

39ème Colloque National  
des Biologistes des Hôpitaux  
Lille, 4 au 8 Octobre 2010

**BioCytex**

Maxime Moulard  
Directeur Scientifique



# BioCytex

## ➤ Filiale du Groupe Stago

- ❖ Fondée au début des années 90 (Marseille)
- ❖ Spécialisée en immunologie et cytométrie de flux
- ❖ Certifiée ISO 9001 & 13485

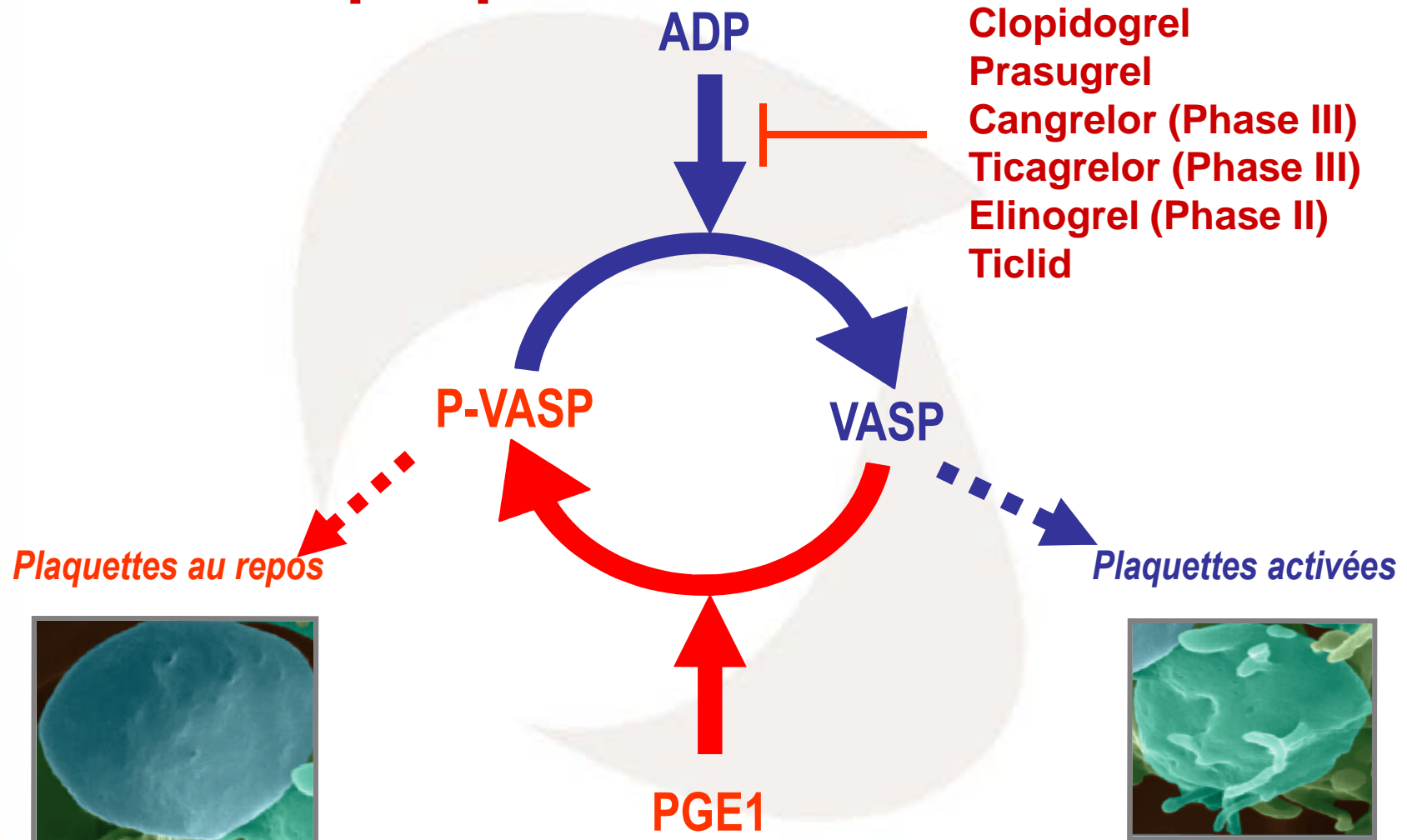


# VASP: Vasodilator Stimulated Phosphoprotein

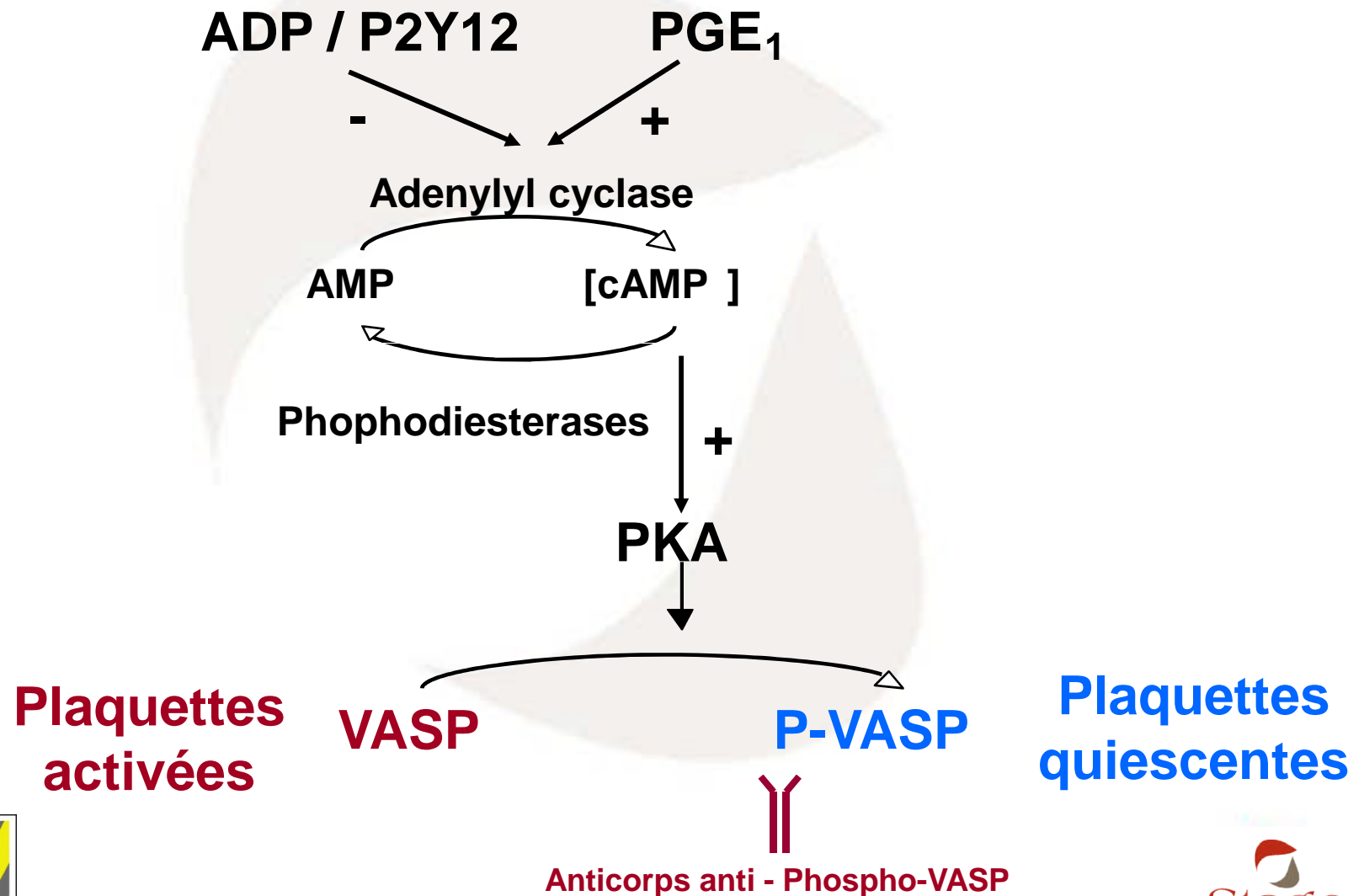
- Biomarqueur intracellulaire permettant d'enregistrer la réponse plaquettaire aux drogues ciblant le récepteur de l'ADP (P2Y12)



# Monitoring de la phosphorylation de VASP dans les plaquettes



# Cascade d'activation plaquettaire médiée par l'ADP



# Protocole général du kit "PLT VASP/P2Y12"

1. Sang total + PGE1 ou PGE1+ADP
