



Université catholique de Louvain, Brussels

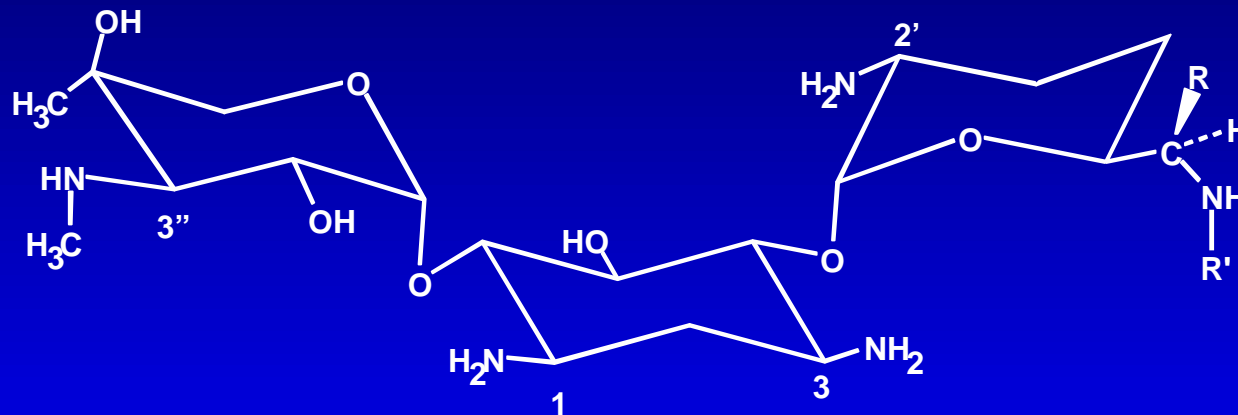
Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire

Mise en évidence et étude de l'apoptose induite par les antibiotiques du groupe des aminoglycosides

Thèse présentée par
Mohammed El Mouedden, Lic. Sc.
(Doctorat en Sciences Biomédicales
[orientation biologie et pharmacologie cellulaires])

10 juillet 2000

Structure de la gentamicine, un prototype des aminoglycosides utilisés en clinique



Complexe gentamicine: gentamicine C1a
 gentamicine C2
 gentamicine C1

R= R' = H
 R= CH₃ R' = H
 R= R' = CH₃

Les aminoglycosides

▶ Avantages:

▶ Antibiotiques à large spectre d'action.

◆ bactéries Gram (-) (*E. Coli*, *P. aeruginosa*...).

◆ certains groupes de bactéries Gram (+).

(Staphylocoques, Entérocoques...).

▶ Activité bactéricide rapide et complète.

Les aminoglycosides

▶ Effets secondaires:

- ▶ blocage neuromusculaire (rare)

- ▶ ototoxicité.

- ▶ néphrotoxicité.

Néphrotoxicité

▶ Signes cliniques:

▶ précoces:

- ◆ altérations tubulaires (enzymurie).
- ◆ polyurie avec ▲ de l'osmolalité urinaire.

▶ tardifs: ▲ filtration glomérulaire (▼ de la concentration de la créatinine et l'urée sériques).

Néphrotoxicité

▶ Signes histopathologiques:*

- ▶ surcharge lysosomiale en phospholipides.
- ▶ nécrose tubulaire.
- ▶ régénération tubulaire.

* tels que classiquement décrits

Les aminoglycosides

▶ Etudes sur animaux:

▶ doses fortes:

- ◆ nécrose tubulaire.
- ◆ insuffisance rénale aiguë.

▶ doses faibles:

- ◆ phospholipidose.
- ◆ apoptose?

Buts de ce travail

- ⇒ Mise en évidence et quantification de l'apoptose induite par les aminoglycosides dans le cortex rénal de rat.
- ⇒ Démonstration de l'apoptose induite par les aminoglycosides dans des modèles de cellules en culture.
- ⇒ Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'apoptose en relation avec la phospholipidose.

Apoptose

- ♦ **contrôle génétique**
- ♦ **activation des caspases**
- ♦ **coupure du DNA internucléosomique**
- ♦ **condensation de la chromatine et acidophilie du cytoplasme**
- ♦ **fragmentation en corps apoptotiques**

Apoptose

♦ **contrôle génétique**



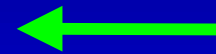
famille Bcl-2

♦ **activation des caspases**



inhibiteurs

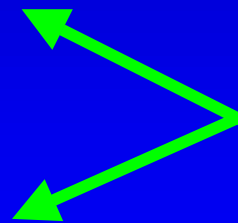
♦ **coupure du DNA internucléosomique**



- **TUNEL**

- **électrophorèse**

♦ **condensation de la chromatine et acidophilie du cytoplasme**



- **microscopie optique**
(**hématoxyline-éosine, Unna-Brachet**)

- **microscopie électronique**

♦ **fragmentation en corps apoptotiques**

1ère partie: études animales

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 2000, p. 665–675
0066-4804/00/\$04.00+0
Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 44, No. 3

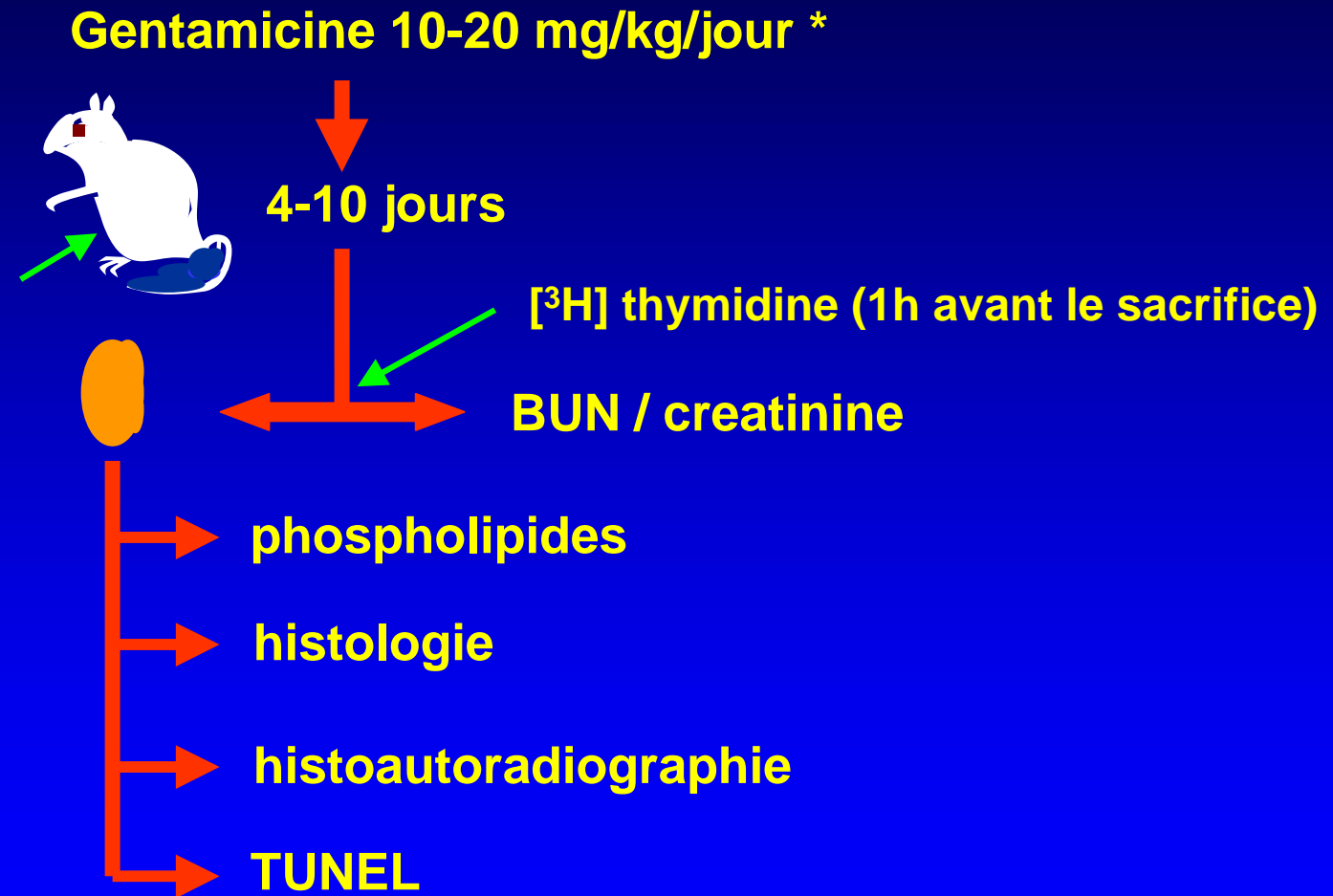
Apoptosis in Renal Proximal Tubules of Rats Treated with Low Doses of Aminoglycosides

MOHAMMED EL MOUEDDEN,¹ GUY LAURENT,² MARIE-PAULE MINGEOT-LECLERCQ,¹
HENRYK S. TAPER,³ JEAN CUMPS,⁴ AND PAUL M. TULKENS^{1*}

*Unités de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire,¹ de Pharmacocinétique, Métabolisme, Nutrition et Toxicologie,³
et de Chimie Pharmaceutique et Radiopharmacie,⁴ Université Catholique de Louvain, B-1200 Brussels, and
Service d'Histologie et de Cytologie Expérimentale, Université de Mons-Hainaut, B-7000 Mons,² Belgium*

