitié des TE et MFP (3). Des mutations de MPL (Myeloproliferative Leukemia), le récepteur à la thrombopoïétine, principal facteur de croissance de la lignée mégacaryocytaire, ont été mises en évidence dans 3 à 5% des TE et 5 à 10% des myélofibroses (4). Fin 2013, des mutations du gène de la *calréticuline* (CALR), une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, participant à la régulation calcique, ont été mises en évidence (5,6). Les patients non mutés JAK2, MPL ou CALR sont dits triple négatifs. On distingue, en plus des mutations dites « driver » (JAK2, MPL, CALR), des mutations que l'on retrouve fréquemment associées à de faibles fréquences. Ces mutations affectent les voies de signalisation, des acteurs de la régulation

épigénétique, des gènes affectant la régulation de la transcription et la progression leucémique ainsi que des gènes impliqués dans l'épissage (7).

2. Complications thrombo-emboliques et hémorragiques des syndromes myéloprolifératifs

Les complications thrombotiques et hémorragiques constituent les principales causes de morbi-mortalité. L'étude ECLAP qui a étudié une cohorte de 1638 PV, retrouvait 45% de décès par causes cardiovasculaires, contre seulement 13% liés à la progression fibrotique ou leucémique (8).

Les publications sont nombreuses et parfois contradictoires ; la variabilité des prévalences rapportées pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des cohortes qui sont comparées, l'influence des traitements cytoréducteurs, mais également par quelques erreurs diagnostiques, de patients étiquetés SMP à tort, avant l'avènement du diagnostic moléculaire dans les SMP.

Quand ? Les événements thrombotiques peuvent être pré ou post-diagnostiques. Dans la PV, le risque thrombotique a été estimé entre 1,8 et 10,9 événements pour 100 personnes et par an (8,9). Dans la TE, il est rapporté entre 1 et 7,7 événements pour 100 personnes et par an (10).

On estime à 33% le risque de récurrence de l'évènement thrombotique dans les deux ans (typologie similaire fréquente). Ce risque est d'autant plus élevé que le sujet est âgé.

Où ? Les deux territoires, artériel et veineux, peuvent être touchés, néanmoins, il existe une prédominance artérielle puisqu'on rapporte deux à trois fois plus de thromboses artérielles que de thromboses veineuses (8,10,11).

Les accidents thrombotiques artériels sont principalement des accidents vasculaires cérébraux ischémiques (38%), des syndromes coronariens aigus (21%), ainsi que des localisations plus atypiques : thromboses artérielles périphériques (5%), thromboses de l'artère splanchnique ou rénale (2%), thrombose de l'artère rétinienne (0,8%) (12).

Pour le territoire veineux, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires sont les événements les plus fréquemment retrouvés dans la PV et la

TE. Ils sont plus fréquemment retrouvés dans la PV que dans la TE (12). Une thrombose de localisation atypique, notamment des veines intra-abdominales (splanchniques) doit faire rechercher un SMP, du fait de la prévalence élevée de la mutation *JAK2V167F*. En effet, on la retrouve positive chez 31% des patients présentant une thrombose de la veine porte et 53% de ceux présentant une thrombose veineuse sus-hépatique (syndrome de Budd-Chiari) (13).

Qui ? La prévalence des événements thrombotiques est plus élevée dans les PV que dans les TE. Les femmes ont davantage tendance à faire des thromboses veineuses que les hommes qui inversement thrombosent plus facilement en territoire artériel (10).

Le risque thrombotique est élevé chez les patients âgés de plus 60 ans et/ou présentant des antécédents thrombotiques, une mutation de *JAK2*, une leucocytose (>11 G/L) ou des facteurs de risque cardiovasculaire (14). Ce risque est plus faible chez les moins de 60 ans sans antécédents de thrombose. Cette stratification des patients selon leur risque thrombotique est primordiale, car elle conditionne l'attitude thérapeutique (détaillée plus bas).

Si l'on s'intéresse au risque thrombotique selon le statut mutationnel, les choses ne sont pas si évidentes pour *JAK2V617F*. Le gène *JAK2* étant muté dans 98% des PV, son évaluation statistique requiert des populations très importantes.

La mise en évidence en 2013, de mutations de *CALR* dans la TE et les myélofibroses a également permis de démontrer que la mutation *JAK2V617F* prédisposait davantage aux thromboses que la mutations *CALR* (5).

Des troubles de la microcirculation (vertiges, maux de tête, troubles visuels et auditifs, paresthésies périphériques, érythromélgie notamment) sont assez fréquemment retrouvés au moment du diagnostic, surtout dans les TE (15).

Les risques hémorragiques (<10%) sont moins fréquents que les événements thrombotiques. Ils sont majoritairement présents dans les TE avec thrombocytose supérieure à 1000 G/L, dans lesquelles un syndrome de Willebrand acquis est fréquemment associé. Les risques hémorragiques sont majorés par la prescription d'antiagrégants plaquettaires ou d'antagonistes de la vitamine K (AVK).

3. Aspirine : généralités et indications dans les SMP

L'aspirine ou acide acétylsalicylique est un antiagrégant plaquettaire, qui inhibe la production de thromboxane A2 (TXA2), principal métabolite responsable de l'activation et de l'agrégation des plaquettes, en se fixant irréversiblement sur le site actif des cyclo-oxygénases 1 (COX-1) plaquettaires par acétylation irréversible d'une sérine en position 529 (**Figure 2**). COX-1 ne pouvant plus réaliser la synthèse des prostaglandines, la production de TXA2 est ainsi éteinte. L'aspirine agit principalement au niveau de la circulation portale et sa biodisponibilité systémique est faible (60% pour des doses inférieures à 500 mg).

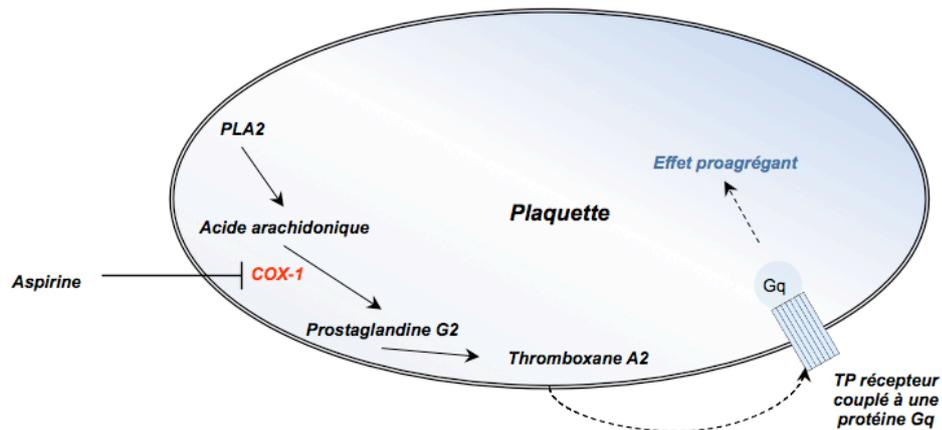


Figure 2. Voie métabolique ciblée par l'aspirine. L'aspirine inhibe la cyclo-oxygénase-1 (COX-1) plaquettaire et mégacaryocytaire, qui catalyse la première étape de biosynthèse des prostaglandines plaquettaires à partir de l'acide arachidonique, libéré par la phospholipase A2 (PLA2). La thromboxane synthase convertit ces prostaglandines en thromboxane A2, puissant agrégant plaquettaire, via l'activation de ses récepteurs spécifiques TP (thromboxane-prostanoid).

L'aspirine à faible dose est principalement utilisée en prévention primaire ou secondaire chez les sujets à risque cardio-vasculaire, mais également chez les patients atteints de SMP notamment de type TE ou PV (recommandation de grade B, ANSM 2012), en prévention d'un évènement thrombotique. Cette recommandation se fonde sur la première étude clinique, publiée en 2004, conduite sur l'aspirine dans la PV. L'étude *European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia vera*

(ECLAP) a considéré que l'aspirine à faible dose prévenait les complications thrombotiques des patients atteints de PV, sans risques hémorragiques (16). Ce résultat se basait toutefois uniquement sur de l'analyse en sous-groupe, le critère de jugement principal de l'étude n'étant pas significatif. Dès lors, la prescription d'aspirine à faible dose est rentrée dans les pratiques cliniques courantes dans les PV, et dans les TE, par extrapolation. En 2010, une étude rétrospective sur les TE à bas risque thrombotique a montré l'intérêt de l'aspirine à faible dose uniquement dans les TE JAK2V617F positives, précédemment rapportées comme étant associées à un risque thrombotique plus élevé que les TE JAK2V617F négatives (17).

Actuellement, l'âge (supérieur à 60 ans) et les antécédents thrombotiques sont les deux principaux facteurs de risque de thrombose dans la TE et permettent de définir les patients à bas risque, sans facteur de risque, et les patients à haut risque, présentant un ou deux facteurs de risque (14).

Cette classification conditionne l'attitude thérapeutique du clinicien. En effet, les patients à bas risque, sont traités uniquement par de l'aspirine à faible dose (75 à 100 mg/jour) et des phlébotomies (pour les PV > 45% d'hématocrite). Les patients à haut-risque reçoivent, quant à eux, un traitement cytoréducteur (hydroxyurée ou anagrélide sauf contre-indications particulières) et de l'aspirine à faible dose.

Récemment, dans la TE, le score thrombotique IPSET pour *International Prognostic Score of thrombosis in WHO defined essential thrombocytemia* a proposé d'inclure en plus de l'âge et des antécédents thrombotiques, la mutation JAK2V617F, une leucocytose >11 G/L, ainsi que les facteurs de risque cardiovasculaire (hypertension, diabète de type 2, tabac). Ce score peut permettre d'affiner la conduite thérapeutique chez certains patients (14).

En 2015, de nouvelles recommandations de Tefferi et Barbui préconisaient une prise quotidienne d'aspirine, en cas d'antécédent de thrombose veineuse chez des patients JAK2 mutés ou présentant des facteurs de risque cardiovasculaire (18). En cas d'antécédents de thrombose artérielle chez des patients de plus de 60 ans, ou JAK2 mutés ou présentant des facteurs de risque cardiovasculaire, une double prise quotidienne d'aspirine est recommandée. Une précaution d'emploi chez les patients à faible risque présentant des thrombocytoses > 1000 G/L, impose la

recherche d'un syndrome de Willebrand acquis, qui majorerait le risque hémorragique, avant utilisation d'aspirine.

Ainsi, une intégration dans les pratiques thérapeutiques courantes d'une double prise quotidienne d'aspirine dans les SMP semble prometteuse mais requiert des études supplémentaires en termes d'efficacité clinique et de tolérance.

4. Résistance à l'aspirine

a) Définition

Malgré plusieurs centaines de publications (625 occurrences dans Pubmed au 01/08/2016), ce phénomène reste controversé et encore mal défini : comment la définir? quelle est sa prévalence? quels sont ses mécanismes potentiels ? *quid* de son caractère permanent ou temporaire? de ses implications cliniques?

Il convient de rappeler en premier lieu qu'à ce jour, aucune définition consensuelle clinique et/ou biologique se basant sur des critères diagnostiques validés, n'a été établie pour définir la résistance à l'aspirine. Le concept de « résistance à l'aspirine » est apparu dès 1983.

La résistance clinique à l'aspirine est définie par la survenue d'évènement(s) thrombotique(s) chez un patient recevant un traitement antiagrégant plaquettaire de type aspirine. Le terme d'échec thérapeutique n'est d'ailleurs pas approprié, dans la mesure où l'effet du traitement, même minime n'est pas connu. Et il est impossible de savoir dans quelle mesure le traitement a pu réduire le risque de survenue de thrombose ou diminuer sa sévérité.

La résistance à l'aspirine est définie biologiquement par l'incapacité de la molécule à inhiber la COX-1 plaquettaire et donc la production de TXA2 dépendante de COX-1. Les fonctions plaquettaires dépendantes du TXA2, telles l'activation et l'agrégation, sont donc maintenues.

Les pourcentages rapportés de patients résistants à l'aspirine sont très variables, et vont de 1% à plus de 60%, selon les études (19). Ces différences peuvent s'expliquer par le type de population testée, et les outils biologiques qui ont servi à la mesurer. En conséquence, les patients considérés comme mauvais répondeurs peuvent se voir prescrire d'autres antiagrégants plaquettaires, en plus de l'aspirine.

b) Mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistances à l'aspirine ne sont pas encore totalement élucidés. Des mécanismes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques semblent jouer un rôle important, tout comme des facteurs génétiques, biologiques et cliniques.

La compliance semble être la première cause de « résistance à l'aspirine » décrite dans la littérature. Ainsi, il n'est pas inhabituel que son existence même soit discutée. Il a également été suggéré que la forme galénique de l'aspirine pourrait être un facteur limitant : en effet, une équipe a observé moins de résistance à l'aspirine avec la forme gastro-résistante à libération retardée, qu'avec l'aspirine en poudre (20). Malheureusement, une autre équipe, constatant l'inverse, a suggéré que l'enrobage gastro-résistant serait une cause de la résistance à l'aspirine (21).

Deux types de mécanismes, pouvant s'ajouter, pourraient expliquer la résistance à l'aspirine (**Figures 3 et 9**). Une résistance dite intrinsèque, indépendante des paramètres pharmacocinétiques, expliquée par la présence d'anomalies qualitatives au sein des plaquettes. Et, une résistance dite extrinsèque, qui regroupe un ensemble de causes extérieures à l'aspect qualitatif plaquettaire, freinant l'action de l'aspirine jusqu'à son site actif sur la COX-1 : l'augmentation du turnover plaquettaire (ou résistance de turnover) (22), les problèmes d'ordre pharmacocinétique, pharmacodynamique, mais également biologique (inflammation).

