



Institut national
de la santé et de la recherche médicale



**ETUDE DE L'EFFET DU DEFIBROTIDE
SEUL ET EN ASSOCIATION AU r-tPA
SUR UN MODELE MURIN D'ISCHEMIE CEREBRALE**

Stage Master 2
Neurosciences

Sophie Guettier

Sous la direction de :

Pr Vivien
Dr Gauberti
Dr Martinez de Lizarrondo
Dr Rubio-Gomez

I. INTRODUCTION :

AVC=PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE MAJEUR

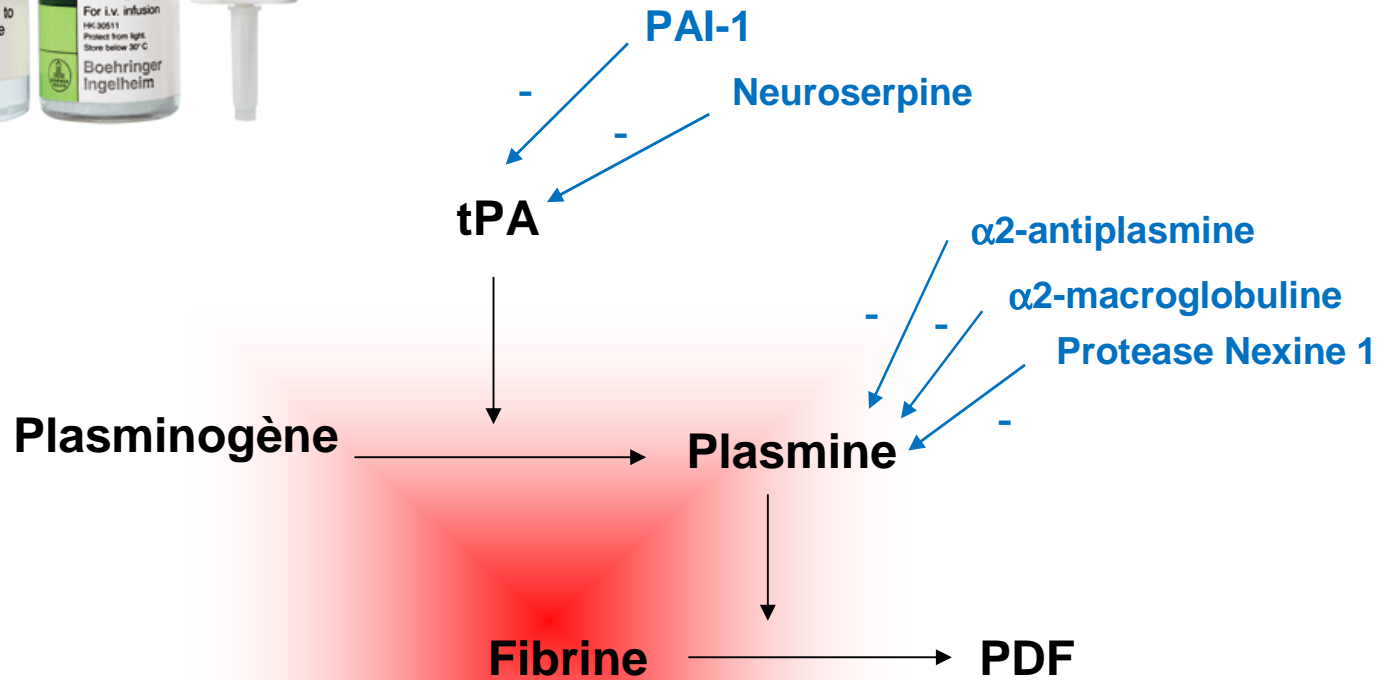
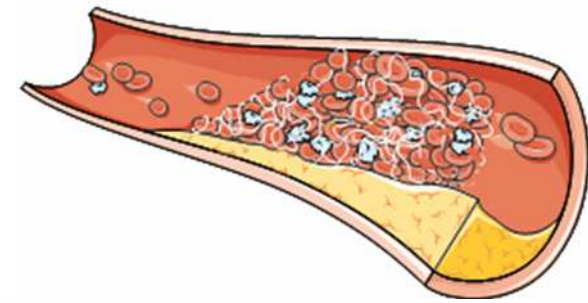


- **130 000** nouveaux patients/an
- **25% < 65 ans**
- 1ère cause de handicap moteur acquis
- 2ème cause de démence
- 3ème cause de décès
- Mortalité à 1 an=**40%**
- **8.3 milliards €**/an

D'après le Ministère de la santé. Rapport sur la prévention et la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux en France.

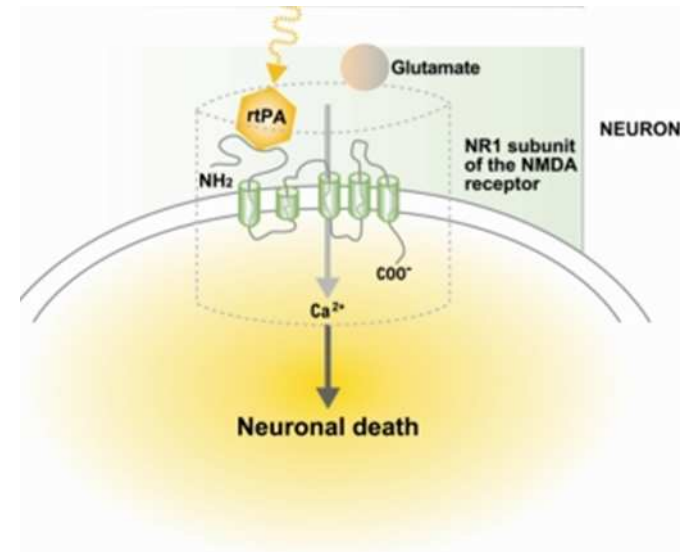
- AVC Ischémiques = 80%

- Traitement AVCi : fibrinolyse par le r-tPA dans les 4h30

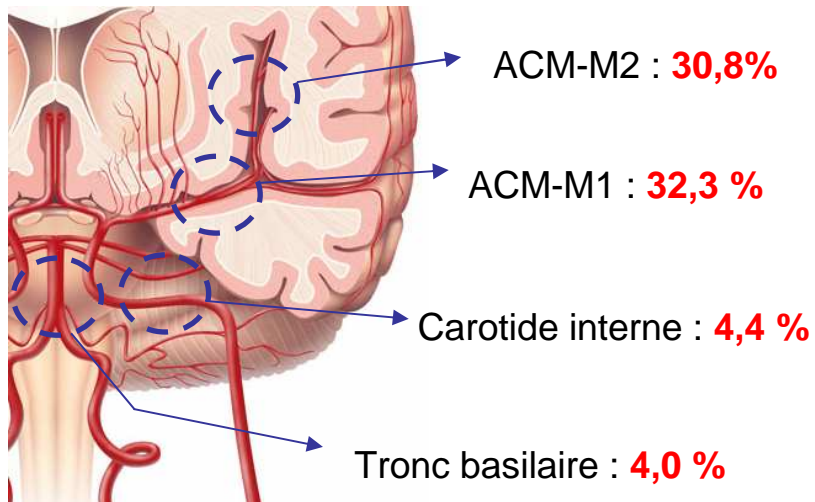


LIMITES : faible efficacité + effets indésirables

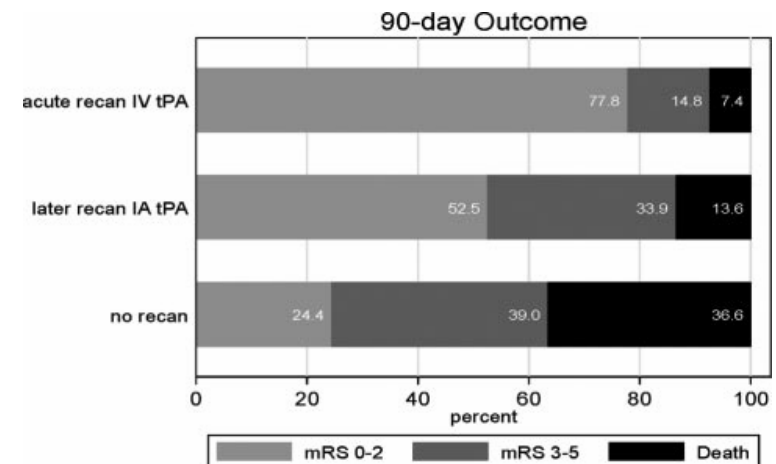
- faible taux de recanalisation
- risque hémorragique
- excitotoxicité



Site de l'occlusion :

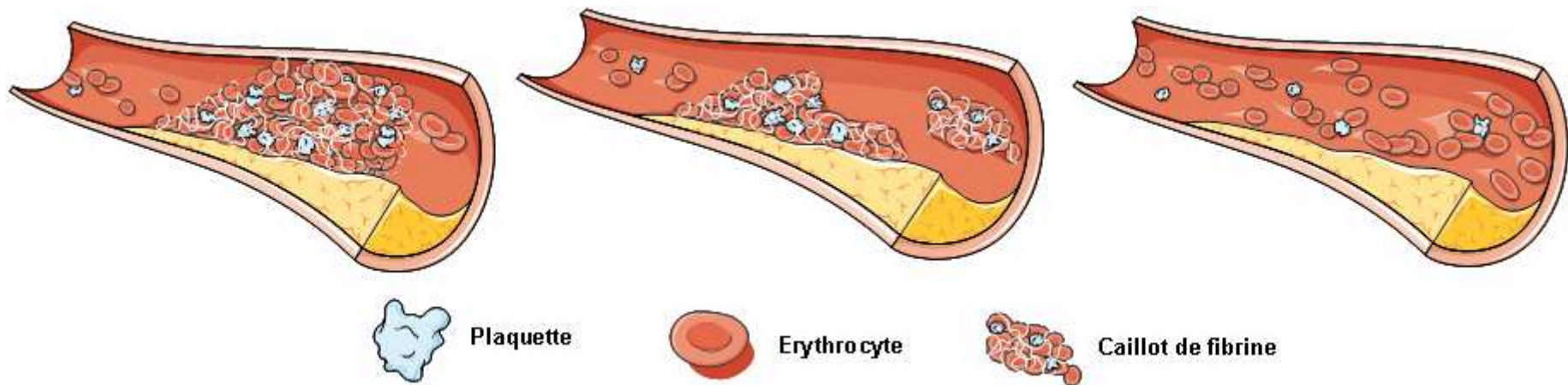


Bhatia R. et al. Stroke. 2010 ;41:2254-8.