Received 19 August 1999/Returned for modification 1 December 1999/Accepted 20 December 1999

Etudes animales: protocole



* ou doses équithérapeutiques de netilmicine, amikacine ou isepamicine

Etudes animales: justification des doses utilisées

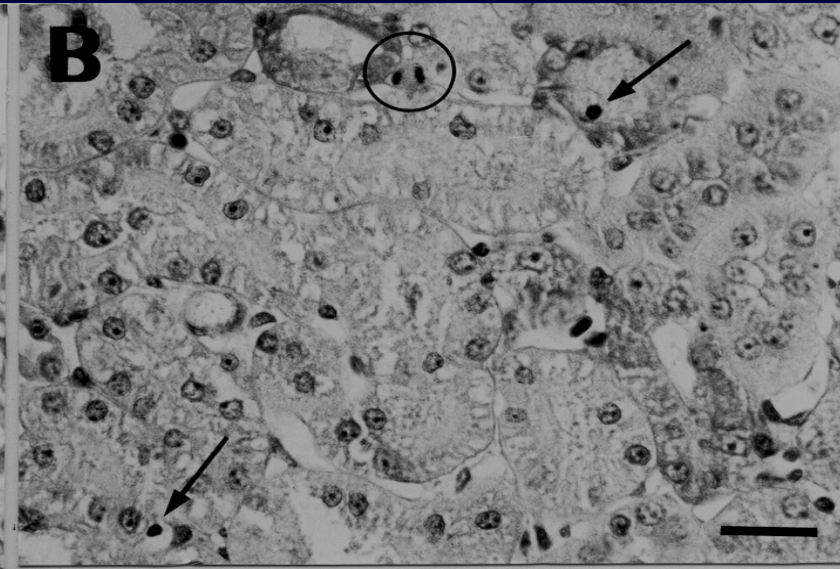
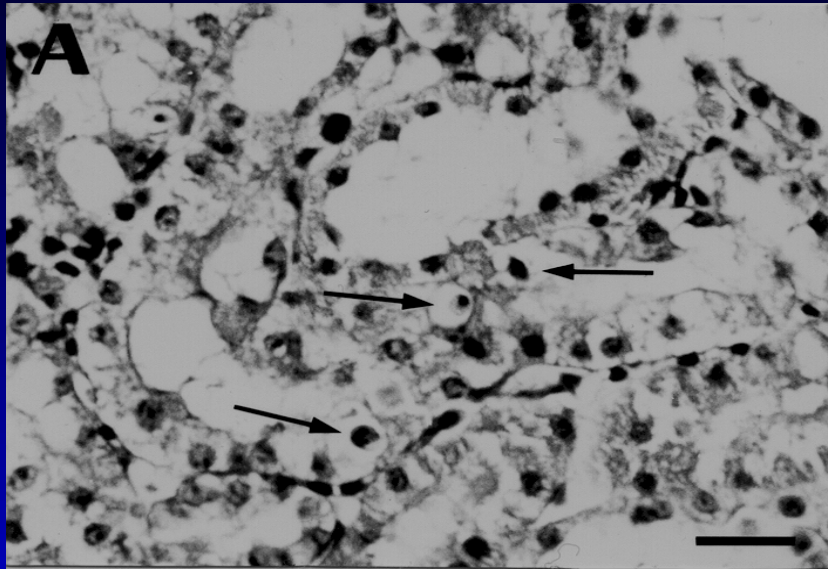
| | Drug (mg/kg) | Duration (days) | Fold increase over | |
|------------|-----------------|--------------------|-------------------------------|--|
| | | | clinical dose ^a | Clinical daily drug exposure ^b |
| Gentamicin | 10 | 4-10 | ~2 | ~0.5 |
| Netilmicin | 10 | 10 | ~1.7 | ~0.4 |
| Amikacine | 40 | 10 | ~2.7 | ~ 0.7 |
| Isepamicin | 40 | 10 | ~ 2.7 | ~ 0.7 |

^a suggested maintenance doses for an adult patient with an estimated creatinine clearance of 90 ml/min (gentamicin, 5.1 mg/kg; netilmicin, 6 mg/kg; amikacin, 15 mg/kg) or on the registered dosage in Belgium and many other countries for isepamicin.

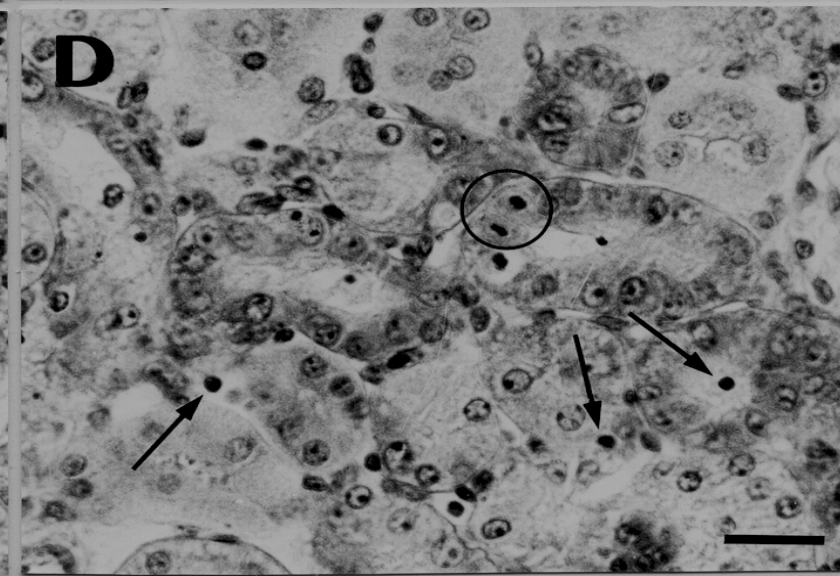
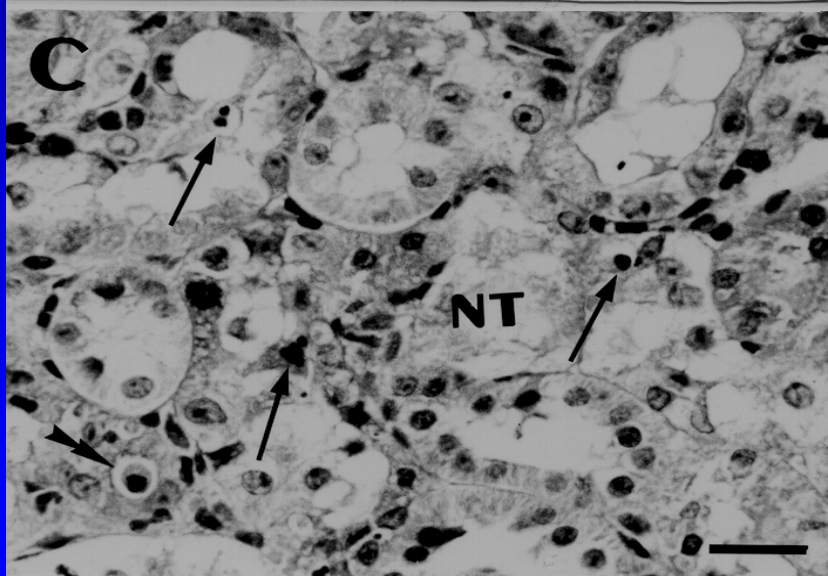
^b based on estimated AUC ratio, using the dose ratio defined in ^b and assuming apparent half-lives of ~ 30 min in rats and ~ 120 min in humans, respectively (β -elimination phases).

