



Université catholique de Louvain

Faculté de Médecine

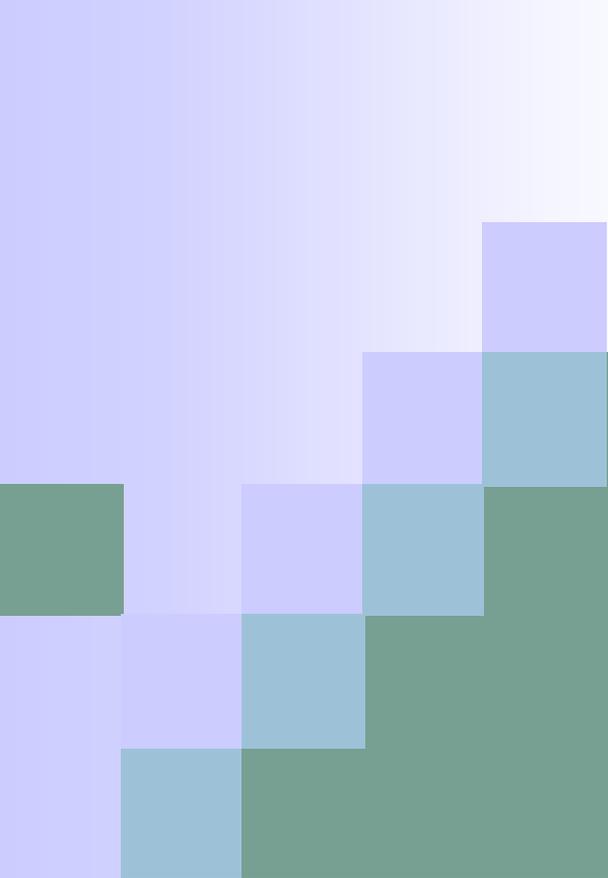
École de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté par **Sophie Denamur** en vue de
l'obtention du diplôme de Licence en Sciences
Biomédicales – Orientation Toxicologie

Promoteur : **Pr. M.P. Mingeot-Leclercq**

Année académique 2006-2007

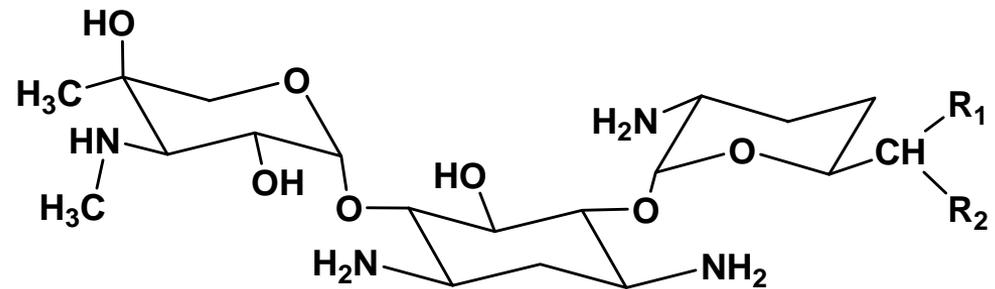


Apoptose : un marqueur de toxicité des aminoglycosides?

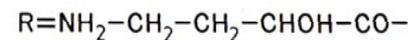
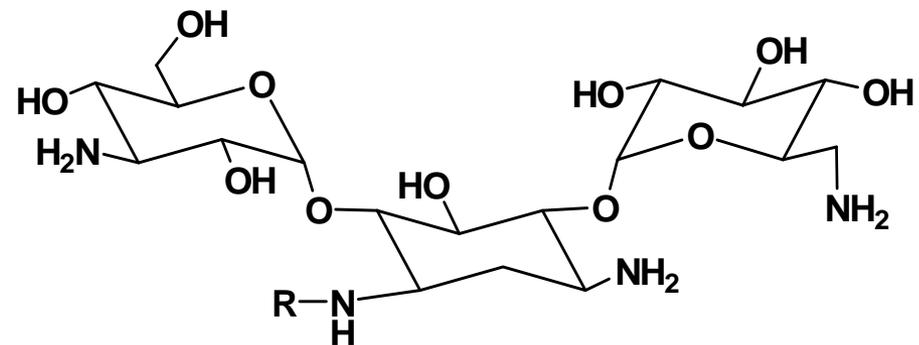
Étude comparative sur cellules en culture incubées avec de la gentamicine et de l'amikacine.

Aminoglycosides

- Infections sévères à Gram négatif
- Molécules polaires et polycationiques.
Fonctions aminées chargées positivement à pH acide
- Ototoxicité et néphrotoxicité



gentamicine



amikacine

Toxicité sélective...

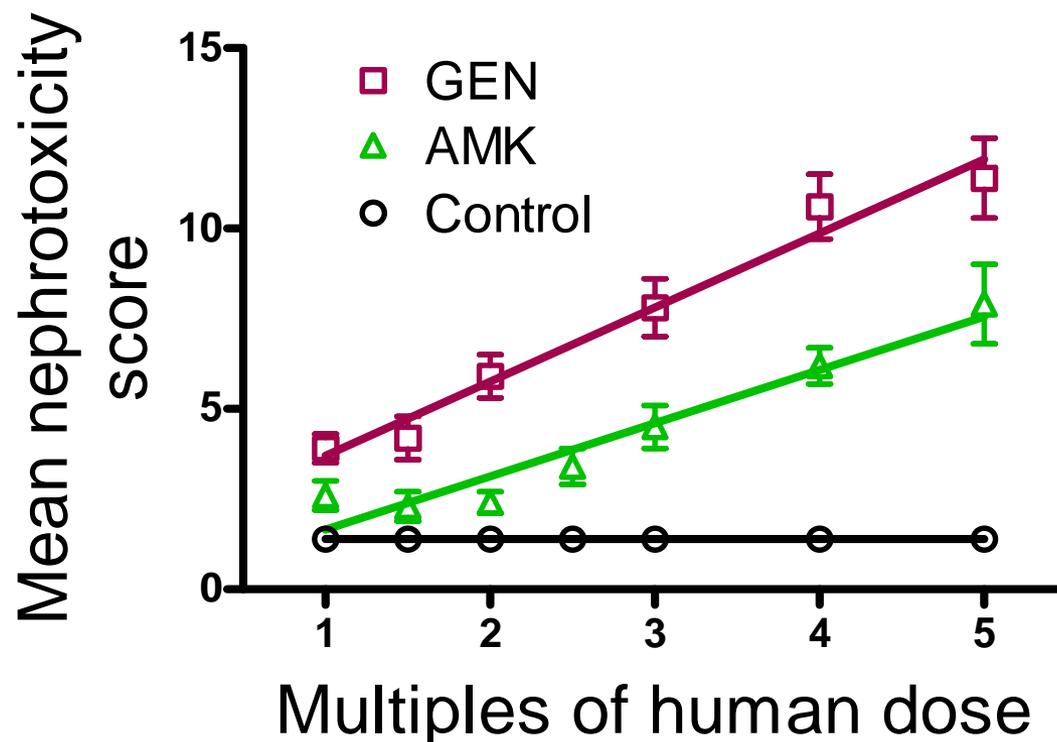
Accumulation spécifique des aminoglycosides :

- Interaction avec les phospholipides acides de la membrane plasmique
- Endocytose médiée par la mégaline

Manifestations cliniques de néphrotoxicité

- Phospholipidurie et présence d'enzymes lysosomiaux dans l'urine
- Protéinurie
- Polyurie
- Augmentation de l'urée sanguine et de la créatinine
- Anurie (au stade terminal, très rare)

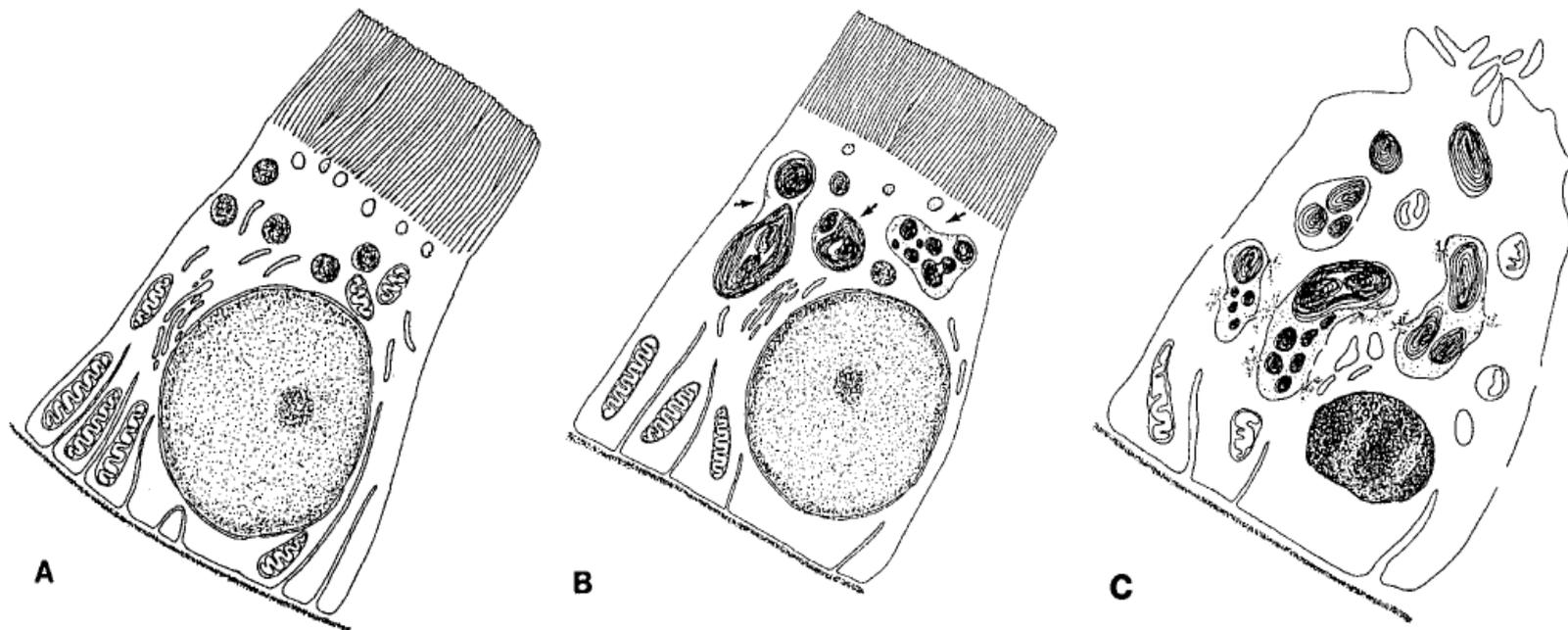
Comparaison de l'induction de néphrotoxicité *in vivo*



Score déterminé en fonction de la dégénérescence tubulaire, de l'inflammation péritubulaire, de la nécrose tubulaire, de la dilatation tubulaire, de la basophilie tubulaire et de la fibrose interstitielle

Hottendorf et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1981; 19 (6) : 1024 -1028

Mécanismes de néphrotoxicité



Mingeot-Leclercq & Tulkens, 1999, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 : 1003-1012

↪ Accumulation dans
les lysosomes
(Tulkens et al. 1978)

↪ Phospholipidose
(Kosek et al., 1974; Aubert-Tulkens et
al., 1979; Laurent et al., 1982;
Mingeot-Leclercq et al., 1988; Laurent
et al., 1990; Piret et al., 1992)

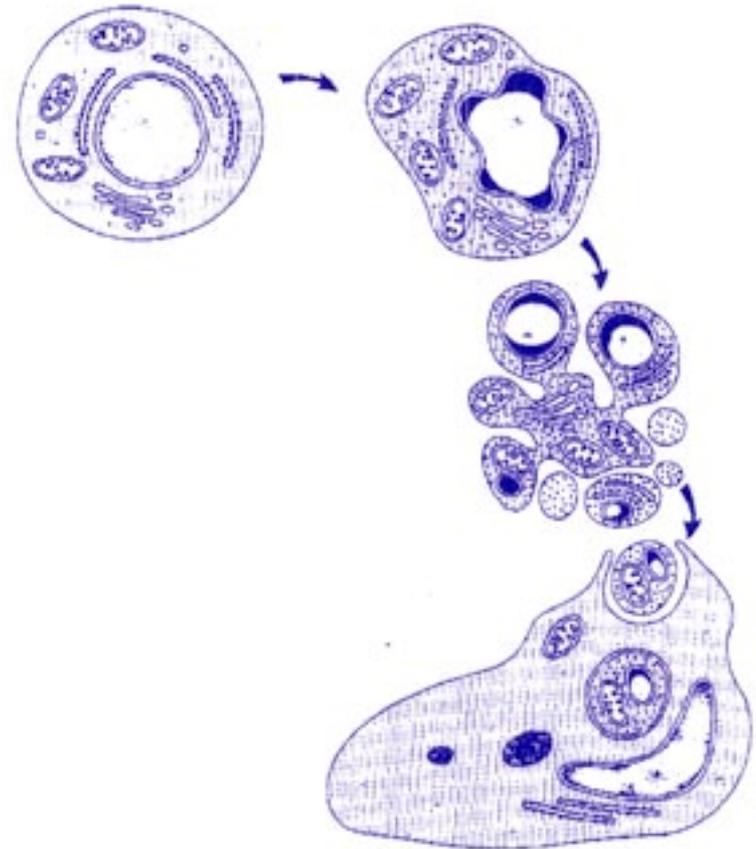
↪ Apoptose
(El Mouedden et al.,
2000.a, b)

Apoptose...

- Phénomène actif
- Perte des contacts intercellulaires
- Modifications de la membrane plasmique (translocation des PS)
- Altérations du cytosquelette
- Réduction du volume cellulaire
- Condensation de la chromatine

Apoptose... (2)

- Fragmentation de l'ADN
- Pas de changement apparent des organites subcellulaires
- Formation de corps apoptotiques
- Voie intrinsèque (mitochondriale) ou voie extrinsèque (death receptors)