Bhatia R. et al. Stroke. 2010 ;41:2254-8.

=> Recherche active de
nouvelles stratégies thérapeutiques pour
augmenter l'efficacité de la fibrinolyse



QU'EST-CE QUE LE DEFIBROTIDE?

1. Le defibrotide est un mélange d'ADN

à 90% simple brin

Extrait du mucus intestinal du porc ; purifié ; dénaturé

Poids moléculaire moyen 16.5kDa

Longueur moyenne 50 pb



6

2. Le defibrotide est un médicament utilisé en clinique chez l'homme pour une pathologie thrombotique :

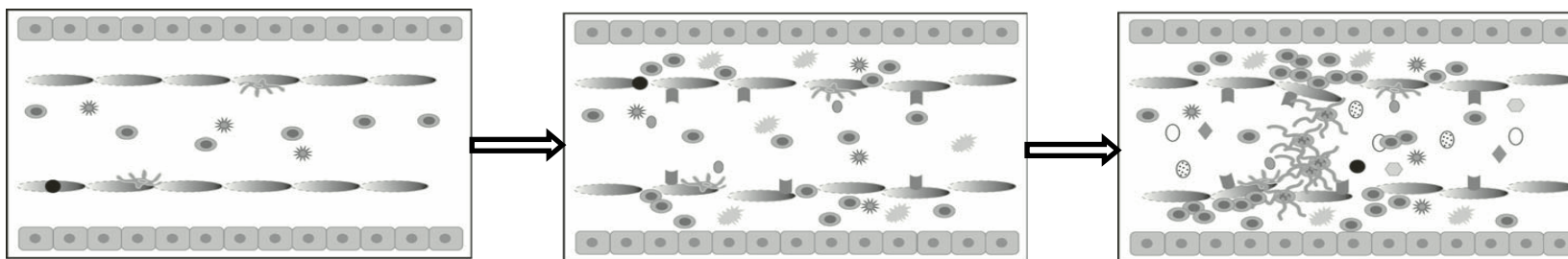


La **MALADIE VEINO OCCLUSIVE HEPATIQUE (MVO)**

Lésion des cellules
endothéliales

Thrombose

Infiltration de cellules
sous l'endothelium



Efficace dans la prévention et le traitement de la MVO

100% de survie en prévention; jusqu'à 64% en traitement

Quelque soit son indication :

Pas plus d'hémorragies versus placebo

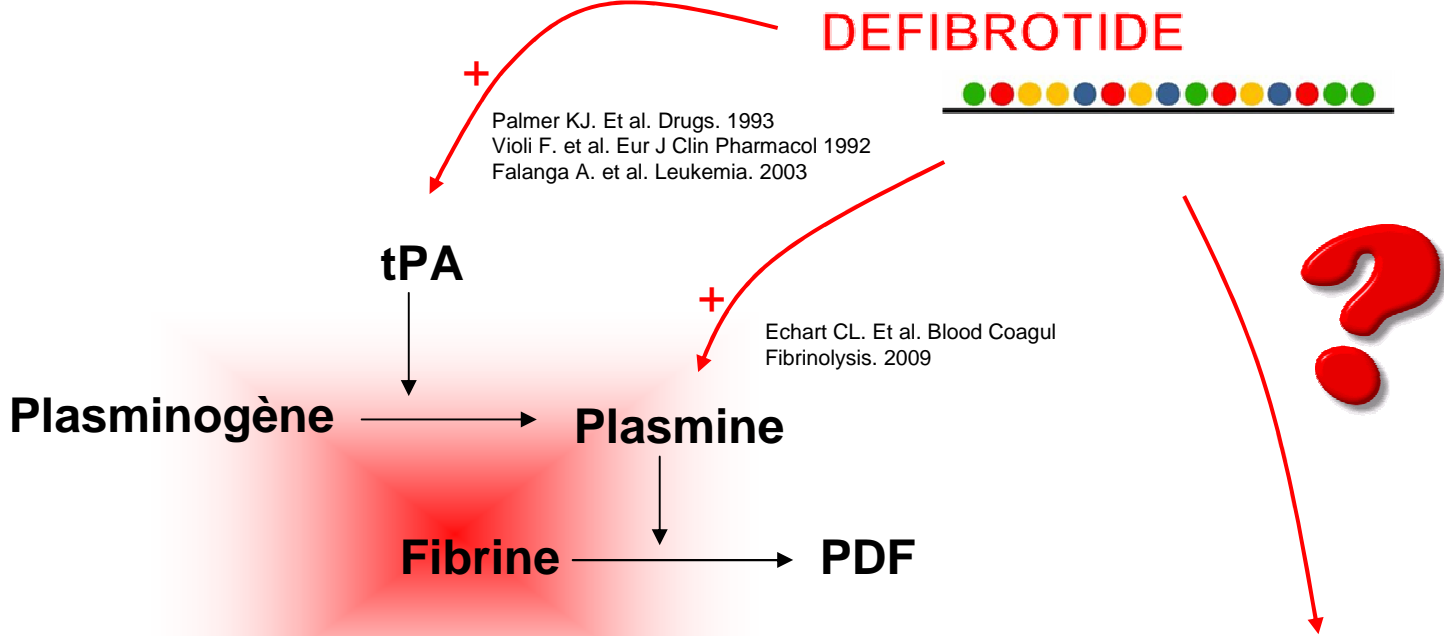


HYPOTHESE DE TRAVAIL :

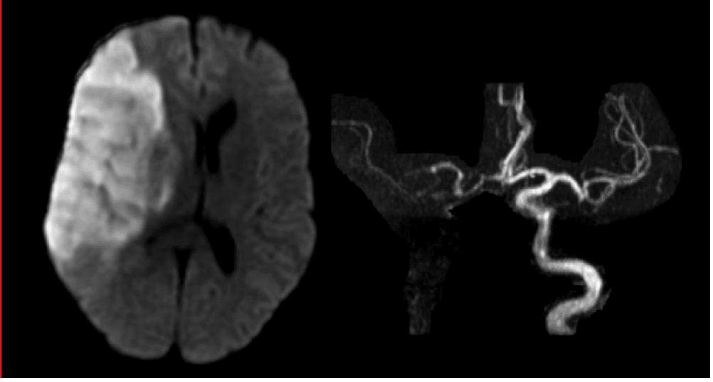
**LE DEFIBROTIDE AUGMENTE L'EFFICACITÉ
DE LA FIBRINOLYSE PAR LE r-tPA
DANS LES AVC ISCHÉMIQUES**

POURQUOI CETTE HYPOTHESE?



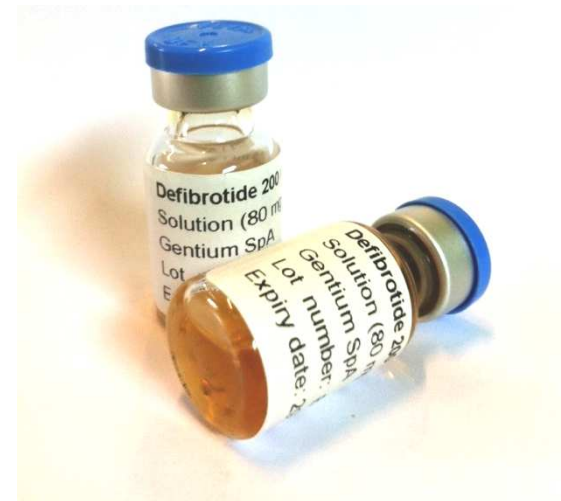


Amélioration du % de recanalisation lors d'un AVC?