Hématoxyline / Eosine

Unna-Brachet



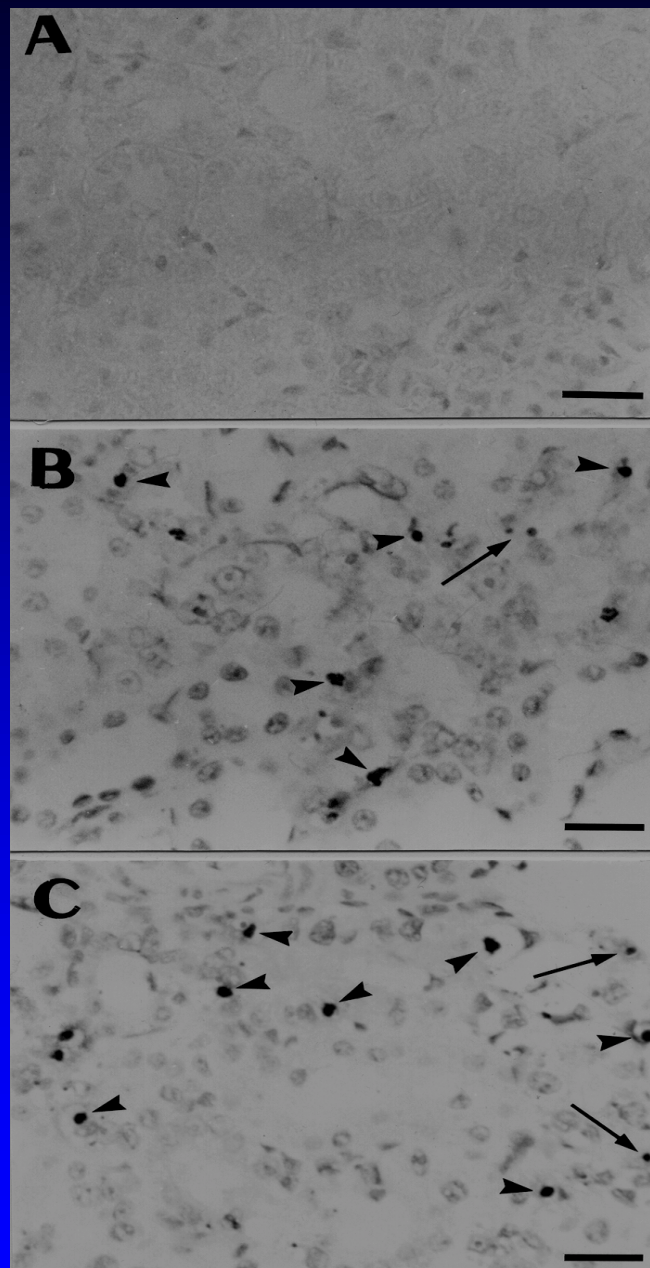
10 mg/kg



20 mg/kg

Traitements de 10 jours

TUNEL:
10 jours de
traitement



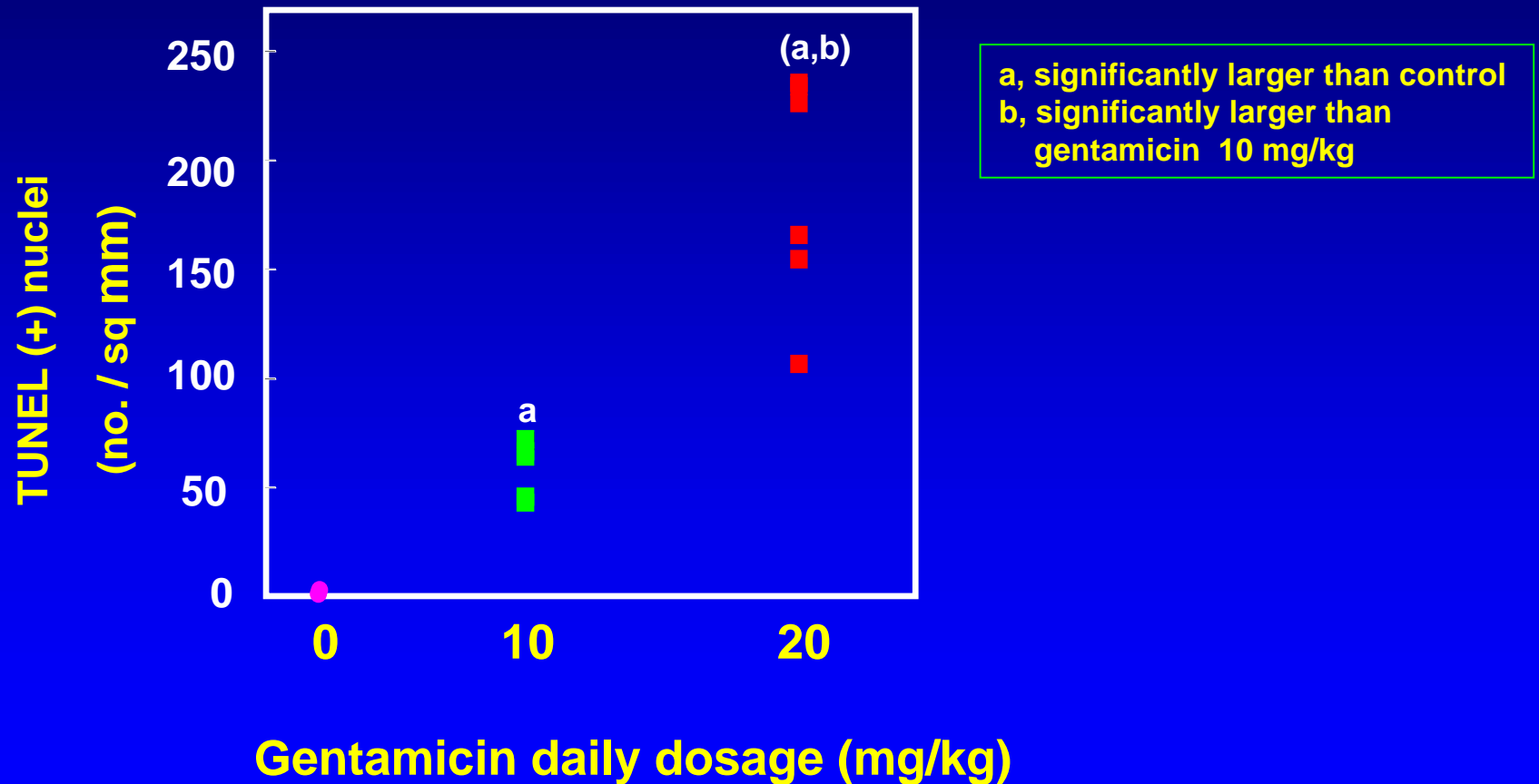
contrôle

10 mg/kg

20 mg/kg

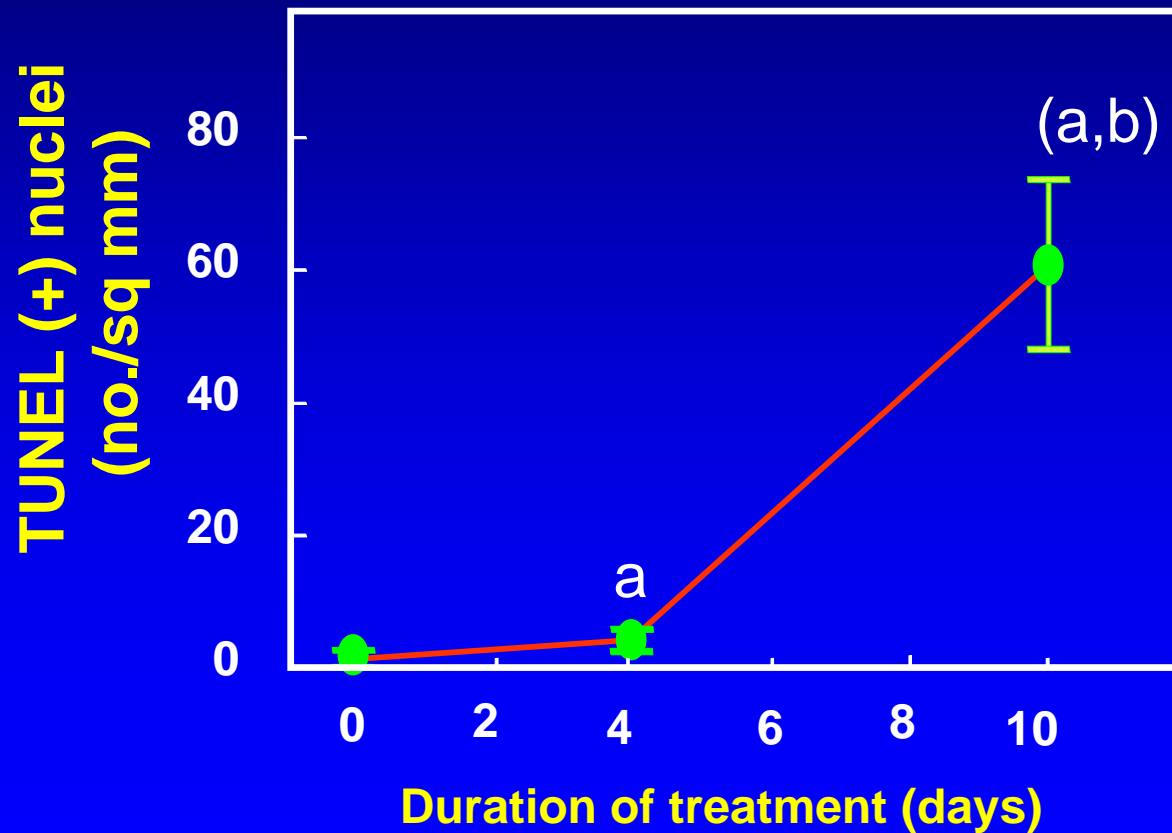
Apoptose induite par la gentamicine

1.influence de la dose



Apoptose induite par la gentamicine :

2. influence de la durée du traitement



a, significantly larger than control
b, significantly larger than
gentamicin 4 days

*Travaux antérieurs:
démonstration d'une prolifération cellulaire
induite par la gentamicine ...*

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 1983, p. 586-593
0066-4804/83/100586-08\$02.00/0
Copyright © 1983, American Society for Microbiology

Vol. 24, No. 4

**Increased Renal DNA Synthesis In Vivo After Administration
of Low Doses of Gentamicin to Rats**

GUY LAURENT,^{1-2*} PAUL MALDAGUE,³ MARIE-BÉATRICE CARLIER,^{1,2} AND PAUL M.
TULKENS^{1,2}

*Laboratoires de Chimie Physiologique¹ and Pathologie et Cytologie Experimentales,³ Université Catholique
de Louvain, and International Institute of Cellular and Molecular Pathology,² B-1200 Brussels, Belgium*