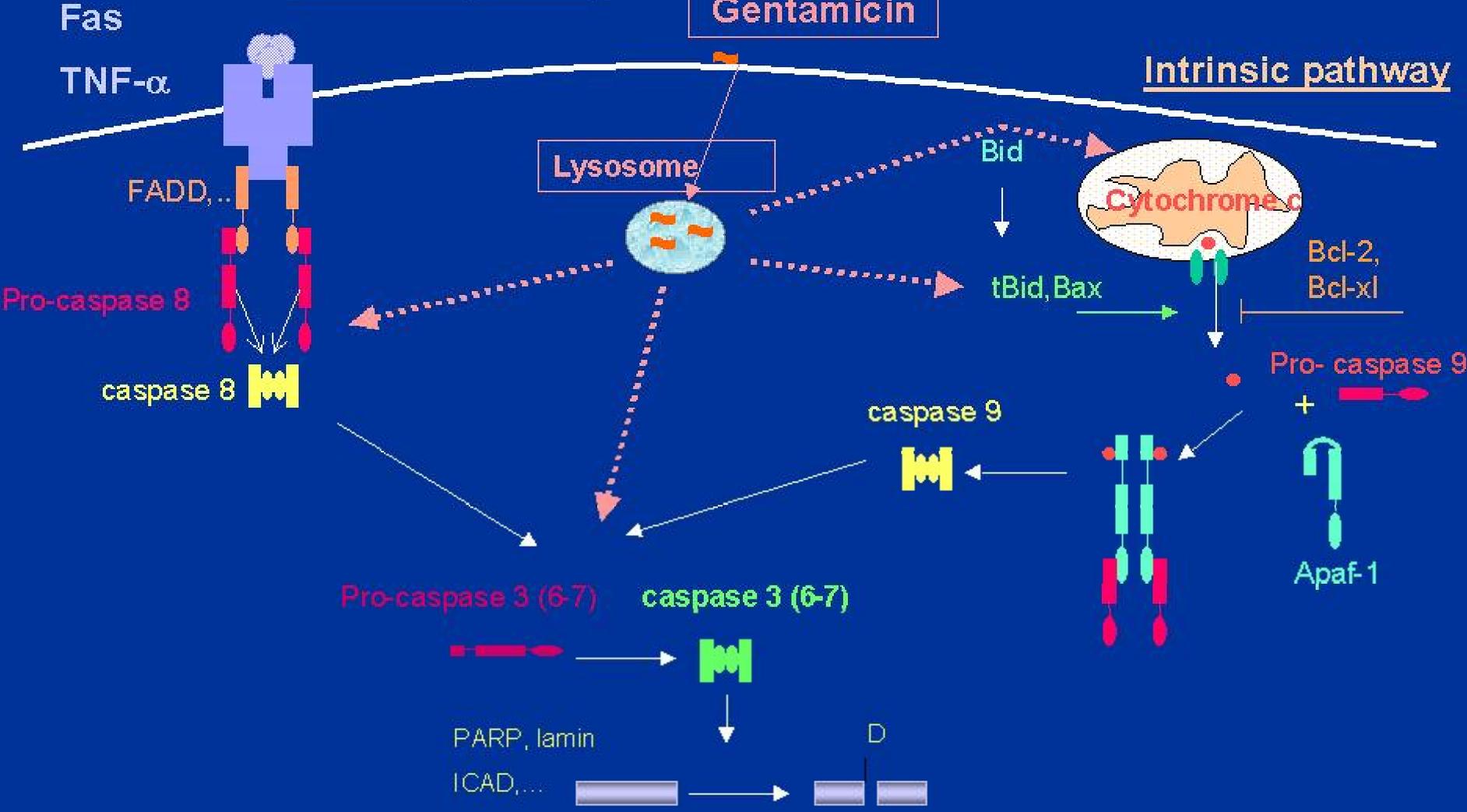


http://dialogica.com.ar/medline/archives/2004/07/apoptosis_celul.html

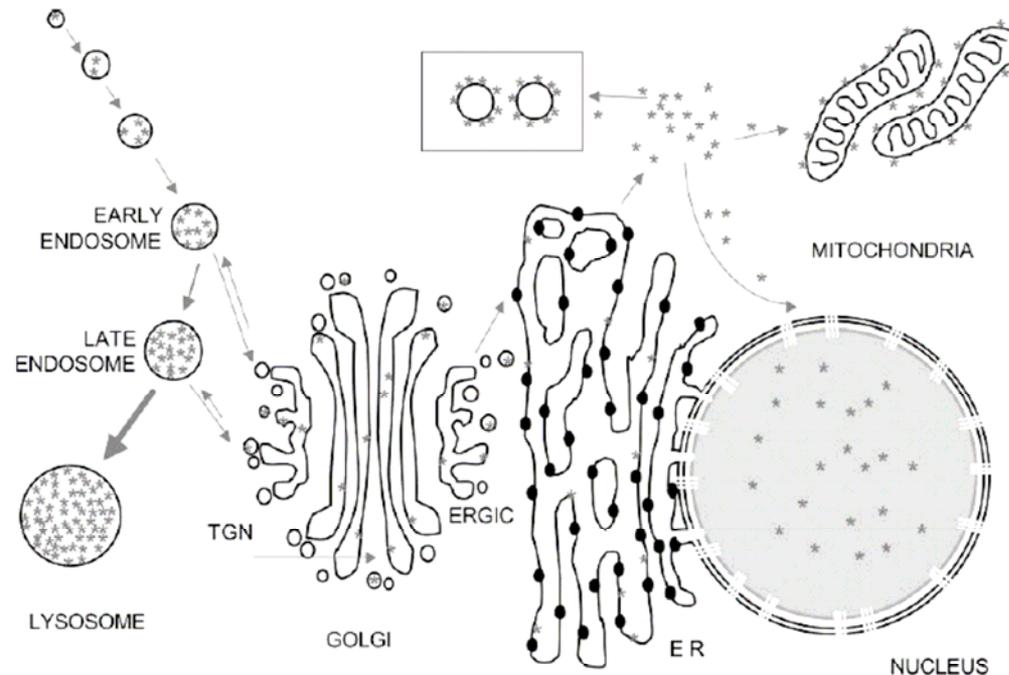
Extrinsic pathway

Gentamicin

Intrinsic pathway

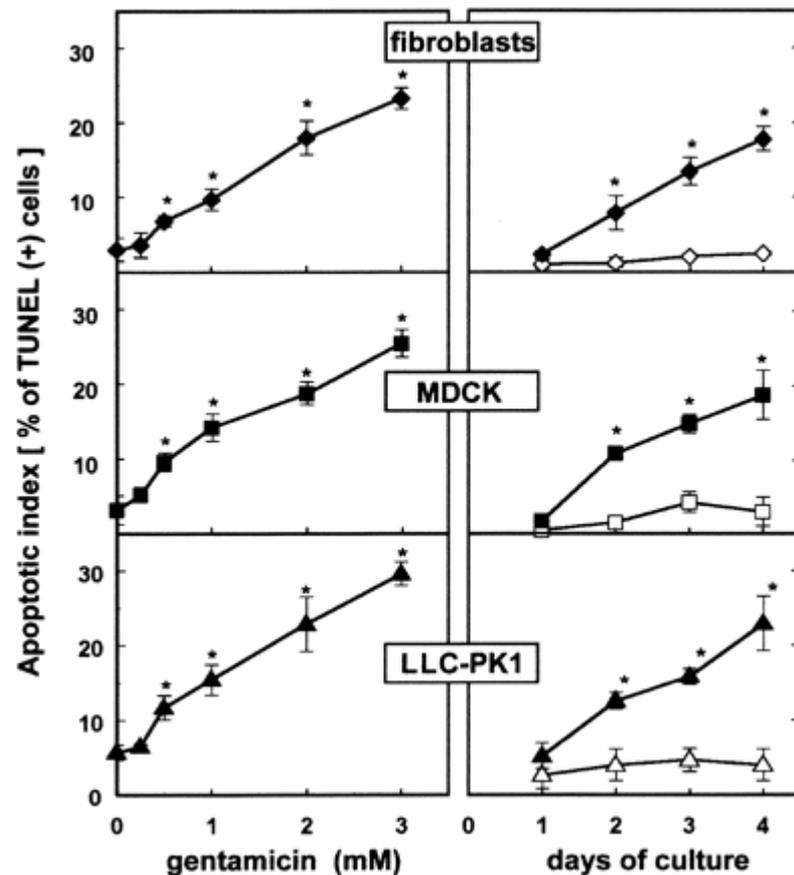


Rôle du réticulum endoplasmique



Sandoval and Molitoris, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2004 ; 286 : 617-624

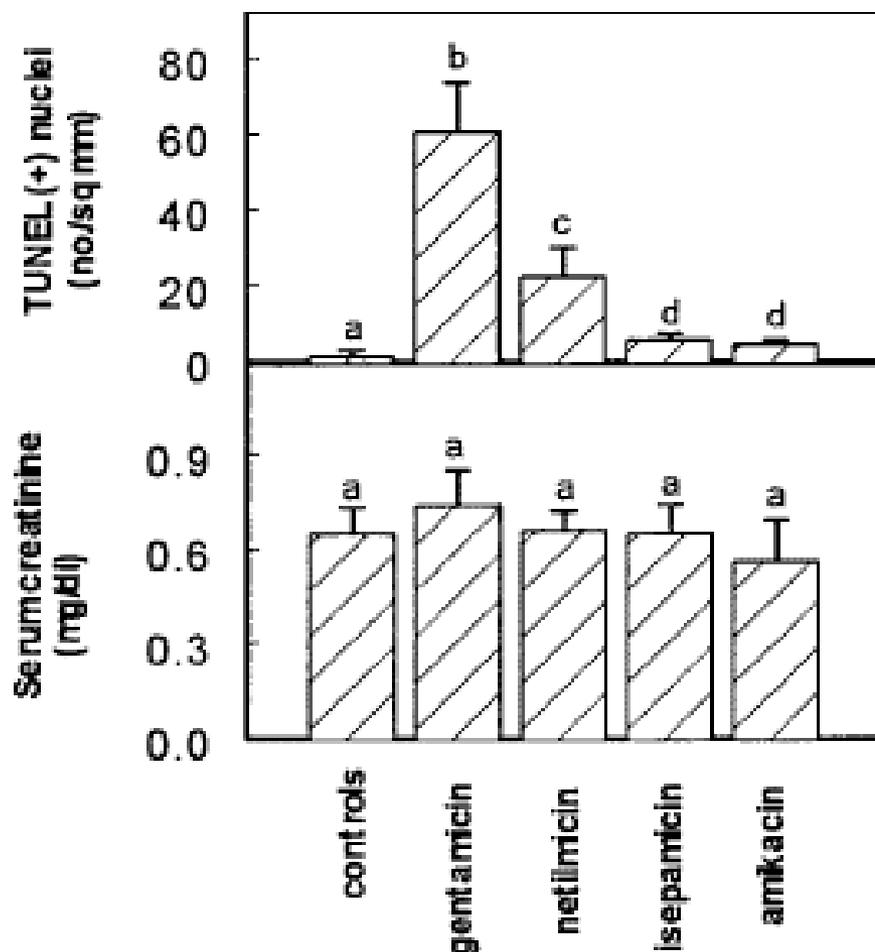
Apoptose *in vitro*



- Induction d'apoptose *in vitro* sur différents types cellulaires

El Mouedden et al., Toxicological Sciences 2000; 56 : 229-239

Néphrotoxicité *in vivo*



El Mouedden et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44 : 665-675

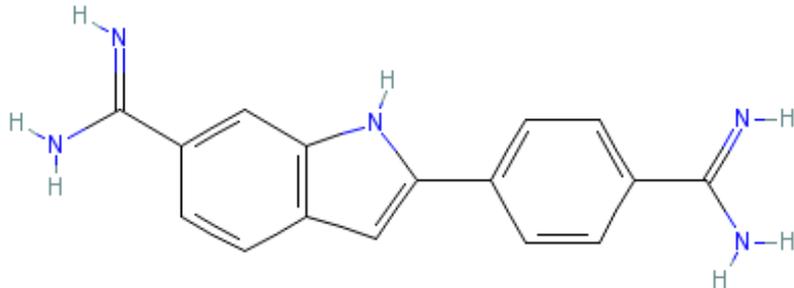
Objectifs du mémoire

- L'apoptose observée *in vitro* peut-elle constituer un marqueur prédictif de la toxicité d'aminoglycosides ?
- Meilleure compréhension du mécanisme d'induction d'apoptose par la gentamicine et l'amikacine

Modèles cellulaires et antibiotiques utilisés

- LLC-PK1 : lignée cellulaire provenant du tube contourné proximal de rein de porc
 - J774 : lignée de macrophages dérivée d'un réticulosarcome de souris
-
- Gentamicine : Geomycin® Pro injection 40 mg/ml, Schering-Plough, mélange de gentamicine C1, C1a et C2
 - Amikacine : Amukin®, solution injectable IV-IM 50 mg/ml, Bristol-Myers Squibb Belgium

Quantification du nombre de cellules en apoptose : technique du DAPI

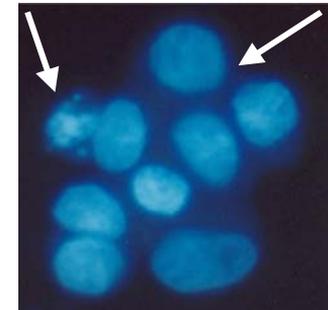


- 4', 6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
- Agent intercalant

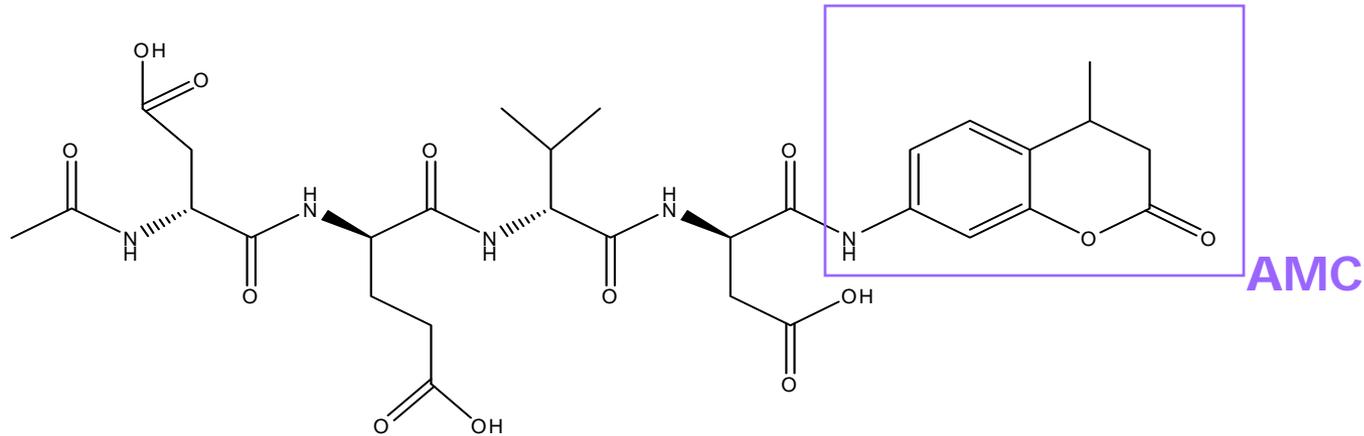
➔ Marquage des noyaux

Cellule apoptotique

Cellules non apoptotiques



Détermination de l'activité apoptogène d'un composé : dosage de l'activité de la caspase 3

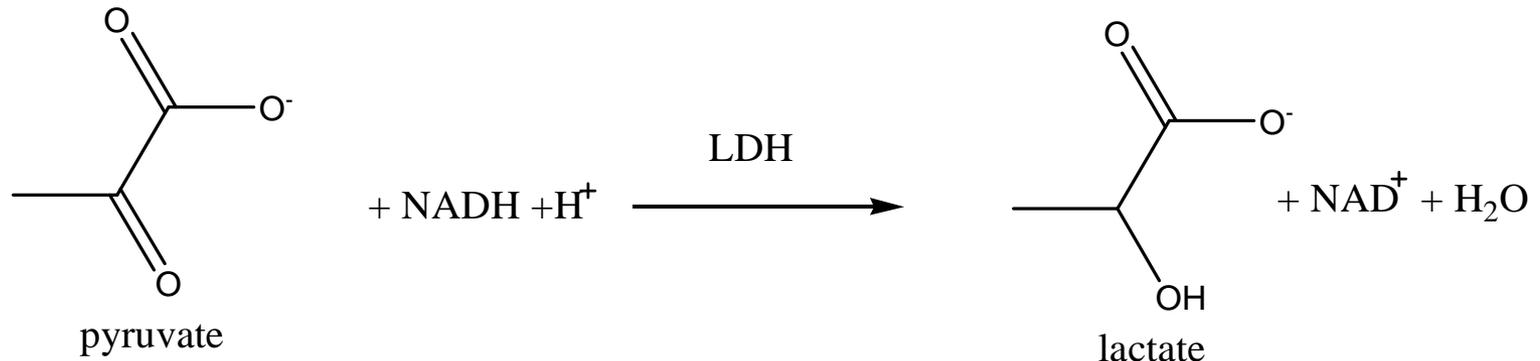


- Clivage du substrat Ac-DEVD par la caspase 3 et libération de l'AMC (7-amino-4-méthylcoumarine)

➡ Evaluation de l'activité de la caspase 3 (caspase effectrice)

Détermination de la cytotoxicité cellulaire : dosage de lactate déshydrogénase (LDH)