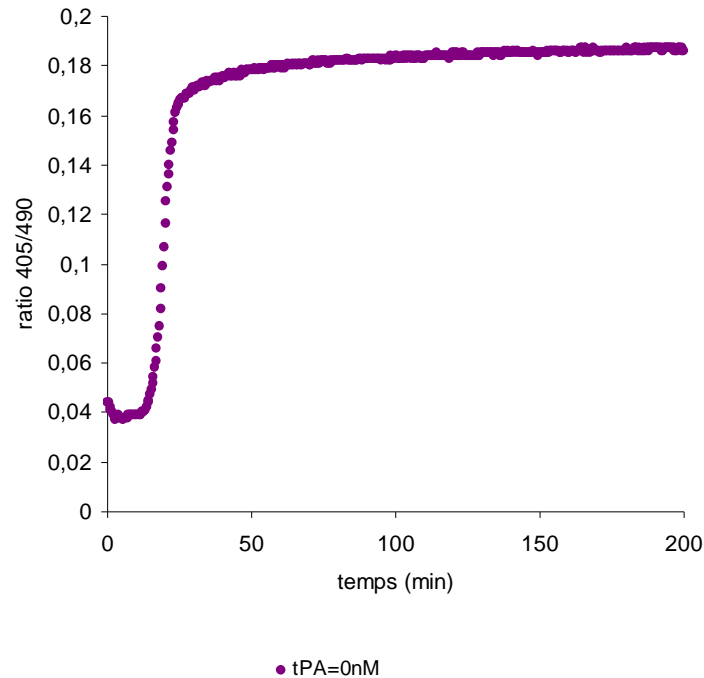


II. RESULTATS :

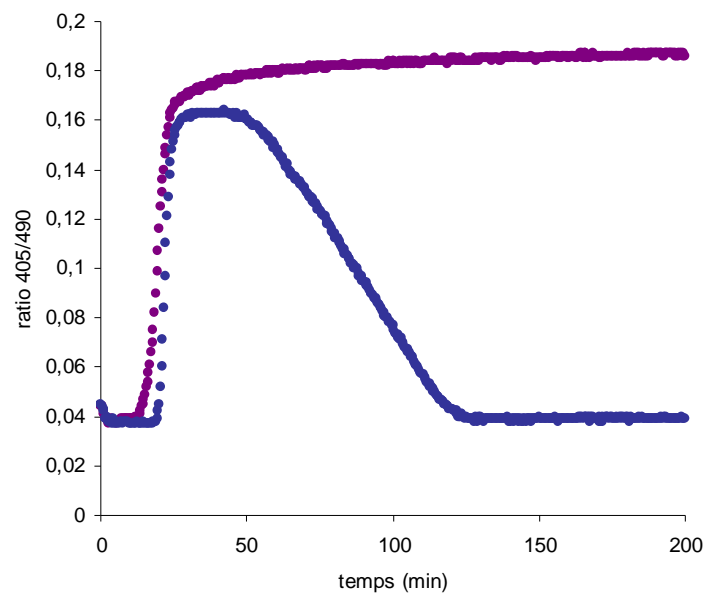
DEFIBROTIDE RESULTATS *IN VITRO*



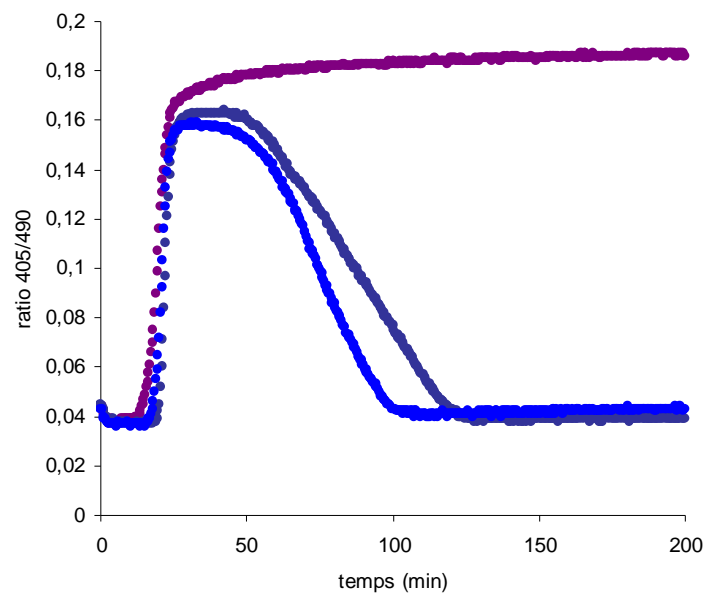
CLOT LYSIS ASSAY



Defibrotide à différentes concentrations pré-incubé pendant 1 heure à 4°C avec du plasma humain en présence/absence de tPA à 0.5nM

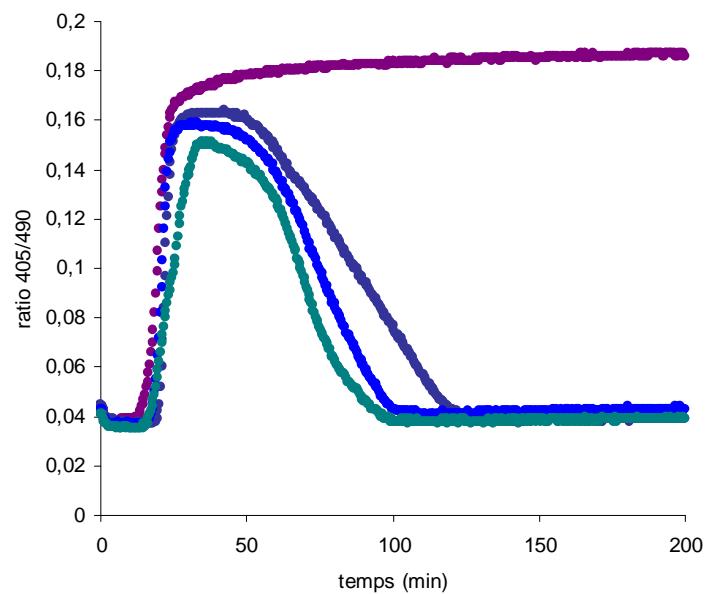


● tPA=0nM
● defibratide=0µg/mL **+r-tPA 0,5nM**

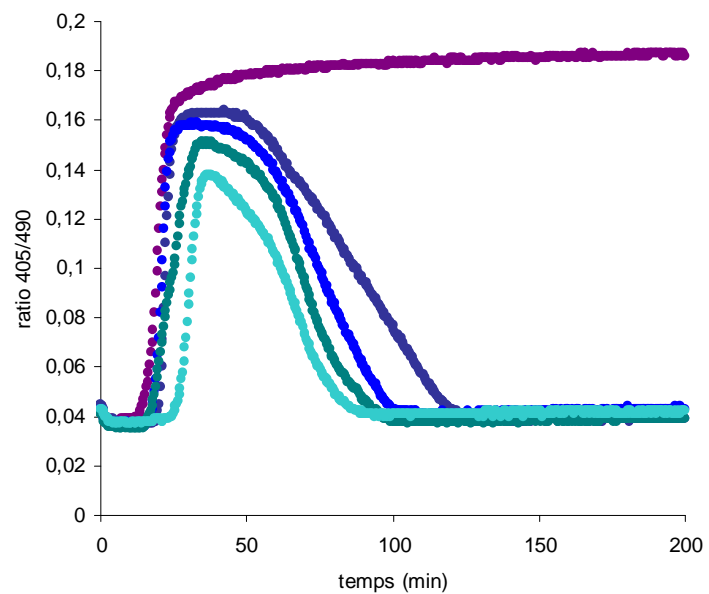


● tPA=0nM
● defibratide=0µg/mL
● defibratide=800µg/mL

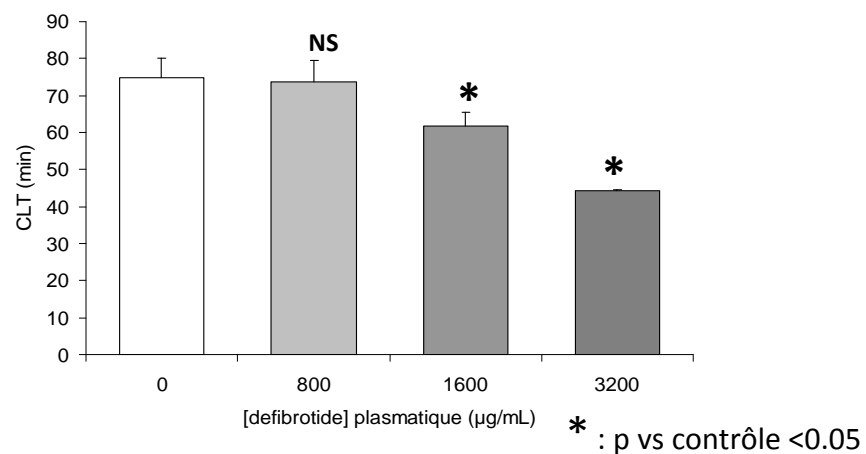
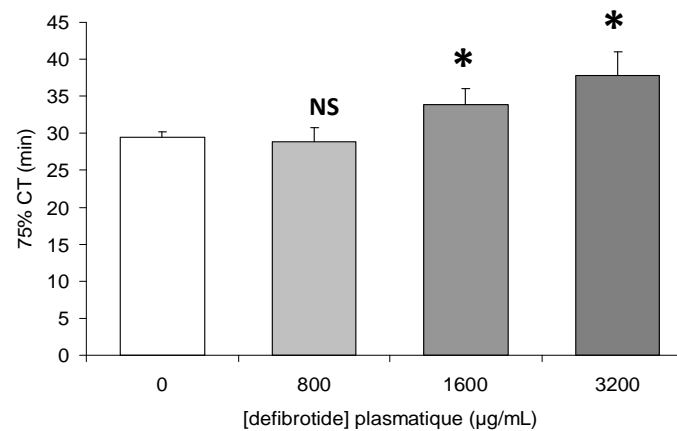
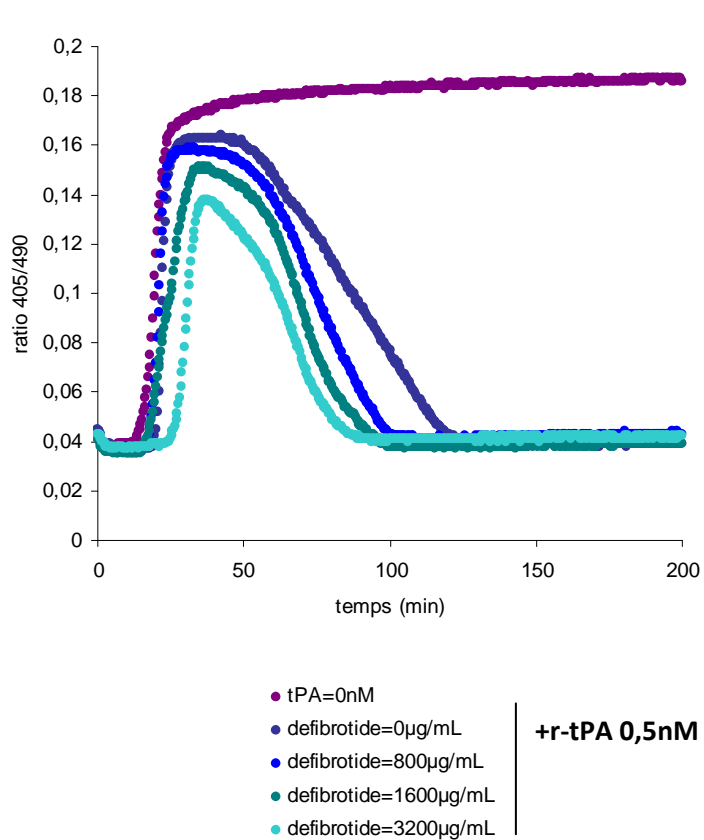
+r-tPA 0,5nM



- tPA=0nM
 - defibrotide=0µg/mL
 - defibrotide=800µg/mL
 - defibrotide=1600µg/mL
- +r-tPA 0,5nM**