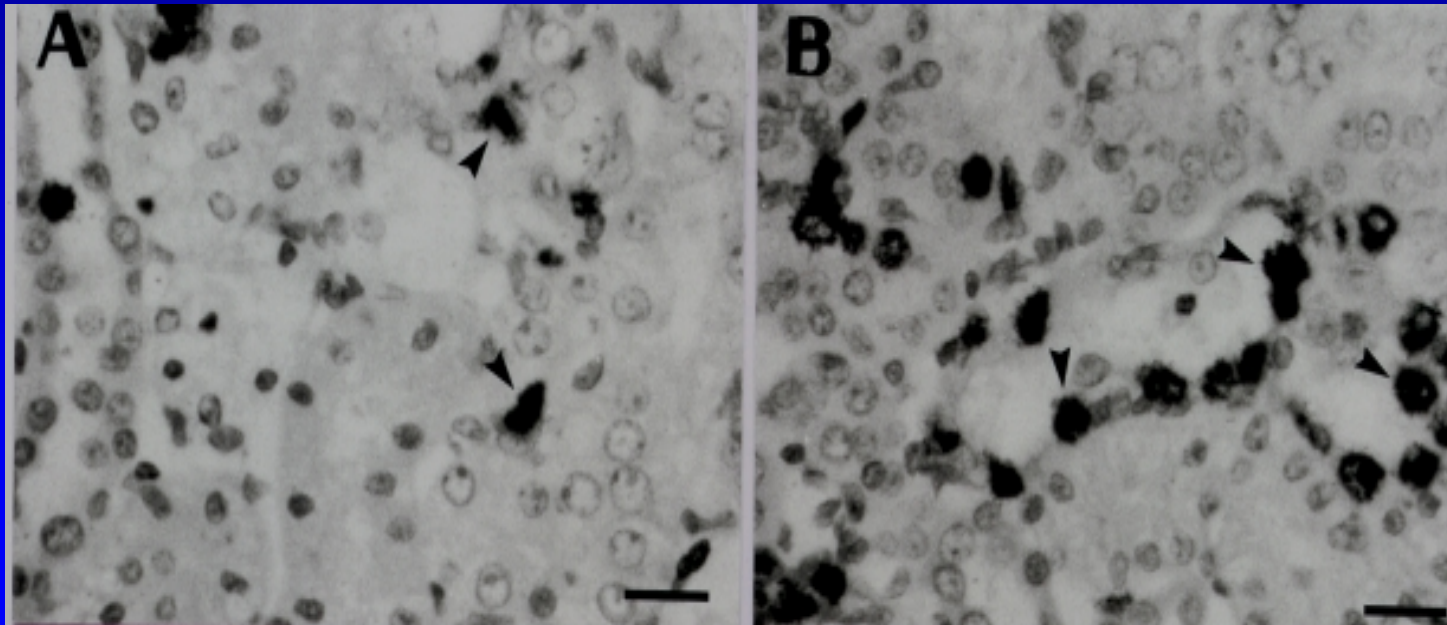
Received 15 April 1983/Accepted 20 July 1983

Cellules en phase S (histoautoradiographie)

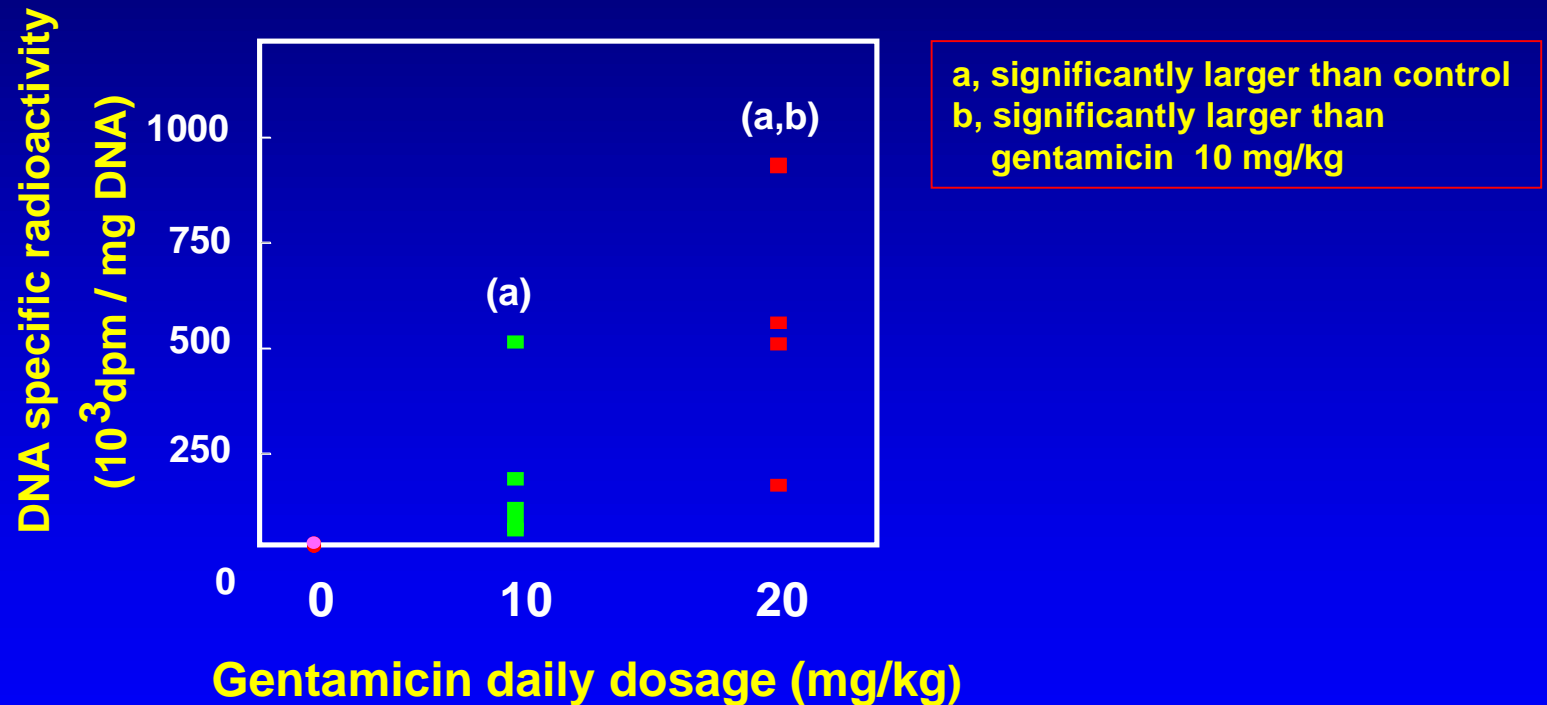
Gentamicine 10 jours

10 mg/kg

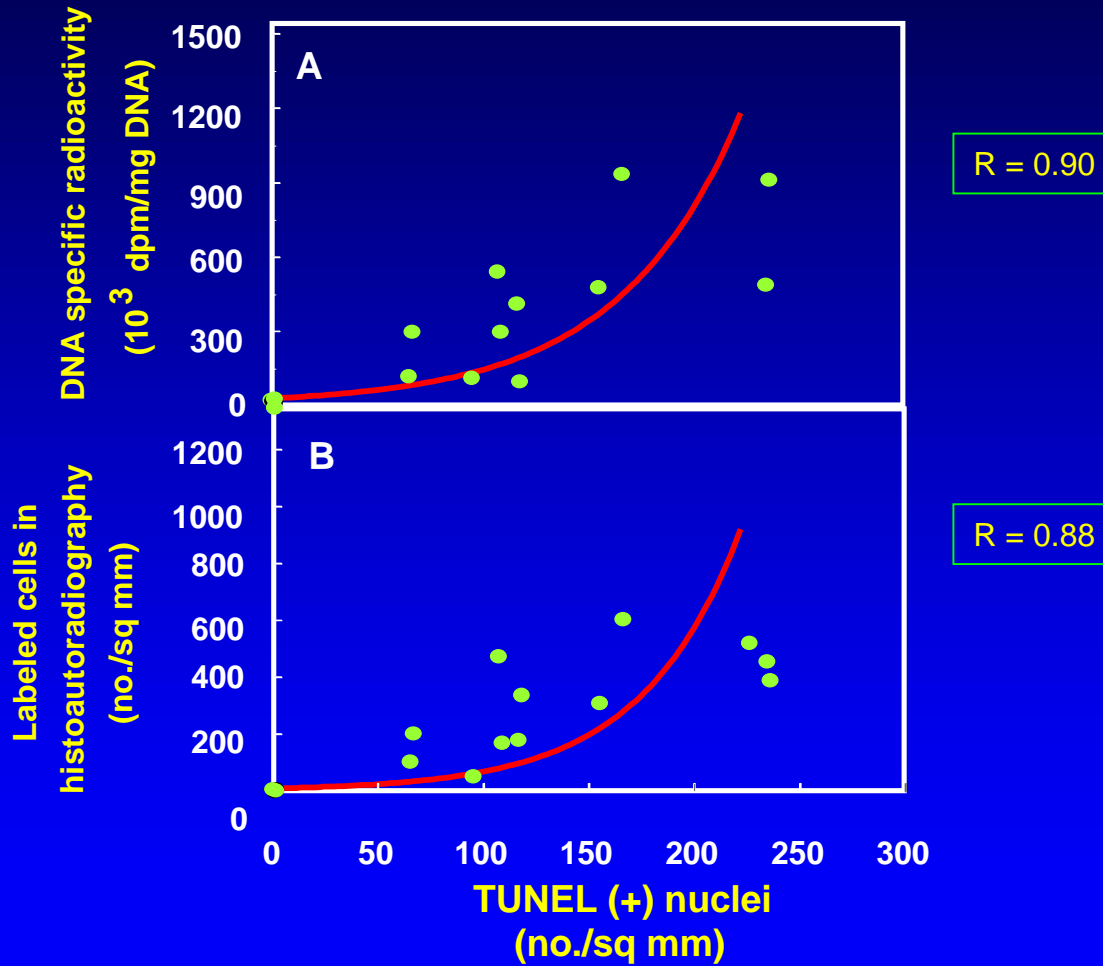
20 mg/kg



Radioactivité spécifique de l'ADN



Relation entre apoptose et régénération tubulaire



Travaux antérieurs: comparaison gentamicine - amikacine ...