2. Fixation
3. Perméabilisation & anticorps monoclonal anti-phospho-VASP (P-Ser<sup>239</sup>)
4. Révélation (FITC) + contremarquage des plaquettes (CD61-PE)
5. Lecture en cytométrie de flux (sans compensation de fluorescence)



# Kit "PLT VASP/P2Y12"

## ➤ Platelet Reactivity Index (PRI)

$$\diamond \frac{(\text{MFI PGE1} - \text{MFI PGE1+ADP}) \times 100}{\text{MFI PGE1}}$$

## ➤ Zone de travail et interprétation du PRI

**Mauvais  
répondeurs  
au Clopidogrel**

85.8%



6.6 %

**Bons  
répondeurs  
au Clopidogrel**

Aleil *et al* (2005) *J Thromb Haemost* 3 : 85-92





# Kit "PLT VASP/P2Y12"

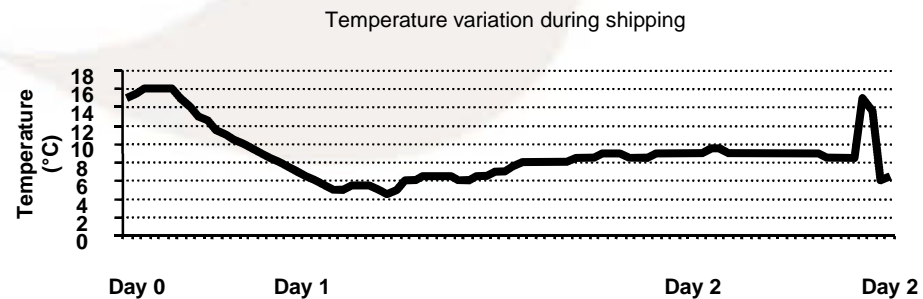
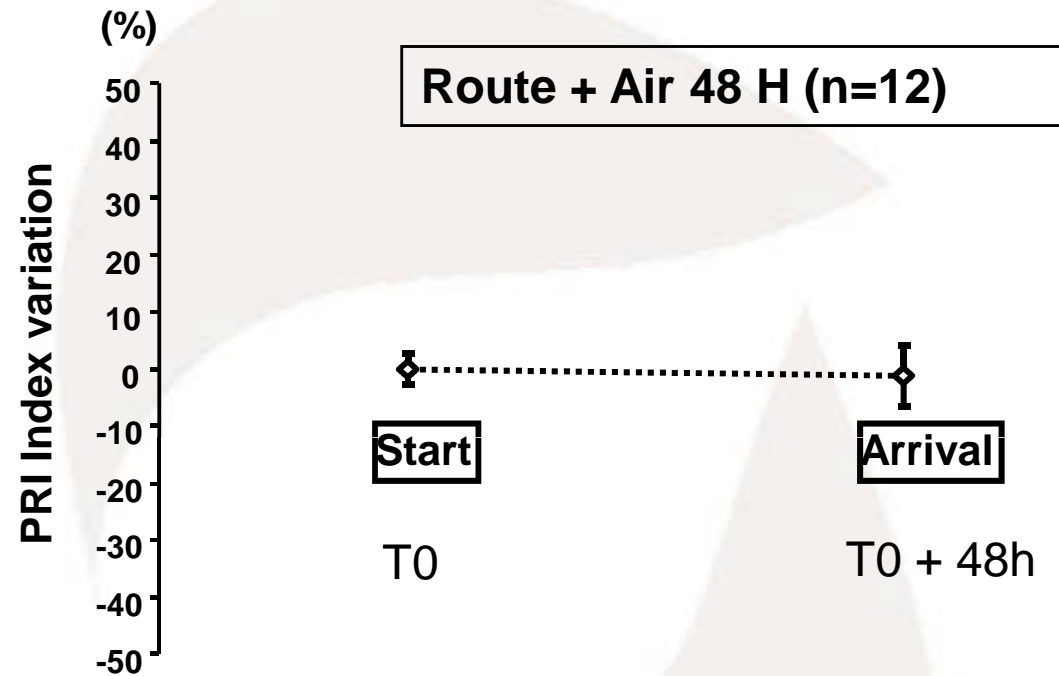
## *Principales caractéristiques*