- tPA=0nM
 - defibrotide=0µg/mL
 - defibrotide=800µg/mL
 - defibrotide=1600µg/mL
 - defibrotide=3200µg/mL
- +r-tPA 0,5nM**



Augmentation du temps de coagulation et réduction du temps de lyse

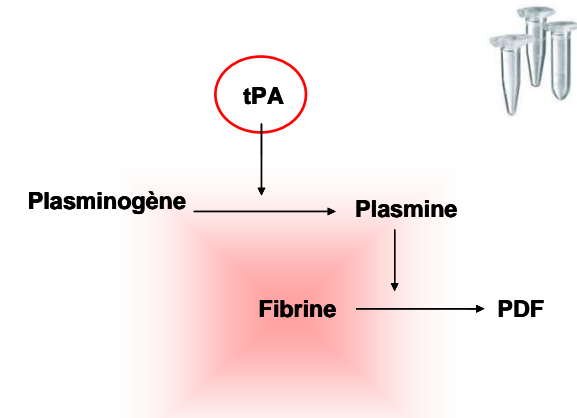
Incubation plasma/DF 1h



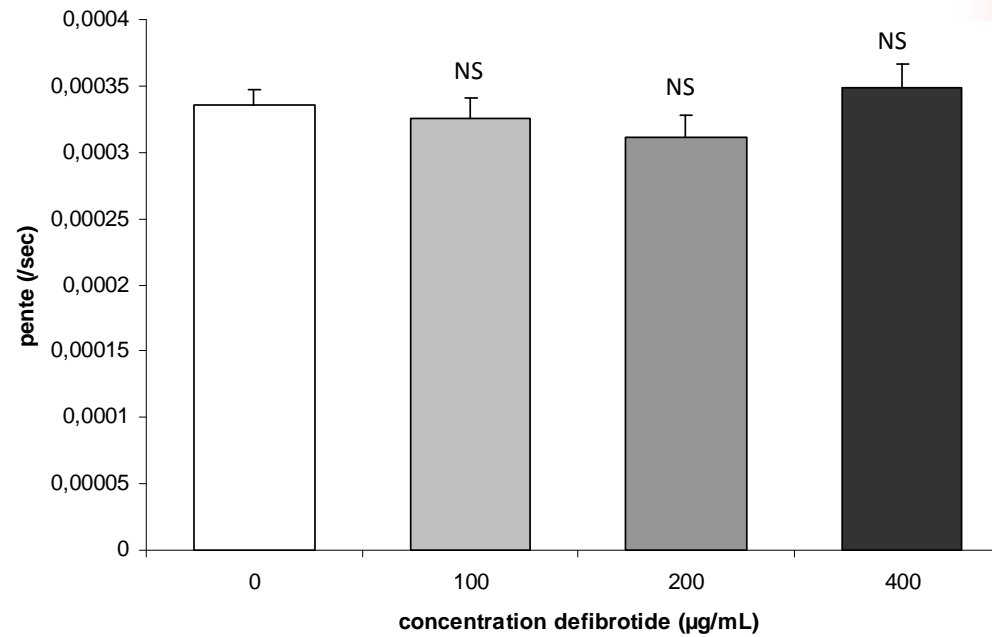
**Par quels mécanismes
le defibrotide accélère-t-il la lyse
dans les expériences de clot lysis ?**



EFFET SUR L'ACTIVITE tPA

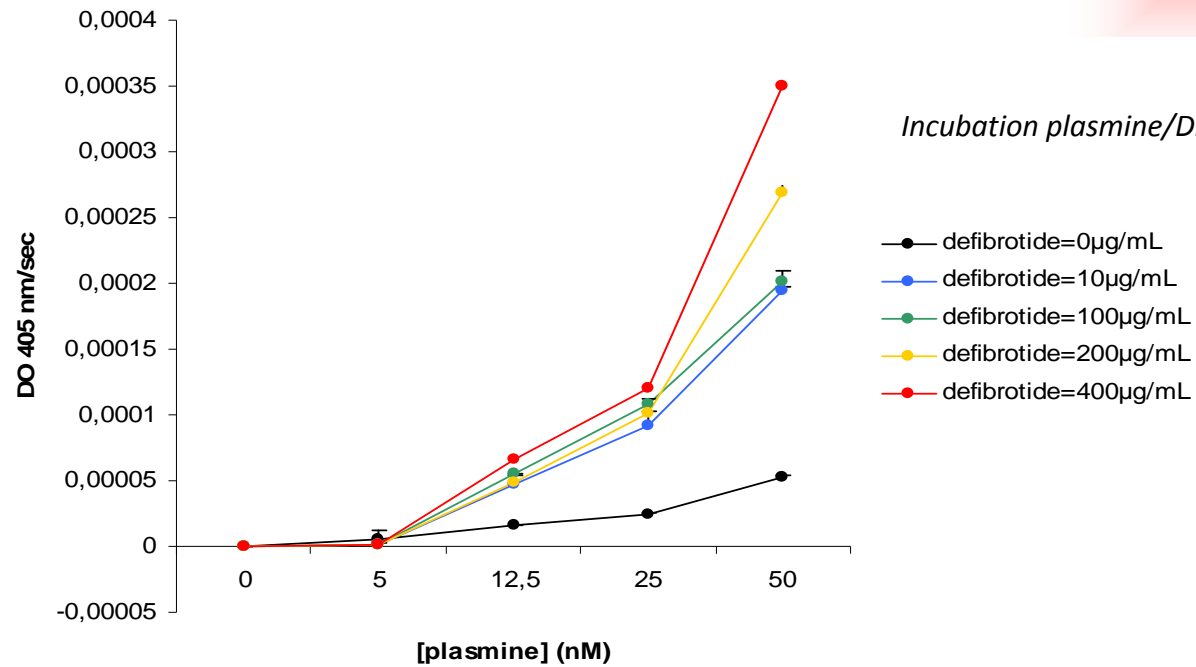
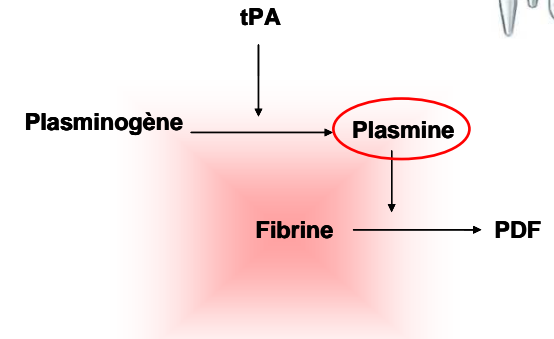


Incubation r-tPA/DF 30 min
tPA=3µg/mL



Pas d'effet sur l'activité du r-tPA

EFFET SUR L'ACTIVITE PLASMINE

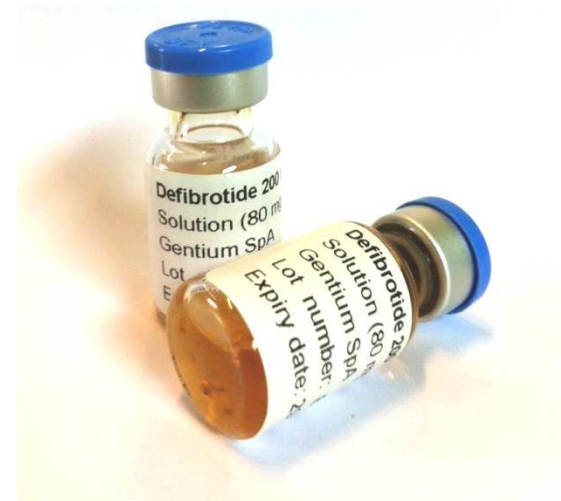


Forte augmentation de l'activité plasmine en substrat S2251



**Le DF accélère la lyse du caillot par le r-tPA *via* une
augmentation de l'activité plasmine.**

DEFIBROTIDE RESULTATS *IN VIVO*



PROCEDURES IN VIVO



1. Evaluation des effets délétères potentiels :

- **Pro-hémorragique** : - temps de saignement
 - modèle d'hémorragie cérébrale
- **Excitotoxique** : modèle d'excitotoxicité

2. Evaluation de l'efficacité du DF dans l'infarctus cérébral :

Modèles d'infarctus cérébral :

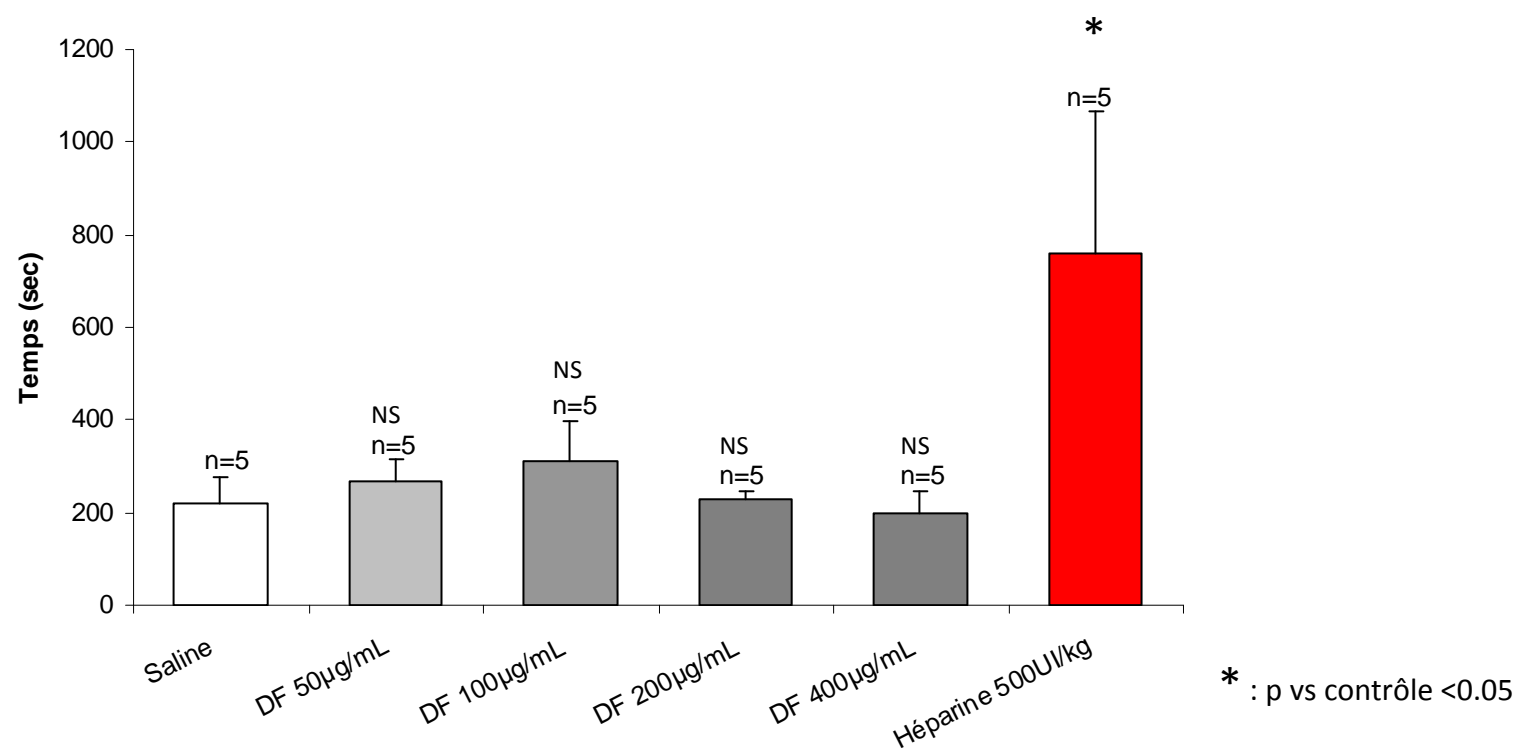
- **Modèle thrombine**
- **Modèle chlorure de fer**