L'accroissement de la production de plaquettes (renouvellement plaquettaire) dans les SMP notamment de type TE, mais également en situation inflammatoire, infectieuse, post-chirurgicale, post-hémorragique, ou dans certains cancers, augmente le pool de plaquettes non exposées à l'aspirine mis en circulation. Si l'on considère que la durée de vie moyenne d'une plaquette est de 10 jours, alors chaque jour, 10% du pool plaquettaire est renouvelé. Ces néo-plaquettes « naïves », synthétisées entre deux prises quotidiennes d'aspirine ne sont pas exposées à l'aspirine, du fait de la demi-vie très courte du médicament (20 à 30 minutes). Ces plaquettes naïves restent donc actives et on estime qu'elles sont maximales juste avant une prise d'aspirine.

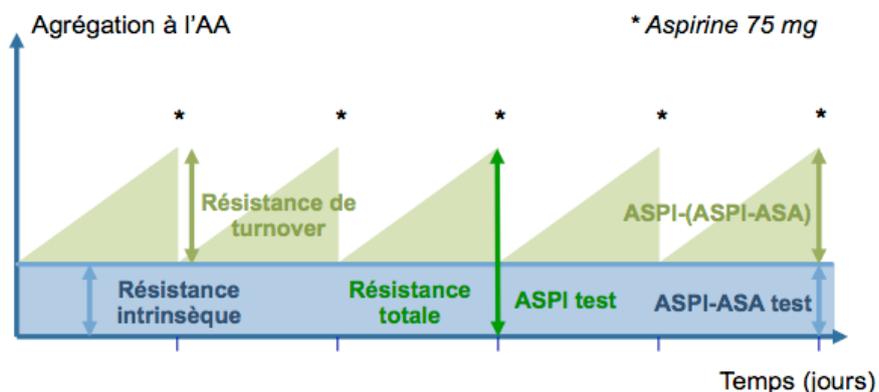


Figure 3. Modélisation des résistances plaquettaires sous 75 mg d'aspirine par jour et des tests d'agrégation plaquettaire réalisés sur Multiplate®. Les pics « en toits d'usine » de la résistance de turnover (courbe verte) correspondent à la production de plaquettes naïves, non exposées à l'aspirine, et donc toujours actives. La prise d'aspirine (*) abolit chaque jour, théoriquement le pool des plaquettes naïves.

Dans les SMP, ce contingent de plaquettes naïves est *de facto* plus important du fait du caractère prolifératif et le taux de plaquettes encore actives peut très facilement dépasser 50 G/L voire atteindre 100 G/L, ce qui est suffisant pour induire un évènement thrombotique. Le risque thrombotique semble donc lié au turnover plaquettaire accru dans ces hémopathies myéloïdes, et à la demi-vie très courte de l'aspirine.

Du point de vue pharmacodynamique, le risque d'interaction pharmacologique a été bien décrit : le blocage du site actif de l'aspirine au niveau de la COX-1 plaquettaire, par des analgésiques ou des anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofène, naproxène, pyrazoles) empêchera la fixation de l'aspirine sur sa cible. Les inhibiteurs de COX-2 (coxibs) et le paracétamol ne semblent pas provoquer d'interactions médicamenteuses.

Enfin, peuvent se surajouter des causes de résistances intrinsèques. De nombreux polymorphismes, notamment de COX-1, de glycoprotéines plaquettaires (GPIIIa), ou de récepteurs au collagène, ont également été identifiées, et pourraient contribuer à l'hétérogénéité de la réponse à l'aspirine. Toutefois, l'importance des

mécanismes génétiques dans la résistance biologique reste difficile à démontrer. Il semble également exister des voies de biosynthèse alternatives dans la voie du TXA2. De rares mutations de COX-1 pourraient conduire à une inactivité de l'aspirine.

Récemment, des études transcriptomiques des gènes impliqués dans les fonctions plaquettaires semblent indiquer qu'il existerait un profil d'expression spécifique chez les patients non-répondeurs à l'aspirine (23–25). Néanmoins, seule une étude a été conduite sur ARN plaquettaires (24), les autres ayant été réalisées sur ARN sanguins totaux.

5. Méthodes biologiques d'évaluation de la résistance à l'aspirine

Différentes méthodes ont été proposées pour déterminer la résistance à l'aspirine : l'agrégation sur plasma riche en plaquettes, l'agrégation en sang total ou MEA (Multiple Electrode Aggregometry), le Verify Now®, le PFA-100®, le dosage du thromboxane B2 ainsi que la thromboélastographie.

Des tests biologiques, réalisables au laboratoire de biologie médicale ou en recherche, ont été développés pour permettre de détecter les non-répondeurs. Les différents tests biologiques, ne permettent bien souvent pas, de définir des zones de normalité et de résistance, se contentant de classer le patient en « résistant » ou « non résistant ».

On distingue les tests dits spécifiques (dosage du thromboxane B2 (TXB2) circulant, dosage urinaire du déhydro-TXB2, agrégométrie plaquettaire par transmission optique, agrégométrie en sang total par Multiple Electrode Aggregometry (MEA)) des tests non spécifiques (PFA-100® avec les cartouches adrénaline (EPI) et adénosine di-phosphate (ADP), VerifyNow Aspirin®, thromboélastographie).

L'absence de corrélation suffisante entre ces différentes méthodes, la difficulté à fixer les valeurs seuils de résistance à l'aspirine, ainsi que la variabilité de réponse à l'aspirine, rendent actuellement ces tests non utilisables pour le clinicien dans sa pratique quotidienne.

a) Test d'agrégation photométrique sur plasma riche en plaquettes (PRP) : Light Transmission Aggregometry (LTA)

La méthode de Börn ou Light Transmission Aggregometry (LTA) est la première méthode décrite dans l'exploration des fonctions plaquettaires (26). Depuis 1963, elle reste, aujourd'hui encore, considérée comme une méthode de référence, malgré son manque de standardisation. Le principe du test repose sur la variation de densité optique, lors de l'agrégation des plaquettes en présence d'inducteurs (acide arachidonique, ADP,...) dans un plasma citraté riche en plaquettes (PRP), sous agitation à 37°C. Le PRP est obtenu après centrifugation à 150 g pendant 10 min de sang total citraté. L'ajout de l'inducteur déclenche la mesure. L'acide arachidonique 1 mM permet de tester spécifiquement la voie de la cyclo-oxygénase 1 inhibée par l'aspirine. L'agrégation doit être réalisée dans les 2 heures suivant le prélèvement, imposant des contraintes pré-analytiques strictes ainsi que des contraintes analytiques organisationnelles. Un sujet est habituellement considéré comme résistant à l'aspirine si l'agrégation plaquettaire résiduelle est supérieure ou égale à 20% (27).

De nombreux paramètres limitent la fiabilité de la méthode de Börn : la vitesse de centrifugation pour l'obtention du PRP, la déplétion calcique intra-plaquettaire provoquée par le citrate de sodium, l'absence de réactifs standardisés, le taux de plaquettes du PRP, les interférences optiques (plasma ictérique, lipémique, hémolysé) ainsi que la reproductibilité de la technique (28). Il a également été suggéré par certains auteurs que l'étape de centrifugation à basse vitesse pouvait sélectionner les plaquettes de plus petites tailles dans le surnageant au détriment des macrothrombocytes qui rejoindraient le culot.

b) L'agrégométrie en sang total

L'agrégation en sang total ou Multiple Electrode Aggregometry (MEA) repose sur le principe de variation d'impédance électrique au cours de l'agrégation plaquettaire. Un automate récent, le Multiplate® (Roche Diagnostics, Meylan, France) contraction commerciale de *Multiple Platelet Function Analyser* permet de tester la résistance à l'aspirine grâce à sa gamme d'agonistes dédiés. Le sang total anticoagulé (citraté,

hépariné ou hirudiné) est placé dans une cupule thermostatée à 37°C contenant deux paires d'électrodes en argent (**Figures 4 et 5**). L'impédance entre les électrodes, qui augmente parallèlement à l'agrégation plaquettaire est mesurée après ajout de l'inducteur seul à 0,5 mM (ASPI) et elle est suivie pendant 6 minutes après ajout de l'inducteur. L'ajout de l'inducteur déclenche la mesure de l'impédance. Cinq canaux permettent une analyse simultanée de différents patients ou agonistes à tester. Le résultat obtenu est une courbe de variation de l'impédance en fonction du temps. Cette courbe fournit plusieurs paramètres (**Figure 6**) : l'aire sous la courbe (*Area under the curve*, AUC) exprimée en unités arbitraires U (1U = 10 AU*min) ; la vélocité (AU/min) qui correspond à la tangente au point d'inflexion ; et l'agrégation maximale (AU) qui correspond à l'asymptote de la courbe.

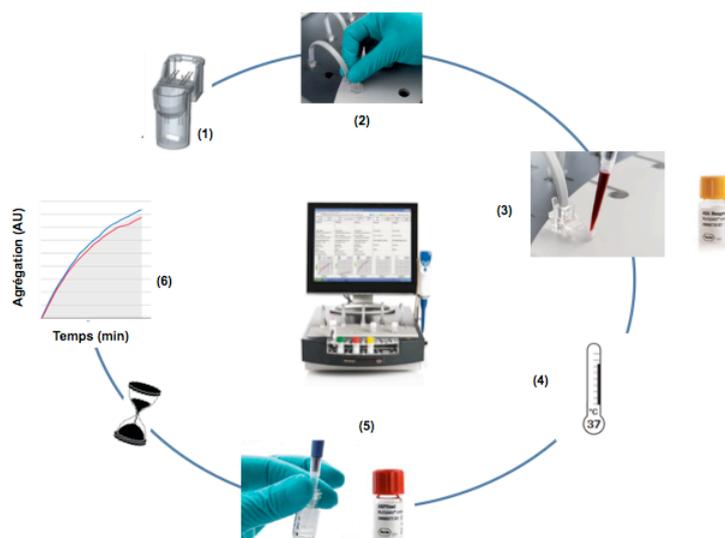


Figure 4. Mode opératoire du Multiplate®. **(1)** La cellule d'analyse en téflon contenant un barreau aimanté, ainsi que deux paires d'électrodes en argent, dont chacune est le contrôle de l'autre, est placée dans le puits dédié du Multiplate®. **(2)** La cellule est ensuite reliée à l'analyseur par un connecteur. **(3)** A l'aide de la pipette automatique, 300 µL de sang total anticoagulé et 300 µL de solution NaCl 0,9% sont placés dans la cellule d'analyse thermostatée, avec ou sans aspirine. **(4)** Incubation du mélange pendant 3 minutes à 37°C. **(5)** L'ajout de 20 µL d'acide arachidonique 0,5 mM (ASPI test) dans le milieu réactionnel, déclenche le début de la mesure. **(6)** Au bout de 6 minutes, l'acquisition s'interrompt et les résultats sont rendus en unités arbitraires (U). Adapté de Roche Diagnostics. Pictogramme *Hourglass* opensource.

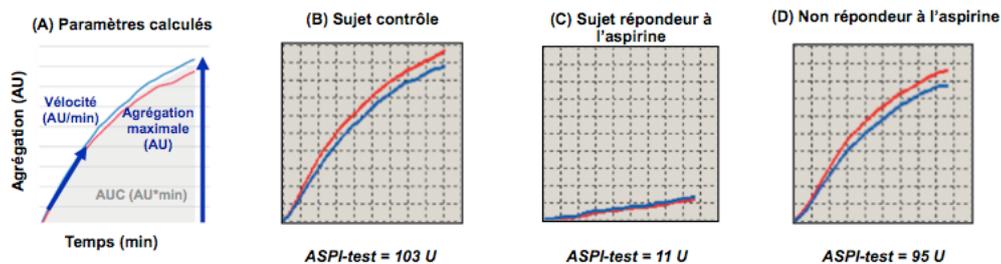


Figure 5. Paramètres calculés à partir des courbes du Multiplate® et exemples de profils obtenues avec ASPI-test. **(A)** La courbe fournit trois paramètres : l'aire sous la courbe (Area under the curve, AUC) exprimée en unités arbitraires U (1U = 10 AU*min) ; la vélocité (AU/min) qui correspond à la tangente à l'origine ; et l'agrégation maximale (AU) qui correspond à la valeur d'agrégation à 6 minutes. **(B)** Sujet sain ne prenant pas d'aspirine (valeurs normales = 71-115 U) et présentant une réactivité à l'acide arachidonique. **(C)** Patient répondeur à l'aspirine (sous 75 mg par jour) retrouvant une valeur inférieure à la valeur seuil (31 U) déterminée par un précédent travail (29) **(D)** Patient non répondeur à 75 mg d'aspirine par jour, retrouvant une valeur supérieure à 31 U.

L'AUC de l'ASPI-test renseigne sur la résistance totale des plaquettes vis-à-vis de l'aspirine. On étudie dans ce test, la réponse globale à l'acide arachidonique (AA) des plaquettes, exposées à l'aspirine, naïves, et/ou présentant une éventuelle résistance intrinsèque. On teste la réactivité de l'ensemble du pool plaquettaire (**Figure 3**).

La technique MEA présente de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes d'investigation de résistance à l'aspirine. Une interférence optique telle qu'un plasma ictérique ou lipémique n'affecte pas la mesure par MEA. De plus, parce qu'elle est réalisée sur sang total, la MEA reproduirait plus fidèlement la réalité de l'hémostase primaire. Par ailleurs, l'absence de centrifugation de l'échantillon n'induit en principe pas de biais de sélection d'une sous-population plaquettaire comme pour la méthode LTA. Enfin, des études ont rapporté que la MEA était une méthode plus sensible pour détecter l'effet anti-agrégant plaquettaire de l'aspirine chez des sujets sains (30). Néanmoins, la technique reste sensible à l'hémolyse, témoin de l'activation plaquettaire, qui sera difficilement détectée sur sang total.