Biochemical Pharmacology, Vol. 31, No. 23, pp. 3861-3870, 1982.
Printed in Great Britain.

0006-2952/82/233861-10 \$03.00/0
© 1982 Pergamon Press Ltd.

MECHANISM OF AMINOGLYCOSIDE-INDUCED LYSOSOMAL PHOSPHOLIPIDOSIS: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES WITH GENTAMICIN AND AMIKACIN

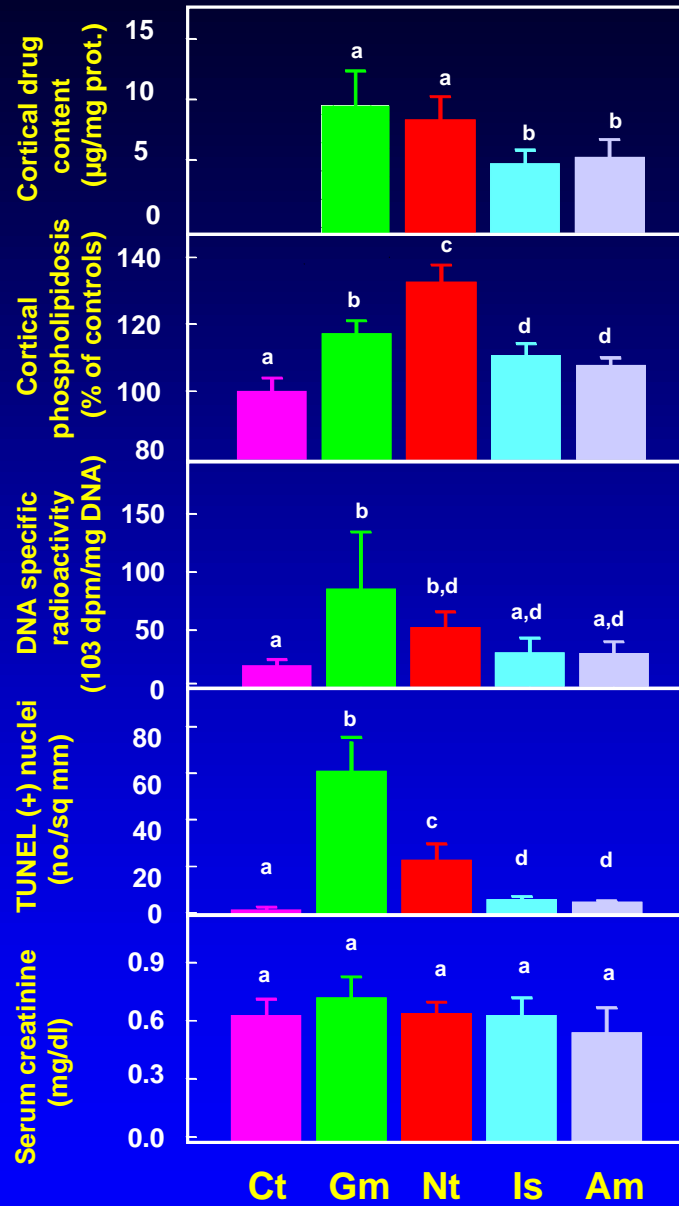
GUY LAURENT,* MARIE-BÉATRICE CARLIER,* BRUNO ROLLMAN,† FRANÇOIS VAN HOOF*
and PAUL TULKENS*‡

*Laboratoire de Chimie Physiologique and, †Laboratoire de Chimie Analytique. Université
Catholique de Louvain, and International Institute of Cellular and Molecular Pathology, avenue
Hippocrate, 75, B-1200 Brussels, Belgium

(Received 25 March 1982; accepted 9 June 1982)

| | mg/kg* |
|--------------------|--------|
| - gentamicine (Gm) | 10 |
| - nétilmicine (Nt) | 10 |
| - amikacine (Am) | 40 |
| - isépamicine (Is) | 40 |

* doses équithérapeutiques
(2 fois la dose clinique)



Analyse statistique:
les groupes significativement
≠ les uns des autres portent
des lettres différentes

Conclusions de la 1ère partie (I)

⇒ A doses faibles, les aminoglycosides provoquent une mort cellulaire par apoptose dans le cortex rénal de rat.

⇒ L'importance de cette apoptose dépend:

- ▶ du composé administré.

- ▶ de la durée du traitement.

- ▶ de la dose.

Conclusions de la 1ère partie (II)

- ⇒ Il existe une corrélation entre apoptose et prolifération cellulaire.
- ⇒ L'apoptose se révélerait donc un des premiers signes de toxicité cellulaire des aminoglycosides.

2ème partie: études sur cellules en culture

TOXICOLOGICAL SCIENCES **56**, 229–239 (2000)
Copyright © 2000 by the Society of Toxicology

Gentamicin-Induced Apoptosis in Renal Cell Lines and Embryonic Rat Fibroblasts

Mohammed El Mouedden, Guy Laurent,* Marie-Paule Mingeot-Leclercq, and Paul M. Tulkens¹

Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université Catholique de Louvain, B-1200 Brussels, Belgium; and

**Service d'Histologie et de Cytologie Expérimentale, Université de Mons-Hainaut, B-7000 Mons, Belgium*

Received December 24, 1999; accepted March 27, 2000

Cellules en culture: modèles

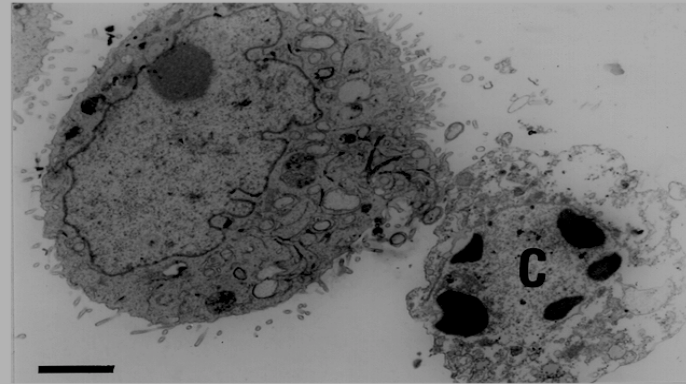
▶ Cellules:

- ① fibroblastes embryonnaires de rat.
- ② LLC-PK1 (Lilly Laboratories Culture-Pig Kidney type1).
- ③ MDCK (Madin-Darby Canine Kidney).

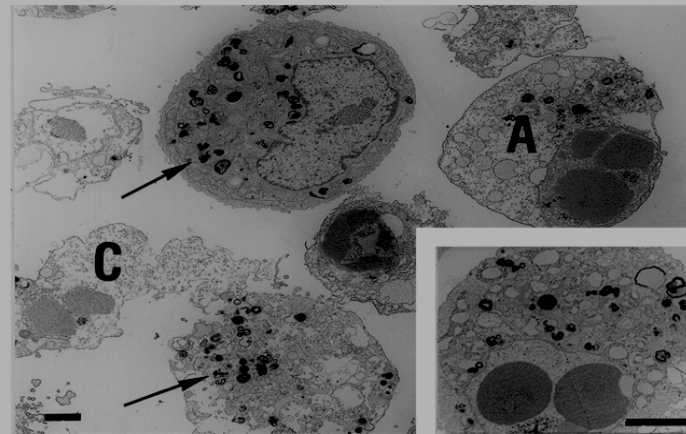
▶ Concentration extracellulaire d'aminoglycosides: 0,5 à 3 mM.