TEMPS DE SAIGNEMENT





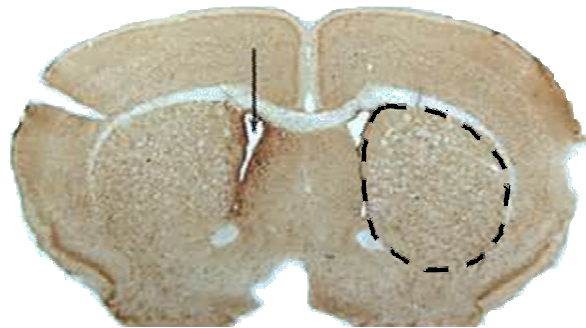
Pas de modification du TS



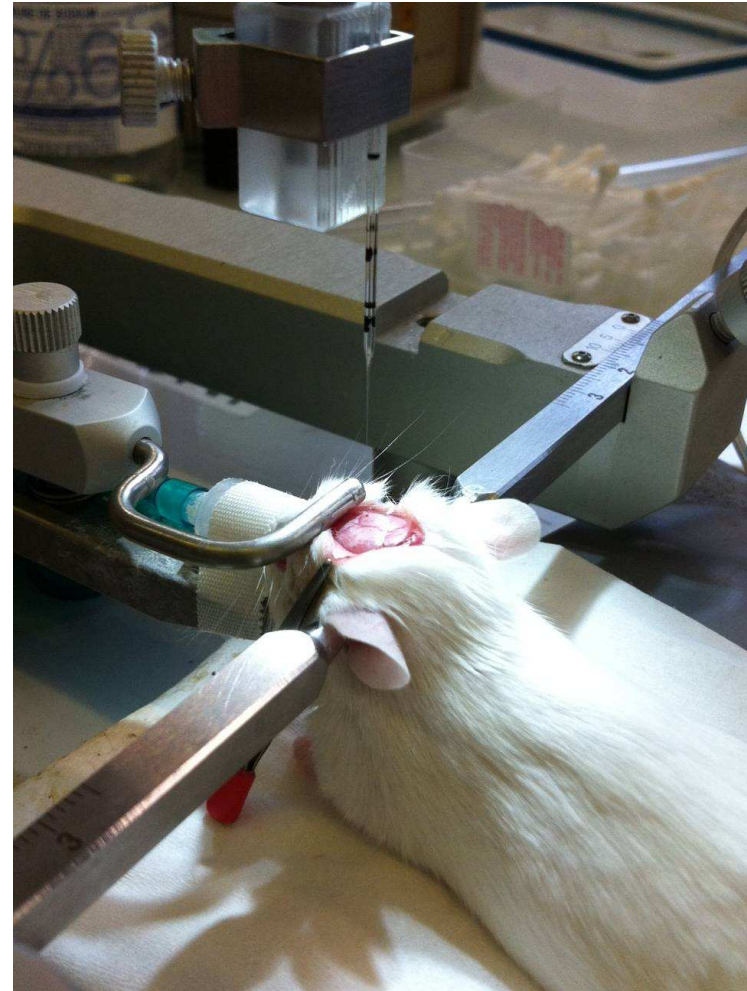
Pas d'effet sur l'hémostase primaire

* : $p < 0,05$ vs saline

MODELE HEMORRAGIE INTRA STRIATALE



+0.5 (AP) ; +2.0 (LR) ; -3.0 (DV)





t=0



t=10min

t=24h

3 groupes :

- Saline
- DF 200mg/kg
- HNF 200UI/kg
- HNF 500UI/kg

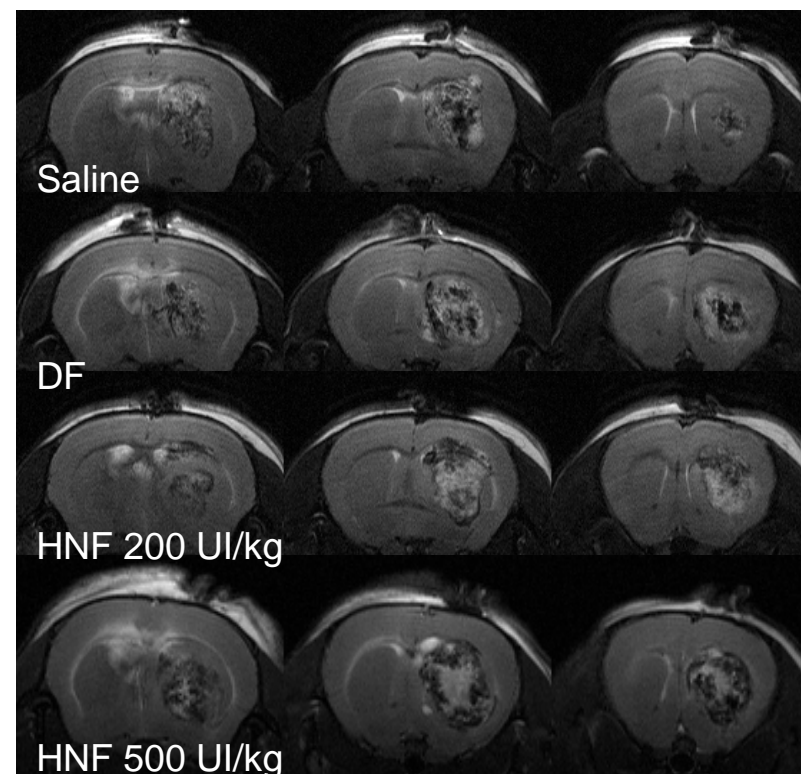
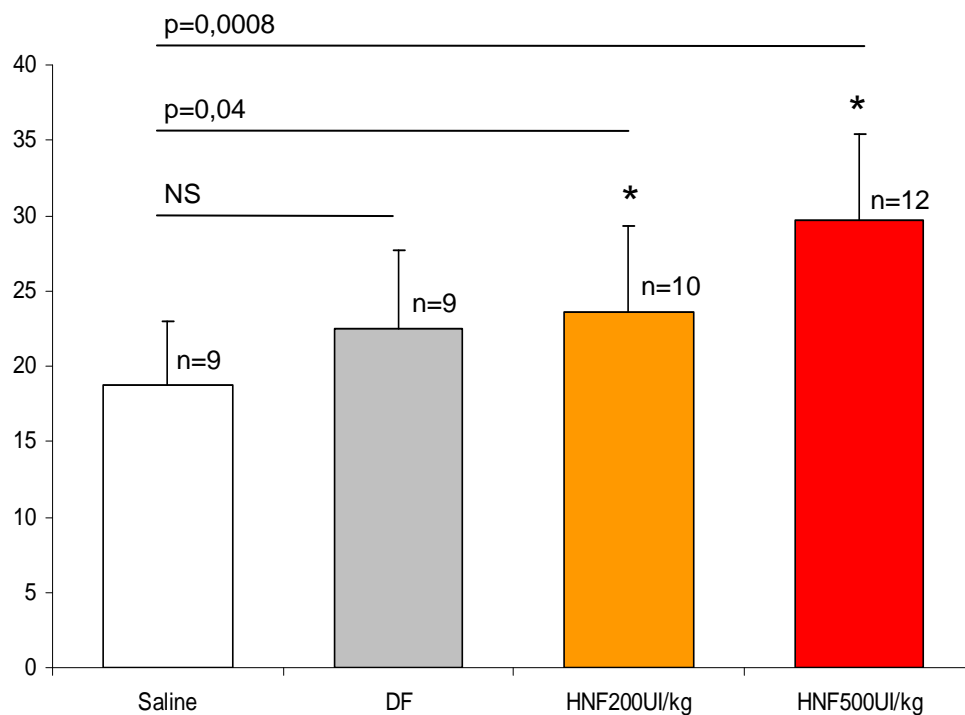
200µL/souris IVD