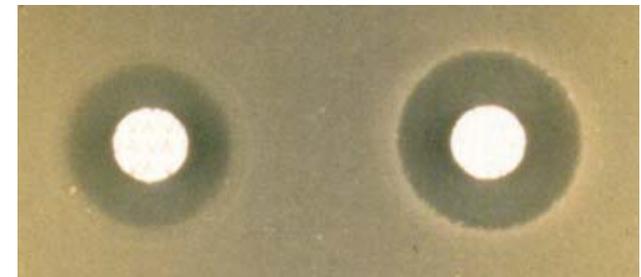
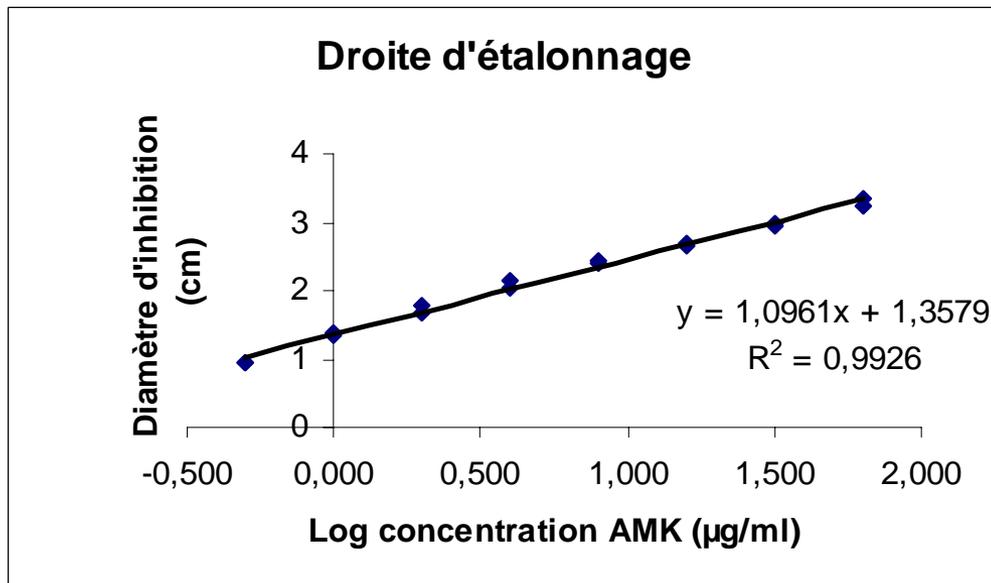
- Mesure de la consommation de NADH au cours de la réduction du pyruvate en lactate par la lactate déshydrogénase



➡ Évaluation du relargage de LDH dans le milieu

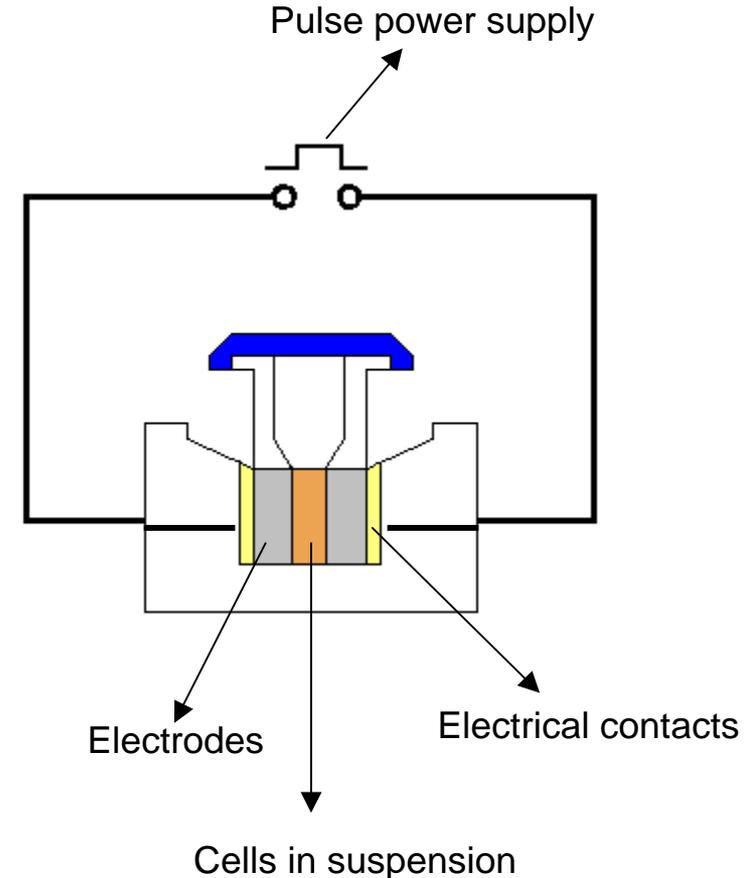
Évaluation de la concentration cellulaire en aminoglycosides : dosage microbiologique

- Détermination de la concentration en aminoglycosides grâce au diamètre d'inhibition de croissance de *Bacillus subtilis* induit par l'échantillon sur une gélose.



Electroporation

- Aminoglycosides directement amenés dans le cytosol
- Tampon d'électroporation contenant l'aminoglycoside
- 8 pulses d'ondes carrées, 800V/cm, 1ms
- Milieu de culture et incubation de 24h à 37°C sous 5% CO₂



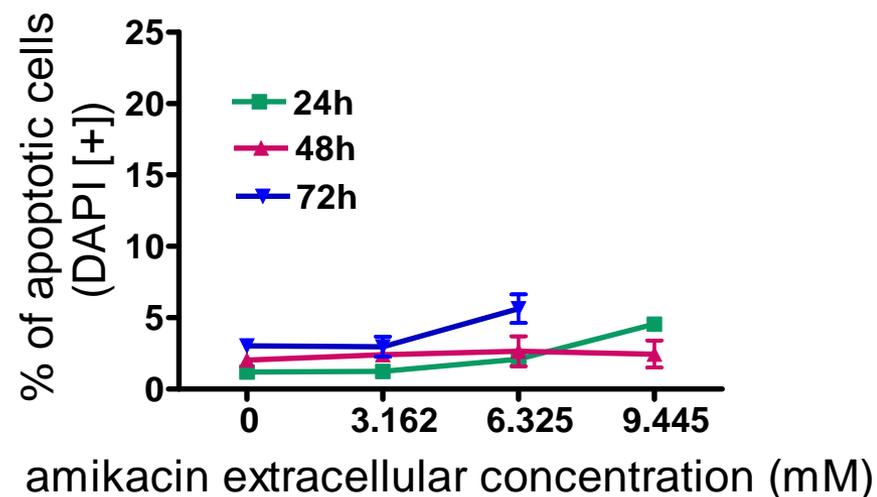
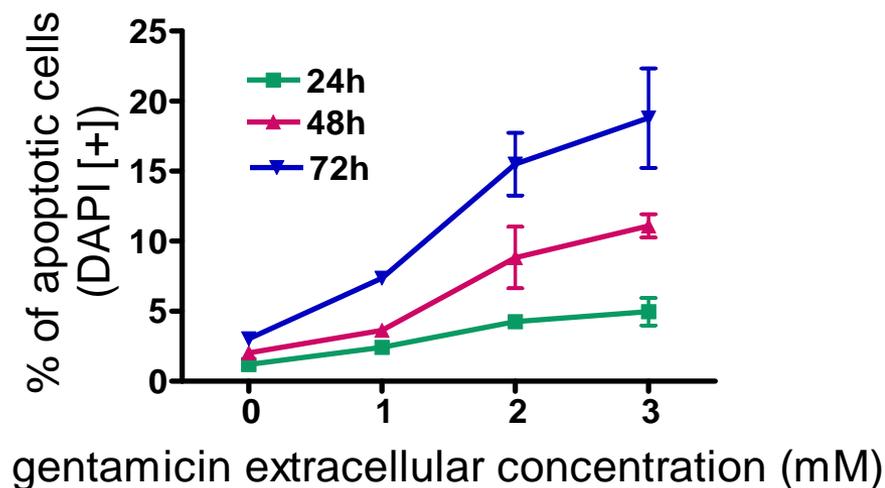
Autres techniques...

- Perméabilisation lysosomiale (acridine orange)
- Délocalisation du cytochrome c (fractionnement, immunoprécipitation, western blot)

Induction d'apoptose dans les LLC-PK1

Effet temps – effet concentration – gentamicine / amikacine

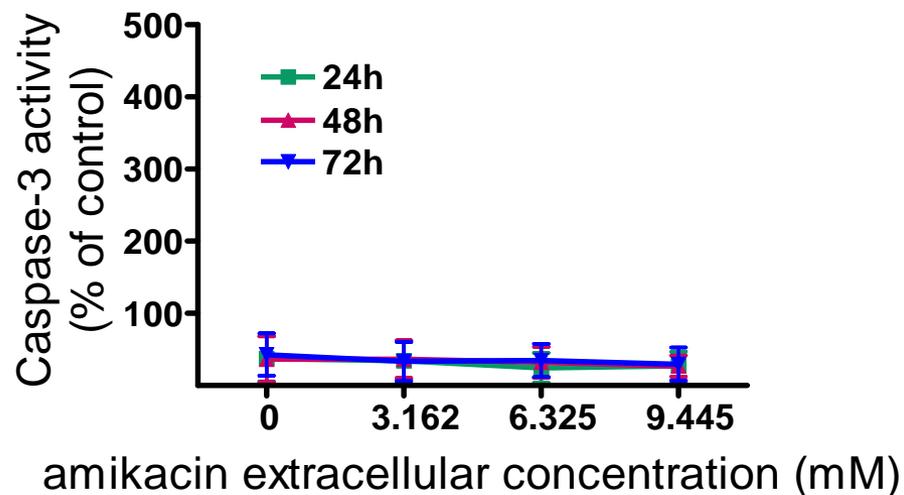
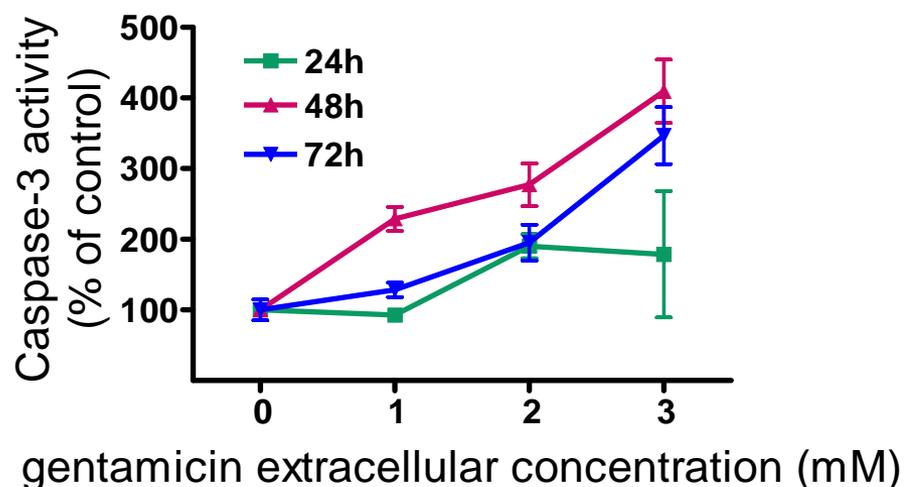
DAPI



Induction d'apoptose dans les LLC-PK1 (2)

Effet temps – effet concentration – gentamicine / amikacine

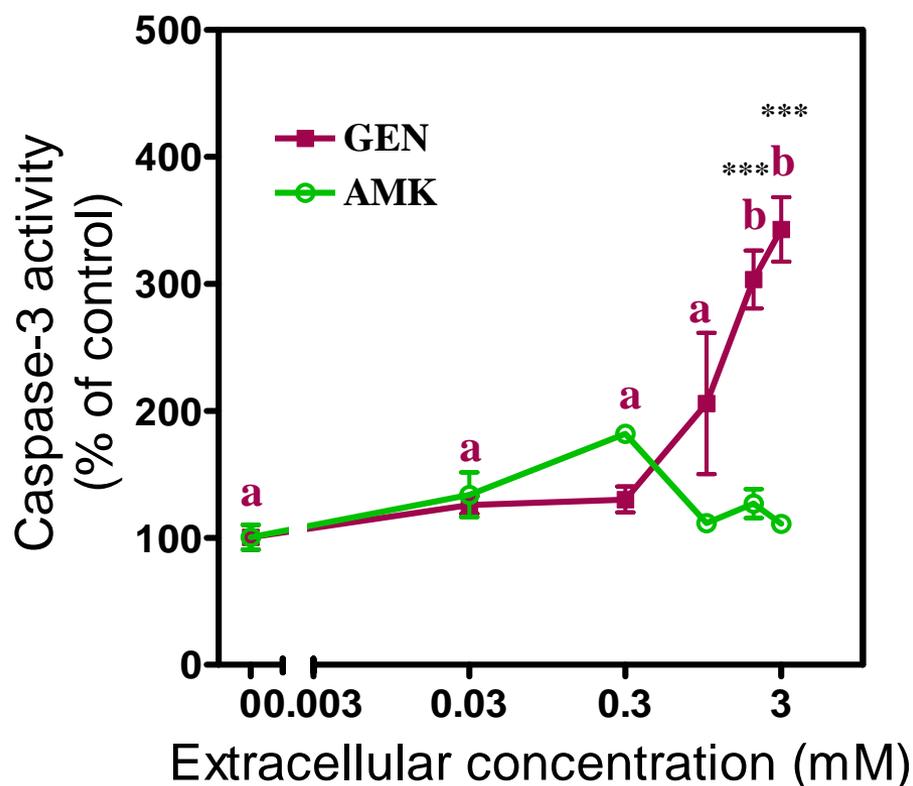
Caspase-3



Induction d'apoptose dans les LLC-PK1 (3)

Comparaison gentamicine / amikacine à 24h

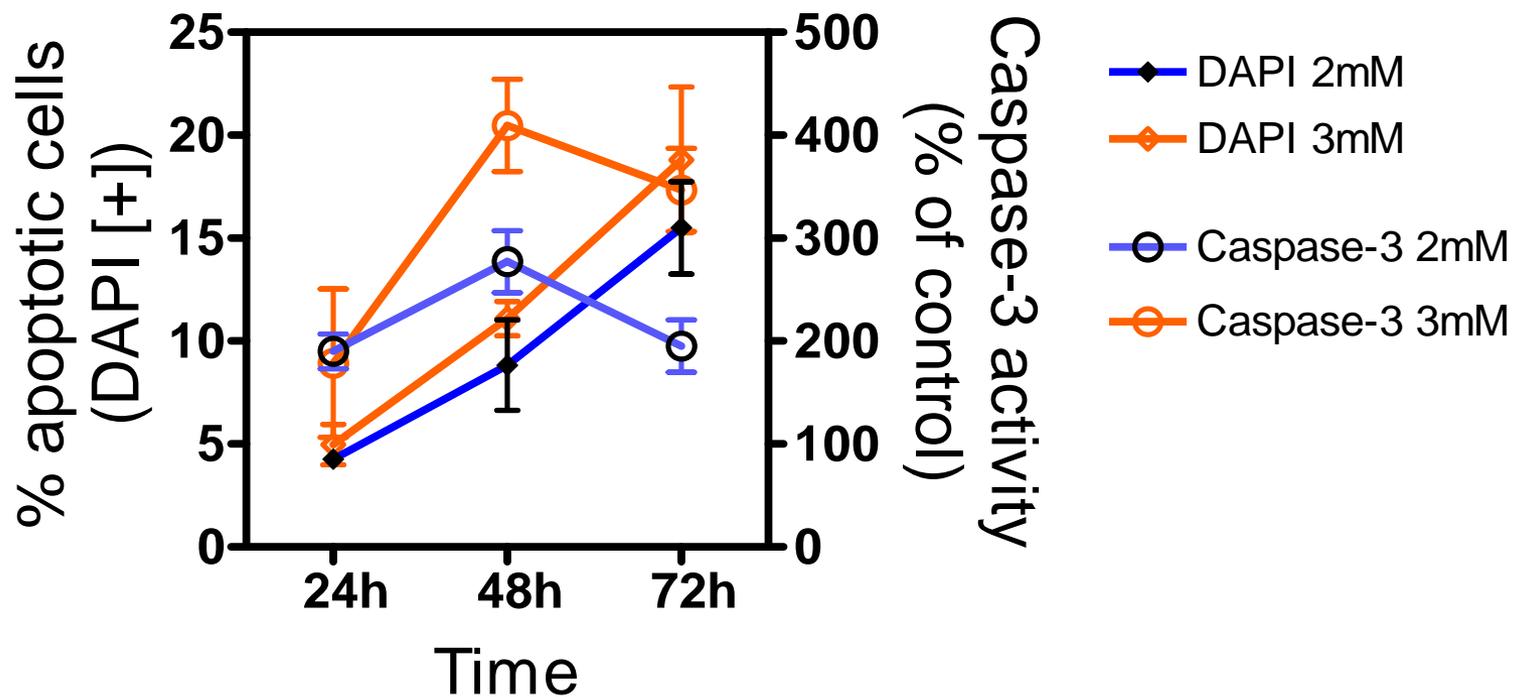
Caspase-3



Activité de la caspase-3 après 24h d'incubation avec de la gentamicine ou de l'amikacine