- L'essai le plus spécifique
  - ❖ Pas d'interférence avec l'ASA, le Réopro ou l'Integrilin
  - ❖ Pas d'interférence avec le récepteur P2Y1
- Stabilité de l'échantillon de sang jusqu'à 48 heures
  - ❖ Analyse déportée dans un laboratoire central possible
- Mise en œuvre facile
  - ❖ Protocole rapide (30 min)
  - ❖ Faible volume de sang total citraté (30 µL)
  - ❖ Kit et réactif prêt à l'emploi
- Convient à différents types d'activités
  - ❖ Tests unitaires ou grandes séries
- Test de référence
  - ❖ Marqué CE
  - ❖ Largement publié





# Stabilité pré-analytique du sang total



# VARIABILITE DE LA REPONSE AUX ANTI-PLAQUETTAIRES DE TYPE ANTAGONISTES DU P2Y12

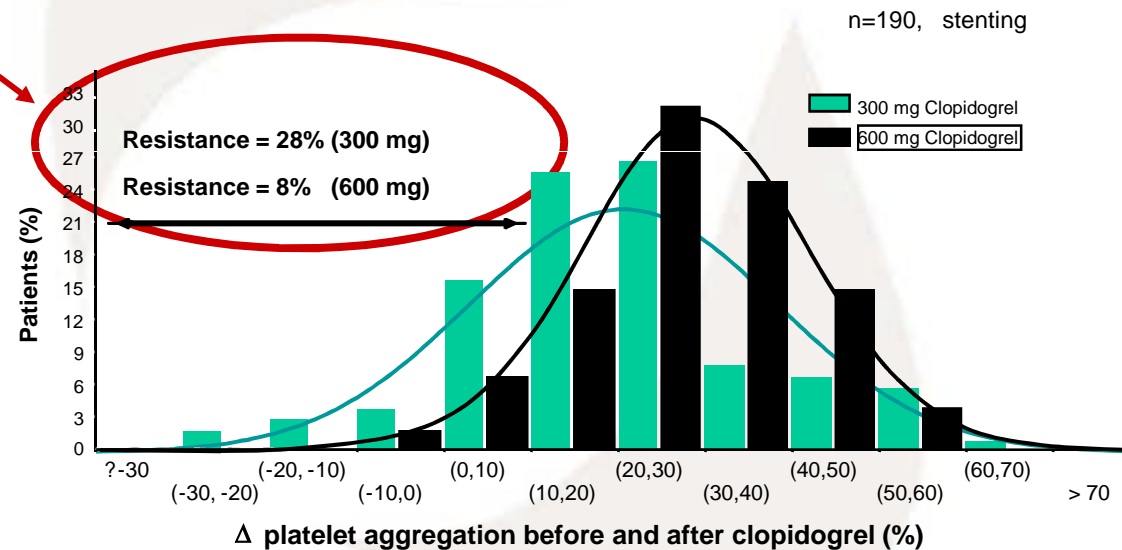


# Variabilité de la réponse au clopidogrel

## Test d'agrégation plaquettaire sur PRP

Effet de la dose de charge

MAIS :