0.04UI collagénase



IRM T2

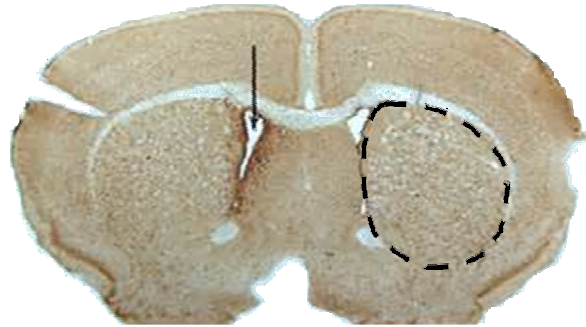
26



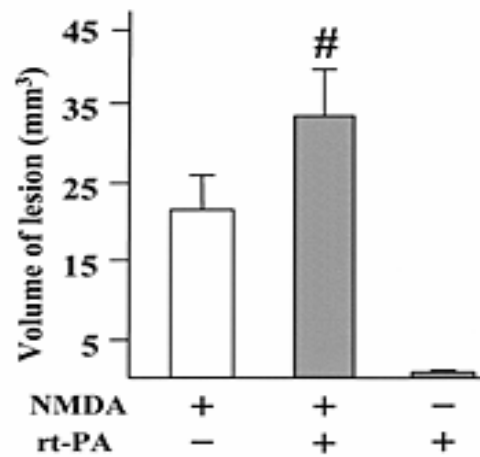
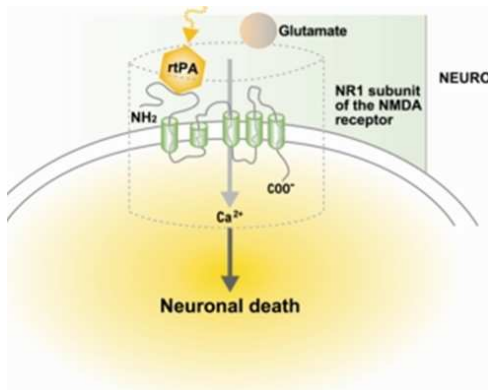
Pas de majoration significative du volume d'hémorragie en cas de saignement...

* : $p < 0,05$ vs saline

INJECTIONS INTRA-STRIATALES DE NMDA



+0.5 (AP) ; +2.0 (LR) ; -3.0 (DV)



Nicole et al., Nature Med 2001

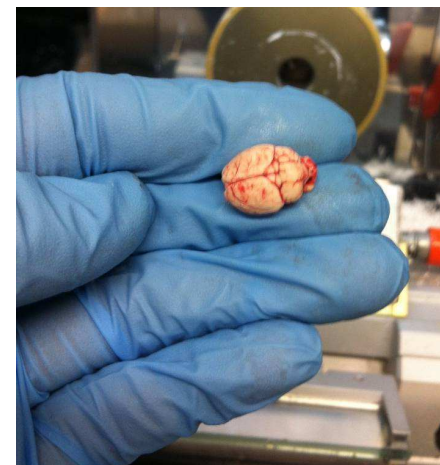


- 4 groupes :
- NaCl
 - r-tPA
 - DF
 - DF + r-tPA

2x200 μ L IVD/souris

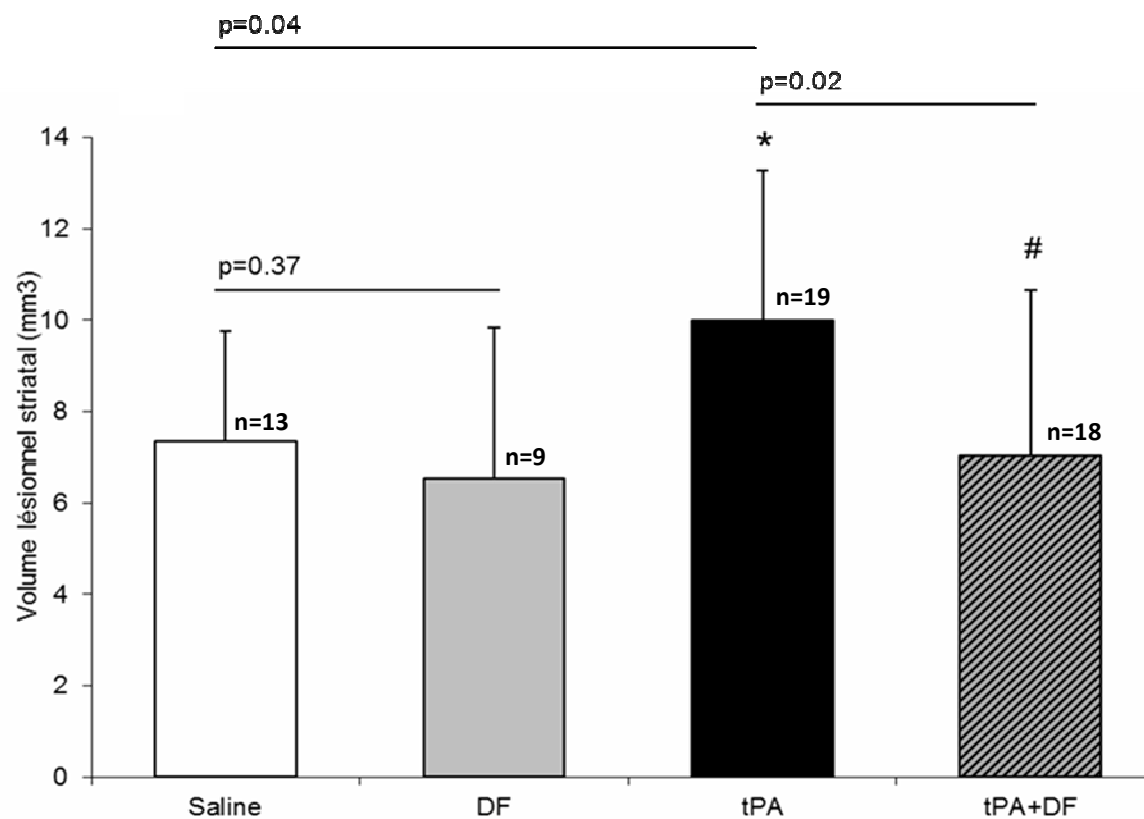
[r-tPA]=10mg/kg

[DF]=200mg/kg





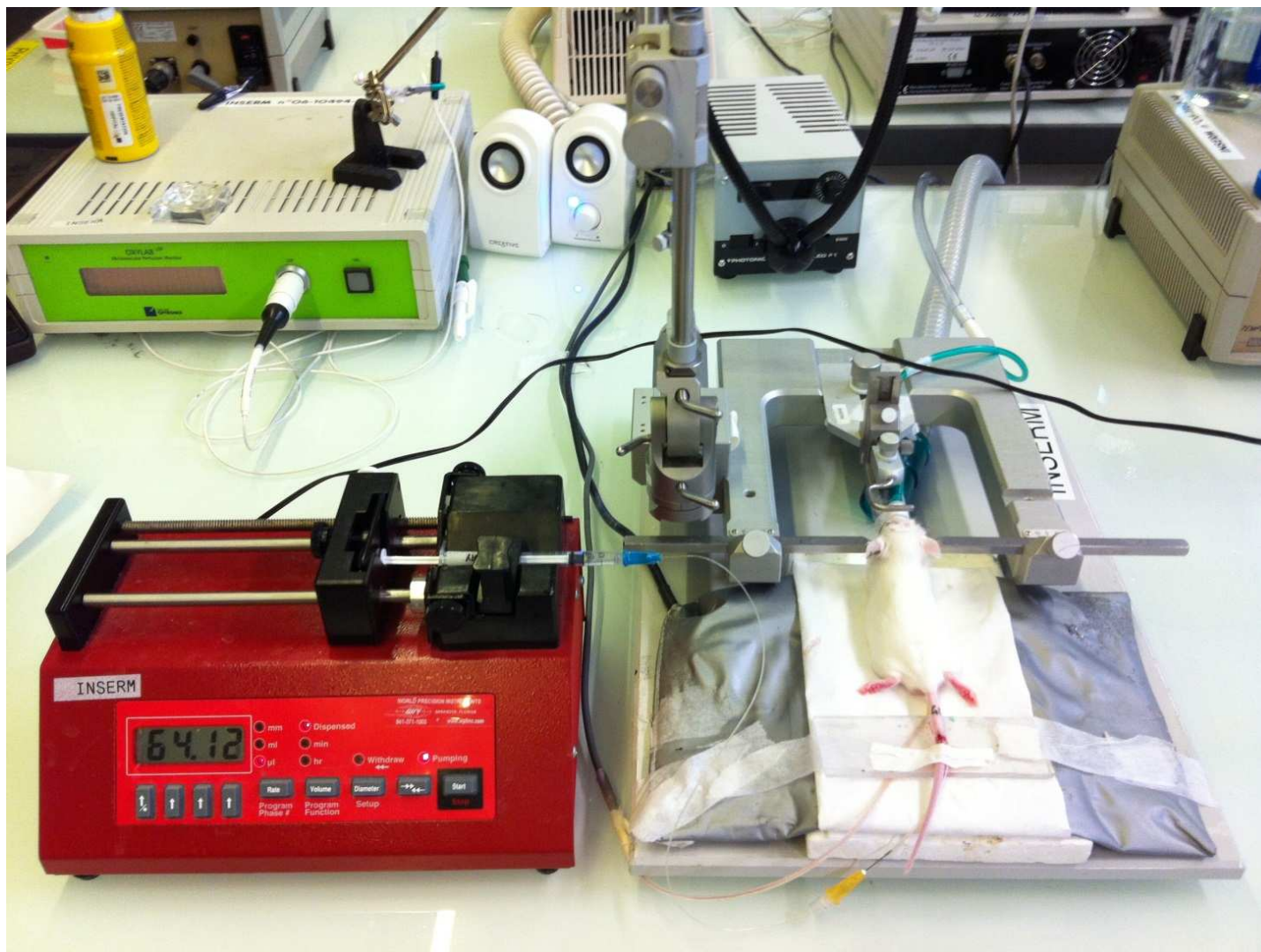
Pas d'effet neurotoxique ni neuroprotecteur propre



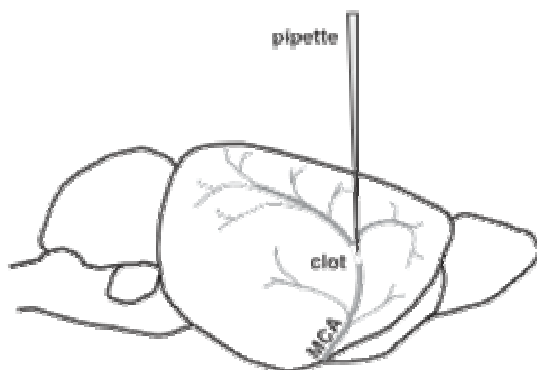
Le DF bloque les effets pro-excitotoxiques du r-tPA *in vivo*