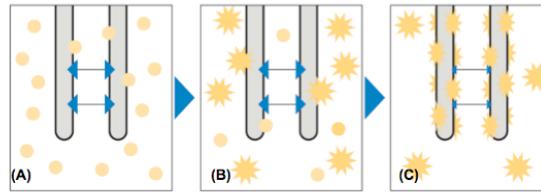


Figure 6. Schéma illustrant la variation d'impédance (résistance) au cours du processus analytique. **(A)** Avant ajout de l'inducteur (acide arachidonique), en l'absence d'agrégation, l'impédance est minimale. **(B)** L'acide arachidonique 0,5 mM déclenche l'activation des plaquettes et leur agrégation dans le milieu réactionnel. **(C)** Au cours de la réaction, les agrégats plaquettaires augmentent et adhèrent aux électrodes, ce qui est responsable d'une augmentation d'impédance. D'après Roche Diagnostics.

c) PFA-100®

Le PFA-100® (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Allemagne) est un test d'agrégation plaquettaire sur sang total anticoagulé, dans des conditions rhéologiques à forts taux de cisaillement. L'analyse enregistre le temps d'obturation d'une membrane de collagène, recouverte d'un inducteur (épinéphrine ou ADP), percée en son centre par une ouverture de 150 µm. Le PFA-100® reproduit donc la formation d'un thrombus plaquettaire suite à une brèche vasculaire d'un petit vaisseau.

Les sujets sont considérés comme résistants à l'aspirine si le temps d'obturation de la cartouche contenant de l'épinéphrine est inférieur à 193 s (recommandation du fabricant). Le test est dépendant notamment du taux de plaquettes, de l'hématocrite, du taux de facteur Willebrand du patient. L'allongement du test est difficilement interprétable pour des patients présentant un hématocrite inférieur à 35%, une thrombopénie inférieure à 100 G/L. Par ailleurs, de nombreux médicaments peuvent allonger le temps d'occlusion.

d) Dosage du thromboxane B2

Le dosage du thromboxane B2 (TXB2) circulant, plasmatique ou sérique, est également considéré, en recherche, comme le *gold standard* pour déterminer la

résistance à l'aspirine. Un seul kit immuno-enzymatique est commercialisé, à visée de recherche, par Cayman Chemicals© (Ann Arbor, MI, USA). Le thromboxane A2 (TXA2) est produit à partir de l'acide arachidonique par de nombreuses cellules, notamment les plaquettes. Le TXA2 est le principal métabolite plaquettaire impliqué dans l'activation et l'agrégation irréversible des plaquettes (31). Il est rapidement hydrolysé en TXB2, relativement stable, qui est un bon reflet du TXA2 produit.

L'aspirine inhibe la voie des COX, diminuant ainsi la formation des prostaglandines et du TXA2. Ainsi, un patient répondeur à l'aspirine présentera des taux effondrés de TXB2 tandis qu'un patient résistant à l'aspirine présentera des taux sériques élevés (>4 ng/mL). Il a été estimé que pour être efficace cliniquement, l'aspirine devait réduire plus de 95% de la production de thromboxane A2, ce qui est le cas pour de faibles doses d'aspirine (32).

Une forme urinaire d'excrétion du TXB2, le 11-dehydro-TXB2 a également été mesurée par certains auteurs, pour déterminer la résistance à l'aspirine, en utilisant un kit de Cayman Chemicals© (Ann Arbor, MI, USA). Les sujets présentant des concentrations $\geq 67,9$ ng/(mmol de créatinine) étaient considérés comme résistants (33).

e) **VerifyNow Aspirin®**

VerifyNow Aspirin® (Accriva Diagnostics, San Diego, CA, USA) est un système qui permet d'évaluer sélectivement l'efficacité de l'anti-agrégation plaquettaire induite par l'aspirine. Le principe de fonctionnement est à mi-chemin entre le PFA et la LTA. L'automate va réaliser une mesure de densité optique dans une chambre de mesure thermostatée à 37°C, sous agitation, contenant du sang total anticoagulé (citraté ou hirudiné) ainsi que des micro-billes coatées par du fibrinogène (**Figure 7**). L'ajout de l'inducteur (acide arachidonique) va déclencher l'agrégation plaquettaire et les pontages interplaquettaires médiés par le fibrinogène, présent sur les billes de latex. L'agrégation plaquettaire induit donc une augmentation de densité optique due à la constitution d'un réseau dense de billes de latex coatées de fibrinogène. Au cours de l'agrégation, le système convertit les données optiques en unités arbitraires ARU (Aspirin Reaction Units).

Un patient qui agrège au delà de 550 ARU sera considéré comme résistant à l'aspirine. Inversement, le traitement sera considéré comme efficace si la valeur

mesurée est inférieure stricte à 550 ARU. Le système présente par ailleurs une très bonne répétabilité.

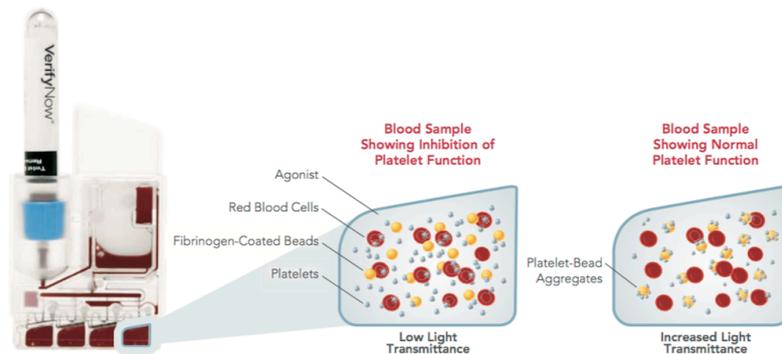


Figure 7. Principe de fonctionnement de la cartouche VerifyNow Aspirin®. Un échantillon dont le traitement anti-agrégant par aspirine est efficace (à gauche) formera moins d'agrégats plaquettaires, et donc la transmittance sera moins importante qu'un sujet témoin (à droite) qui agrégera plus facilement, et laissera davantage passer la lumière. D'après Accriva Diagnostics.

f) Thromboélastographie

La thromboélastographie (TEG) est une analyse globale, quantitative et qualitative des fonctions plaquettaires, qui évalue la formation du caillot, la force du caillot et sa dégradation (fibrinolyse). Deux automates de TEG sont actuellement commercialisés, le ROTEM® (Tem, Munich, Allemagne) et le TEG Platelet Mapping™ (Haemonetics, Niles, IL, USA).

Dans un système thermostaté à 37°C, l'appareil enregistre l'évolution temporelle du couple de résistance en torsion du rotor au fond d'une cupule réactionnelle après introduction de sang total anticoagulé (citraté ou hépariné), ajout de thrombine et d'inducteurs de l'agrégation plaquettaire (acide arachidonique, ADP) et ajouts d'inhibiteurs de la fonction plaquettaire. L'amplitude maximale, correspondant à la solidité du caillot pour chacun des inducteurs est mesurée et permet le calcul du pourcentage d'inhibition plaquettaire par l'aspirine (**Figure 8**). Il a été montré que le TEG était fortement corrélé au LTA (34). Bien que semi-automatisé, le temps de l'analyse reste assez long (30 à 40 min).

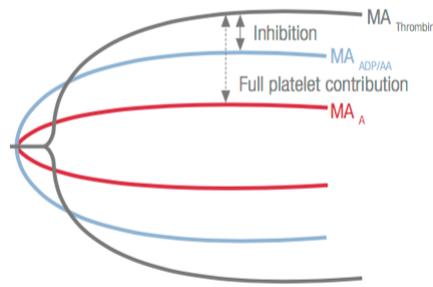


Figure 8. Exemple de courbes « en fusée » obtenues par thromboélastographie. La courbe noire correspond à des plaquettes stimulées par de la thrombine et à une activité plaquettaire non inhibée, la courbe rouge correspond à une activité plaquettaire totalement inhibée et la courbe bleue à une activité plaquettaire stimulée par un inducteur (AA ou ADP) ; l'écart entre les courbes bleue et noire rapporté à celui entre les courbes rouge et noire fournit par conséquent un taux d'inhibition de l'activité plaquettaire lié à l'activité de l'antiagrégant plaquettaire prescrit au patient D'après Haemonetics.

g) Que peut-on attendre des techniques disponibles actuellement pour évaluer la résistance à l'aspirine?

Il convient de rappeler en premier lieu, qu'à ce jour, il n'existe aucun test fonctionnel plaquettaire spécifique préconisé, pour évaluer l'efficacité antiplaquettaire de l'aspirine. Le *Working Group on Aspirin Resistance of the International Society of Thrombosis and Haemostasis* recommande, en 2009, de n'utiliser des tests biologiques que dans le cadre de protocoles de recherche (35).

Différentes méthodes d'évaluation de la résistance existent actuellement (**Tableau 1**). Les deux techniques de référence, à savoir l'agrégométrie sur PRP (LTA) et le dosage du TXB2 circulant, souffrent de certaines limitations développées précédemment. Les tests semi-automatisés, plus maniables en biologie de routine, de type PFA-100® et VerifyNow® sont selon les études, insuffisamment corrélés à la LTA (36). La recherche de la résistance à l'aspirine par TEG n'est validée à ce jour par aucune étude. L'agrégométrie en sang total, reproduit plus fidèlement l'hémostase primaire, est bien corrélée à la LTA (29) et permet un usage maniable en routine. Elle offre des perspectives prometteuses en biologie médicale, comme méthode d'investigation de la résistance biologique à l'aspirine.

Technique	Mécanisme	Avantages	Inconvénients
Agrégométrie sur plasma riche en plaquettes (PRP)	Turbidimétrie (PRP)	-Gold standard historique	-Chronophage -Volumes « importants » -Interférences optiques -Patients thrombopéniques (<100 G/L)
Multiplate	Impédance (sang total)	-Faible volume -Simple -Rapide -Semi-automatisé -Pas d'interférences optiques	-Corrélation variable à l'agrégométrie sur PRP
PFA-100®	Agrégation en conditions de cisaillement élevées (sang total)	-Simple -Rapide -Semi-automatisé	-Prévalence de la résistance surestimée par rapport aux autres méthodes (mauvaise corrélation) -Influence de l'hématocrite, du taux de plaquettes, du facteur Willebrand, des thrombopathies
Thromboxane B2 plasmatique ou sérique	ELISA (plasma ou sérum)	-Le plus spécifique -Référence dans les études de recherche	-Utilisation non validée en routine -Disponibilité commerciale limitée du kit de dosage
VerifyNow Aspirin®	Turbidimétrie (sang total)	-Simple -Rapide -Semi-automatisé	-Corrélation variable à l'agrégométrie sur PRP
TEG	Thromboélastographie (sang total)	-Faible volume -Simple -Rapide -Semi-automatisé	-Non validé dans des études cliniques -Corrélation à l'agrégométrie sur PRP -Temps de l'analyse

Tableau 1. Avantages et inconvénients des différents outils biologiques permettant d'évaluer la résistance à l'aspirine. ELISA, Enzyme linked Immunosorbent assay. PRP, Plasma riche en plaquettes. TXB2, Thromboxane B2. Adapté de (28,37).

B. Rationnel

L'étude RAS pour « Résistance à l'Aspirine dans les Syndromes myéloprolifératifs », a été initiée dès janvier 2015, en collaboration entre le service d'hématologie clinique du CHRU de Brest (Dr Jean-Christophe Ianotto) et le laboratoire d'hématologie (Pr Valérie Ugo, Pr Eric Lippert, Dr Hubert Galinat, Dr Benjamin Gillet). Ce premier travail avait pour objectif de comparer, dans une population de 36 patients atteints de SMP (TE ou PV), trois méthodes permettant de mettre en évidence la résistance à l'aspirine : d'une part, deux méthodes dites de « référence » : la méthode de Börn et le dosage du TXB2 plasmatique et, d'autre part, l'agrégométrie en sang total (Multiplate, Roche).

La publication de Gillet et al. a permis de déterminer : (1) l'équivalence des trois méthodes comparées, (2) l'établissement de valeurs seuils pour la résistance à l'aspirine et (3) la supériorité de la méthode MEA qui renseigne sur le type de résistance à l'aspirine (intrinsèque et/ou de turnover).

A l'aide de 2 tests différents sur le Multiplate®, ASPI-test et ASPI-ASA test, il a été montré qu'il est possible de décomposer la résistance totale à l'aspirine selon deux composantes : la résistance intrinsèque et la résistance de turnover (**Figure 9**).

L'AUC de l'ASPI-test renseigne sur la résistance totale des plaquettes vis-à-vis de l'aspirine. On étudie dans ce test, la réponse globale à l'acide arachidonique (AA) des plaquettes, exposées à l'aspirine, naïves, et/ou présentant une éventuelle résistance intrinsèque. On teste la réactivité de l'ensemble du pool plaquettaire.

- Si les plaquettes ont été exposées à l'aspirine *in vivo* et qu'elles présentent une résistance intrinsèque, elles répondront à une stimulation par l'acide arachidonique et contribueront à la réponse de l'ASPI-test.
- Si les plaquettes sont naïves, c'est-à-dire n'ont pas été exposées à l'aspirine *in vivo*, elles répondront également à une stimulation par l'acide arachidonique et leur réponse, liée à la résistance dite de turnover, comme à la résistance intrinsèque, contribuera également à la réponse de l'ASPI-test.

Plus l'AUC ASPI est élevée, plus la résistance totale à l'aspirine sera forte.

L'AUC de l'ASPI-ASA (AA et aspirine) renseigne sur la résistance plaquettaire intrinsèque. Dans ce test, les plaquettes sont toutes exposées à l'aspirine, qu'elles soient naïves ou non, puis l'agrégation est déclenchée par l'AA. On élimine donc de cette réponse la contribution de la résistance de turnover liée aux plaquettes naïves puisque ces dernières sont exposées *in vitro* à l'aspirine. Ainsi, si les plaquettes présentaient une résistance intrinsèque, elles agrègeront même en présence d'aspirine. L'AUC du test ASPI-ASA est donc directement liée à la résistance intrinsèque.

La résistance extrinsèque ou de turnover se déduit alors par simple soustraction de la résistance intrinsèque (AUC ASPI-ASA) à la résistance totale (AUC ASPI). Elle correspond à la capacité d'agrégation des plaquettes naïves d'aspirine, qui n'ont pas été exposées à l'aspirine, et qui répondent bien à une stimulation par l'AA. La **Figure 9** schématise bien ces deux composantes et leurs méthodes de calcul par MEA.