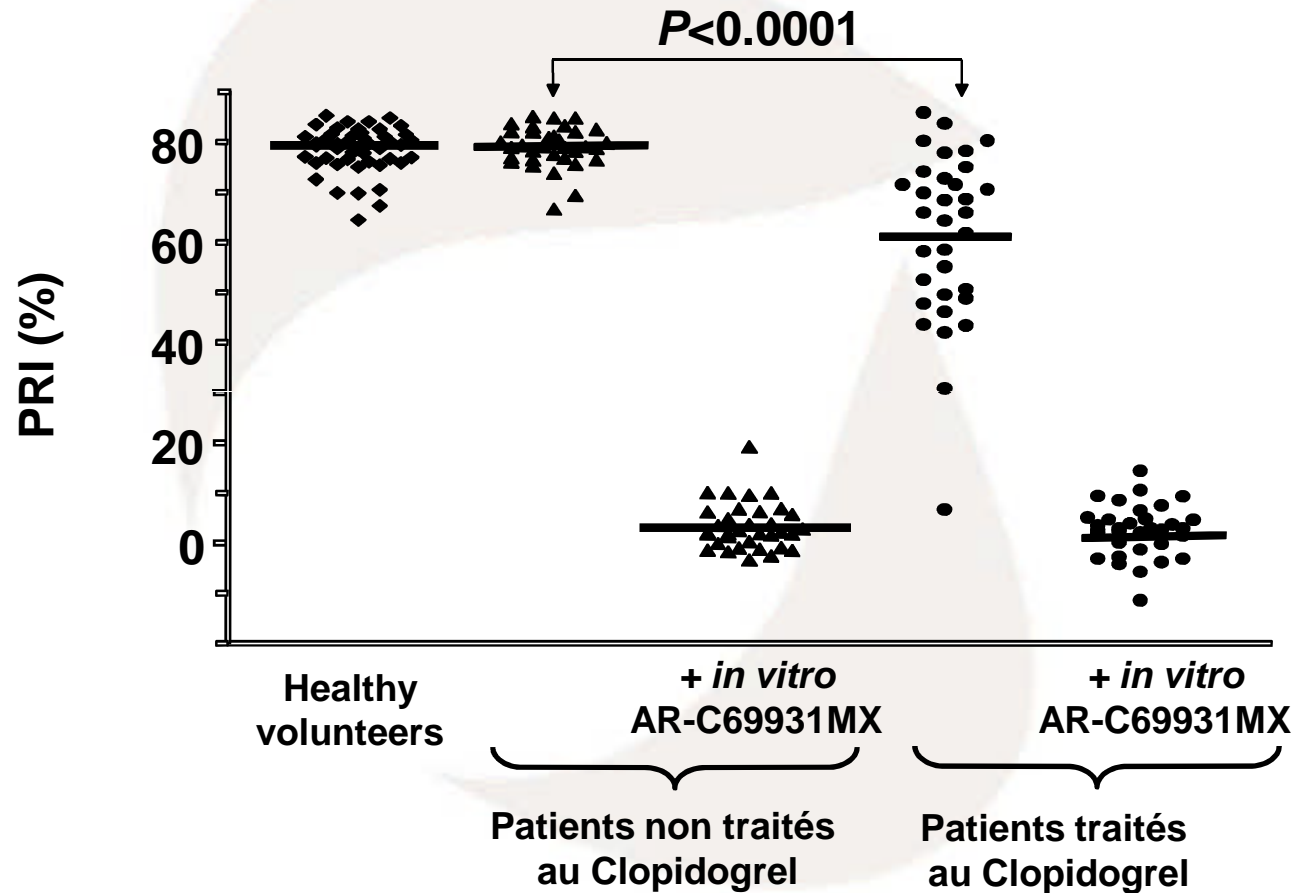


N = 190 undergoing elective coronary stenting  
Absolute change in ADP- induced platelet aggregation



# Variabilité de la réponse au clopidogrel

## Phosphorylation de VASP



# Résistance au Clopidogrel : Etudes internationales

| Investigateurs  | n   | Patients | Clopidogrel Dose (mg Load) | Résistance |
|---|-----|----------|----------------------------|------------|
| 1. Jaremo et al<br>(J Invest Med. 2002;252:233)       | 18  | PCI      | 300                        | 28%        |
| 2. Gurbel et al<br>(Circulation 2003;107:2908)        | 92  | PCI      | 300                        | 31-35%     |
| 3. Muller et al.<br>(Thromb Haemost. 2003;89:783)     | 105 | PCI      | 600                        | 5-11%      |
| 4. Mobley et al<br>(Am J Cardiol. 2004;93:456)        | 50  | PCI      | 300                        | 30%        |
| 5. Lepantalo et al.<br>(Eur Heart J. 2004;25-476)     | 50  | PCI      | 300                        | 40%        |
| 6. Angiolillo et al.<br>(Thromb Res. 2005;115:101)    | 48  | PCI      | 300                        | 44%        |
| 7. Matetzky et al.<br>(Circulation 2004;109:3171)     | 60  | PCI      | 300                        | 25%        |
| 8. Dzieweierz<br>(Kardiol Pol. 2005 ;62:108)          | 31  | PCI      | 300                        | 23%        |
| 9. Gurbel et al.<br>(J Am Coll Cardiol. 2005;45:1392) | 192 | PCI      | 300/600                    | 8-32%      |
| 10. Lev Et al.<br>(J Am Coll Cardiol. 2006;47:27)     | 150 | PCI      | 300                        | 24%        |

**Total**

**616**

**5-44%**



# Mécanismes de la variabilité de réponse au Clopidogrel

## ➔ Fonction plaquettaires

- ❖ Turnover accéléré des plaquettes
- ❖ Sensibilité accrue des plaquettes à l'ADP et au collagène

## ➔ Biodisponibilité

- ❖ Interférence avec les autres drogues: Statins (?), PPI (Omeprazole), antagonistes du récepteur H2 (ranitidine)
- ❖ Non compliance
- ❖ Absorption limitée
- ❖ Sous dosage

## ➔ Polymorphismes génétiques

- ❖ Cytochrome P450 - CYP2C19 [\*2, \*3, \*4, et \*5]
- ❖ P2Y12

## ➔ Other factors

- ❖ BMI, Diabète, Hypercholestérolémie, Fumeur

# Tests fonctionnels de mesure de la Réponse au Clopidogrel

## P2Y12-spécifique

- VASP phosphorylation (cytométrie de flux)

## Tests de stimulation à l'ADP

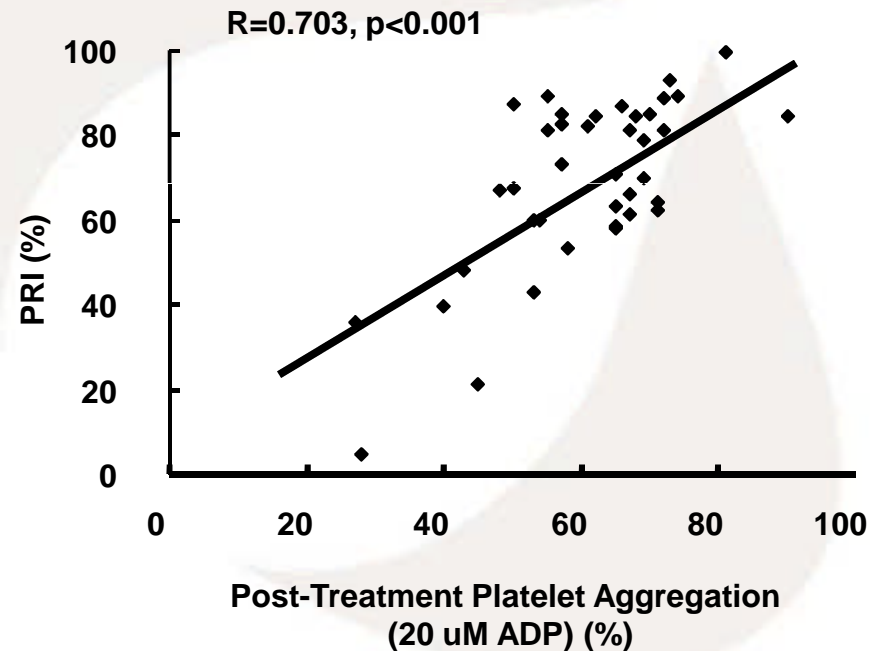
- Agrégométrie plaquettaire (turbidimétrie)
- Agrégométrie plaquettaire (impédance)
- VerifyNow P2Y12 Assay
- Plateletworks
- TEG Platelet Mapping System
- Le système d'Agrégation Impact
- Expression à la surface des plaquettes: GPIIb-IIIa activatée, P-selectin (cytométrie de flux)
- Agrégats Leucocyte-plaquettes (cytométrie de flux)