Induction d'apoptose dans les LLC-PK1(4)

Caspase-3 / DAPI en fonction de la concentration et du temps - Gentamicine

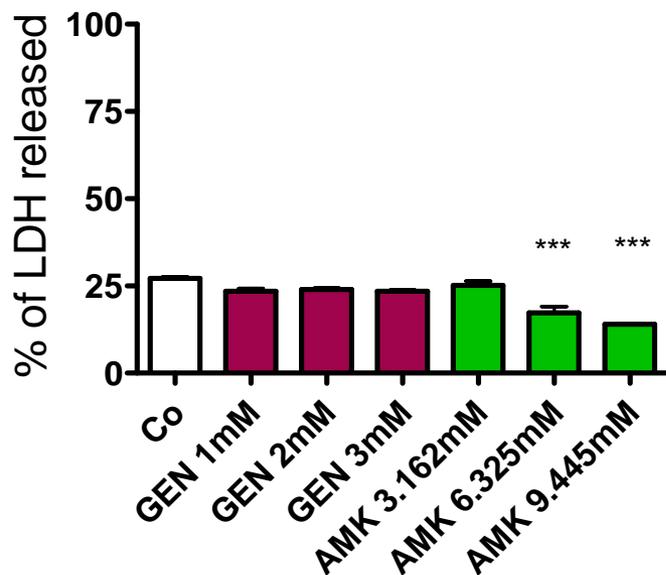


Induction de nécrose dans les LLC-PK1

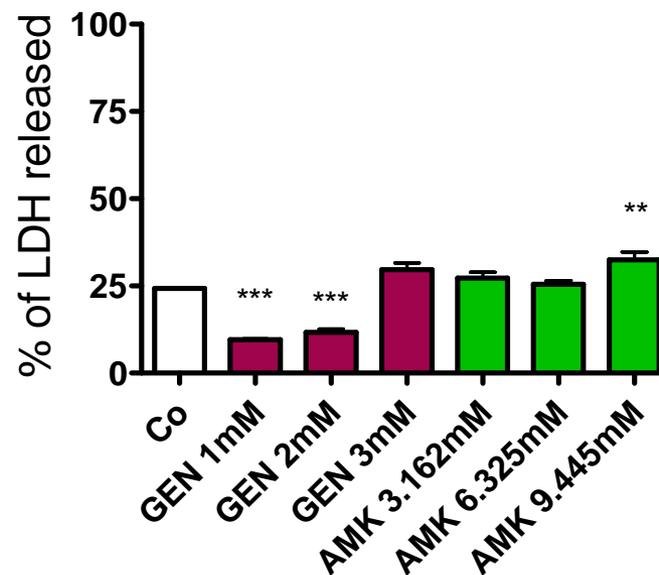
Effet temps – effet concentration – gentamicine / amikacine

LDH

incubation 24h



incubation 72h

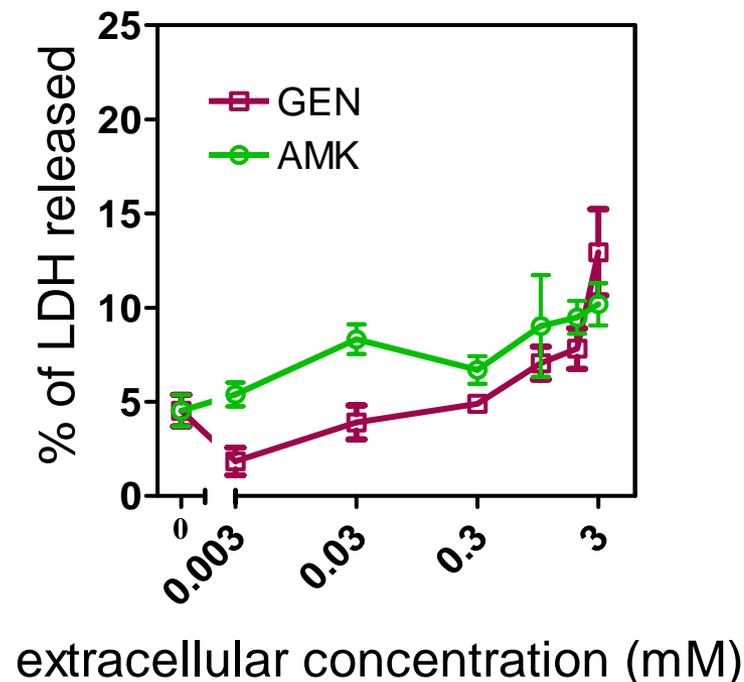
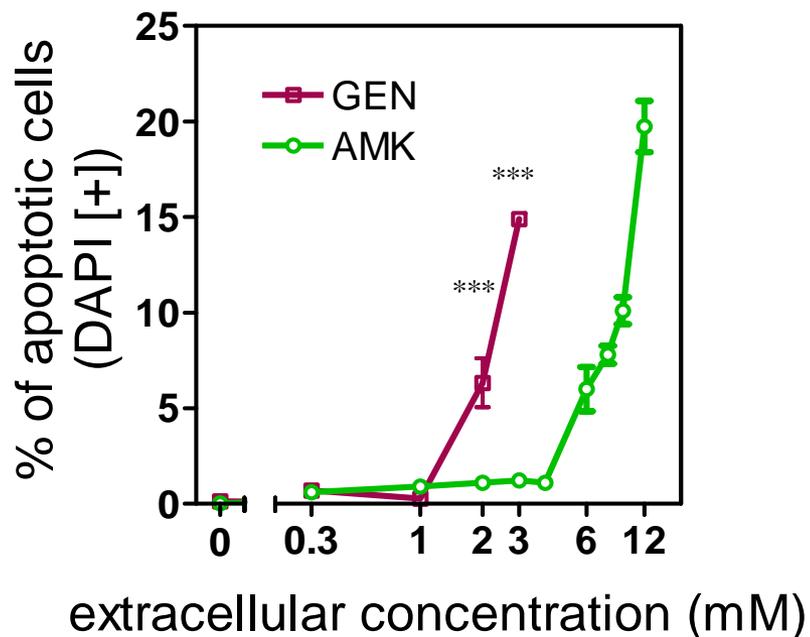


 Mise en évidence *in vitro* d'une différence significative entre l'effet apoptogène de la gentamicine et celui de l'amikacine, qui reflète leur toxicité *in vivo*.

Généralisation des résultats à une autre lignée cellulaire (macrophages J774)

Effet concentration gentamicine / amikacine – Incubation 24h

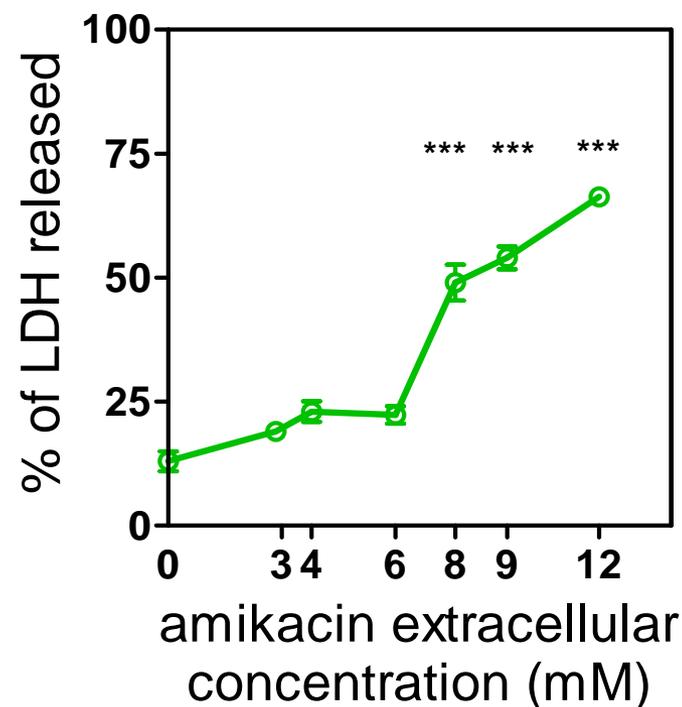
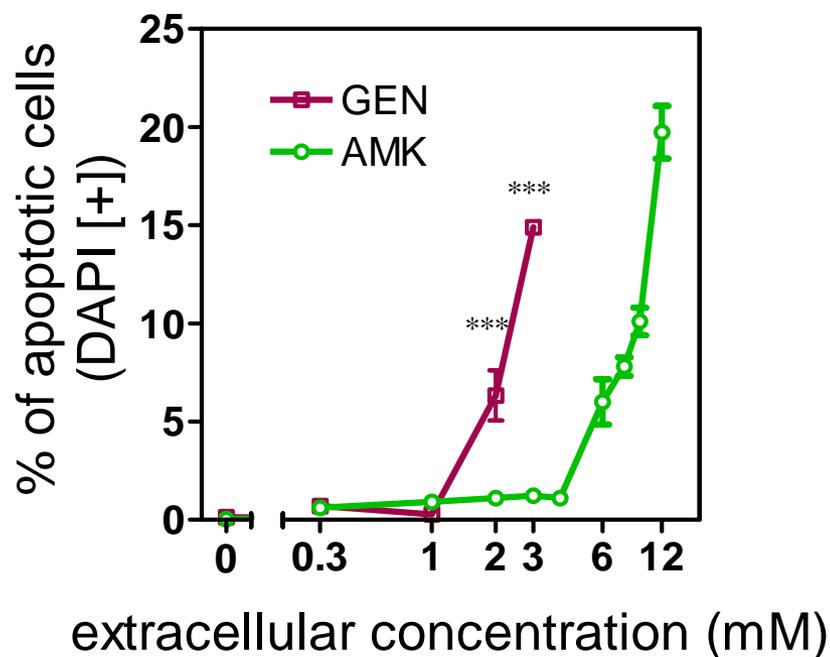
DAPI - LDH



Généralisation des résultats à une autre lignée cellulaire (macrophages J774)

Effet concentration gentamicine / amikacine – Incubation 24h

DAPI - LDH



→ Reproductibilité des résultats dans un autre type cellulaire

Mécanisme d'induction d'apoptose...

- Importance de la quantité d'aminoglycosides accumulée au sein des cellules
- Rôle des aminoglycosides dans le cytosol (électroporation)

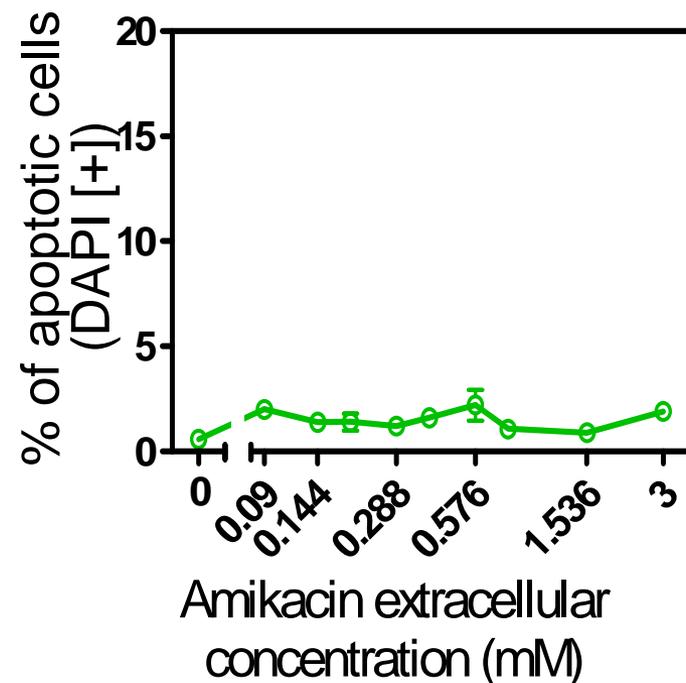
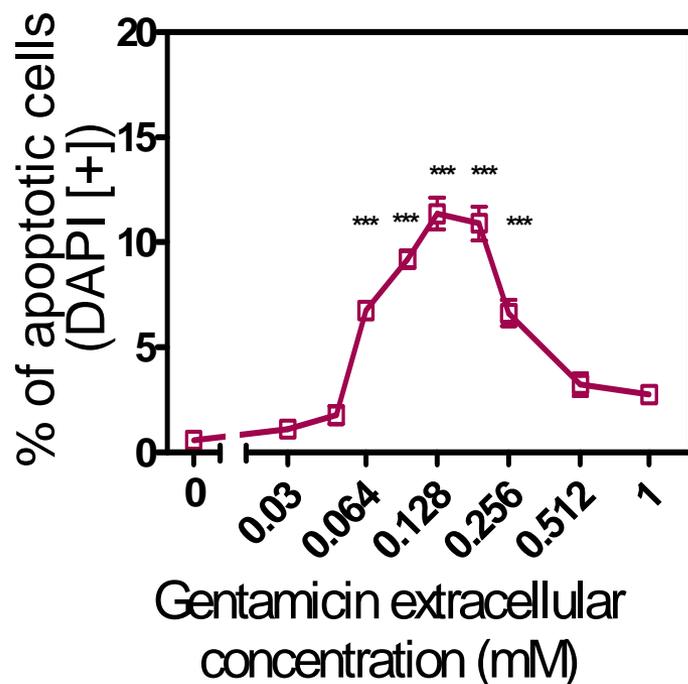
Accumulation des aminoglycosides au sein des cellules

	Cc/Ce	Toxicité (apoptose)
GEN	4	+++
AMK	2.5	+

Induction d'apoptose par les aminoglycosides dans le cytosol des cellules LLC-PK1

Effet concentration – gentamicine / amikacine

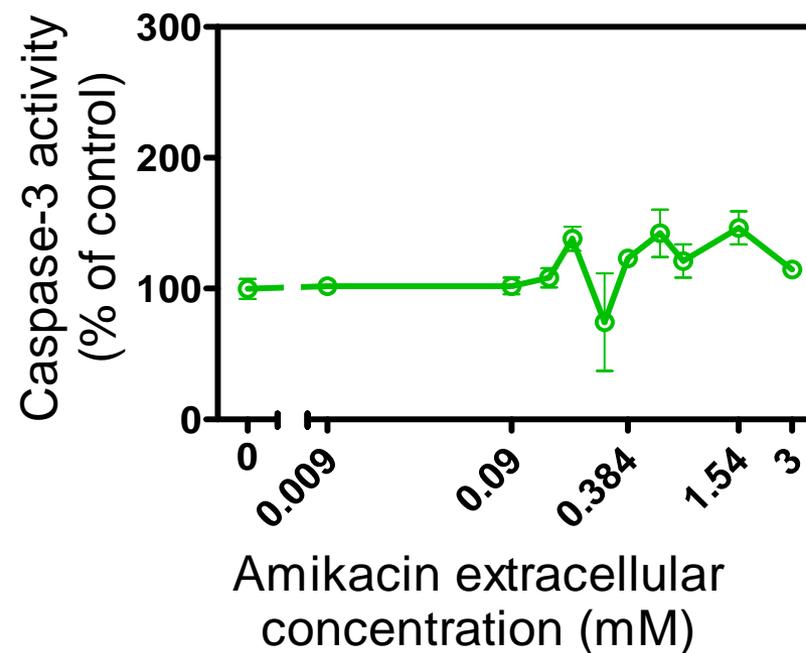
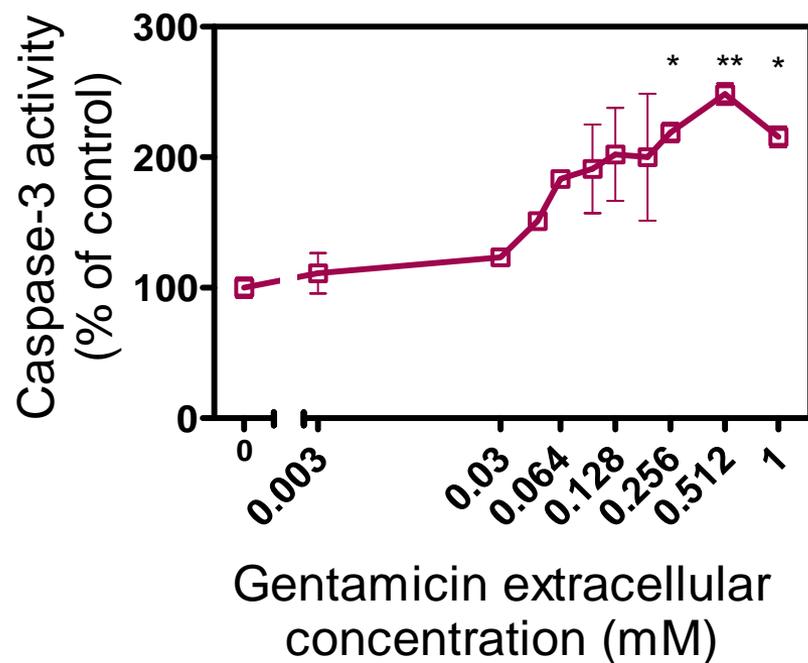
DAPI après électroporation