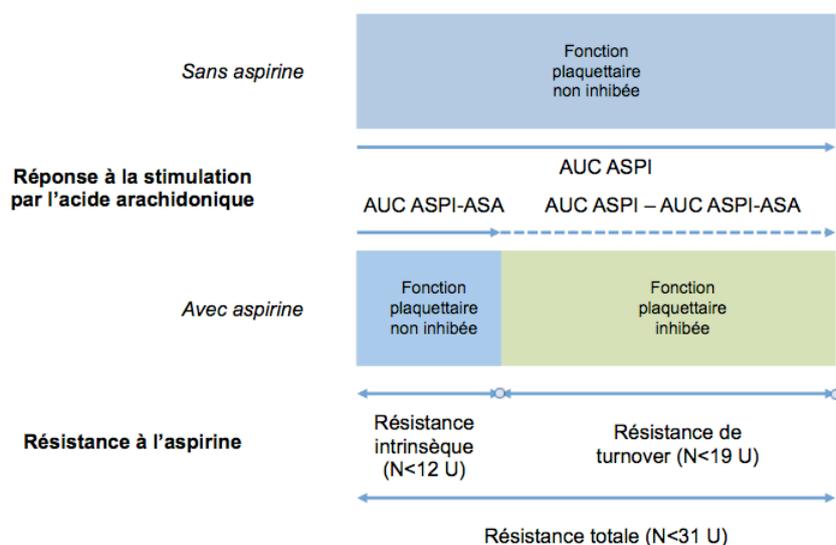


Figure 9. Représentation schématique des deux composantes de la résistance à l'aspirine dans les syndromes myéloprolifératifs, de leur moyen d'exploration par agrégométrie en sang total, ainsi que des valeurs seuils au delà desquelles le patient est considéré comme résistant à l'aspirine : résistance totale (ASPI), résistance de turnover (ASPI moins ASPI-ASA), et résistance intrinsèque (ASPI-ASA). Adapté de Gillet et al.

Des valeurs seuils pour la résistance à l'aspirine ont également été déterminées. Ainsi, un patient présentant une résistance totale supérieure ou égale à 31 U, ou bien une résistance de turnover supérieure ou égale à 12 U, ou une résistance intrinsèque supérieure ou égale à 19 U, a été considéré comme résistant à l'aspirine.

Deux publications ont récemment mis en évidence la réduction de la résistance à l'aspirine sur le plan biologique. L'équipe de Pascale a montré dans une population de TE (n=22) résistant à l'aspirine (TXB2 sérique ≥ 4 ng/mL), une réduction de 88% de la production de TXB2 sérique après passage à 2 fois 100 mg d'aspirine gastro-résistant quotidiennement (22). Une équipe française a également démontré l'intérêt du passage à 2 prises par jour en terme de réduction de l'agrégation maximale (38).

A l'issue du travail précédent, deux interrogations ont rapidement émergé : quel est l'effet de la cytoréduction sur la résistance à l'aspirine? quel est l'effet d'une double prise d'aspirine sur cette même résistance?

Pour tenter de répondre à ces questions, les inclusions du protocole RAS se sont poursuivies au cours de ces douze derniers mois, d'octobre 2015 à octobre 2016, pour atteindre 51 patients recrutés. Une nomenclature spécifique a été mise en place pour les différents points de l'étude (**Tableau 2**).

<i>Patients</i>	<i>Pxy</i>	<i>Nombre de prise(s) par jour</i>
<i>Non cytoréduits</i>	P11	1
<i>(bas risque)</i>	P12	2
<i>Après cytoréduction</i>	P21	1
<i>(haut risque)</i>	P22	2

Tableau 2. Nomenclature des différents points de l'étude selon le risque thrombotique des patients et le nombre de prises quotidiennes d'aspirine.

C. Objectifs du travail

Les objectifs du présent travail ont été de :

-Déterminer si une double prise quotidienne d'aspirine réduit ou abolit les résistances biologiques observées par MEA dans les SMP.

-Suivre l'évolution des résistances de turnover et intrinsèque après cytoréduction chez des patients présentant un SMP à haut risque.

D. Bibliographie

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J et al. WHO Classification Of Tumours Of Haematopoietic And Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med.* 2004 Nov 15;117(10):755–61.
3. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005 Apr 28;434(7037):1144–8.
4. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med [Internet].* 2006 Jul [cited 2014 Oct 15];3(7).
5. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013 Dec 19;369(25):2379–90.
6. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013 Dec 19;369(25):2391–405.
7. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012 Aug 1;51(8):743–55.
8. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patients With Polycythemia Vera. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 1;23(10):2224–32.
9. Gruppo Italiano Studio Policitemia*. Polycythemia Vera: The Natural History of 1213 Patients Followed for 20 Years. *Ann Intern Med.* 1995 Nov 1;123(9):656–64.
10. Casini A, Fontana P, Lecompte TP. Thrombotic complications of myeloproliferative neoplasms: risk assessment and risk-guided management. *J Thromb Haemost.* 2013 Jul;11(7):1215–27.
11. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood.* 2013 Jul 3.

12. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008 Mar 1;93(3):372–80.
13. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, Gianelli U, Fabris F, Reati R, et al. Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology*. 2006 Dec;44(6):1528–34.
14. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5128–33.
15. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *ASH Educ Program Book*. 2012 Dec 8;2012(1):571–81.
16. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):114–24.
17. Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Pérez-Andreu V, Hernández-Boluda J-C, et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1205–10.
18. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2015 Feb;90(2):162–73.
19. Lev EI. Aspirin Resistance: Transient Laboratory Finding or Important Clinical Entity?. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Feb 24;53(8):678–80.
20. Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of Enteric Coating on Antiplatelet Activity of Low-Dose Aspirin in Healthy Volunteers. *Stroke*. 2006 Aug 1;37(8):2153–8.
21. Kapoor JR. Enteric Coating Is a Possible Cause of Aspirin Resistance. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Oct 7;52(15):1276–7.
22. Pascale S, Petrucci G, Dragani A, Habib A, Zaccardi F, Pagliaccia F, et al. Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3595–603.
23. Bishopric NH. Toward a genomic definition of aspirin resistance. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Oct 1;62(14):1277–9.
24. Eicher JD, Wakabayashi Y, Vitseva O, Esa N, Yang Y, Zhu J, et al. Characterization of the platelet transcriptome by RNA sequencing in patients with acute myocardial infarction. *Platelets*. 2016 Apr 2;27(3):230–9.

25. Voora D, Cyr D, Lucas J, Chi J-T, Dungan J, McCaffrey TA, et al. Aspirin exposure reveals novel genes associated with platelet function and cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Oct 1;62(14):1267–76.
26. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 1963 Aug;168(1):178–95.
27. Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2007 Jul 1;28(14):1702–8.
28. Le Quellec S, Bordet J-C, Negrier C, Dargaud Y. Comparison of current platelet functional tests for the assessment of aspirin and clopidogrel response: A review of the literature. *Thromb Haemost*. 2016 Jul 21;116(4).
29. Gillet B, Ianotto J-C, Mingant F, Didier R, Gilard M, Ugo V, et al. Multiple Electrode Aggregometry is an adequate method for aspirin response testing in myeloproliferative neoplasms and differentiates the mechanisms of aspirin resistance. *Thromb Res*. 2016 Jun;142:26–32.
30. McGlasson D, Fritsma G. Whole Blood Platelet Aggregometry and Platelet Function Testing. *Semin Thromb Hemost*. 2009 Mar;35(02):168–80.
31. Thun MJ, Jacobs EJ, Patrono C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012 May;9(5):259–67.
32. Reilly IA, FitzGerald GA. Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood*. 1987 Jan 1;69(1):180–6.
33. Fritsma GA, Ens GE, Alvord MA, Carroll AA, Jensen R. Monitoring the antiplatelet action of aspirin. *JAAPA Off J Am Acad Physician Assist*. 2001 May;14(5):57–8, 61–2.
34. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of Platelet Aspirin Resistance Detection by Thrombelastograph Platelet Mapping and Validation by Conventional Aggregometry Using Arachidonic Acid Stimulation. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 1;46(9):1705–9.
35. Reny J-L, Bonvini RF, Barazer I, Berdagué P, de Moerloose P, Schved J-F, et al. Le concept de « résistance » à l'aspirine : mécanismes et pertinence clinique. *Rev Médecine Interne*. 2009 Dec;30(12):1020–9.
36. Ardillon L, Ternisien C, Fouassier M, Sigaud M, Lefrançois A, Pacault M, et al. Platelet function analyser (PFA-100) results and von Willebrand factor deficiency: a 16-year “real-world” experience. *Haemophilia*. 2015 Sep 1;21(5):646–52.
37. Zimmermann N, Hohlfeld T. Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost* [Internet]. 2008 Aug 14.

38. Dillinger J-G, Sollier CB dit, Sideris G, Ronez E, Henry P, Drouet L. Twice daily aspirin to improve biological aspirin efficacy in patients with essential thrombocytemia. *Thromb Res.* 2012 Jan 1;129(1):91–4.

E. Article

Title: Decrease in turnover aspirin resistance in MPN by bidaily aspirin intake and efficient cyto-reduction

Authors: Perrier-Cornet Andréas¹, Iannotto Jean-Christophe², Galinat Hubert¹ and Lippert Eric¹.

(1) Service d'Hématologie Biologique, CHRU Brest; (2) Service d'Hématologie Clinique, CHRU Brest.

1. Abstract

Introduction: Essential thrombocytemia (ET) and polycytemia vera (PV) are two myeloproliferative neoplasms with an increased risk of arterial and venous thrombosis, and to a lesser extent of bleeding complications. The efficacy of low-dose aspirin in myeloproliferative neoplasms (MPN) has thus been questioned in order to reduce the thrombotic risk. Furthermore, the role of the allegedly “aspirin resistance” has also been debated, considering the recurrence of thrombotic events in some patients treated with low dose aspirin.

Material and methods: An observational study comparing 75 mg aspirin once daily (OD) versus 75 mg aspirin twice daily (BID) was performed in ET and PV patients (n=51) before and after cytoreductive treatments. Aspirin resistance was assessed using whole blood aggregometry (Multiplate®, Roche Diagnostics, Meylan, France).

Results: Global aspirin resistance consisted essentially in turnover resistance (TOR), correlated to “naive” platelets (i.e. platelets not exposed to aspirin). By reducing naive platelets with BID aspirin, TOR was significantly reduced. 60% of patients overcame TOR after BID aspirin and 37% of patients were still considered resistant after BID aspirin intake. This reduction with BID aspirin was observed in high-risk cytoreduced patients ($p=0.0003$) as well as in non-cytoreduced patients ($p=0.001$). After cytoreductive therapy, patients had significantly lower TOR than patients before cytoreduction independently of the aspirin regimen ($p<0.0001$ and $p=0.003$ respectively). To a lesser extent, IR was affected by cytoreduction.

This study demonstrates (1) that twice-daily aspirin is biologically more effective in MPN patients than once-daily aspirin, and (2) a decrease of aspirin resistance after cytoreductive treatments of high-risk MPN patients. However, a multicentric placebo-controlled trial should be considered before changing medical practices.

Key words: whole blood aggregometry, Multiplate, aspirin resistance, MPN, thrombosis

2. Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal hematopoietic stem cell disorders, characterized by proliferation of one or more myeloid lineages (erythroid, megakaryocytic, granulocytic) in the bone marrow. It is usual to distinguish Chronic Myeloid Leukemia (CML), harboring the recurrent t(9;22) translocation and its resulting *BCR-ABL1* fusion gene, from the other MPNs : Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocytemia (ET) and Myelofibrosis (MF). Three acquired driver mutations have been described in MPN, affecting *Janus Kinase 2 (JAK2)*, *Thrombopoietin receptor (MPL)*, and *calreticuline (CALR)*.

Major MPN complications include thrombotic complications, mainly in arterial territories, leukemic/fibrotic transformation and bleeding complications (for ET, mostly with high thrombocytosis). The European Collaboration on Low-Dose Aspirin in PV (ECLAP) trial showed that cardiovascular mortality accounted for 45% of all deaths in 1,638 PV patients while hematologic transformations were the cause of death in 13% of cases (1). Arterial thrombosis including acute myocardial infarction, ischemic stroke and peripheral arterial occlusion accounts for 65% of events related to MPN (2). Up to 60% of ET patients experience a thrombotic event in their lifetime, such as a transient ischemic attack, myocardial infarction, or stroke. At diagnosis, arterial thrombosis appears to be two to three times more frequent than venous thrombosis in MPN patients. Furthermore, ET patients are more likely to be affected by thrombosis than PV patients. The prevalence of venous thrombosis in unusual sites, such as splanchnic vein and cerebral vein has been reported to be unusually increased among patients with MPN (1–6).

Estimation of the thrombotic risks enables to stratify patients and to adapt the therapeutic attitude. Low-risk patients (i.e. age < 60 years old with no history of thrombotic events or cardiovascular risk factors) are likely to receive aspirin, while high-risk patients (i.e. age ≥ 60 years old, history of thrombosis, cardiovascular risk factors, leukocytosis > 11 G/L) are likely to receive cytoreductive therapy and low-dose aspirin (7). To prevent thrombotic complications, low-dose aspirin 75 or 100 mg, once daily is currently recommended for cardiovascular prevention in PV (1,8). On extrapolation, ET patients also receive low-dose aspirin, according to current guidelines, though no prospective trials have yet been conducted (7).

A low dose of aspirin selectively and irreversibly inhibits cyclooxygenases from circulating platelets, blocks the metabolism of arachidonic acid, and reduces formation of thromboxane A₂ (TXA₂), which is the major metabolite in platelets that promotes platelet activation and aggregation (9). Unfortunately, some patients do not respond correctly to aspirin therapy. This phenomenon has been referred to as “aspirin resistance”. The reported prevalence of aspirin resistance is variable, depending on the analytic method used to determine it, the cut-off values and the study population (10).