# VASP- Phosphorylation versus Agrégation plaquettaire induite par l'ADP

n=40  
Patients Loaded with 300 - 600 mg Clopidogrel



# Personalized Anti-Thrombotic Monitoring of Anti-Platelet Drugs

✦ "VASP is perhaps the most specific indicator of residual P2Y12 activity in patients treated with a P2Y12 inhibitor"  
Gurbel (2009) Curr Treat Opt Cardio Med 11:22-32

✦ "The most rational evaluation of ADP-induced platelet P2Y12 receptor activation and, as a consequence, a specific marker of the clopidogrel effect"  
Montalescot (2006) JACC 48:931-938



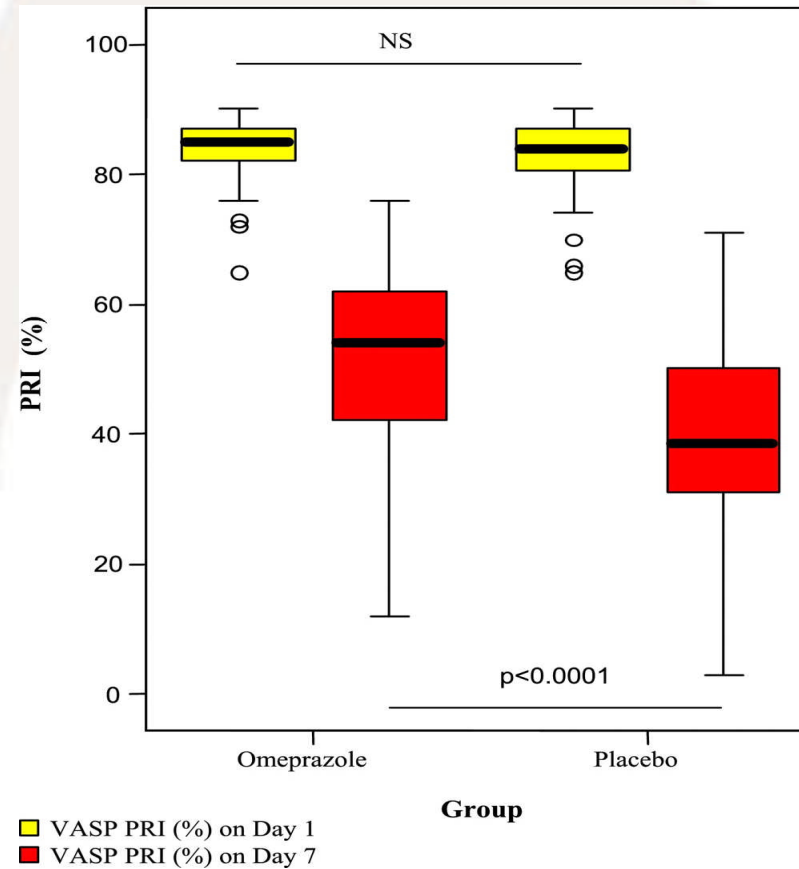