* : $p < 0,05$ vs saline ; # : $p < 0,05$ vs tPA

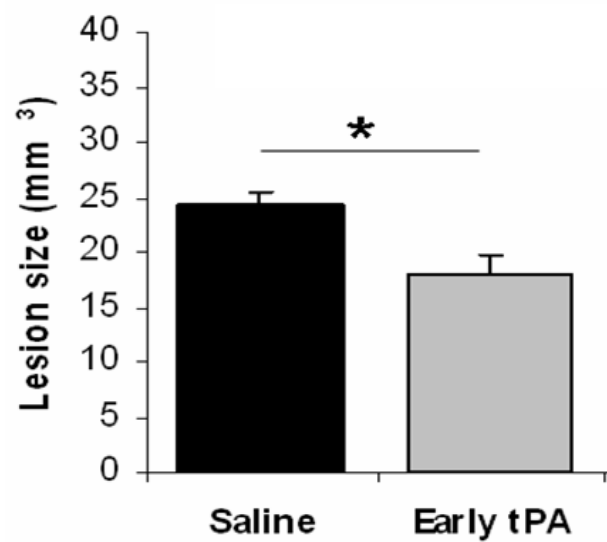
MODELES D'INFARCTUS CEREBRAL



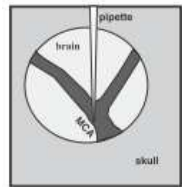
1. MODELE THROMBO-EMBOLIQUE



Thrombin



Defibrotide en association au r-tPA en précoce



t=0



t=20min

t=24h



4 groupes :

- Saline
- DF 200mg/kg
- tPA 10mg/kg
- tPA+DF

2x200 μ L/souris

DF : 200 μ L IVD

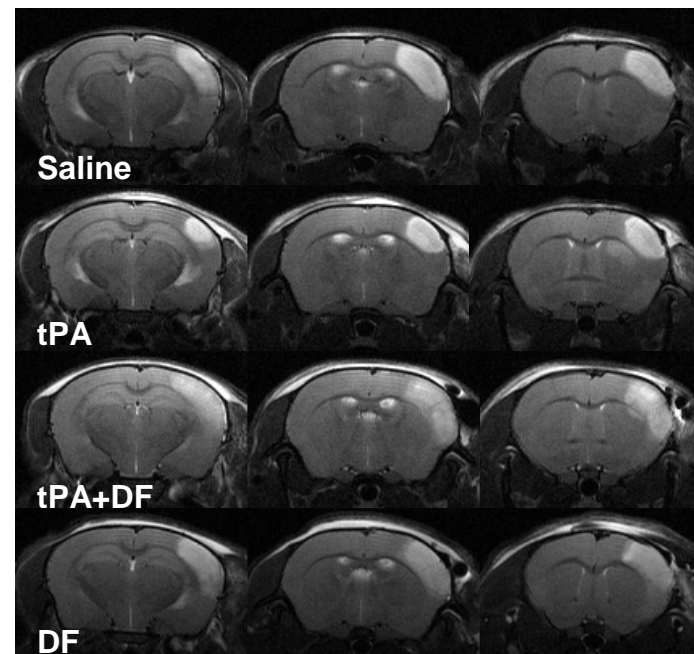
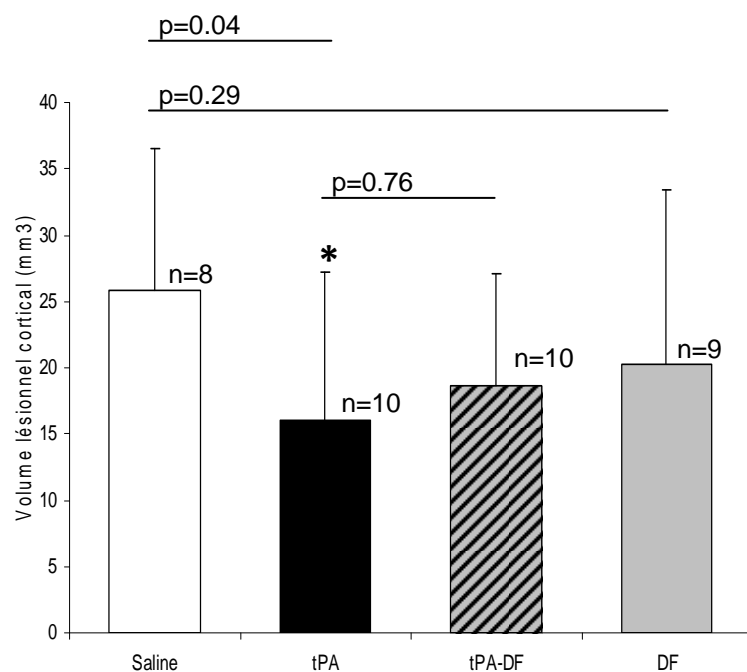
tPA : 200 μ L IVSE 40min



IRM T2

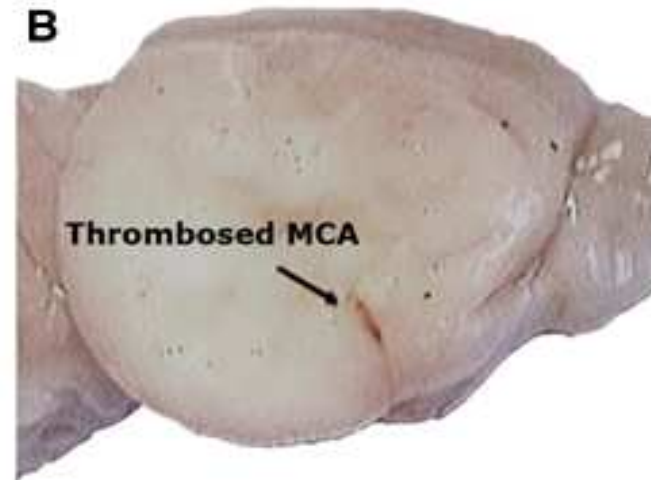
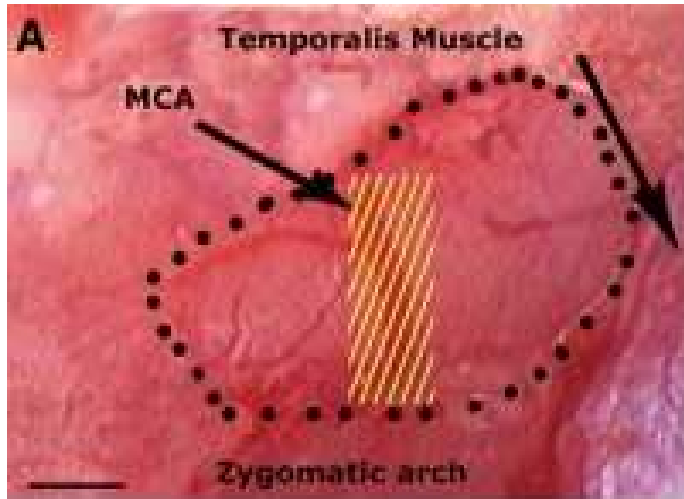


Pas de modification du volume d'ischémie

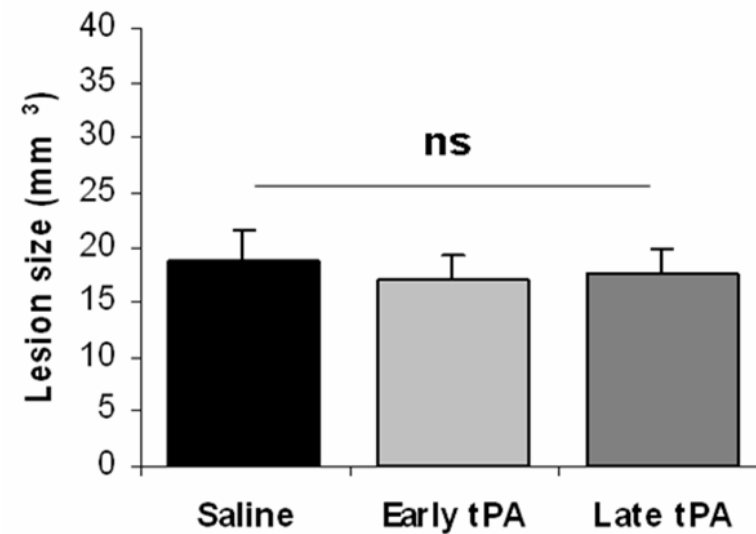
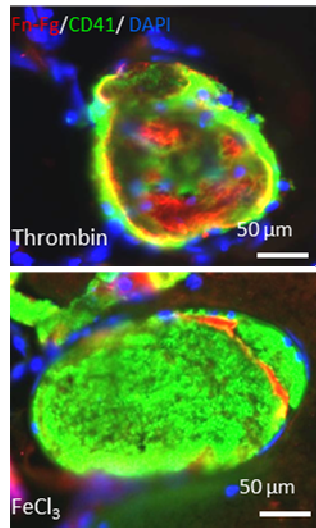


Pas d'effet bénéfique significatif
ni seul ni en association au r-tPA...