Microscopie électronique

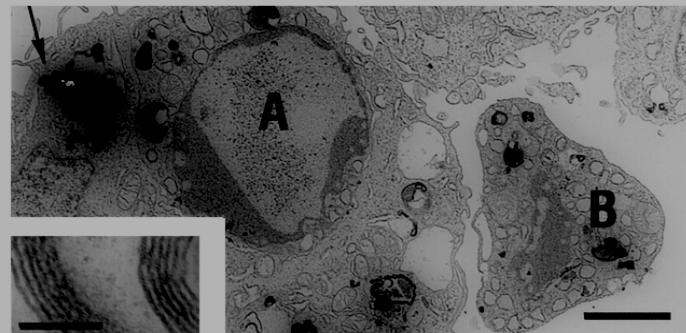
gentamicine
2 mM
4 jours



LLC-PK1



MDCK

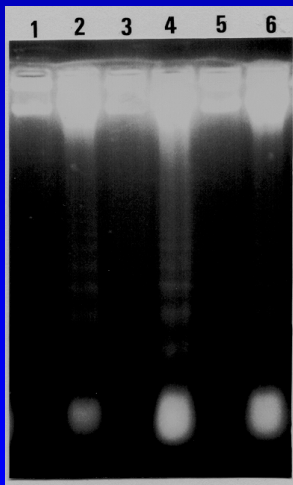


Fibroblasts

Apoptose induite par la gentamicine dans des modèles de cellules en culture

électrophorèse

Fibroblasts
MDCK
LLC-PK1

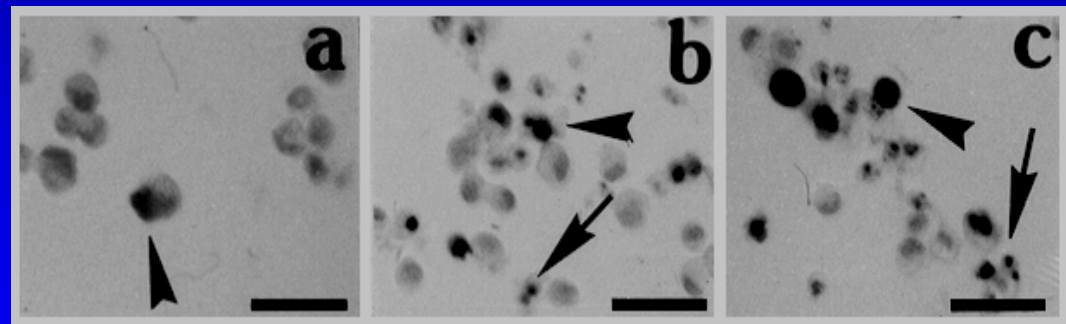


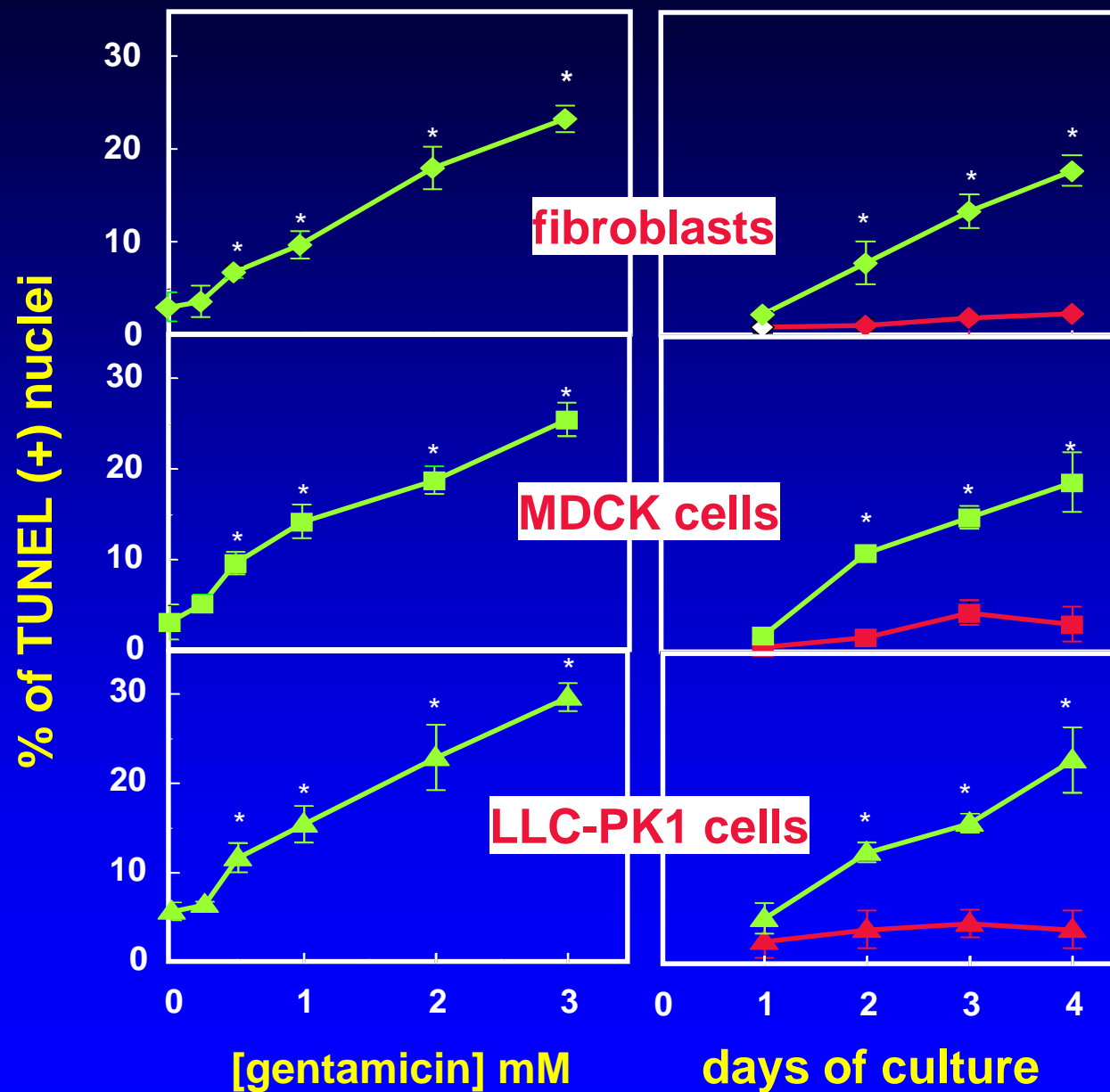
TUNEL

Fibroblasts

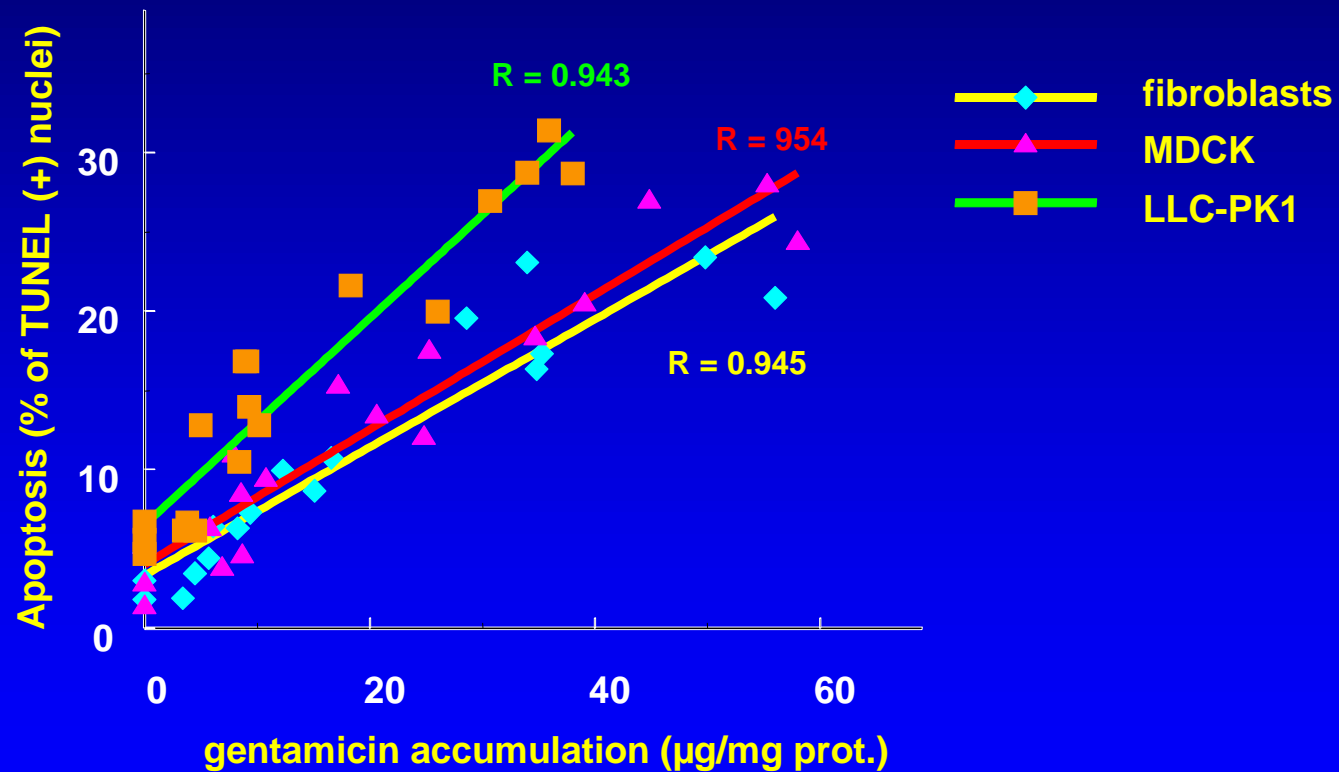
MDCK

LLC-PK1

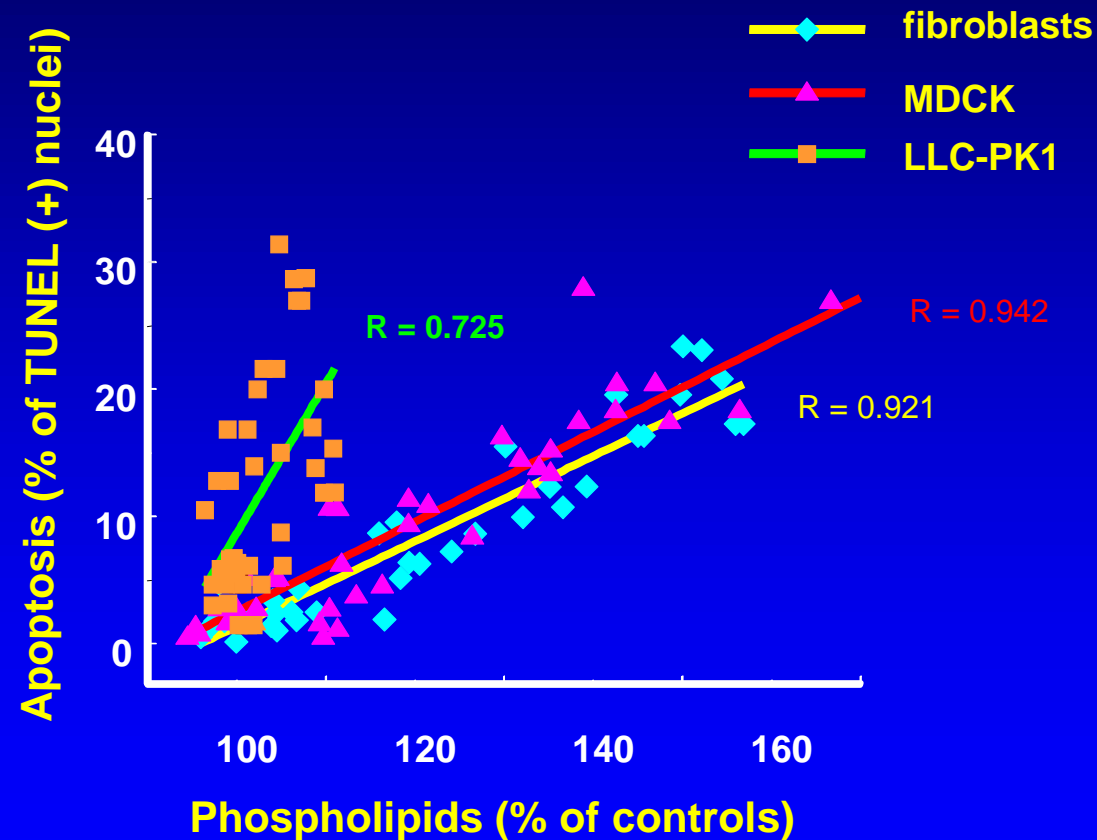




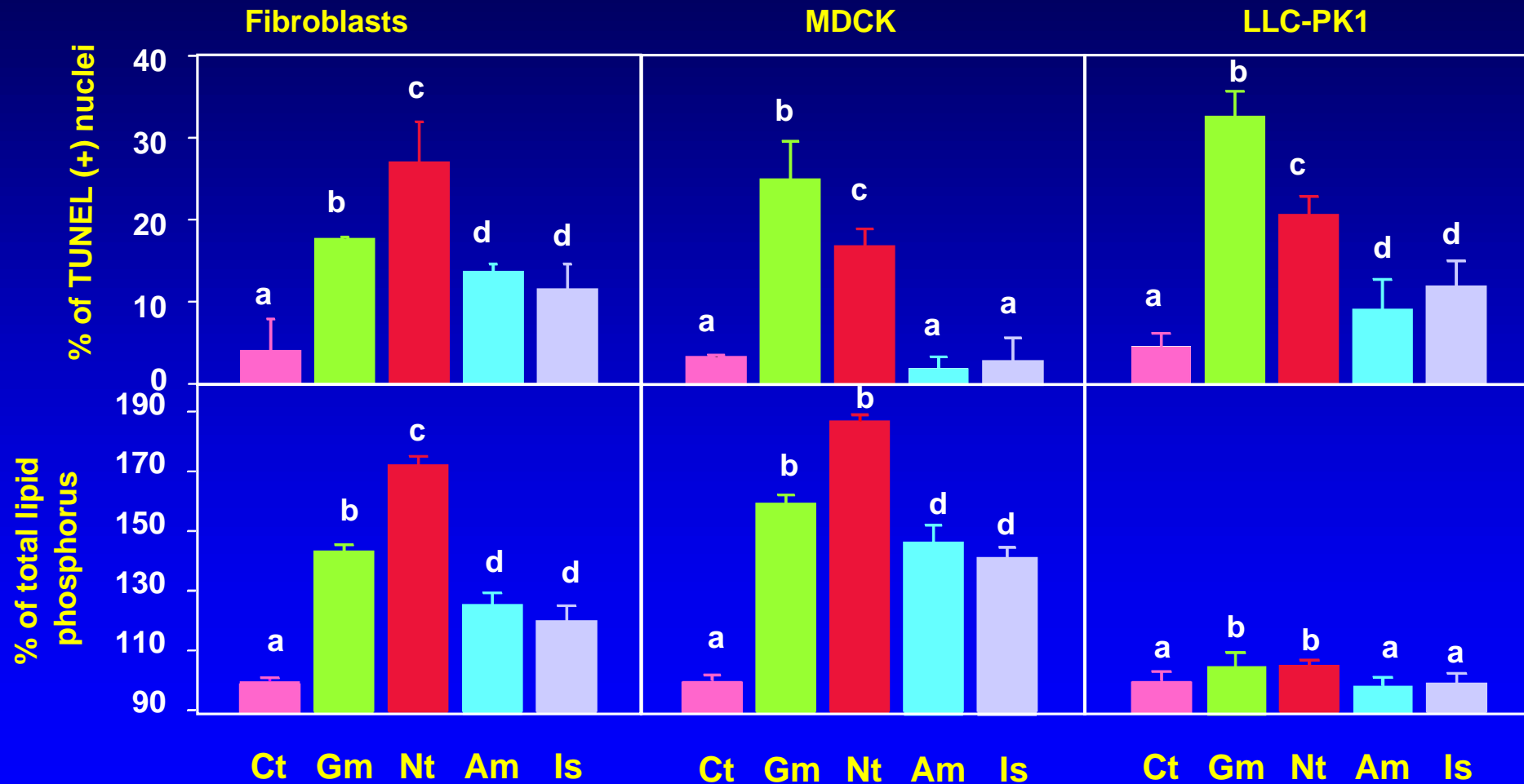
Relation entre apoptose et accumulation cellulaire de la gentamicine



Relation entre apoptose et phospholipidose



Apoptose et phospholipidose induites par les aminoglycosides



Conclusions de la 2ème partie

- ⇒ l'apoptose induite par les aminoglycosides *in vivo* peut être reproduite *in vitro* dans des conditions où l'accumulation cellulaire de l'antibiotique est semblable à celle observée *in vivo*.
- ⇒ cette apoptose dépend du composé et du modèle cellulaire utilisés.
- ⇒ il existe une corrélation significative entre accumulation cellulaire de l'antibiotique et apoptose.

3ème partie: modulation de l'apoptose (cellules en cultures)

- inhibition de la synthèse protéique
 - ➔ cycloheximide
- surexpression d'une protéine antiapoptotique
 - ➔ Bcl-2
- inhibition des caspases
 - ➔ Z-VAD.fmk