Two types of resistances contribute to aspirin resistance : turnover resistance (TOR) and intrinsic resistance (IR) (11). Due to the short-life of aspirin (15 - 20 min), platelets produced between two consecutive aspirin intakes are not exposed to aspirin, thus remain active: these platelets are called « naive » platelets (12). In MPN patients, a large number of platelets is produced, hence a large number of platelets are naive and thus not exposed to aspirin between two intakes which may explain the aspirin « turnover » resistance. This hypothesis has prompted some authors to recommend twice daily aspirin intake to overcome aspirin resistance (7,12–14). Intrinsic resistance (IR) is not related to excessive platelet production, or pharmacokinetic issue, but results from the impossibility for platelets to be inhibited by aspirin. For instance, mutations of cyclooxygenases have been described to be responsible for aspirin resistance (15).

A previous work from our laboratory showed that Multiple Electrode Aggregometry (MEA) was a rapid and reliable method to assess not only global aspirin resistance but also TOR and IR (11). The present study was designed to evaluate with MEA the biological effect of twice-daily aspirin intake in ET and PV patients, and the biological effect of cytoreduction on aspirin resistance among that population.

3. Material and Methods

a) Study design

We screened 51 patients with a diagnosis of ET or PV according to World Health Organization criteria (16,17) who were ongoing treatment with 75 mg aspirin (Kardegic 75 mg, Sanofi-Aventis, France) once daily. Exclusion criteria were : age less than 15 years old, pregnancy, a recent (< 6 months) myocardial infarction or

stroke, personal history of bleeding, aspirin intolerance, gastroduodenal ulcer, use of other antiplatelet agents such as thienopyridine, use of anticoagulants such as vitamin K antagonist or direct oral anticoagulants, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, use of certain classes of antidepressant drugs such as serotonin-specific reuptake inhibitors or serotonin–noradrenaline reuptake inhibitors, liver failure, chronic renal failure (glomerular filtration rate < 30 ml/min/1.73 m²), inflammatory bowel disease, autoimmune diseases, hypertension not controlled by pharmacological treatment, inflammatory intercurrent event, patients who had undergone surgery in the past 6 months, patients ongoing cytoreductive treatments with incomplete cytoreduction criteria, and non-compliance to the drug intake schedule. Based on the recommendation of Tefferi (7,13), patients harboring biological aspirin resistance, were asked to take aspirin on a regimen of twice daily. Patients gave written informed consent to the study, which was approved by the ethical committee.

A dedicated nomenclature was used to properly identify patients at each point of the study: Pxy: x standing for cytoreductive state (x=1 : low risk patient, non cytoreduced patient; x=2 : high risk patient, stabilized cytoreduced patient) and y standing for the aspirin regimen (y=1 : one daily aspirin intake; y=2 : twice daily aspirin intake). For simplicity reason, P1y and P2y were commonly abbreviated to P1 and P2 patients.

PX1 patients (P11 and P21) were instructed to take their aspirin at breakfast (between 07:00 and 08:00 am), while PX2 patients were asked for 3 days, prior to the blood sampling, to take a second dose of aspirin at dinner (between 07:00 and 08:00 pm) in addition to their usual morning intake. Platelet function was always analyzed at trough, just before aspirin intake. Two screening visits were performed within a 1-week interval. In order to assess the compliance, patients received a dedicated aspirin intake schedule (**Supplemental data**), and also a compliance notebook in which they had to report daily for a month, the hours of drug intakes (aspirin plus or minus cytoreductive treatments). Compliance was finally assessed by face-to-face interviews, during medical consultation and before blood withdrawal. Only patients harboring a biological aspirin resistance in the first place (P11 or P21) were eligible to receive a double dose of aspirin (P12 or P22).

The first endpoint of the study was the comparison of once daily versus twice daily aspirin regimen of TOR and IR assessed by MEA in whole blood. The secondary objective was to compare, among high-risk patients, the effect of cyto-reduction on TOR and IR.

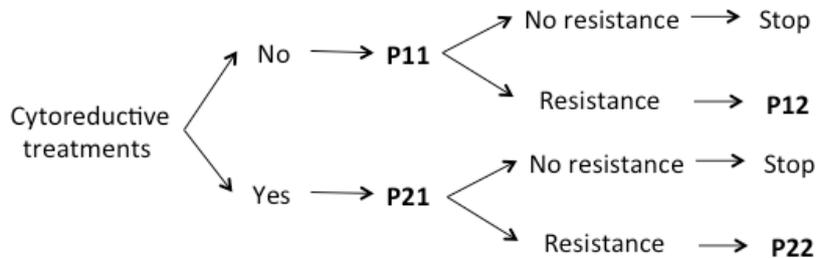


Figure 1. Design of the observational study. Patients with fitting criteria were put into groups. Only patients harboring a biological aspirin resistance with a single dose (P11 or P21) were eligible to receive a double dose of aspirin (P12 or P22).

b) Blood collection

The local Ethics Committee of the CHRU of Brest approved this study. All ET or PV patients (n=51) gave their informed consent. For each patient at each point of the study (P11, P12, P21, P22), 2 tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) of venous blood were collected: 1 citrate tube 0.109 M/3.2% for Multiplate® (Roche, Basel, Switzerland) analyzer and 1 EDTA tube for routine blood tests run on XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan). MEA was realized within 3 hours after collection, requiring a fast delivery to the laboratory.

c) Multiple Electrode Aggregometry

Whole blood impedance measurement using Multiple Electrode Aggregometry (MEA) were performed on the Multiplate® analyzer (Roche®, Switzerland). 300 µL of citrated whole blood were stimulated at 37°C with 0.5 mM arachidonic acid (AA) in the presence (ASPI-ASA) or absence (ASPI) of aspirin according to the manufacturer's instruction. Results were expressed in arbitrary units (U) as the area under the curve (AUC). ASPI-AUC measured total aspirin resistance, and ASPI-ASA-AUC measured intrinsic resistance. Turnover resistance was calculated by difference between ASPI-AUC and ASPI-ASA-AUC, as indicated in a previous work (11).

Patients were considered to be resistant to aspirin when TOR (ASPI-ASA) >12 U and/or IR (ASPI) >19 U, as determined in the same study.

d) Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the XLSTAT® software (v5.01-Addinsoft, France). P-values less than 0.05 were considered statistically significant. Non-parametric test (Mann-Whitney) was used to compare different groups characteristics. Correlation map were computed using Pearson and Spearman correlation coefficients. All p-values were two-sided.

4. Results

a) Population study

Fifty-one aspirin-treated ET or PV patients (median age 58 years, min-max, 16-90) the main characteristics of which are described in **Table 1** were recruited to perform MEA analysis. From September 2015 to September 2016, 17 blood samples from non-cytoreduced patients and 34 blood samples from cytoreduced patients were collected, while patients were undergoing once or twice daily aspirin (**Table 2**). Paired patients were then analyzed before and after the change of aspirin regimen. Women accounted for 67% of our population, and WHO-defined ET patients for 59%.

	All patients	ET P1y	ET P2y	PV P1y	PV P2y
	(n=51)	(n=14)	(n=17)	(n=3)	(n=17)
Median age (years old)	68	69		68	
		60	70	69	68
Men	37% (n=19)	3	5	2	9
Women	63%(n=32)	11	12	1	8
PV	39% (n=20)	NA	NA	3	17
ET	61% (n=31)	14	17	NA	NA
JAK2V617F mutation	78% (n=40)	9	11	3	17
CALR mutation	8% (n=4)	2	2	0	0
MPL mutation	4% (n=2)	1	1	0	0
Triple-negative	10% (n=5)	2	3	0	0
Bleeding history	4% (n=2)	1	-	-	1
Thrombosis history	18% (n=9)	2	3	0	4
Cytoreductive agents	65% (n=34)	-	N=17	-	N=17
Hydroxyurea	53% (n=27)	-	76% (n=13)	-	82% (n=14)
Anagrelide	6% (n=3)	-	18% (n=3)	-	-
Pegylated interferon	6% (n=3)	-	6% (n=1)	-	12% (n=2)
Pipobroman	2% (n=1)	-	-	-	6% (n=1)
Platelets (G/L)	-	591	343	695	277
		(387-1175)	(145-487)	(345-718)	(151-381)
Hemoglobin (g/L)	-	14.3	13.0	18	13.8
		(12.1-15.9)	(10.3-15.5)	(14.9-19.8)	(10.3-16.3)
Hematocrit (%)	-	42.8	37.4	56.4	41.5
		(36.4-47.4)	(29.3-44.3)	(44.9-59.5)	(30.0-47.2)
Leukocytes (G/L)	-	8.3	6.2	10.3	5.6
		(4.2-13.2)	(3.4-8.5)	(8.1-11.9)	(3.8-10.9)
MPV (fL)	-	9.8	10.0	10.3	10.4
		(8.7-11.5)	(8.3-11.5)	(9.1-11)	(8.8-12.5)
IPF (%)	-	2.6	3.7	2.4	4.2
		(1.2-3.7)	(1.1-6.4)	(1.0-6.7)	(1.1-7.7)

Table 1. Clinical and biological characteristics of the population of ET and PV recruited for the study. Data are expressed as median (min-max) or percentage of the global population. ET, Essential Thrombocythemia; IPF, Immature Platelet Fraction; MPV, Mean Platelet Volume; P1, before cytoreduction; P2, after cytoreduction; PV, Polycythemia Vera.

All PV were JAK2V617F positive (n=20), while 76% of ET harbored a JAK2V167F mutation (n=13). 76% of ET patients (n=13) and 82% of PV patients (n=14) received hydroxyurea. Other cytoreductive treatments also included anagrelide (n=13), pegylated interferon (n=1) in ET and pegylated interferon (n=2) and pipobroman (n=1) in PV. No bleeding complications or thrombotic events occurred while patients were receiving twice-daily aspirin. 14% of patients exhibited thrombotic events : 12% occurred before MPN diagnosis and 2% after diagnosis.

	Pxy	n=	Aspirin intake
Before	P11	17	1/day
cytoreduction	P12	17	2/day
After	P21	34	1/day
cytoreduction	P22	34	2/day
	Total	51	

Table 2. Numbers of low-risk non-cytoreduced patients (P11 and P12) and high-risk patients (P21 and P22) included in the study from September 2015 to September 2016. P12 and P22 patients received twice daily aspirin for 3 days.

b) Effect of twice daily aspirin intake versus once

In non-cytoreduced patients, median TOR as measured by MEA was 70 U [Min-max, 9-104 U] on once daily intake, 22 U [1-76 U] on twice daily intake. After cytoreduction, median TOR was 20 U [1-68 U] on once daily intake and 8 U [2-40 U] on twice daily intake. TOR was thus significantly reduced with two daily aspirin intakes whether or not patients underwent cytoreductive treatment (p=0.001 and p=0.0003 respectively) (**Figure 2**). 60% of patients overcame TOR after BID aspirin and 37% of patients were still considered resistant after twice daily aspirin intake. Median IR in non-cytoreduced patients was 15 U [4-23 U] on once daily intake, 12 U [1-23 U] on twice daily intake. After cytoreduction, median IR was 8 U [2-25 U] on once daily intake and 7 U [1-22 U] on the twice-daily regimen. IR was not affected by twice daily aspirin intake, and no significant differences were found between patients with OD (p=0.08) or BID (p=0.17) regimen, whatever the status of patients regarding cytoreduction as indicated in **Figure 3**.

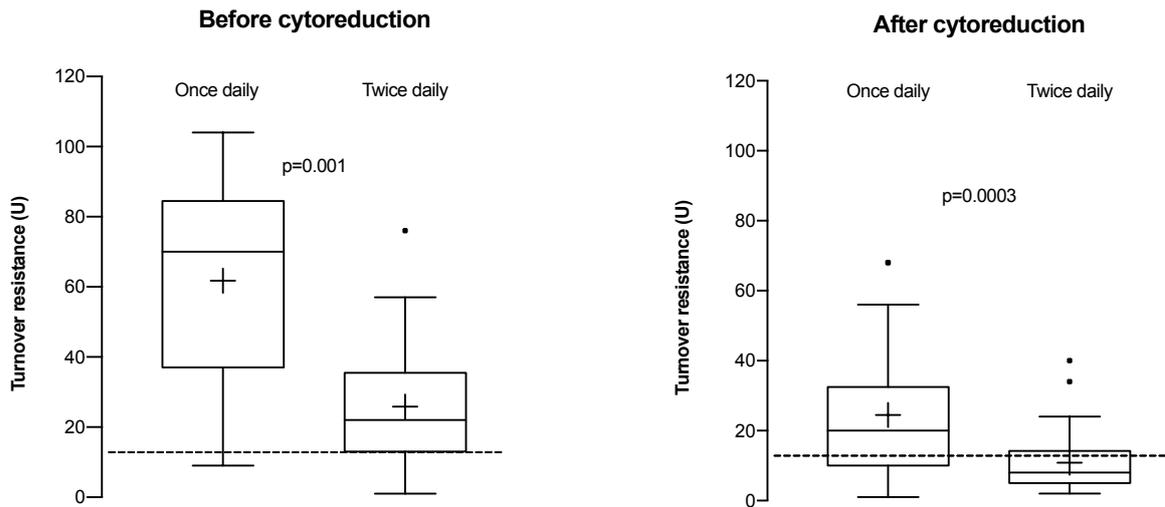


Figure 2. Effects of twice daily aspirin intake on turnover resistance (TOR) before (A) and after cyto reduction (B). Boxplots show median and interquartile ranges (25th and 75th percentile) of TOR. Black crosses represent the mean and black diamonds indicate outlier points.