# Investigations Cliniques

## Exemple #1: Interférences au cours du métabolisme du Clopidogrel

### Cytochrome P450 et inhibiteurs des pompes à proton



# Influence de l'Omeprazole sur l'action antiplaquettaire du Clopidogrel en présence d'aspirine



Gilard, M. et al. J Am Coll Cardiol 2008;51:256-260

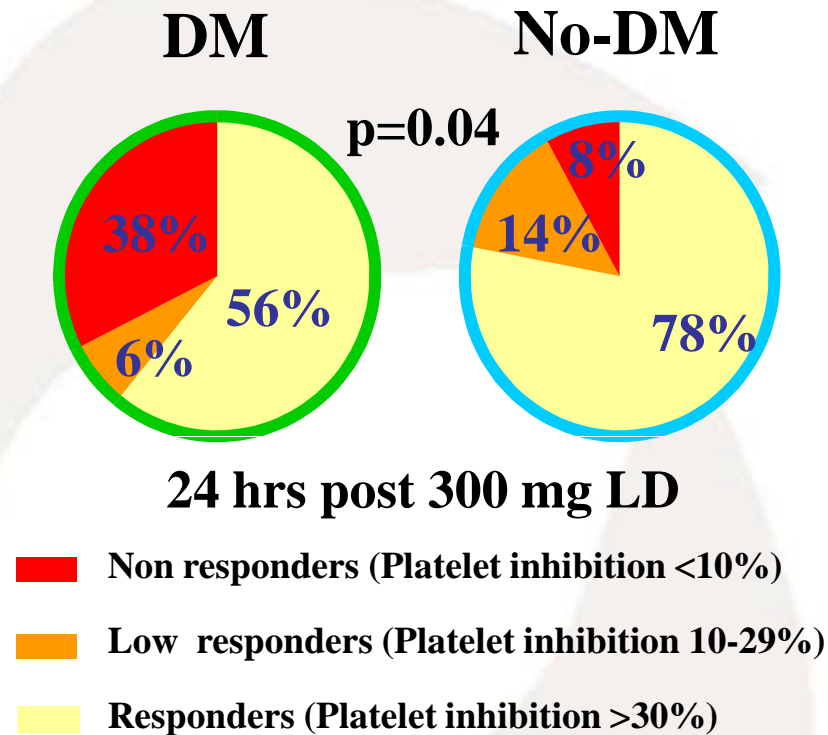


# Investigations Cliniques

## Exemple #2: Inhibition plaquettaire et diabète



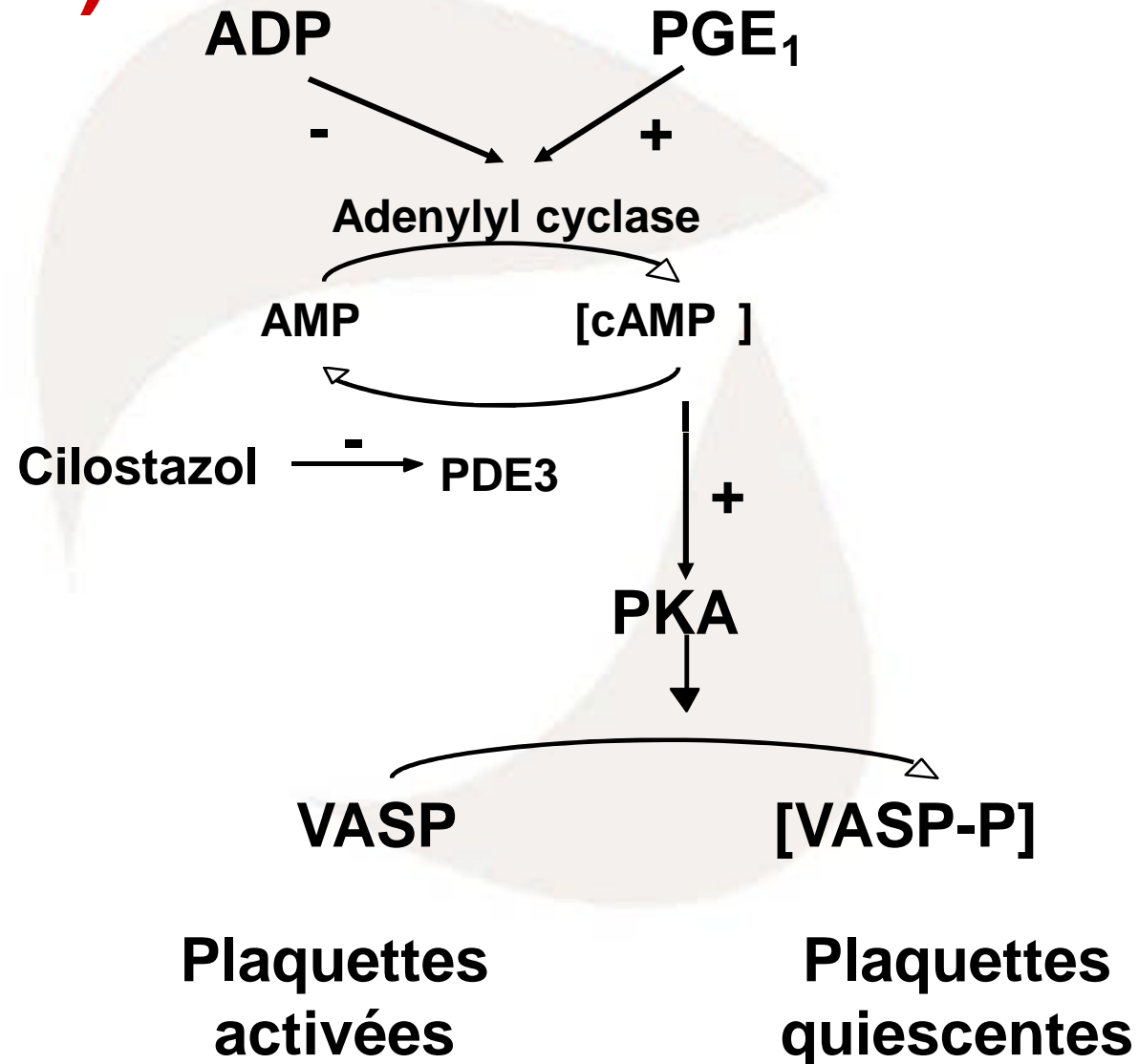
# Influence du diabetes mellitus sur les effets antiplaquettaires induits par le Clopidogrel



Angiolillo DJ et al. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 298-304