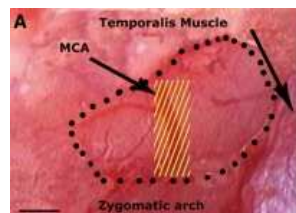
2. MODELE CHLORURE DE FER



FeCl₃



35



t=0

t=20min

t=24h



4 groupes :

- Saline
- DF 200mg/kg
- tPA 10mg/kg
- tPA+DF

2x200 μ L/souris

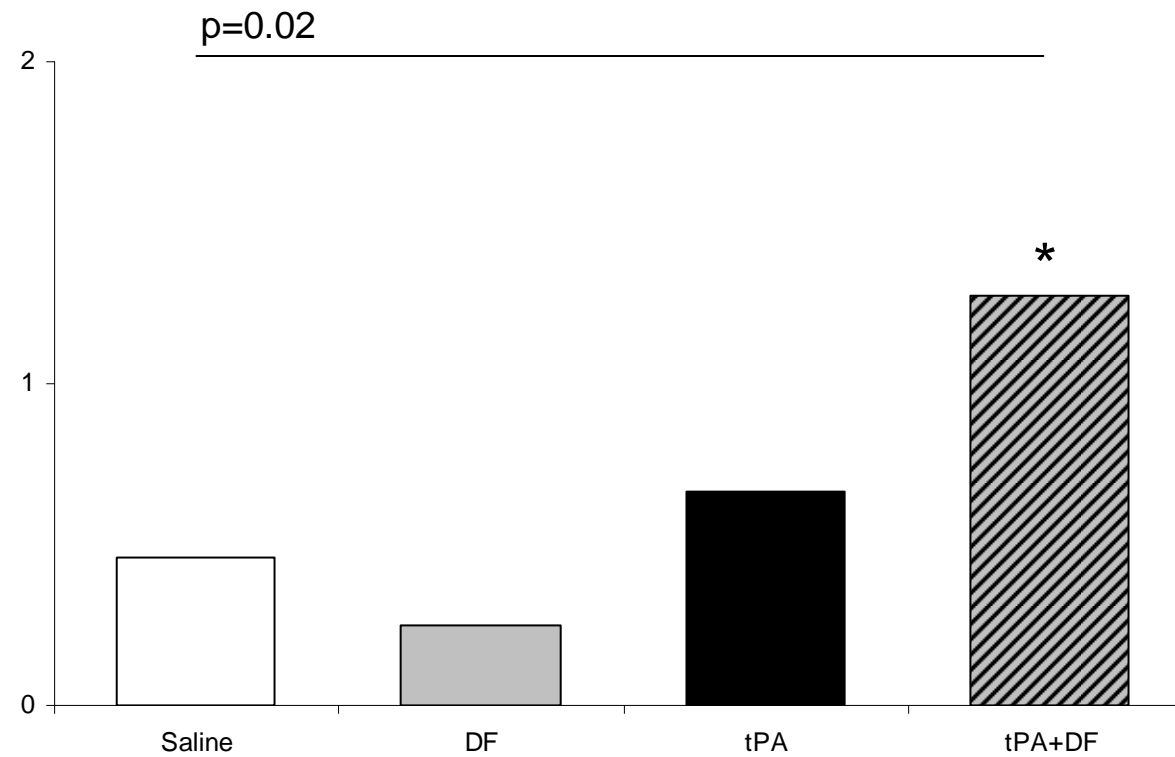
DF : 200 μ L IVD

tPA : 200 μ L IVSE 40min

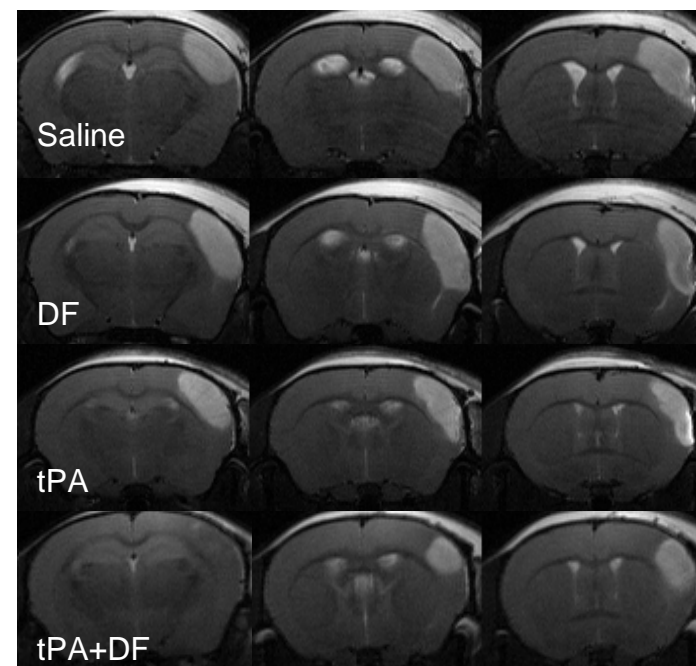
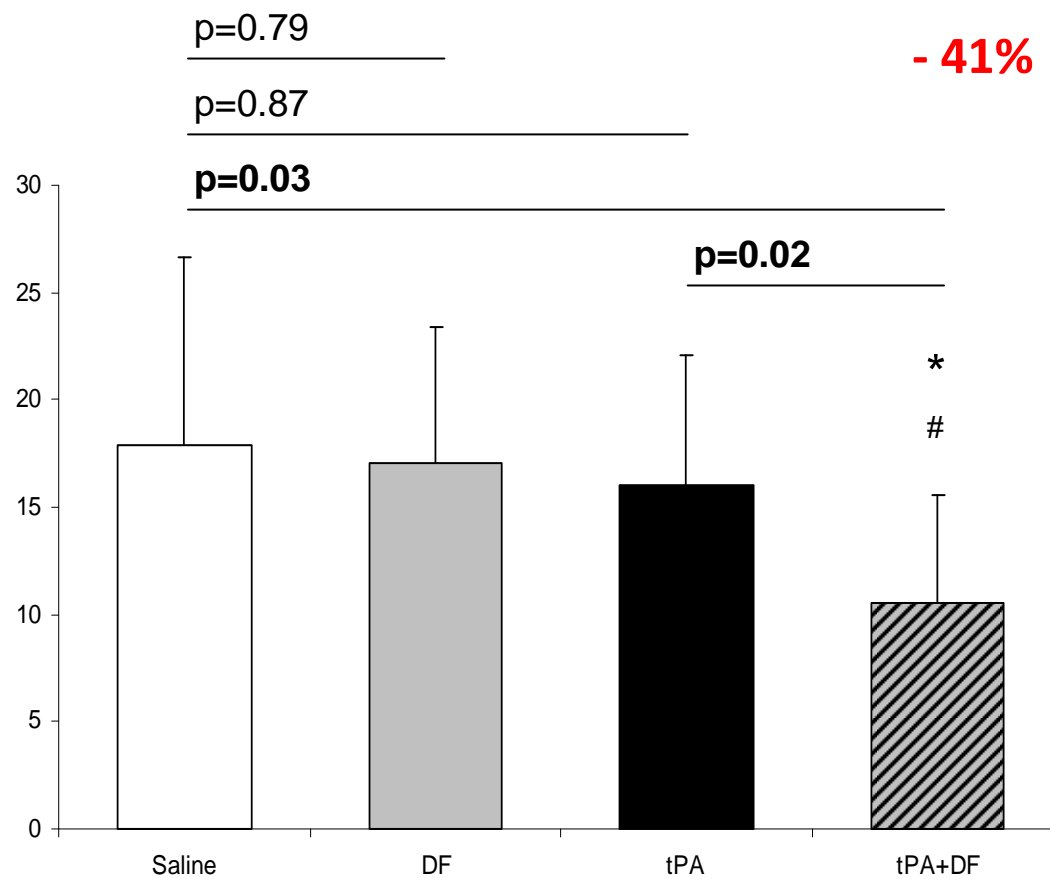


IRM T2

Revascularisation dans le groupe tPA+DF



n=12/groupe



Réduction significative du volume lésionnel

IV. CONCLUSION :

LE DF :



Accélère la lyse du caillot en présence de r-TPA



N'a pas d'effet pro-hémorragique majeur



Protège des effets pro-excitotoxiques du r-TPA



Rend le r-TPA efficace sur les thrombi résistants chez la souris

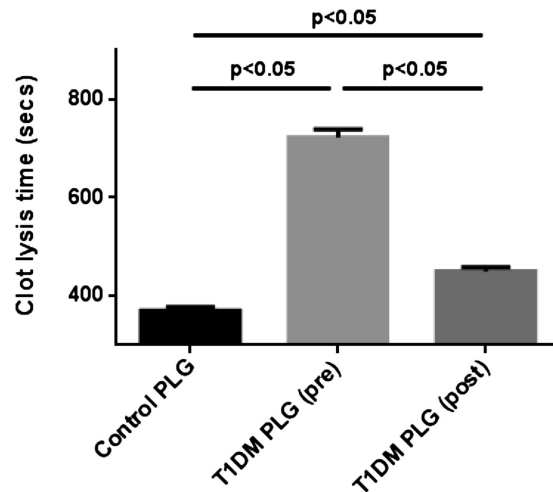


III. PERSPECTIVES :

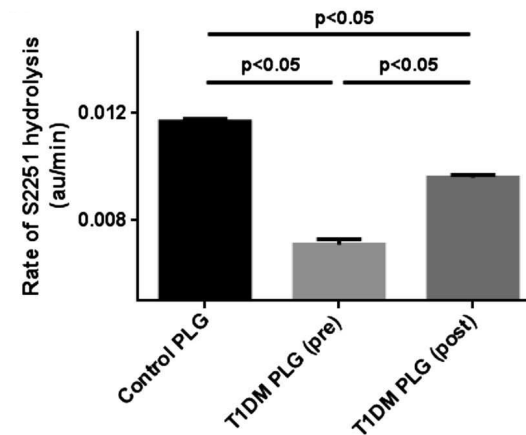
Les patients diabétiques sont plus résistants à la fibrinolyse

Nikneshan et al. Diabetes care, juillet 2013

Allongement du temps de lyse *in vitro*



Diminution de l'activité plasmine



Ajjan R A et al. Blood 2013;122:134-142



POSTULAT

- Les diabétiques sont résistants à la fibrinolyse par r-tPA
 - Le DF fonctionne dans un modèle animal où le thrombus est résistant au r-tPA
 - Les diabétiques ont une activité plasmine diminuée et un temps de lyse allongé
 - Le DF augmente l'activité plasmine et diminue le temps de lyse du caillot *in vitro*
- ⇒ Le DF pourrait « resensibiliser » les diabétiques au r-tPA dans le modèle thrombine



-Modèle stroke tPA-résistant : Souris diabétiques / streptozotocine





MERCI DE VOTRE ATTENTION