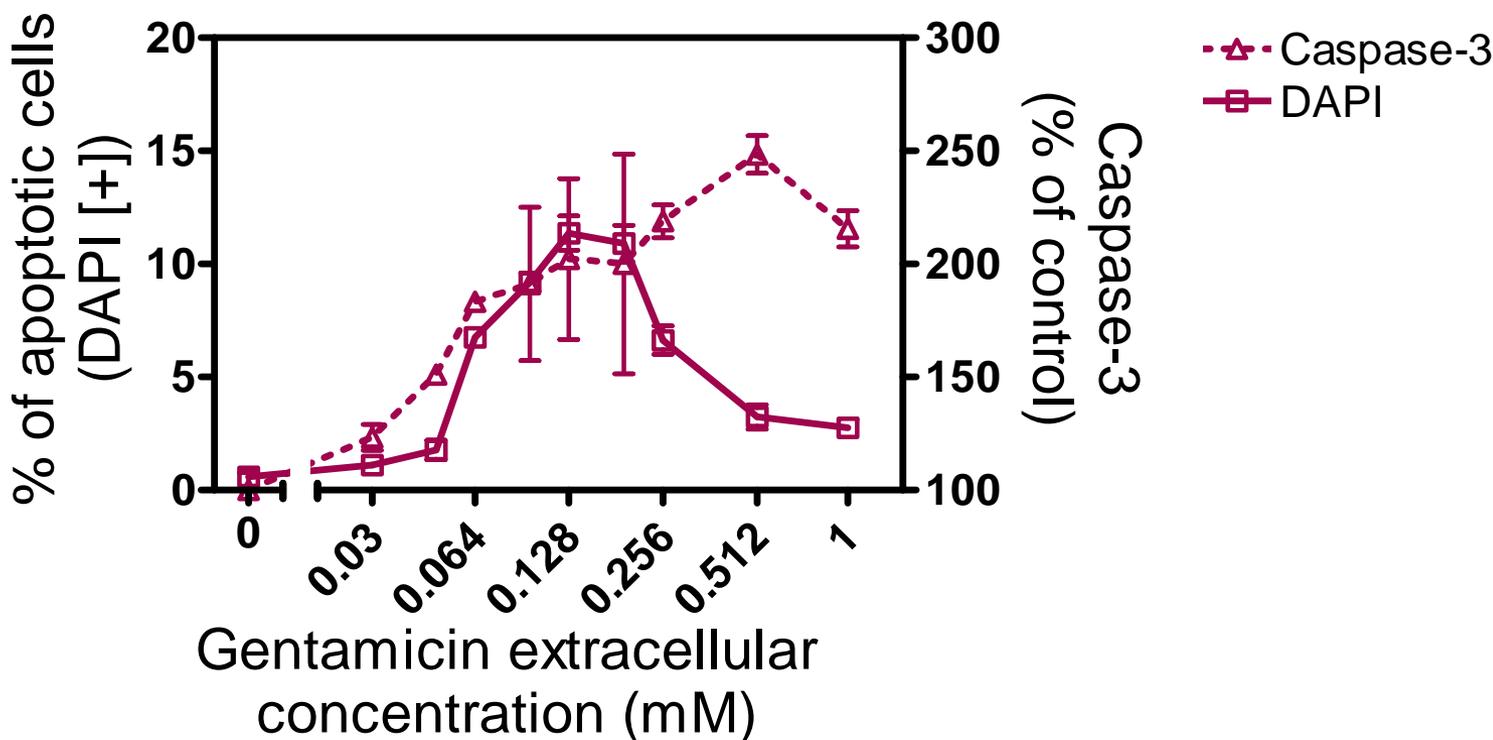
Induction d'apoptose par les aminoglycosides dans le cytosol (2)

Effet concentration – gentamicine / amikacine

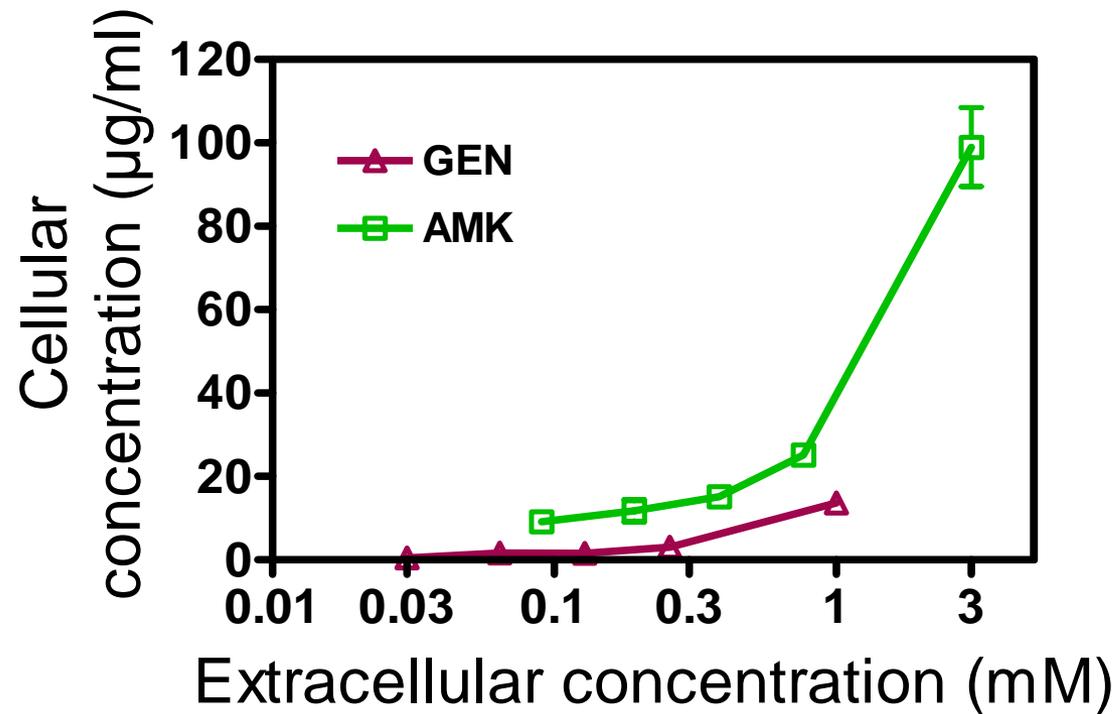
Dosage activité caspase-3 après électroporation



Induction d'apoptose par les aminoglycosides dans le cytosol (3)



Accumulation après électroporation



Accumulation après électroporation (2)

	Cc/Ce	Toxicité (apoptose)
GEN	6	+++
AMK	11.3	+

- ➔ Comme dans les cellules incubées, la gentamicine induit nettement plus d'apoptose que l'amikacine
- ➔ L'effet apoptotique est détectable à des concentrations beaucoup plus faibles lorsque les cellules sont électroporées
- ➔ Le rapport C_c/C_e dans les cellules électroporées n'est pas directement lié à la quantité d'apoptose induite, alors que ces facteurs semblent être en relation directe dans les cellules incubées

Apoptose *in vitro* vs toxicité *in vivo*

- Mise en évidence d'une différence significative entre l'effet apoptogène de la gentamicine et celui de l'amikacine, qui reflète leur toxicité *in vivo*.

➡ l'apoptose pourrait être un bon marqueur prédictif de la toxicité induite *in vivo* par des aminoglycosides.

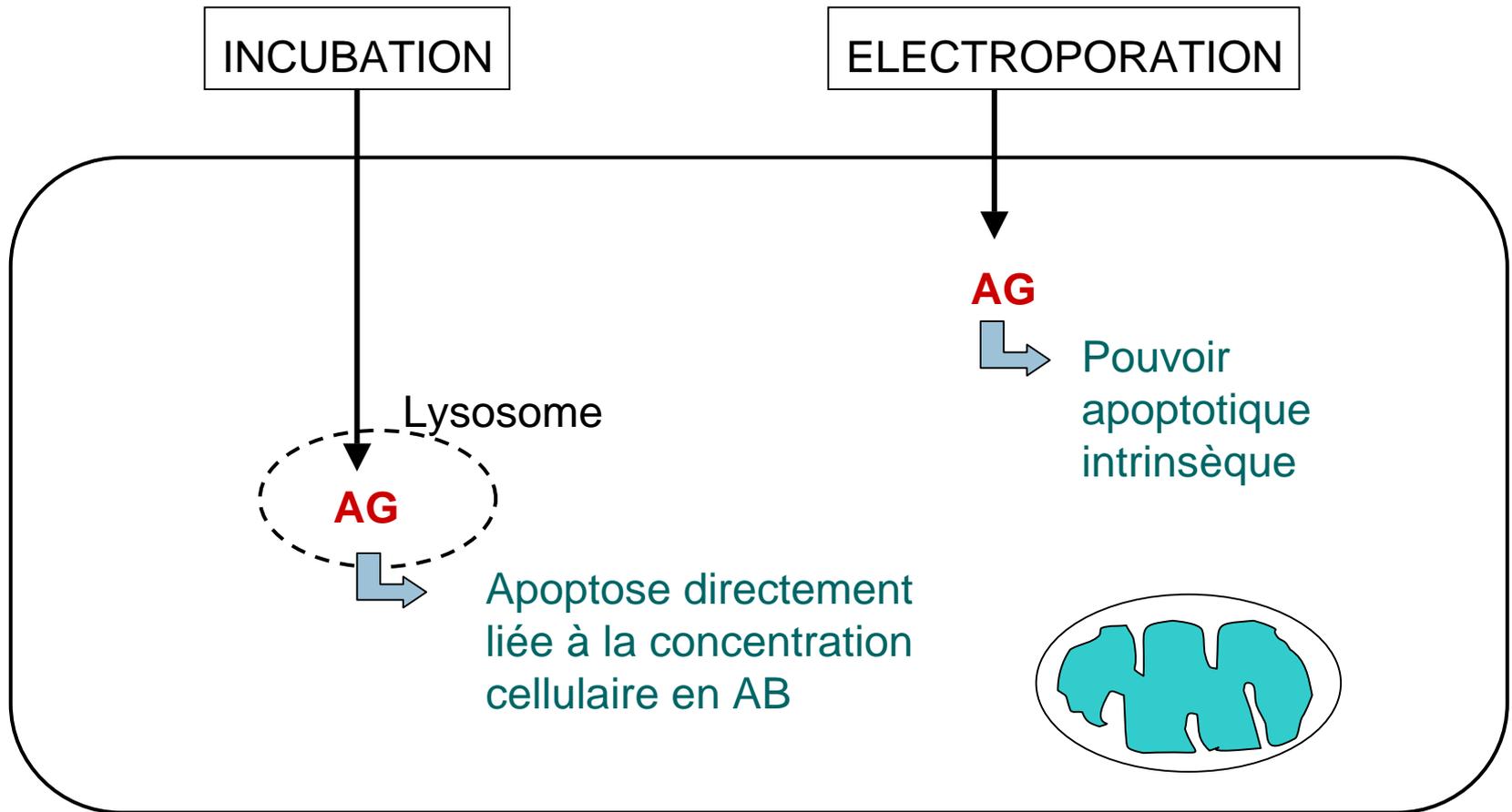
Apoptose, bon marqueur prédictif ?

- Élargissement de l'étude à d'autres aminoglycosides : molécules déjà commercialisées (ex : isépamicine) et des molécules en développement (ex : sous composés de la gentamicine)

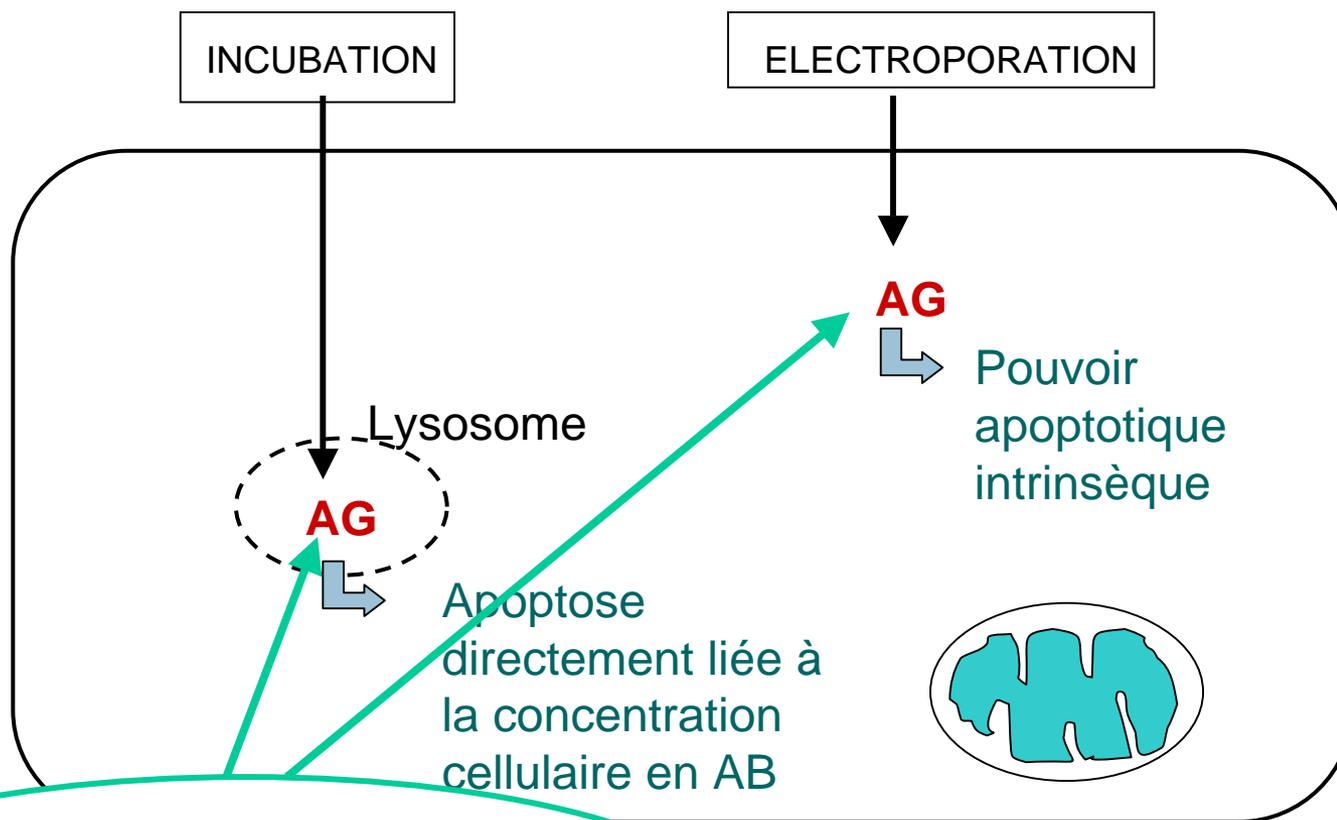
Modèles cellulaires

- Résultats observés sur les LLC-PK1 généralisables à un autre type cellulaire (macrophages J774)
 - Accumulation semblable dans les deux types cellulaires
 - ➔ capture indépendante de la mégaline dans les LLC-PK1
- ↩ Perspective : utilisation de cellules LLC-PK1 exprimant la mégaline