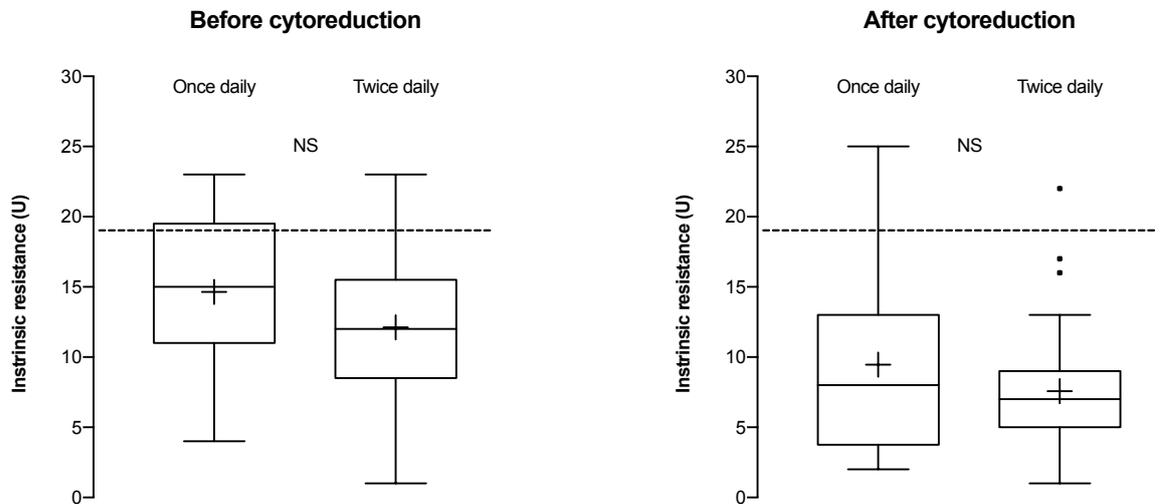


Figure 3. Effects of twice daily aspirin intake on intrinsic resistance (IR) before (A) and after cyto reduction (B). Boxplots show median and interquartile ranges (25th and 75th percentile) of IR. No statistically significant differences of IR were observed between aspirin intake schemes, whatever the cyto reduction status ($p=0.17$ before cyto reduction and $p=0.08$ after cyto reduction).

c) Effect of cytoreductive agents

After cytoreductive therapy, patients had significantly lower TOR (**Figure 4**) than patients before cytoreduction independently of the aspirin regimen ($p < 0.0001$ and $p = 0.003$ respectively). To a lesser extent, statistical differences of IR were observed after cytoreduction ($p = 0.005$ and $p = 0.001$ on once and twice-daily intake respectively) independently of the aspirin regimen (**Figure 5**). Before cytoreduction, the proportion of patients with aspirin resistance, defined by $TOR \geq 12$ U and/or $IR \geq 19$ U, was 94% on once daily intake and 74% on twice daily regimen. Of the 16 patients resistant with once daily aspirin, 10 patients (59%) remained resistant on twice-daily aspirin and 6 patients (35%) overcame resistance after 3 days of twice-daily aspirin. After cytoreduction, 74% of patients harbored aspirin resistance on once daily aspirin and this proportion dropped at 15% after twice daily intake. Whatever the point of the study (Pxy), TOR constitutes the main component of aspirin resistance, since the majority of patients have no IR ($IR < 19$ U).

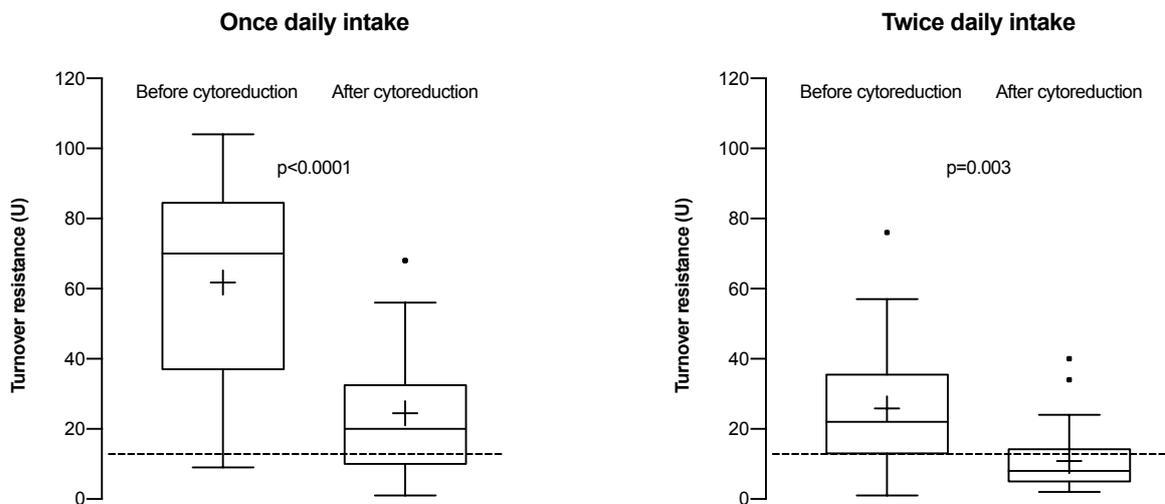


Figure 4. Effects of cytoreduction on turnover resistance (TOR) depending on the aspirin regimen: once daily aspirin (A) and twice a day aspirin (B). Boxplots show median and interquartile ranges (25th and 75th percentile) of TOR. Statistically significant differences of TOR were observed between once and twice daily aspirin intakes, before and after cytoreduction ($p < 0.0001$ and $p = 0.003$ respectively).

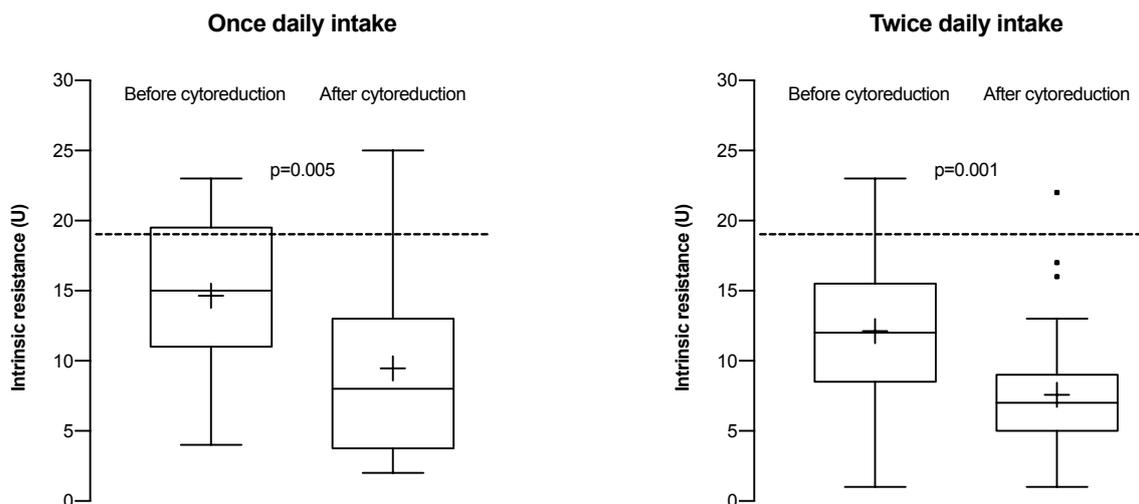


Figure 5. Effects of cyto reduction on intrinsic resistance (IR) depending on the aspirin regimen: once daily aspirin and twice a day aspirin. Boxplots show median and interquartile ranges (25th and 75th percentile) of IR. Statistically significant differences of IR were observed before and after cyto reduction ($p=0.005$ and $p=0.001$ respectively) independently of the aspirin regimen.

d) Correlations between turnover resistance and platelet counts

Correlation of TOR and IR and with hematological parameters were studied and showed that TOR was highly correlated with platelet counts (OD, $r^2=0.52$, $p<0.0001$; BID, $r^2=0.58$, $p<0.0001$), estimated naive platelet counts (OD, $r^2=0.52$, $p<0.0001$; BID, $r^2=0.58$, $p<0.0001$) (**Figure 6**), and leukocyte counts (OD, $r^2=0.33$, $p<0.0001$; BID $r^2=0.40$, $p<0.0001$). As shown in **Figure 6**, TOR is a function of thrombocytosis depending on the aspirin regimen. Relationship between TOR and platelet counts appears more sigmoid than linear and this relationship (**Figure 6A**) seems to be different depending on the aspirin regimen : abscissas of inflexion points are different for OD and BID regimen with a ratio close to 2. **Figure 6A** shows that TOR is an increasing function of platelets and that TOR is reduced after BID aspirin intake. TOR is also a function of theoretical naive thrombocytosis regardless of the aspirin regimen (**Figure 6B**) : the two curves related respectively to OD and BID regimen seem to be stackable.

IR was poorly correlated to platelet counts (OD, $r^2=0.11$, $p=0.025$; BID, $r^2=0.13$, $p=0.011$) and to leukocyte counts (OD, $r^2=0.13$, $p=0.012$; BID, $r^2=0.13$,

p=0.014). No clear relationship between IR and platelets could be determined (Figure 7).

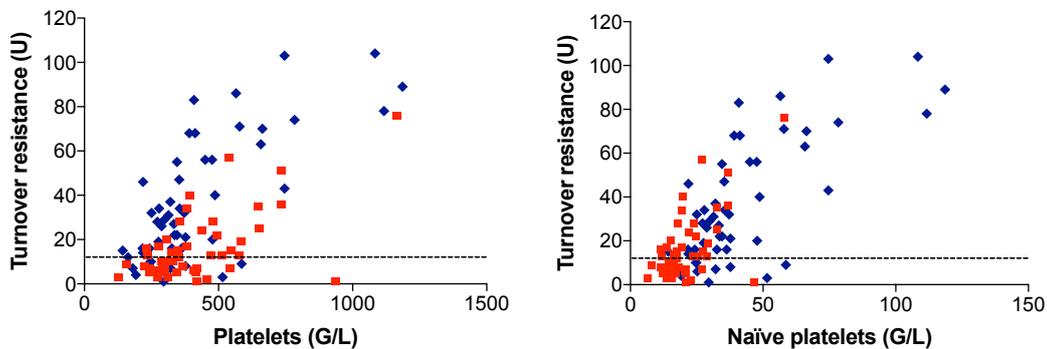


Figure 6. (A) Turnover resistance (TOR) is a function of thrombocytes depending on the aspirin regimen. Blue diamonds represent once daily aspirin and red squares represent twice-daily aspirin. **(B) Turnover resistance (TOR) is a function of naïve thrombocytes regardless of the aspirin regimen.**

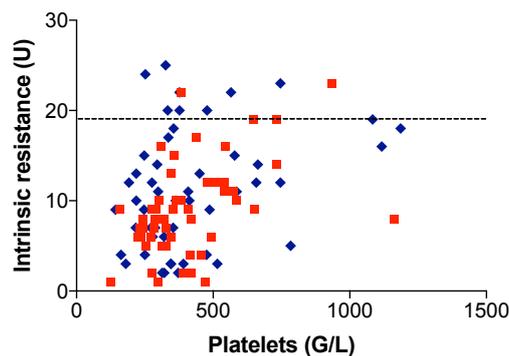


Figure 7. Intrinsic resistance (IR) is not a function of the thrombocytes regardless of the aspirin regimen ($y_{X1} = 0.0089x + 7.5$, $r^2=0.10$; $y_{X2} = 0.012x + 4.0$, $r^2=0.21$). Blue diamonds represent once daily (X1) aspirin and red squares represent twice-daily (X2) aspirin.

In order to estimate the reduction of TOR produced by the change of aspirin regimen, TOR once daily versus TOR twice daily were plotted and a linear regression showed a reduction of 61% of TOR on average ($y=0.39x$, $r^2 = 0.34$). The decrease of TOR was quite similar between cytoreduced patients (-64%) and non-cytoreduced patients (-60%) as shown in **Figure 8**. A weak linear regression was found for IR for all confounded patients, before and after cytoreduction ($y=0.68x$; $r^2 = 0.14$) (**Figure 9**).

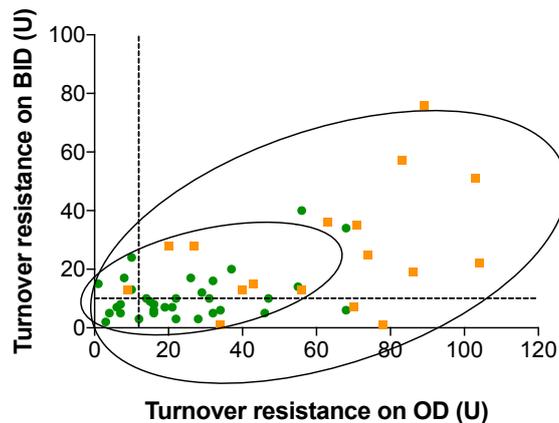


Figure 8. Relationship between turnover resistance (TOR) after once daily (OD) aspirin intake and TOR after twice daily (BID) aspirin intake among low-risk patients (P1, orange squares) and high-risk patients (P2, green circles). Linear trendline of all confounded patients estimated that twice daily aspirin reduces TOR on average of 61% ($y=0.39x$, $r^2 = 0.34$).

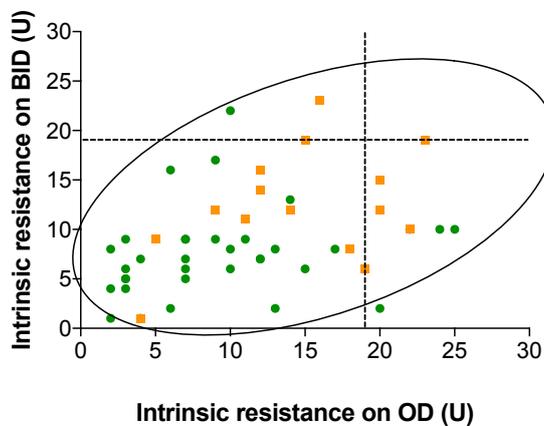


Figure 9. Relationship between intrinsic resistance (IR) after once daily (OD) aspirin intake and IR after twice daily (BID) aspirin intake among low-risk patients (P1, orange squares) and high-risk patients (P2, green circles). No clear trend was demonstrated and the majority of patients present an IR below the cut off of positivity, regardless of the aspirin regimen ($y_{P1}=0.77x$, $r^2= 0.12$, $y_{P2}=0.60x$, $r^2= 0.05$).

e) Effect of mutations on TOR

As shown in **Figures 10 and 11**, no statistically significant differences of TOR between mutational statuses (JAK2V617F, *CALR*, *MPL*, triple-negative) were observed between once and twice daily aspirin intakes, before and after cytoreduction, whatever the aspirin regimen was.