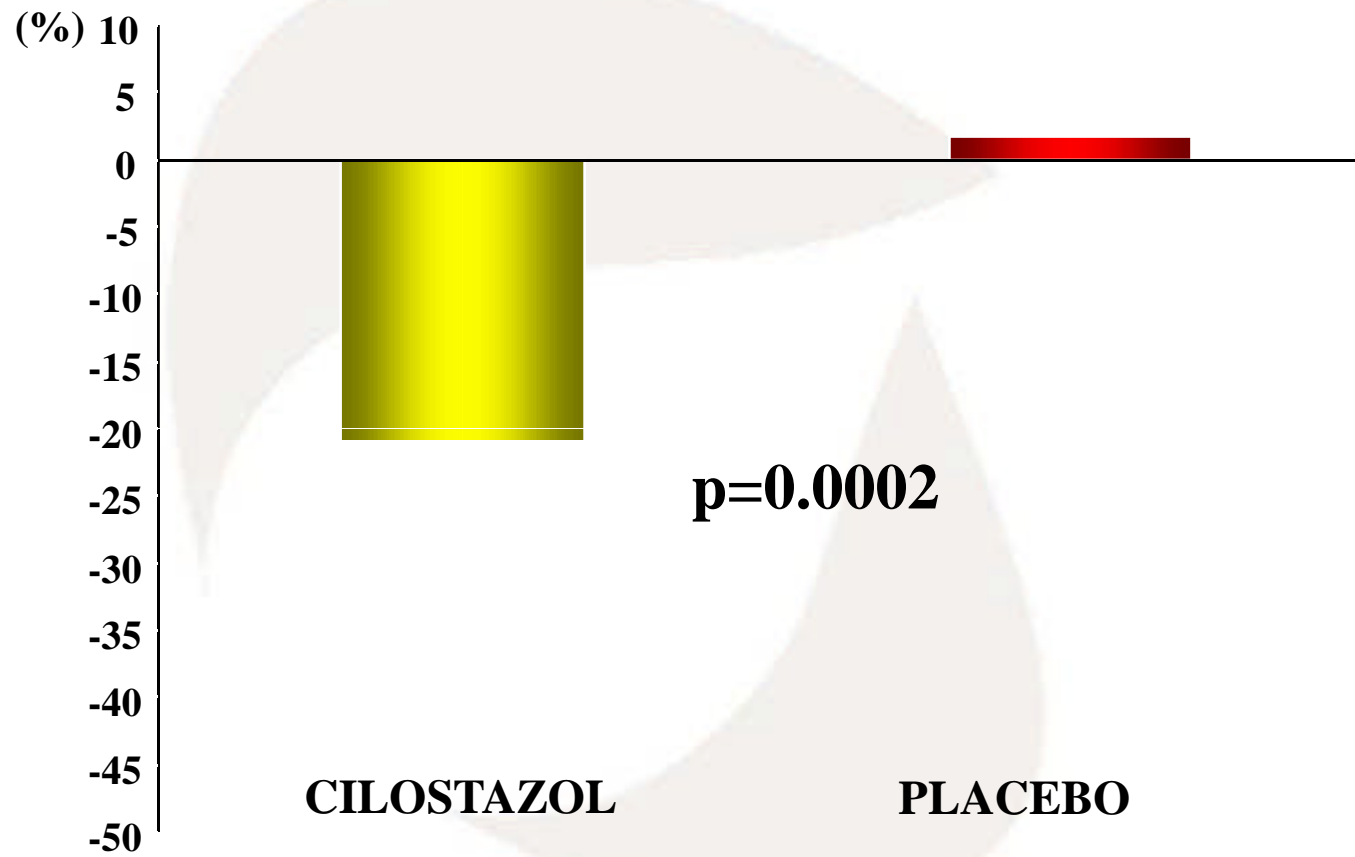


# Inhibiteurs de la Phosphodiesterase III (PDE3)





# Variation absolue du PRI



# Investigations Cliniques

## Exemple #3: Approche personnalisée Monitoring des drogues Anti- Plaquettaires



# Mesure de la fonction plaquettaire : Peut-elle guider le praticien dans le choix du traitement?

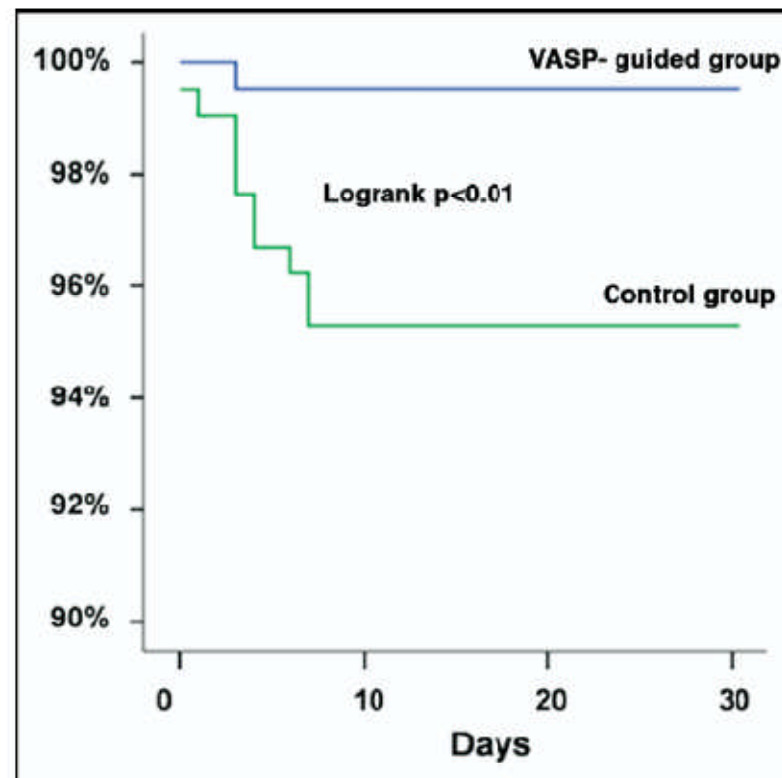
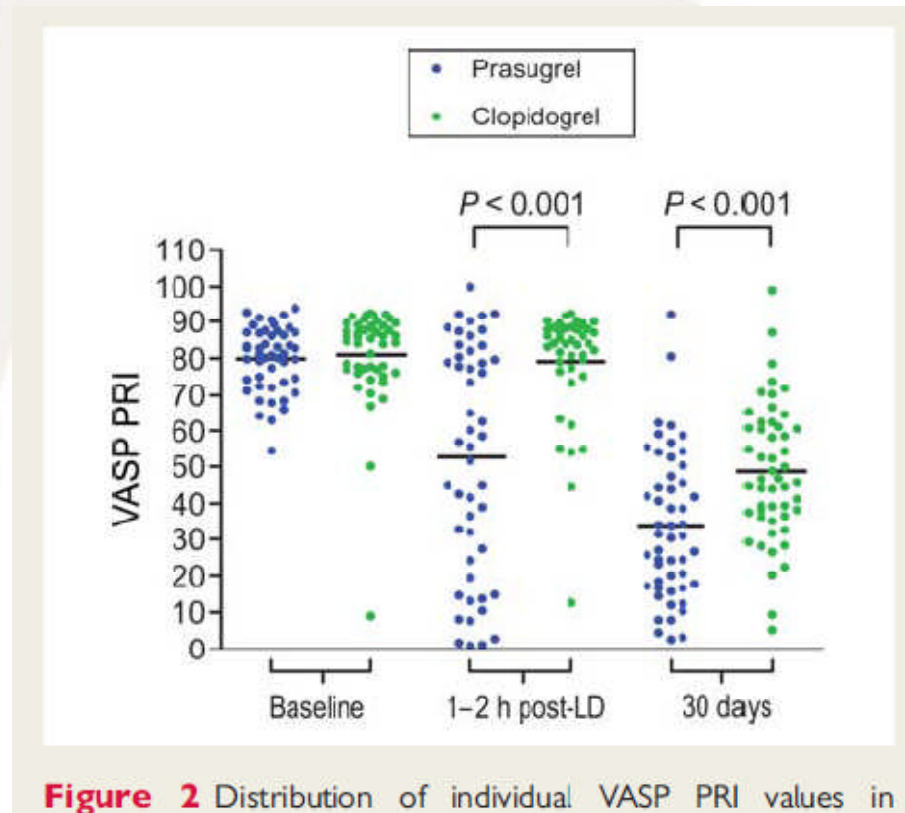


Figure 3. Kaplan-Meier curve of freedom of definite stent thrombosis survival according to groups.