Compréhension du mécanisme (1)

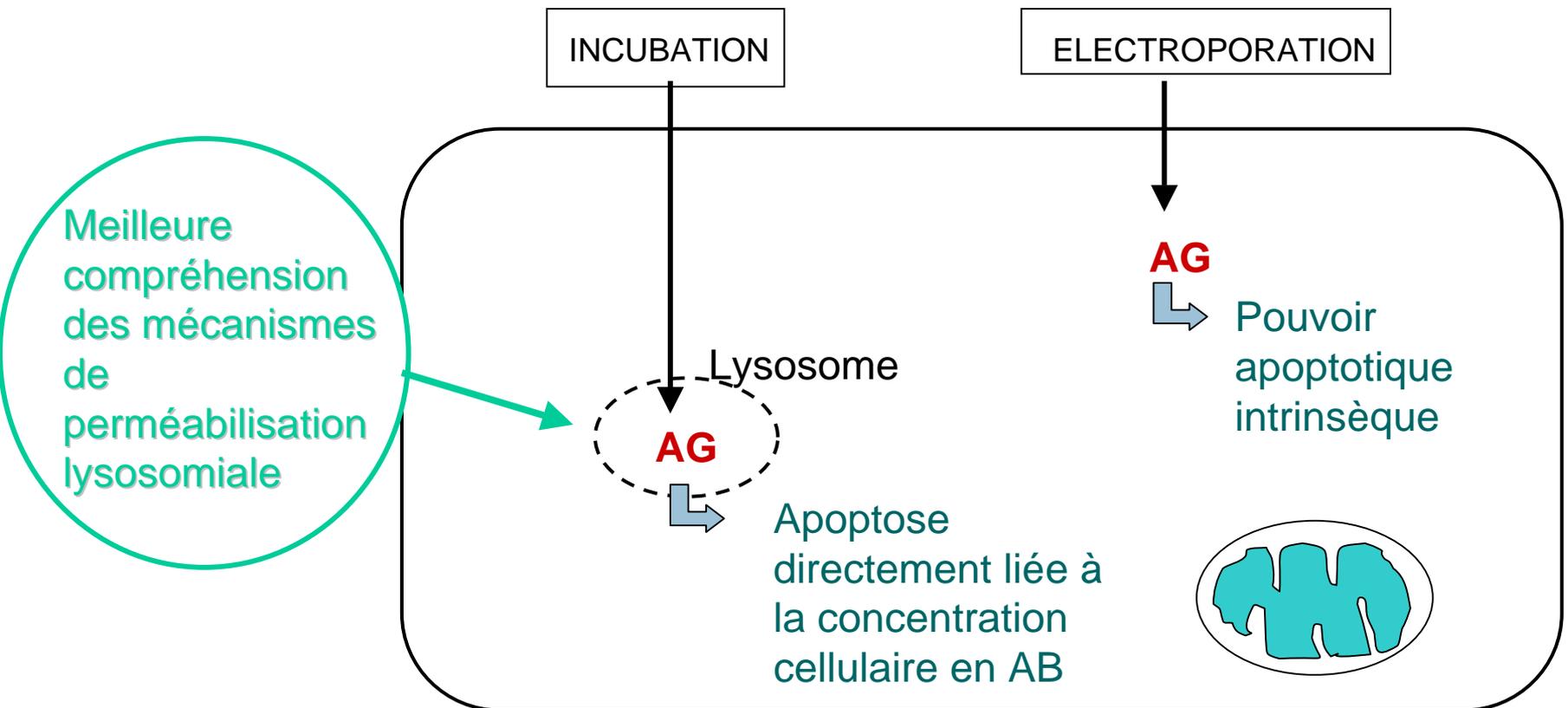


Compréhension du mécanisme (2)

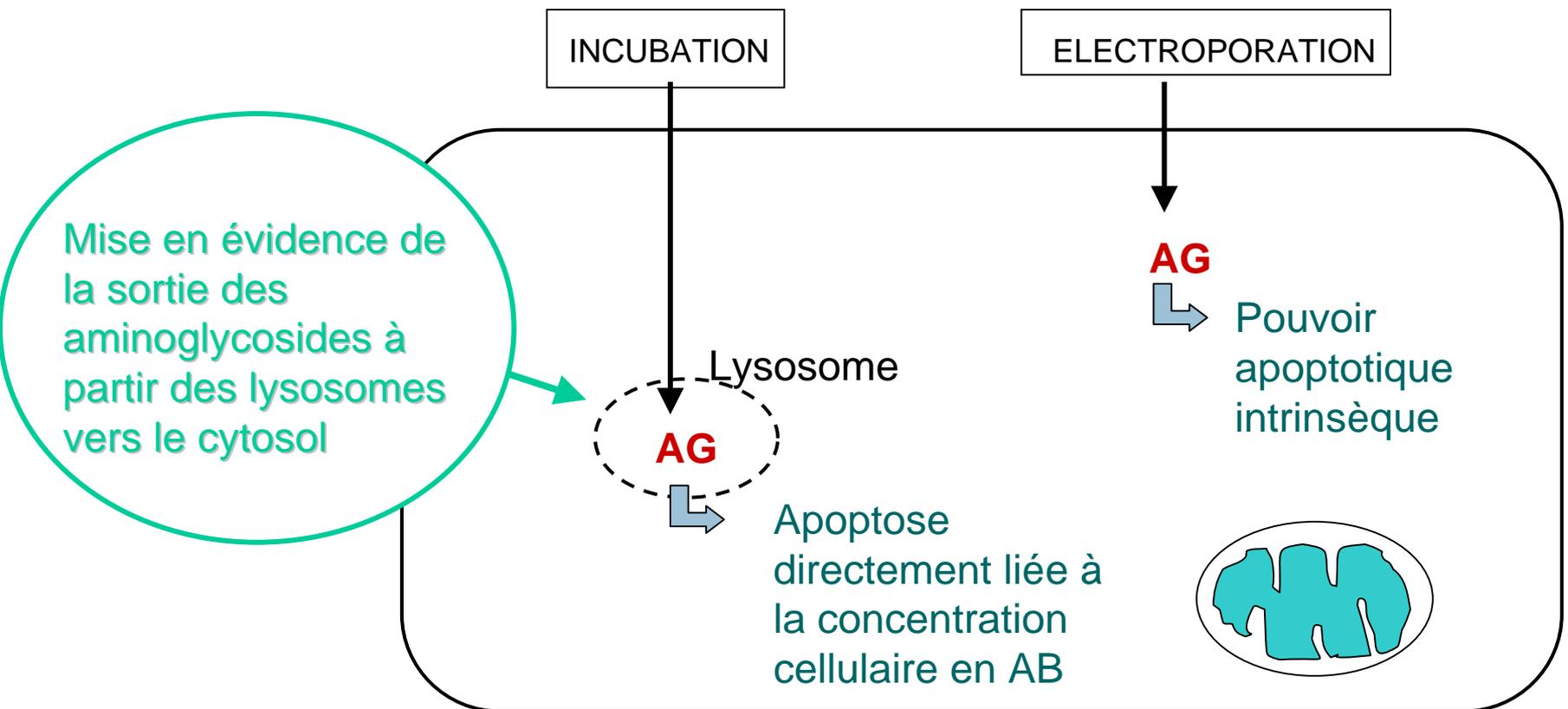


Vérification de la localisation subcellulaire des aminoglycosides après incubation et électroporation

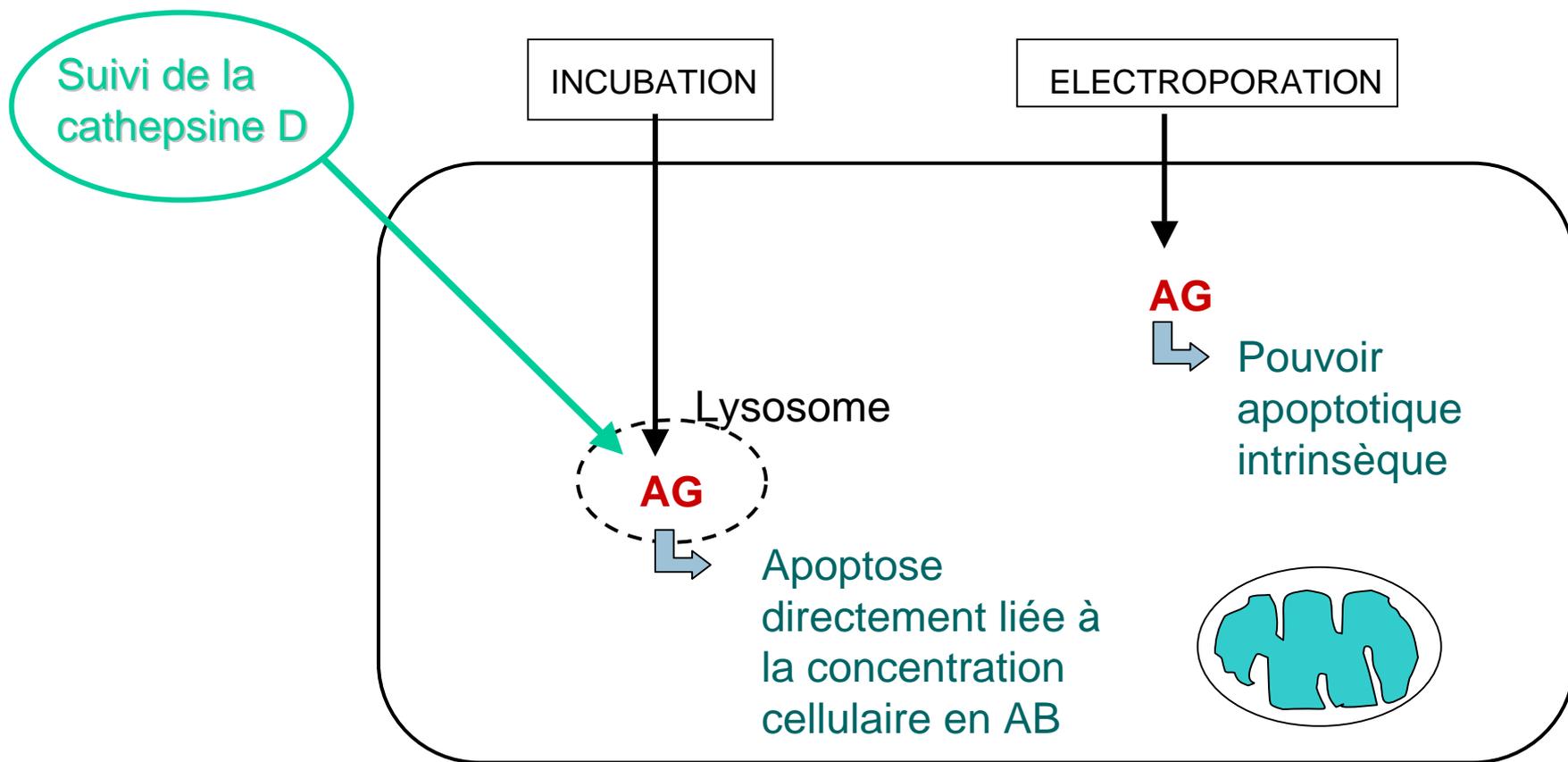
Compréhension du mécanisme (3)



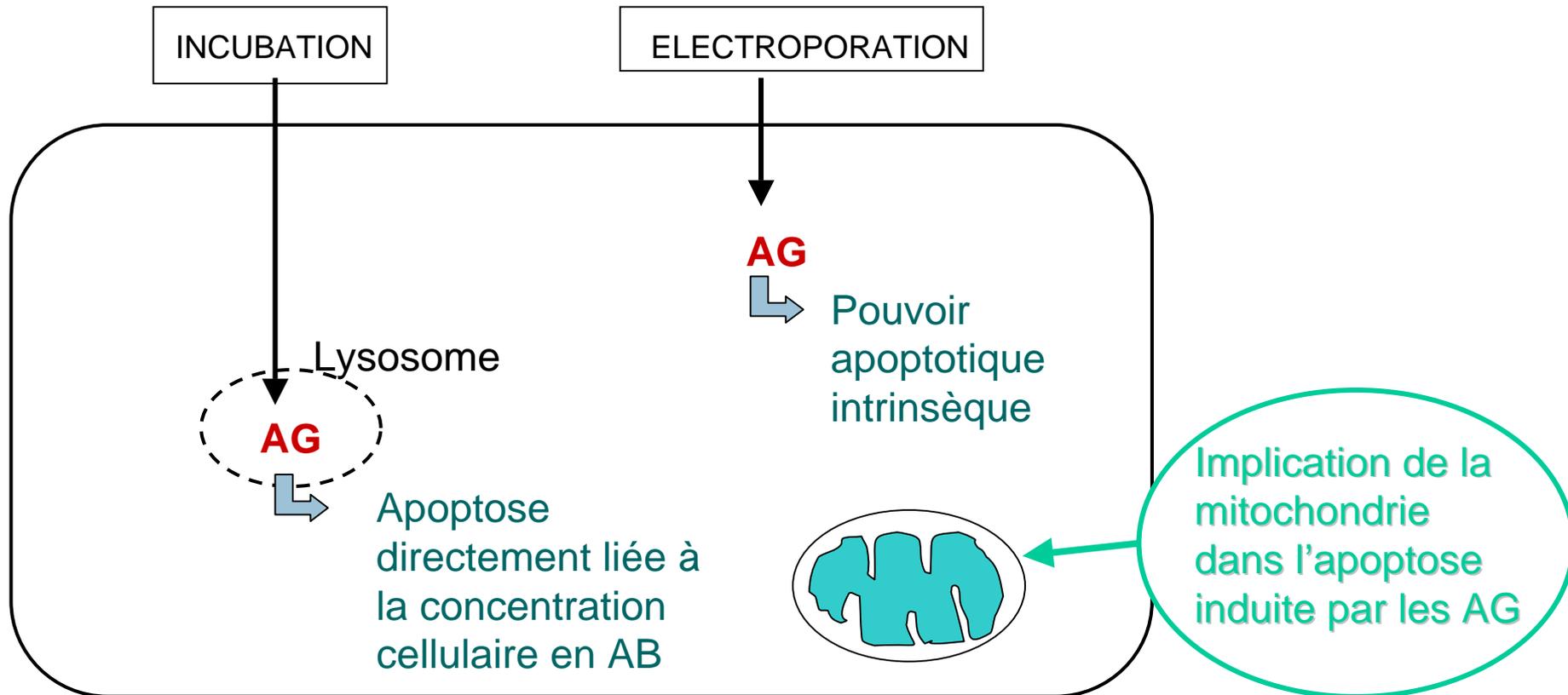
Compréhension du mécanisme (4)



Compréhension du mécanisme (5)



Compréhension du mécanisme (6)