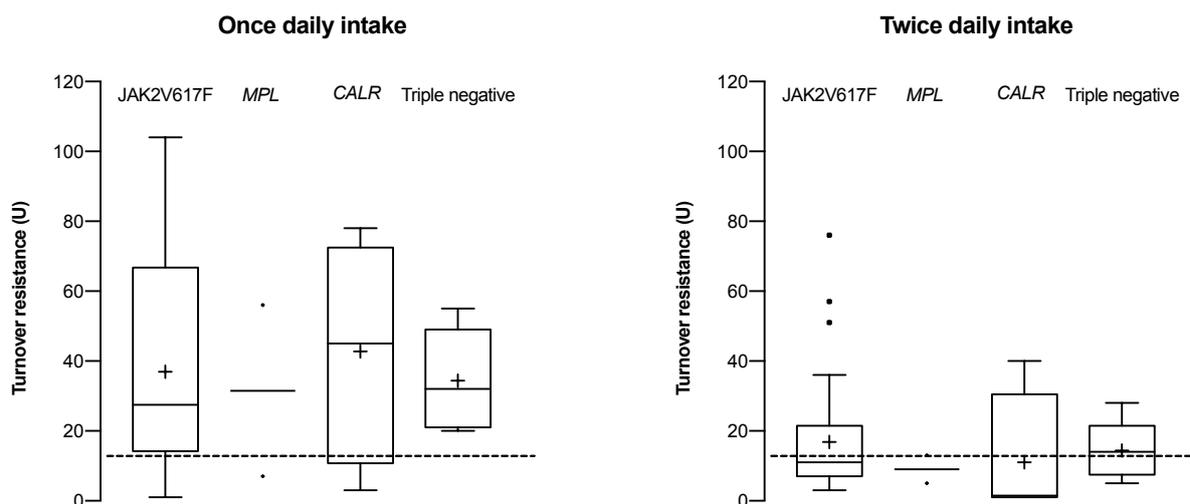


Figure 10. Effects of mutational status of myeloproliferative neoplasms on turnover resistance (TOR) depending on the aspirin regimen: once daily aspirin (A) twice a day aspirin (B). Boxplots show median and interquartile ranges (25th and 75th percentile) of TOR in JAK2V167F, *CALR* mutated patients and triple negative patients.

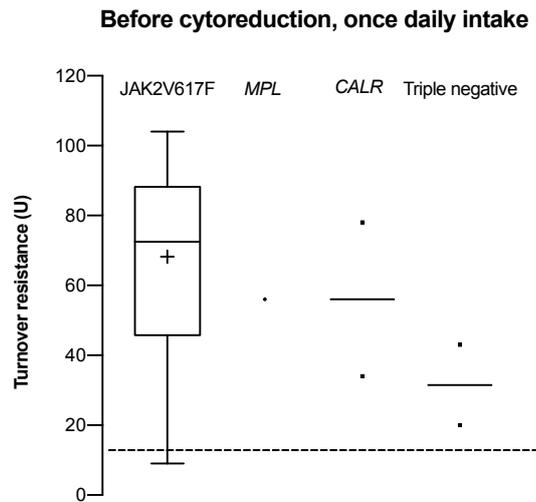


Figure 11. Effects of mutational status of myeloproliferative neoplasms (MPN) on turnover resistance (TOR) before cytoreduction on once daily aspirin. Boxplots show median and interquartile ranges (25th and 75th percentile) of TOR in *JAK2*, *CALR* mutated patients and triple negative patients.

5. Discussion and perspectives

The main goals of the study were (1) to determine if a twice-daily aspirin intake could reduce or abolish aspirin resistances; and (2) to determine the effect of cytoreductive treatments on turnover and intrinsic resistances. This work was based on the hypothesis, that naive platelets, which have not been exposed to aspirin, could be responsible for biological global aspirin resistance assessed using whole blood aggregometry, in MPN patients.

It occurred that turnover resistance represented the major component of biological aspirin resistance among our patients. Indeed, TOR represents 70% of total aspirin resistance on daily aspirin regimen and 58% after twice daily aspirin (64% on average for all patients). In our MPN study population, a global aspirin resistance exclusively due to IR was found in 14% for OD intake. The majority of patients (55%) receiving OD had IR below the positivity cut-off value (19 U). Lower numerical values were measured for IR than TOR, and most of them were quite close to the cut-off value. Indeed, maximum value for IR never exceeded 25 U.

Correlation map showed a strong correlation of TOR with total platelet and naïve platelet counts (data not shown). Furthermore, a weaker but significant correlation was also retrieved between leukocytes and TOR. We assumed that the myeloproliferative character of MPN could have been a confounding factor.

Relationship between TOR and platelets depends on the aspirin regimen according to a sigmoid function. Abscissa of inflexion point for OD regimen is close to 350 G/L while it is close to 700 G/L for BID regimen. At the opposite, if we represent TOR as a function of naïve platelets, relationship between TOR and naïve platelets remains a sigmoid function but the dependence of aspirin regimen has disappeared : abscissas of inflexion points are quite the same for OD and BID curves, close to 35 G/L. TOR is only a function of naïve platelets regardless of aspirin regimen.

The determination of naïve platelets as a function of platelets is based on the following rationale : considering that life span of human blood platelets is approximately 10 days, 10% of the platelets' pool is being renewed every day with naïve platelets that have never encountered COX inhibitor. If we infer that platelet production is linear, a patient on OD aspirin will have 10% of naïve platelets just before the intake. Similarly, BID aspirin will theoretically halves naïve platelets, i.e. a patient will have 5% of naïve platelets. Thus, naïve platelets represent Platelets/10 for OD regimen and Platelets/20 for BID regimen.

Thus, TOR is a function of naïve platelets, regardless of aspirin regimen. By lowering naïve platelets, we reduce TOR with a BID aspirin. Relationship between TOR BID and TOR OD (**Figure 8**) shows that this reduction is close to 61% ($TOR_{BID} = 0.39 \times TOR_{OD}$), regardless of patient's thrombotic risk (P1 or P2). This observation tends to reinforce our basis hypothesis, namely the implication of naïve platelets in TOR and that increasing the frequency of administration of aspirin could effectively reduce it.

IR was poorly correlated to platelets or naïve platelets. Furthermore, IR was not affected by the daily increase of aspirin dosing. For the majority of our patients, IR values are below the positivity cut-off. Based on our observations, IR implication in aspirin resistance seems to be minor.

Therefore, total aspirin resistance among our patients is mostly a function of TOR, and thus, naïve platelets, regardless of aspirin regimen.

Lowering the number of circulating platelets, and thus of naïve platelets, cytoreduction has permitted to reduce TOR, whatever the aspirin regimen. Lowest

values of TOR were measured among cytoreduced patients receiving BID aspirin. Boxplots (**Figure 4**) also showed similar profile between P12 and P21 patients : a twice-daily aspirin intake in non-cytoreduced patients seems to have the same effect on TOR than a once daily aspirin intake in cytoreduced patients : the number of naive platelets, around 30 G/L, is quite similar in P12 population and in P21 population (**Table 2**). With BID aspirin, the decrease of TOR was quite similar among cytoreduced and non-cytoreduced patients (respectively 60 and 64%).

IR was also affected, in a lesser extent, by cytoreduction or BID aspirin. This observation must be qualified by the fact that 83% of the patients receiving OD aspirin were below the cut-off of 19 U, and highest value observed was 25 U. Furthermore, before cytoreduction, no differences were observed before and after twice daily intake.

Considering recent reports suggesting a higher risk of thrombosis in JAK2V167F mutated patients, we screened our population to enlighten a possible link with TOR. PV patients included in our study (n=20) were all positive for JAK2V617F mutation. For ET patients (n=31), we wondered if the type of mutation (*JAK2*, *CALR*, *MPL* or triple negative) could influence TOR, with one or two daily aspirin intake, as JAK2V617F positive patients have been described to be at higher risk of thrombosis. No statistical differences were retrieved, possibly due to limited sample size.

Modulating aspirin dosage in MPN has only been studied in very few publications. In 2012, Dillinger and al. first demonstrated that aspirin BID was more effective in ET patients than aspirin OD using LTA (14). Another work studied different galenic formulations (enteric-coated, plain), dosages (100 mg, 200 mg) and frequency (once or twice a day) of administration of aspirin using various techniques (LTA, Verify Now Aspirin® and TXB2 assay). They showed that a twice-daily dosing of enteric-coated 100 mg aspirin suppressed aspirin-insensitive platelet TXA2 biosynthesis by 90%, whereas 200 mg OD only reduced partially of 39% TXB2 levels (12). Thus, the frequency of administration matters more than the dosage. Those reports suggest that aspirin resistance measured by LTA and/or TXB2, can be overcome by increasing the frequency of administration of aspirin.

In our study, we demonstrated that TOR was mainly responsible for global aspirin resistance. We also showed that TOR was a function of naive platelets, and

confirmed that increasing frequency of administration of aspirin, or reducing the time between aspirin intakes, reduces naive platelets and thus, reduces TOR. The reduction of TOR with cytoreduction is also due to reduction of naive platelets by cytoreduction. To our knowledge, the lowering effect on aspirin resistance of cytoreduction in MPN patients was never reported before.

For patients (n=5) who are still harboring a biological aspirin resistance after cytoreduction and BID, it might be interesting to try a three times daily aspirin intake (P23). Patients under 100 mg of enterocoated aspirin (Aspirin Protect®, Bayer, Germany) were excluded from our study, considering that the pharmacokinetics of the drug was too different from Aspirin 75 mg. Indeed, enterocoated formula ensures a 7-hour release of aspirin, thus reducing the maximum naive thrombocytosis, and probably reducing TOR in those patients. Surprisingly, recent studies seems to suggest quite the opposite in so far as enterocoated aspirin is being suspected of causing more resistance than plain aspirin (18). But this observation would have to be confirmed in a forward study.

The present work is a preliminary work, observing with MEA, only biological effects of aspirin resistance, not clinical resistance, and offering to a forward coming trial, a reliable, affordable and fast technical tool to access it. Recently, it was shown that in low-risk CALR-mutated ET, a low-dose of aspirin does not reduce thrombotic risk and may increase the risk of bleeding (19). Thus, before changing current medical practices, a prospective randomized controlled trial is required. It will provide us with information on short and long-term safety (particularly bleeding complications) and efficacy (thrombosis and/or re-thrombosis risk) of a twice-daily aspirin regimen. A larger population is also required to investigate the possible over-risk of the JAK2V167F mutation in the thrombosis physiology.

Our results are not only interesting for MPN patients but contribute to the understanding of the physiopathology of aspirin resistance. In other populations of patients, overcoming biological aspirin resistance could also be achieved by increasing the frequency of aspirin administration when TOR is the main component of aspirin resistance. This would require more investigations.

6. Conclusion

We observed in MPN a biological resistance to aspirin essentially related to “naive” thrombocytes that can be overcome in most of the cases by a twice-daily aspirin intake and/or by cytoreduction. Further research is required now to investigate clinical aspirin resistance (i.e. thrombotic events) and to correlate it with biological resistance. Despite limitations of the small sample size and the short period of exposition to BID aspirin, this study indicates that a change of regimen of aspirin is well tolerated in patients with PV or ET. A larger prospective multicentric randomized controlled trial should be considered before changing medical practices. Yet no existing platelet function tests can reliably predict patients in whom thrombotic events will possibly occur, MEA could be a promising research tool to investigate thrombosis and re-thrombosis risk, in future prospective randomized trials.

7. Acknowledgments

The authors had no conflict of interests. This study received technical support from Brest university hospital (France).

8. Bibliography

1. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patients With Polycythemia Vera. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2224–32.
2. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *ASH Educ Program Book*. 2012 Dec 8;2012(1):571–81.
3. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2005 Feb 1;128(3):275–90.
4. Fenaux P, Simon M, Caulier MT, Lai JL, Goudemand J, Bauters F. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer*. 1990 Aug 1;66(3):549–56.
5. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008 Mar 1;93(3):372–80.
6. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-Resistant Thromboxane Biosynthesis and the Risk of Myocardial Infarction, Stroke, or Cardiovascular Death in Patients at High Risk for Cardiovascular Events. *Circulation*. 2002 Apr 9;105(14):1650–5.
7. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2015 Feb 1;90(2):162–73.
8. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):114–24.
9. Mega JL, Simon T. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *The Lancet*. 2015 Jul 24;386(9990):281–91.
10. Le Quellec S, Bordet J-C, Negrier C, Dargaud Y. Comparison of current platelet functional tests for the assessment of aspirin and clopidogrel response: A review of the literature. *Thromb Haemost*. 2016 Jul 21;116(4).
11. Gillet B, Ianotto J-C, Mingant F, Didier R, Gilard M, Ugo V, et al. Multiple Electrode Aggregometry is an adequate method for aspirin response testing in myeloproliferative neoplasms and differentiates the mechanisms of aspirin resistance. *Thromb Res*. 2016 Jun;142:26–32.
12. Pascale S, Petrucci G, Dragani A, Habib A, Zaccardi F, Pagliaccia F, et al. Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3595–603.

13. Tefferi A. Overcoming “aspirin resistance” in MPN. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3377–8.
14. Dillinger J-G, Sollier CB dit, Sideris G, Ronez E, Henry P, Drouet L. Twice daily aspirin to improve biological aspirin efficacy in patients with essential thrombocythemia. *Thromb Res*. 2012 Jan 1;129(1):91–4.
15. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: Effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther*. 2003 Jan 1;73(1):122–30.
16. Swerdlow SHCE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J et al. WHO Classification Of Tumours Of Haematopoietic And Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 Jan 1;blood – 2016–03 – 643544.
18. Kapoor JR. Enteric Coating Is a Possible Cause of Aspirin Resistance. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Oct 7;52(15):1276–7.
19. Alvarez-Larran A, Pereira A, Guglielmelli P, Hernandez-Boluda JC, Arellano-Rodrigo E, Ferrer-Marin F, et al. Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with a CALR mutation. *Haematologica*. 2016 Aug 1;101(8):926–31.