Bonello et al (2009) Am. J. Cardiol.



# Etude pharmacodynamique de inhibition plaquettaire par le Prasugrel vs. Clopidogrel (TRITON-TIMI 38 trial)



Michelson et al (2009) European Heart Journal



# Conclusion

- Phospho-VASP: Un **nouveau test spécifique** du P2Y12
- Un test unique permettant de réaliser des investigations à un niveau moléculaire dans les plaquettes directement **dans le sang total**
- Un **test fonctionnel** unique compatible avec le stockage du sang total et son transport pendant **48 heures**
- Le niveau d'expression du biomarqueur phospho-VASP et **les conséquences cliniques** semblent corrélés
- VASP est désormais reconnu comme le test le plus spécifique pour suivre l'activité des drogues ciblant le récepteur P2Y12
- Statut IVD



# Bibliographie PLT VASP/P2Y12

## 2010

- |                               |                                  |                          |                                   |
|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <b>Gurbel et al</b>           | J Thromb Haemost; 8: 43-53       | <b>Bouman et al</b>      | J Thromb Haemost.8(3):482-8       |
| <b>Gurbel et al</b>           | Circulation, 121:1188-1199       | <b>van Werkum et al</b>  | Thromb Research in press          |
| <b>von Beckerath et al</b>    | Blood Coag Fibr, 21:1, 46-52     | <b>Gajos et al</b>       | J Am Coll Cardiol 55:1671-1678    |
| <b>Metzler et al</b>          | Eur J Anaesthesiol. 27(2):138-45 | <b>Chang et al</b>       | Thromb Res.,125(2):159-65         |
| <b>Cuisset et al</b>          | Arch Cardiovasc Dis, 103, 39-45  | <b>Flierl et al</b>      | Thromb Res.125(3):93-9            |
| <b>Bellemain-Appaix et al</b> | J Am Coll Cardiol, 55:815-22     | <b>Palmerini et al</b>   | Thromb Res, 125(4):309-14         |
| <b>Small et al</b>            | Clin Ther 2010;32:365-379        | <b>Bidet et al</b>       | Platelets, 21(2): 94-100          |
| <b>Small et al</b>            | Clin Ther. 32:365-379            | <b>El Ghannudi et al</b> | J Am Coll Cardiol Intv, 3:648-656 |
| <b>Cuisset et al</b>          | Thromb Haemost 103(4): 774-9     | <b>Silvain et al</b>     | Eur Heart J, in press             |
| <b>Schafer et al</b>          | Pharmacol Res, in press          | <b>Aradi et al</b>       | Platelets, in press               |
| <b>Bonello et al</b>          | JACC 56(12), 919-32              | <b>Angiolillo et al</b>  | J Am Coll Cardiol 56:1017-23.     |
| <b>Storey et al</b>           | JACC in press                    | <b>Armero et al</b>      | Platelets in press                |
| <b>Assingera et al</b>        | Platelets in press               | <b>Zighetti et al</b>    | J Thromb Haemost in press         |
| <b>Delavenne et al</b>        | J Thromb Haemost in press        | <b>Bonello et al</b>     | JACC 56(13), 1024-31              |
| <b>Bonello et al</b>          | JACC in press                    | <b>Fontana et al</b>     | J Thromb Haemost in press         |

## 2009

- |                            |                                       |                        |                                 |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| <b>Gurbel et al</b>        | Circulation, 120(25):2577-85          | <b>Aleil et al</b>     | J Thromb Haemost, 7(10):1747-9  |
| <b>Frere et al</b>         | J Thromb Haemost, 7(8):1409-11        | <b>Ormezzano et al</b> | J Thromb Thrombolysis, In Press |
| <b>Michelson et al</b>     | Eur Heart J 30: 1753-1763             | <b>Gremmel et al</b>   | Thromb Haemost 101(2):333-9     |
| <b>Varenhorst et al</b>    | Eur Heart J 157:562.e1-9              | <b>Lortie et al</b>    | Thromb Res.123(6):869-73        |
| <b>Siller-Matula et al</b> | Am Heart J 157:148.e1-5               | <b>James et al</b>     | Am Heart J 157:599-605          |
| <b>Siller-Matula et al</b> | Thromb Res, 6:874-880                 | <b>Alström et al</b>   | Thromb Res, 124(5):572-7        |
| <b>Siller-Matula et al</b> | Thromb Haemost, 102:397-403           | <b>Bonello et al</b>   | Am J Cardiol 103: 5-10          |
| <b>Osmancik et al</b>      | Cathet Cardiovasc Intervent, In Press | <b>Bonello et al</b>   | Thromb Res In Press             |
| <b>Gurbel &amp; Tantry</b> | Curr Treat Op Cardio Med 11:22-32     | <b>Bonello et al</b>   | Heart 95(15):1214-9             |
| <b>Motovska et al</b>      | Blood Coag Fibr 20:257-262            | <b>Bonello et al</b>   | Int J cardiol In Press          |
| <b>Motovska et al</b>      | Int J Cardiol, In Press               | <b>Hogberg et al</b>   | Thromb J, 7:2                   |
| <b>Motovska et al</b>      | J Cardiovasc Pharmacol 53:368-372     | <b>Morris et al</b>    | Int J Cardiol, In Press         |
| <b>Motovska et al</b>      | Thromb J, 19;7(1):6                   | <b>Cuisset et al</b>   | J Am Coll Cardiol;54:1149-53    |
| <b>Cuisset et al</b>       | Thromb Res 123:597-603                | <b>Cuisset et al</b>   | EuroIntervention 5:325-329      |



# Merci

**info@biocytex.fr**

**www.biocytex.fr**

**www.stago.fr**