A ma promotrice, Madame le Professeur
M.P. Mingeot-Leclercq,

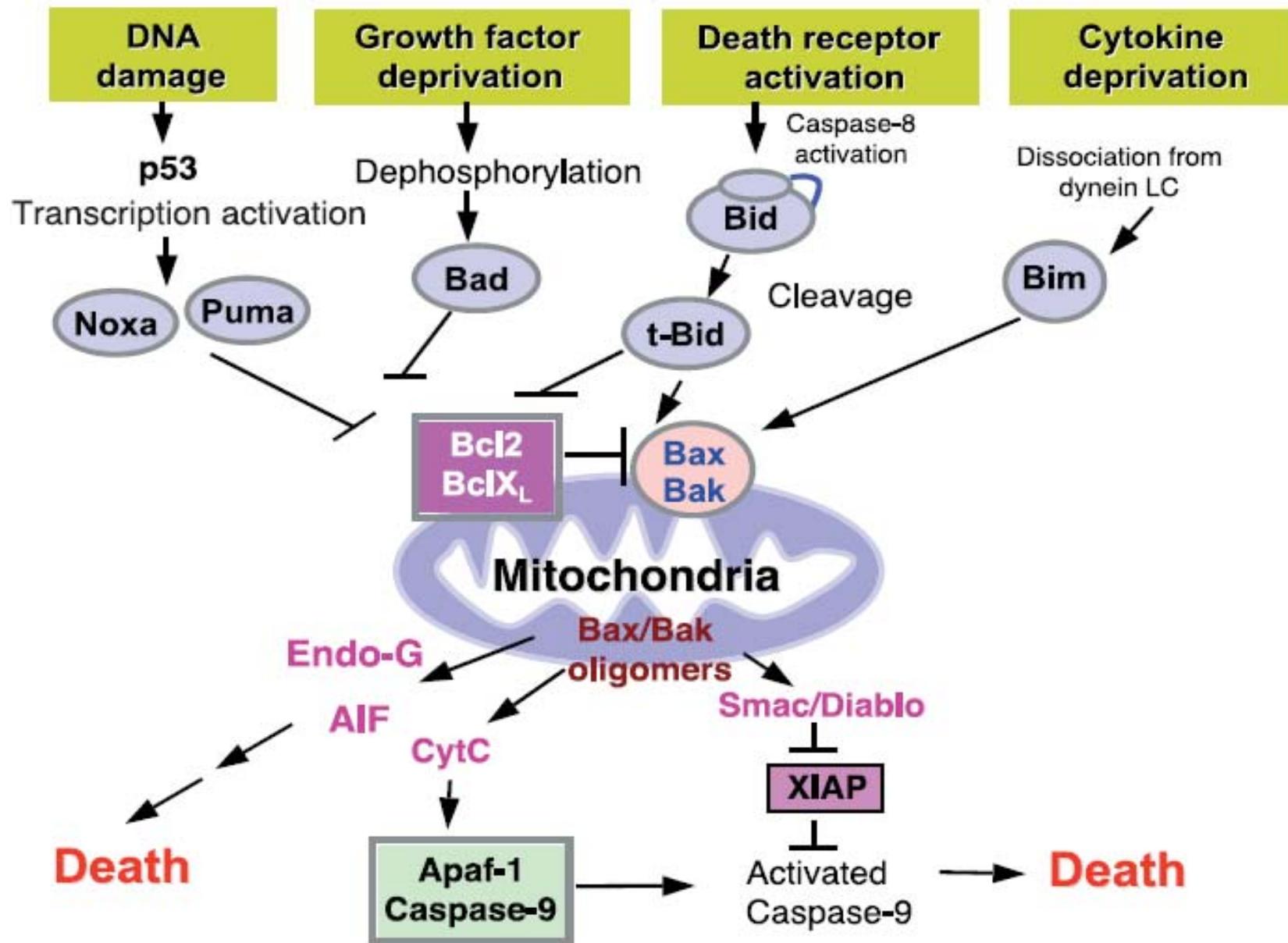
aux Professeurs F. Van Bambeke et P.
Tulkens,

à tous les membres de l'équipe FACM,

Merci...

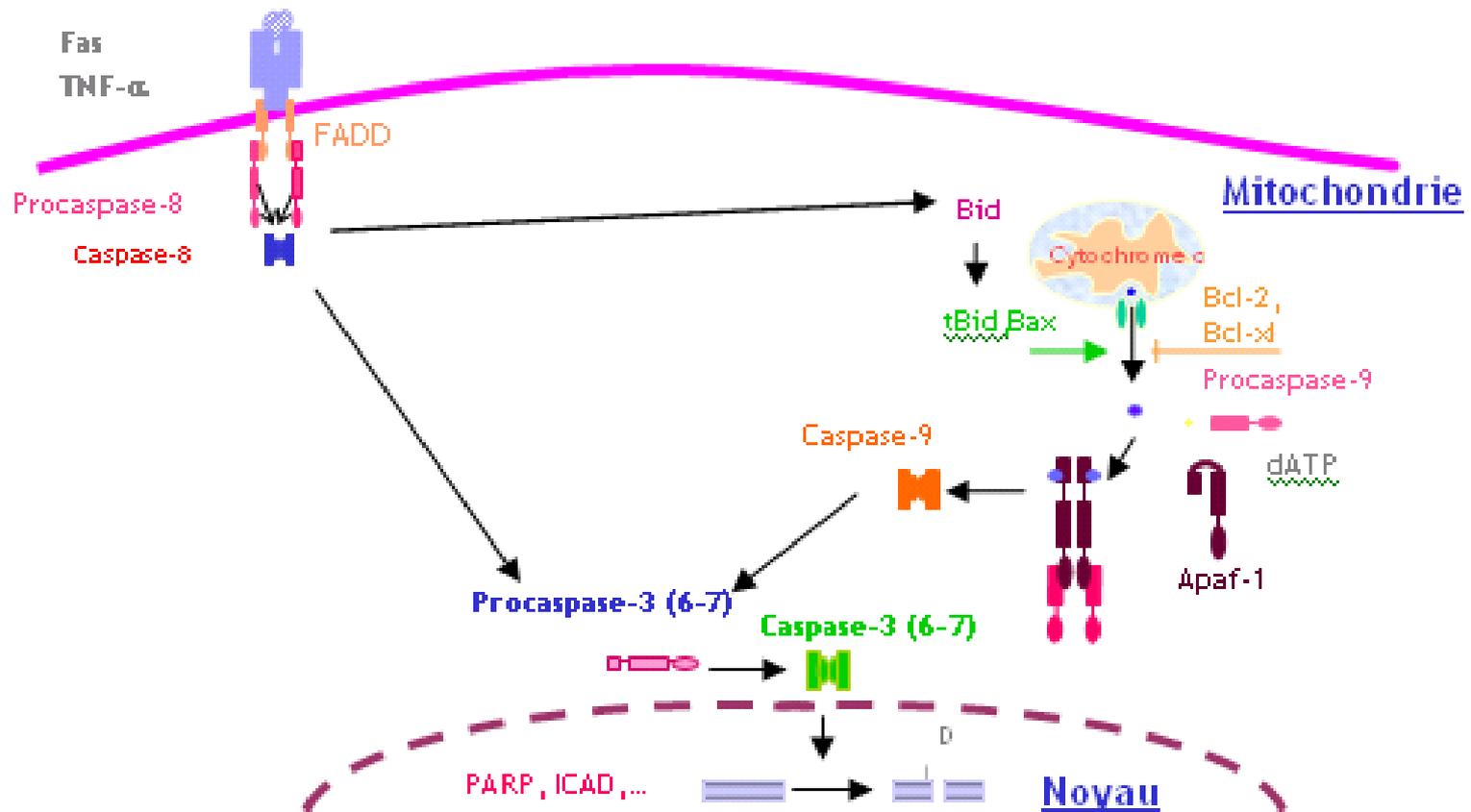
CMI's moyennes (mg/l) des aminoglycosides pour des bactéries pathogènes courantes

	GENTA	AMIKA
<i>Staph. aureus</i>	0.25	1
Coagulase-negative staphylococci	0.03	0.25
<i>Str. pyogenes</i>	4	32
<i>Str. pneumoniae</i>	4	64
<i>E. faecalis</i>	16	128
<i>N. meningitidis</i>	16	32
<i>N. gonorrhoeae</i>	4	16
<i>H. influenzae</i>	0.5	1
<i>E. coli</i>	0.5	2
<i>K. pneumoniae</i>	0.5	2
<i>B. fragilis</i>	R	R
<i>M. tuberculosis</i>	R	1



Voie extrinsèque

Voie intrinsèque

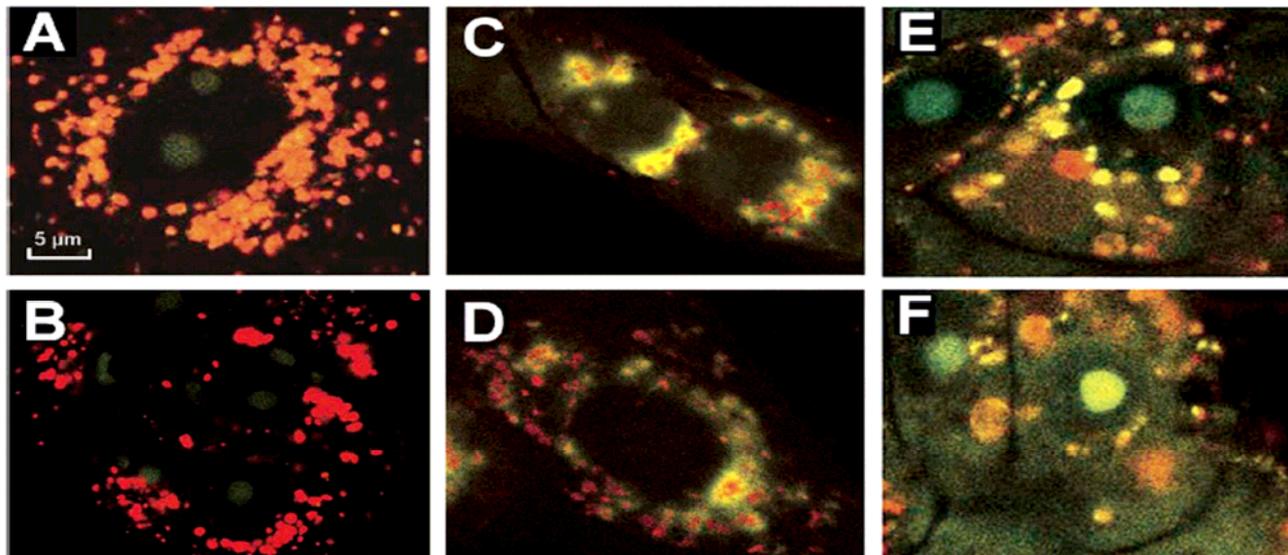


Perméabilisation des lysosomes

Control – 4h

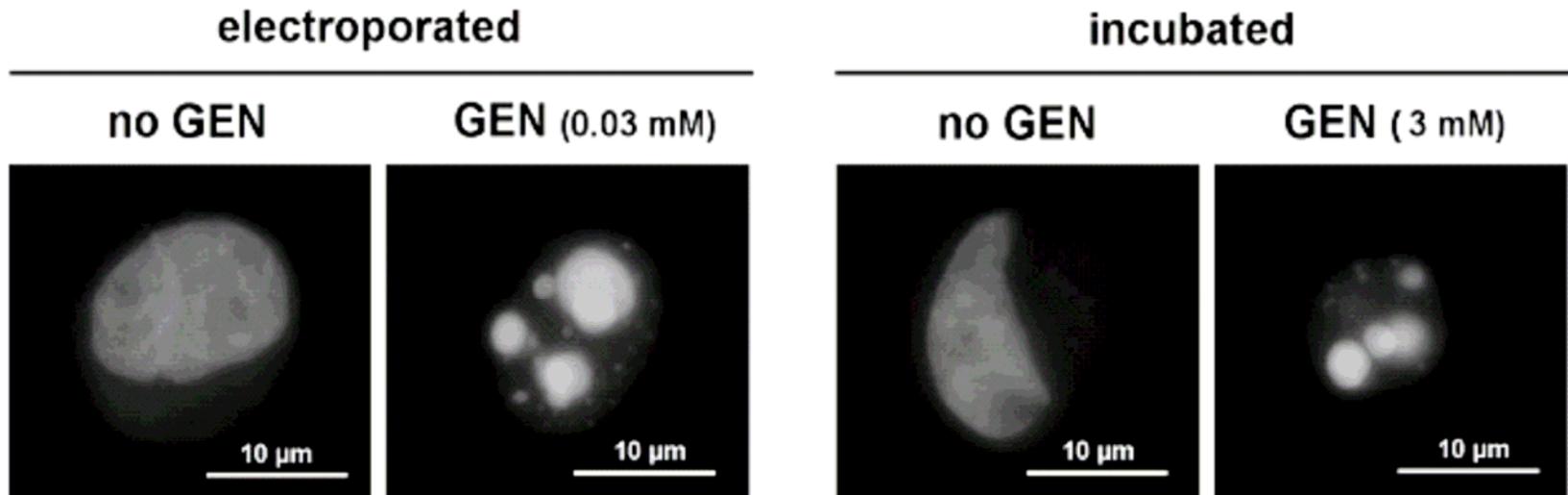
Gentamicin 2mM – 4h

MSDH 25 μ M – 3h



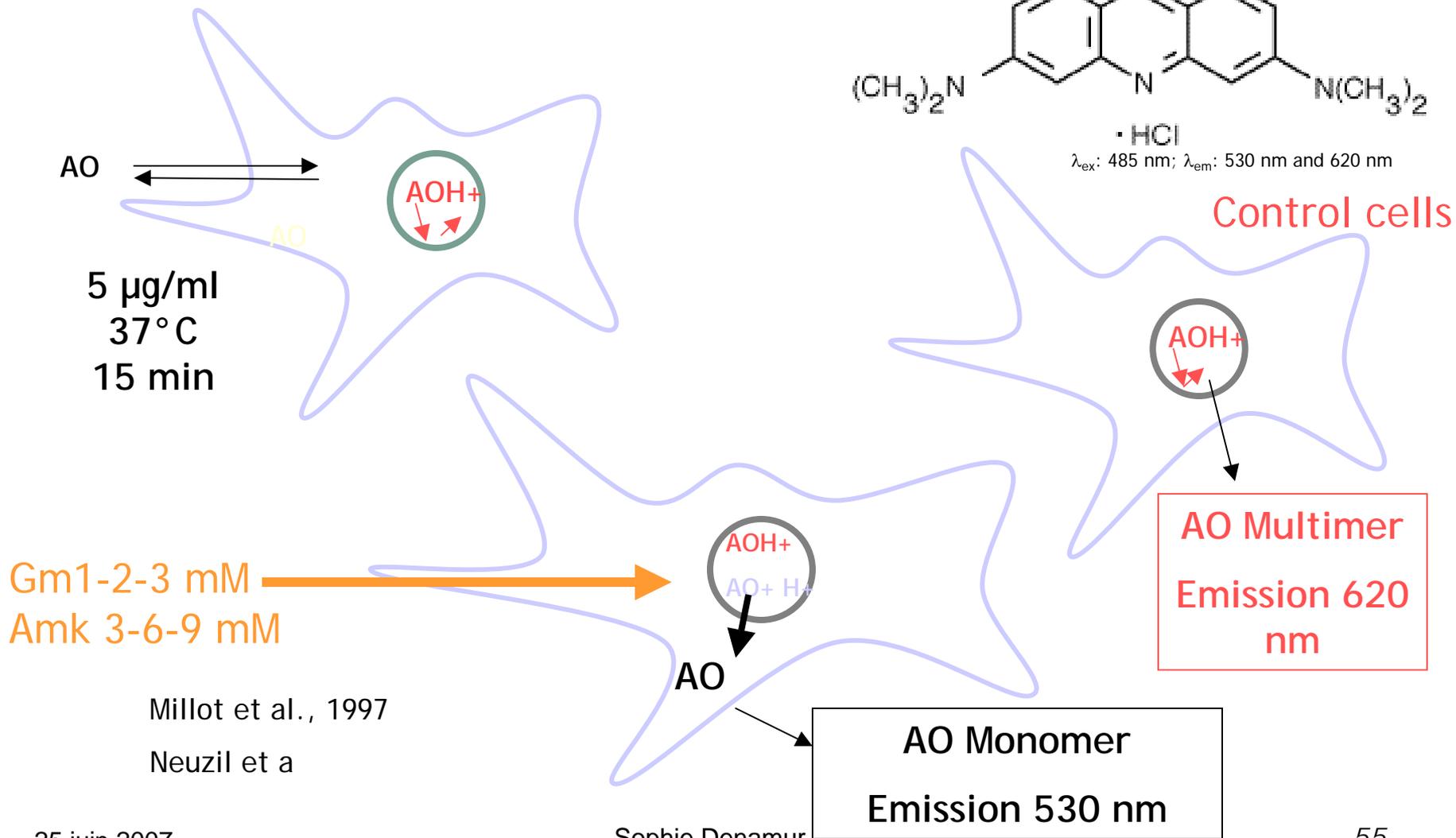
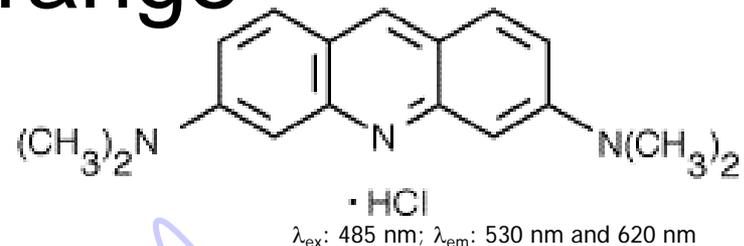
H. Servais et al., *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005 : 206; 321–333