9. Supplemental Data

- Information brochure about RAS trial

NOTICE D'INFORMATION Recherche non interventionnelle Etude de la Résistance à l'Aspirine dans les Syndromes myéloprolifératifs - RAS Responsable de la recherche : Dr Hubert Galinat, Laboratoire d'hématologie, CHRU de Brest Investigateur Principal : Pr Eric Lippert, Laboratoire d'hématologie, CHRU de Brest
Ce document est remis au patient Un exemplaire est conservé dans le dossier médical

Madame, Monsieur,

Vous êtes actuellement vu(e) en consultation pour un bilan ou un suivi d'un excès de globules rouges et/ou de plaquettes pour lequel un diagnostic de syndrome myéloprolifératif va être ou est posé; il sera éventuellement traité par la prise d'aspirine une fois par jour sous forme de Kardegic® 75mg, il pourra y être associé un traitement cytoréducteur (Hydrea®, Vercyte®, Interferon...). Des études récentes révèlent qu'il existerait, chez certains patients, une réponse insuffisante à l'aspirine favorisant les thromboses ou caillots sanguins. Des tests sanguins sont maintenant disponibles au CHRU de Brest pour apprécier cette réponse à l'aspirine.

Nous vous proposons, aujourd'hui, de participer à une étude dont l'objectif est d'évaluer l'impact de la cytoréduction sur la réponse plaquettaire à l'aspirine. Cette étude est réalisée au moyen de différents tests biologiques, dans le but d'optimiser la prise en charge de ce type de pathologie.

Pour cette étude, nous avons besoin de prélever quelques tubes de sang supplémentaires par rapport à la prise de sang habituelle. Ces prélèvements seront réalisés lors de votre consultation initiale, puis, si vous n'êtes pas encore sous aspirine, après 15 jours de prise de Kardegic® 75mg et enfin, dans tous les cas, quand vous serez revu(e) en consultation, après normalisation de votre bilan sanguin dans quelques mois. Les résultats de ces différents tests permettront de connaître votre profil de réponse à l'aspirine, de dépister une éventuelle réponse insuffisante et de savoir si elle perdure après cytoréduction.

Vos données médicales personnelles feront l'objet d'un traitement informatique qui permettra l'analyse des résultats dans le respect de la confidentialité et du secret médical.

Un registre de données vous concernant va donc être constitué. Votre identité sera dissimulée sous forme d'un numéro d'étude unique. Les personnes qui analyseront les données n'auront accès qu'aux données codées. Votre nom n'apparaîtra dans aucun rapport ni aucune publication liée à cette étude.

Conformément à la loi, vous disposez d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées et d'être traitées dans le cadre de cette recherche.

Un traitement informatique de vos données personnelles sera réalisé sauf opposition écrite de votre part.

Vous pouvez exercer vos droits d'accès, de rectification et d'opposition auprès du Docteur Jean-Christophe Iannotto CHRU de Brest-Site Morvan - Institut de Cancérologie et d'Hématologie - 29609 BREST cedex 9 ou au 02-98-22-34-21.

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Si vous acceptez, vous êtes libre de changer d'avis à tout moment sans avoir à vous justifier et votre décision ne portera aucun préjudice à la qualité de votre prise en charge.

Cette étude a reçu une autorisation de la Commission Nationale Informatique et Libertés.

Cadre réservé au service	
Date information patient :	
Nom du patient :	Prénom du patient :
Opposition exprimée :	oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Signature du responsable de la consultation/service :	

-Aspirin intake schedules for patients and nurses

FICHE pour l'étude RAS (à joindre obligatoirement au bon de demande)

A remplir par l'**IDE** au moment du prélèvement :

L'étude RAS s'intéresse à la résistance à l'aspirine dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP). Pour cette étude, il est important de s'assurer que le patient a bien suivi le plan de prise classique (1 prise d'aspirine par jour le matin) ponctuel demandé par le Dr Ianotto (**2 prises par jour pendant 3 jours**). Ces informations permettront de garantir la fiabilité des résultats de l'étude.

Statut : Non cytoréduit **P11** / **P12** Cytoréduit **P21** / **P22**

Dosage aspirine : 75/100/160mg

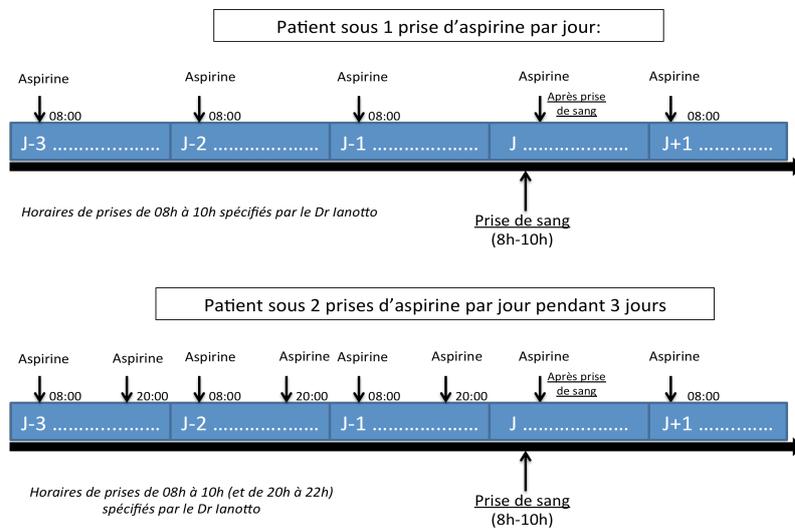
Jour de la dernière prise : / /

Heure de la dernière prise :

Merci de s'assurer que la dernière prise d'aspirine a bien eu lieu :

- La veille au soir (si 2 prises/jour) (P12 ou P22) entre 20h et 22h (selon horaire spécifié par le Dr Ianotto)
- La veille, le matin (si 1 prise/jour) (P11 ou P21) vers 08h

Le patient peut prendre son aspirine **immédiatement** après le prélèvement du matin



En cas de doute ou pour toute question, contacter le laboratoire d'hématologie (47033)

FICHE INFORMATION PATIENT POUR L'ETUDE RAS

L'étude RAS s'intéresse à la résistance à l'aspirine dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP). Pour cette étude, il est important de bien respecter le plan de prise classique (1 prise d'aspirine par jour le matin) ou ponctuel (2 prises par jour) demandé par le Dr Ianotto. Ces informations permettront de garantir la fiabilité des résultats de l'étude.

A remplir par le médecin

Plan de prise de l'aspirine :

Classique : 1 fois par jour le matin (08:00)

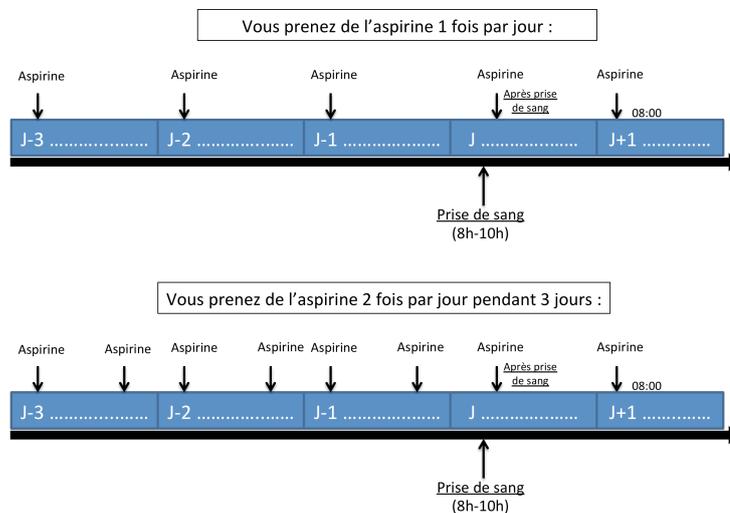
Protocole : Pendant 3 jours, prendre l'aspirine 2 fois par jour, matin et soir aux horaires spécifiés par le médecin puis reprendre 1 prise par jour, après le prélèvement.

Ne prenez pas votre aspirine le matin de la consultation :

-L'infirmière vous demandera le jour et l'heure de votre dernière prise. Il devra s'agir de :

- La veille, le matin (vers 08h00) si vous prenez 1 prise par jour
- La veille au soir (vers 21h00) si vous prenez 2 prises par jour

Vous pourrez prendre votre aspirine **immédiatement** après le prélèvement du matin





CHRU BREST
CENTRE HOSPITALIER
REGIONAL UNIVERSITAIRE

LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE-CB

Etiquette Patient

Etiquette UF

Signature prescripteur

Nom : _____

Prénom(s) : _____

Date de naissance : _____ Sexe : _____

Prescripteur : _____ Préleveur : _____

POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE



Date de prélèvement : / /

Heure : :

CYTOLOGIE

1 tube EDTA 4,5 ml (violet)

Hémogramme (NFS/Plaquettes)

Plaquettes

Plaquettes réticulées (IPF)

Réticulocytes

Fractions réticulocytaires

Schizocytes

Morphologie érythrocytaire

Sezary

Recherche particulière sur frottis
.....

1 tube citraté (bleu)

Contrôle Plaquettes sur citrate

1 tube à VS

VS

Electrophorèse de l'hémoglobine
(Cf. Feuille de Biochimie)

Cellules souches périphériques

Renseignements cliniques obligatoires, si urgence ou cas particulier

Etude RAS	
P11	P12
P21	P22

Aspirine (dose) = mg

Dernière prise :

Date : / /

Heure :

Bilan pré-opératoire

Cadre réservé au laboratoire

UV UO

NC

A B C

HEMOSTASE

1 tube citraté (bleu)

Temps de Quick (TP)

INR

Temps de Céphaline activé (TCA)

Fibrinogène

Temps de Céphaline Kaolin (TCK)
(A réserver à l'exploration d'un TCA allongé)

Facteur II

Facteur V

Facteur X

Facteur VII

D Dimères Vidas (Exclusion EP)

D Dimères (CIVD)

Monomères de fibrine

1 tube citraté (bleu)

Exploration de la fibrinolyse

ROTEM

2 tubes citratés (bleu)

Facteur VIII

Facteur IX

Facteur XI

Facteur XII

Willebrand Antigène (vWF:Ag)

Willebrand activité (vWF:Ac)

Groupe sanguin :

Anti-VIII

Anti-IX

1 tube citraté (bleu)

ACC - Bilan allongement TCA (Rösner)

1 tube citraté (bleu)

Temps d'occlusion plaquettaire (PFA)

1 tube citraté (bleu)

Liaison VIII-Willebrand (LVV)

Autre(s) analyse(s), précisez

1 tube citraté (Plasmathèque TXB2)
3 tubes ACD 7 ml (Biomol plaquettes)

Traitement anticoagulant

A remplir obligatoirement

Pas de traitement anticoagulant

HNF (standard, Calciparine)

HBPM (Lovenox, Innohep, Fraxi,)

Orgaran

Arixtra

Anti-Vitamine K (AVK)

Rivaroxaban (Xarelto)

Apixaban (Eliquis)

Dabigatran (Pradaxa)

Antiagrégants plaquettaires

Autre :

1 tube citraté (bleu)

Héparinémie HNF/HBPM (activité anti Xa)

Orgaran (dosage activité anti Xa)

Arixtra (dosage activité anti Xa)

Rivaroxaban (dosage)

Apixaban (dosage)

Dabigatran (dosage)

1 tube citraté (bleu)

Thrombopénie induite par l'héparine (TIH - Dépistage)

Score des 4 T obligatoire 📄

3 tubes citratés (bleu)

Confirmation TIH (Agrégration + ELISA)

6 tubes citratés (bleu) 📄

Fonctions plaquettaires

Agrégation à la ristocétine 📄

Bilan de Thrombose

2 à 3 tubes citratés (bleu)

ACC de type lupique 1 tube

Antithrombine (AT) 1 tube

Protéine C activité

Protéine S activité

1 tube citraté (bleu)

Agrégation sur sang total (MULTIPLATE)

1 tube citraté (bleu)

VASP

6920045 - MAJ : Mars 2015 - FAB : Septembre 2015

Dernière page de la thèse

Vu, le Président du jury,

Signature ⇨

Pr Jean-Marie BARD

Vu, le Directeur de thèse,

Signature ⇨

Dr Hubert Galinat

Vu, le Directeur de l'UFR,

Dos de la thèse

UNIVERSITÉ DE NANTES

Année de la soutenance

2016

Nom - Prénoms : PERRIER-CORNET ANDREAS

Titre de la thèse : Résistance à l'aspirine dans les syndromes myéloprolifératifs

Résumé de la thèse :

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des hémopathies myéloïdes clonales présentant un fort potentiel thrombogène. En prévention, les patients à bas-risque reçoivent classiquement de l'aspirine à faible dose, et les patients à haut-risque, un traitement cytoréducteur en plus de l'aspirine. La résistance à l'aspirine peut être responsable de l'apparition d'évènement(s) thrombotique(s) ou de leur réapparition. Par agrégométrie en sang total sur Multiplate® (Roche Diagnostics, Meylan, France), la résistance à l'aspirine a été évaluée chez 51 patients présentant une polyglobulie de Vaquez (PV) ou une thrombocytémie essentielle (TE), ayant reçu un ou deux prises d'aspirine à faible dose. Cette étude a permis de montrer que : (1) la résistance biologique à l'aspirine était essentiellement constituée par la résistance liée au renouvellement plaquettaire accru dans les SMP (résistance de turnover, RTO) ; (2) une double prise quotidienne d'aspirine a permis de réduire la RTO de 61% en réduisant le pool de plaquettes non exposées à l'aspirine; (3) la cytoréduction a permis également de réduire la RTO.

MOTS CLÉS

SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS (SMP), ASPIRINE, RESISTANCE DE TURNOVER, THROMBOSE, AGREGOMETRIE EN SANG TOTAL, MULTIPLATE

JURY

**PRÉSIDENT : Pr. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**ASSESEURS : Pr. Eric LIPPERT, Professeur d'Hématologie
Laboratoire d'Hématologie, 29200 BREST
Dr. Jean-Christophe IANOTTO, Praticien Hospitalier
Service d'Hématologie, 2 Avenue Foch, 29200 BREST
Dr. Hubert GALINAT, Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie, 29200 BREST**