Effet de la gentamicine directement dans le cytosol



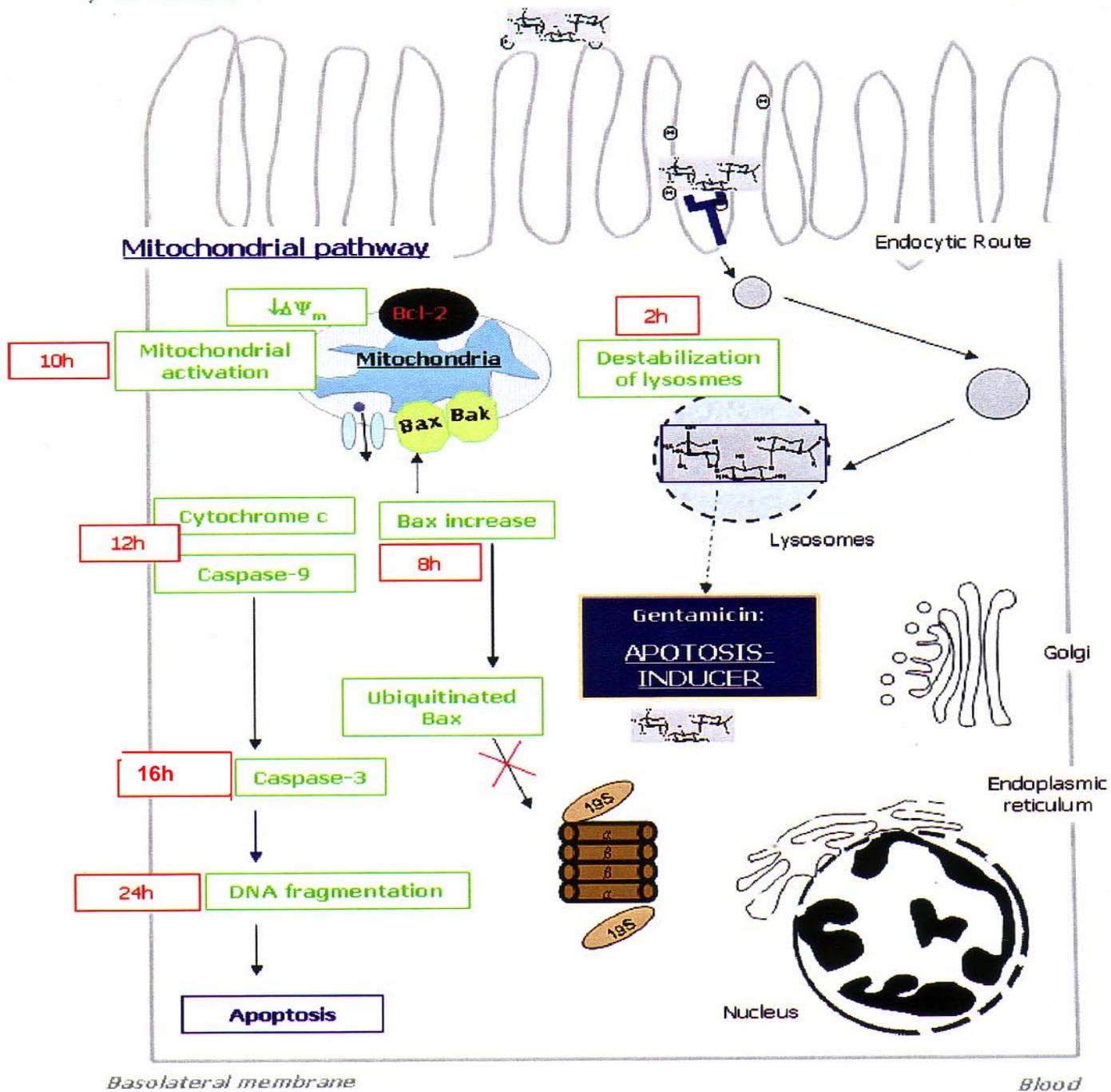
Servais et al., Antimicrob. Agents and Chemother. 2006 ; 50 (4) : 1213 - 1221

Détermination de la perméabilisation lysosomiale : acridine orange



Millot et al., 1997

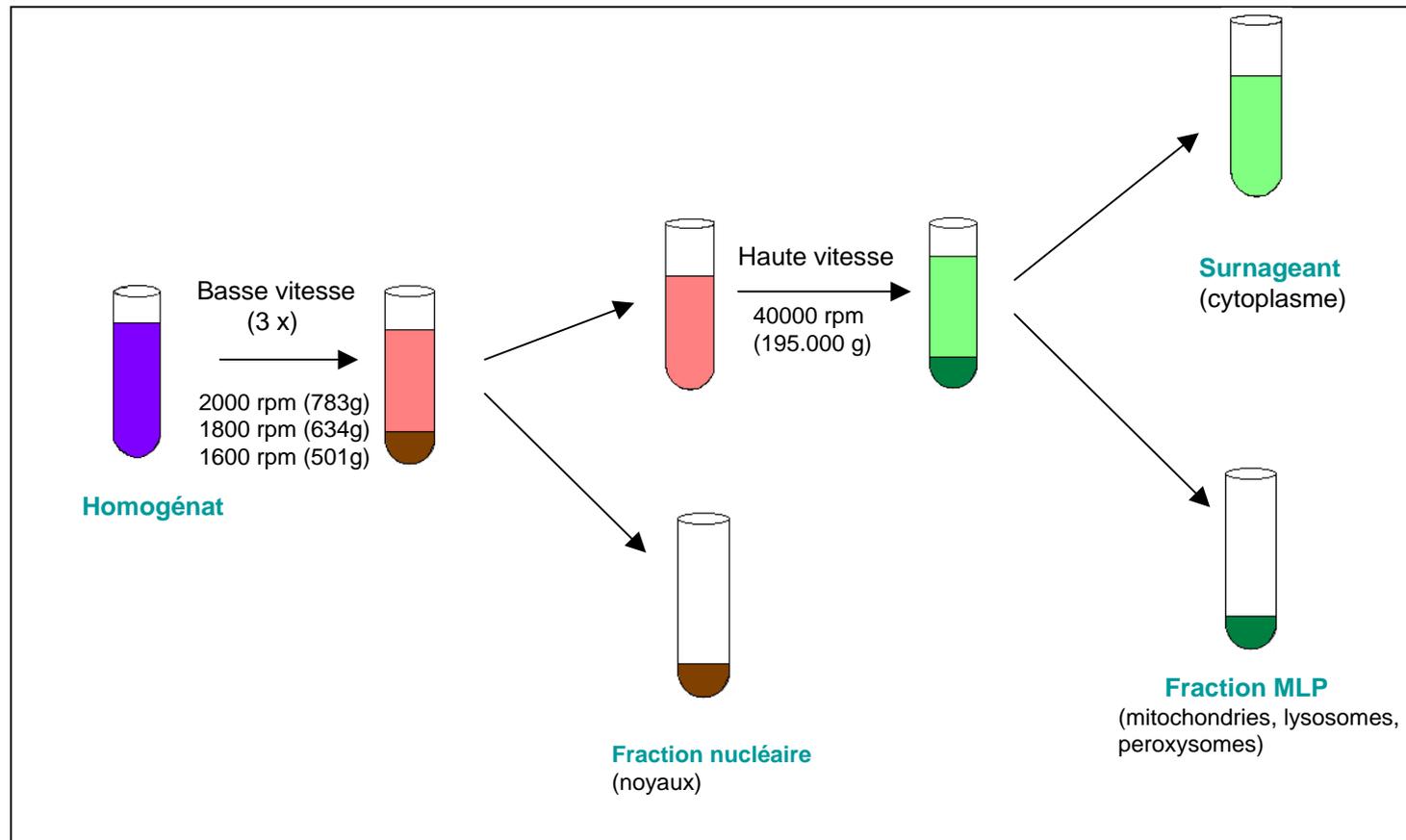
Neuzil et a



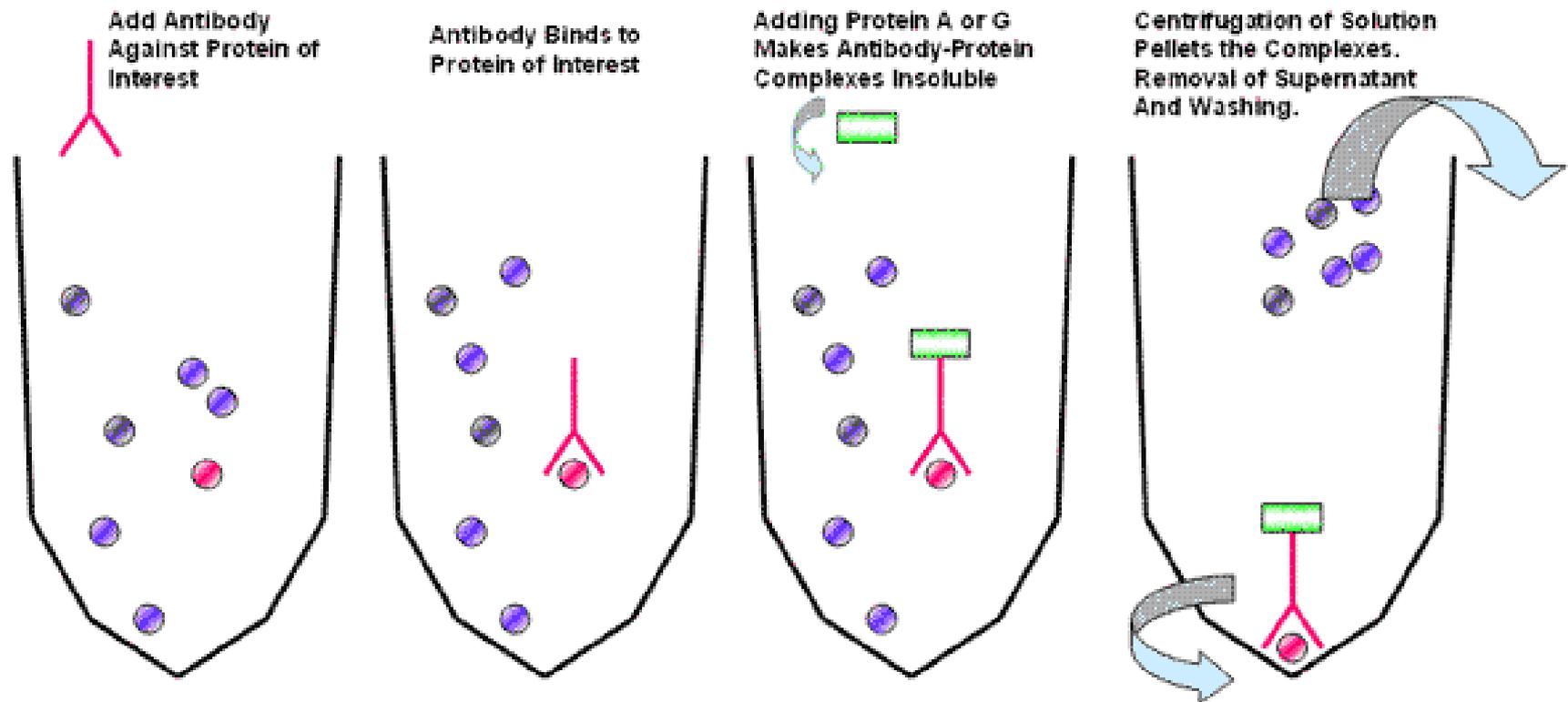
Mise en évidence de la délocalisation du cytochrome c

- Fractionnement cellulaire
- Immunoprécipitation
- Western blot

Fractionnement cellulaire



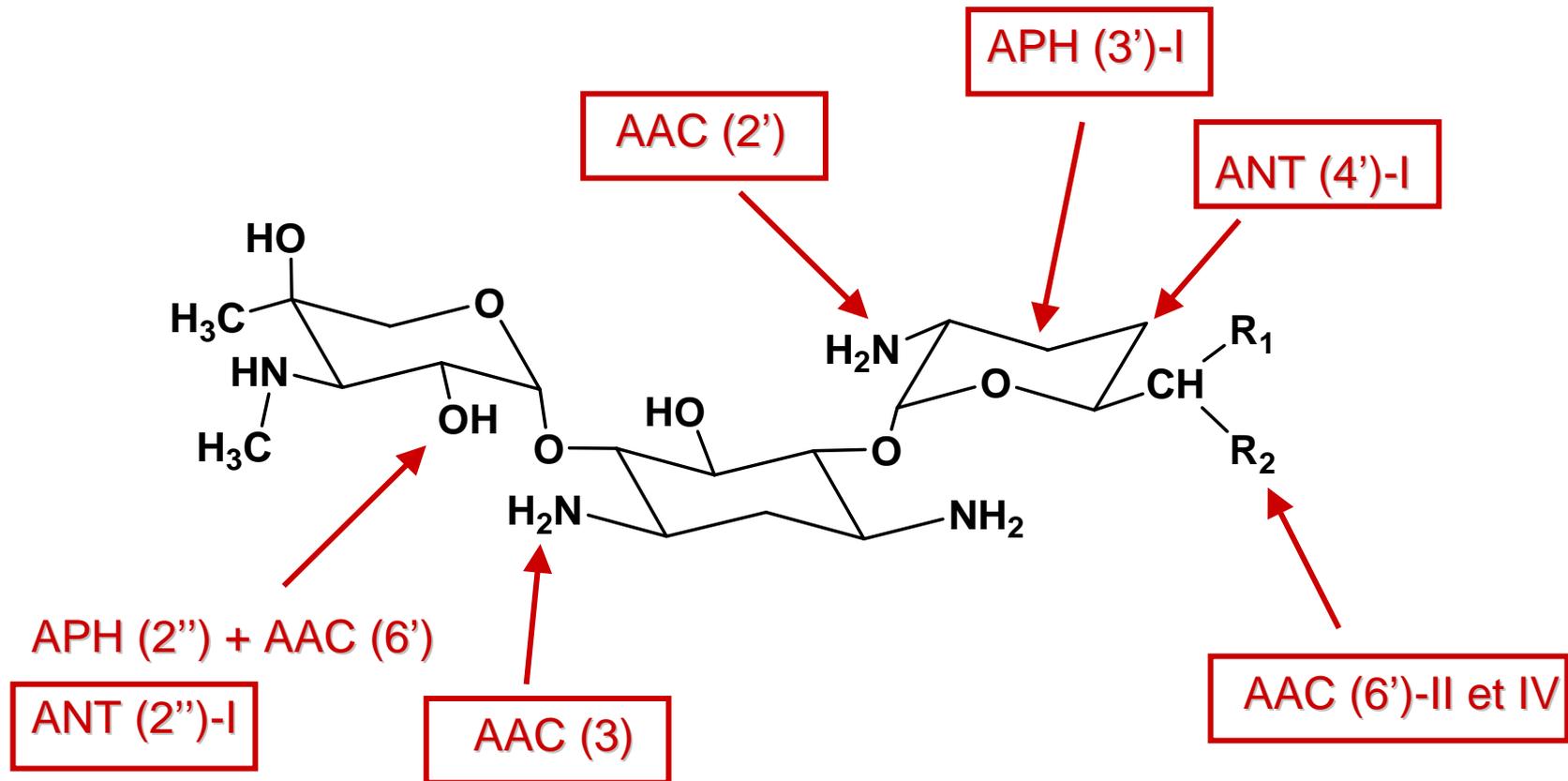
Immunoprécipitation



Western blot

- Migration dans un gel de polyacrylamide
- Transfert sur membrane de nitrocellulose
- Marquage avec anticorps (primaires et secondaires)
- Révélation

Résistance acquise (GEN)



Résistance acquise (AMK)