Effet de la cycloheximide sur l'apoptose induite par la gentamicine

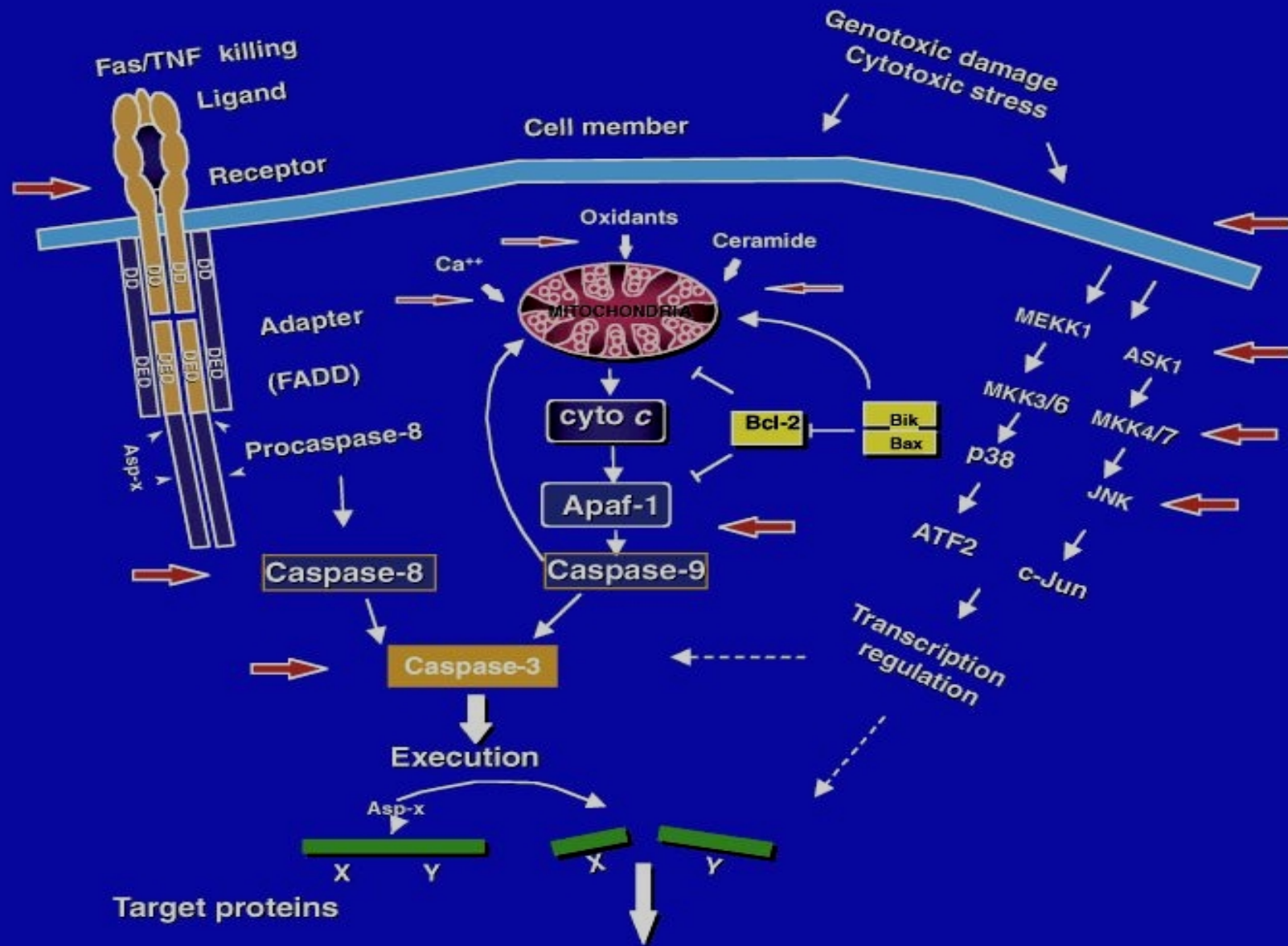
% of TUNEL (+) nuclei

| | controls | cycloheximide | gentamicin | cycloheximide plus gentamicin |
|---------------------------|-----------|----------------|--------------|-------------------------------|
| Fibroblasts | 2.0 ± 0.3 | 4.6 ± 1.2 | 13.4 ± 1.8 * | 4.8 ± 1.35 + |
| MDCK cells | 2.8 ± 0.3 | 3.7 ± 1.2 | 14.9 ± 1.3 * | 1.3 ± 0.3 + |
| LLC-PK ₁ cells | 4.6 ± 1.5 | 28.7 ± 1.3 *,° | 15.8 ± 1.1 * | 52.8 ± 3.9 *,°,x |

^a cells were exposed to cycloheximide (1 µM), gentamicin (2 mM), or their combination for 3 days.

Statistical analysis:

- * significantly larger than control (p < 0.01)
- + significantly lower than gentamicin alone (p < 0.001)
- ° significantly larger than gentamicin alone (p < 0.01)
- x significantly larger than cycloheximide alone (p < 0.001)

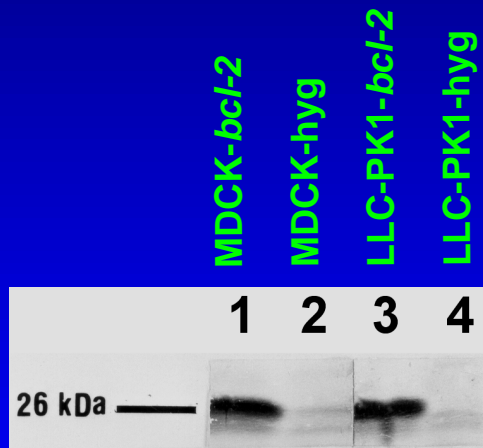


Bcl-2, protéine anti-apoptotique

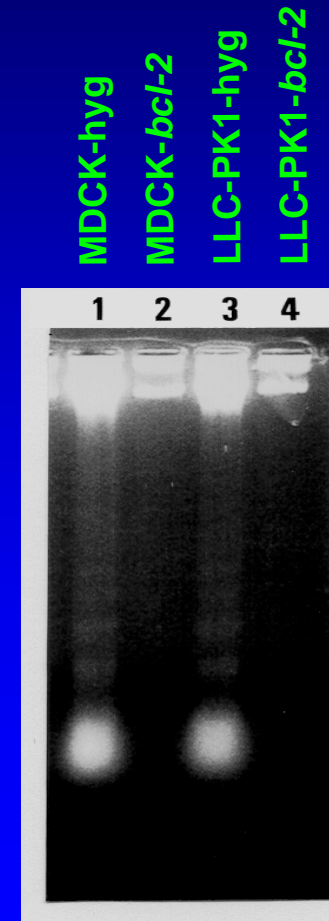
- ▶ **Oncoprotéine de taille de 26 kDa.**
- ▶ **Identifiée pour la première fois dans des lymphomes de type B suite à une translocation t(14;18).**
- ▶ **Protège contre l'apoptose induite par divers stimuli dans de nombreux modèles cellulaires.**

Effet de la surexpression de Bcl-2 sur l'apoptose (MDCK et LLC-PK1)

1. Démonstration de la surexpression de Bcl-2



2. Démonstration de l'effet anti-apoptotique de Bcl-2



Effet de Bcl-2 sur l'apoptose induite par la gentamicine ^a

% of TUNEL (+) nuclei

| | <i>bcl-2</i> (+) transfectants ^b | <i>bcl-2</i> (-) transfectants ^c |
|----------------------------|---|---|
| MDCK-cells | 3.3 ± 1.0 ^{+,§} | 21.0 ± 5.2 |
| LLC-PK ₁ -cells | 5.4 ± 2.9 ^{+,§} | 22.9 ± 1.3 |

^a cells were exposed to gentamicin (2 mM) for 4 days

^b cells transfected with a *bcl-2* gene-containing vector

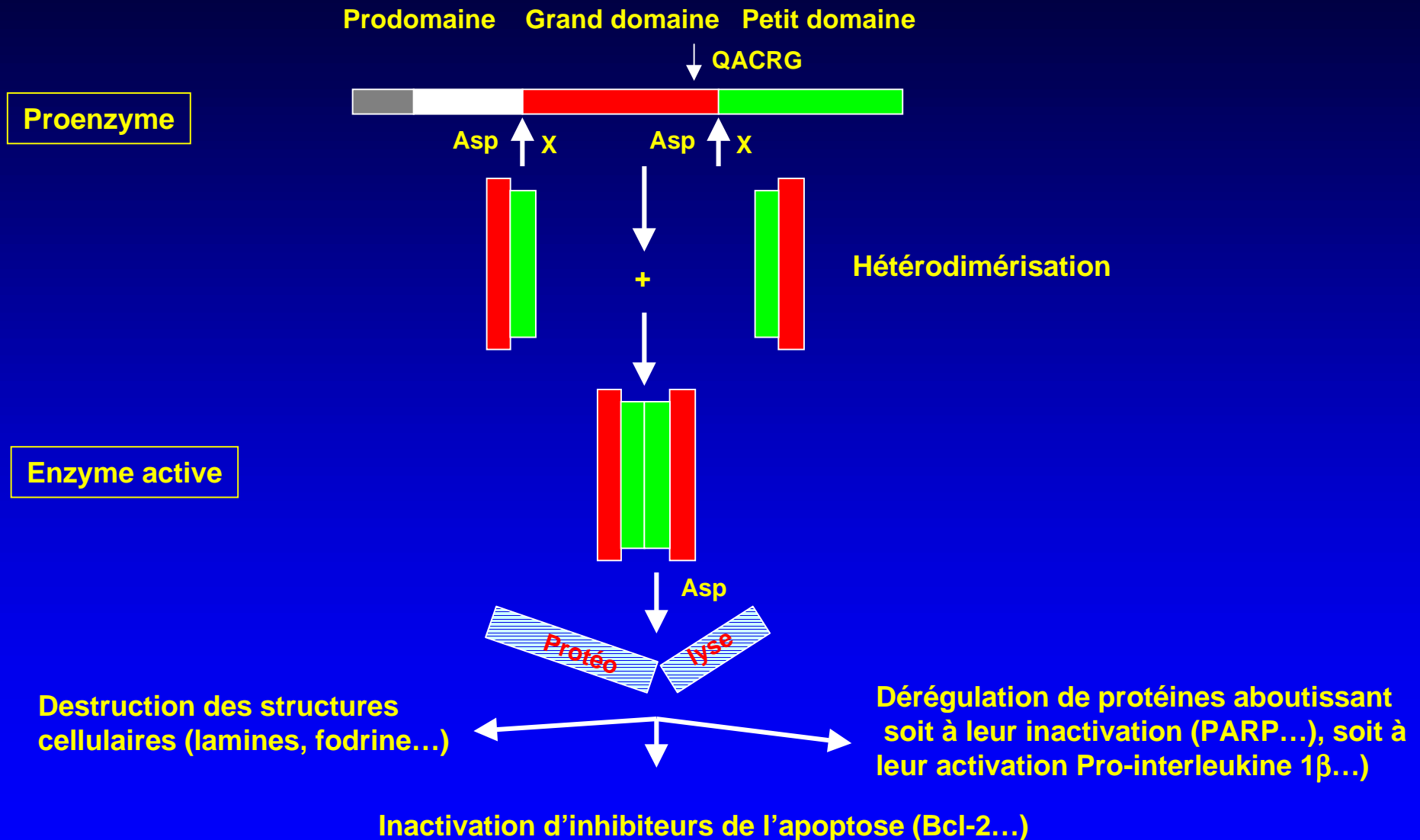
^c cells transfected with a control vector

Statistical analysis:

⁺ significantly lower than the *bcl-2* (-) group (p < 0.001)

[§] not significantly different from untransfected cells not exposed to gentamicin

Mécanisme d'activation des caspases



Effet de Bcl-2 sur l'activité des caspases induite par la gentamicine dans les cellules MDCK ^a

gentamicin-treated cells^b

| controls cells ^c | untransfected cells | <i>bcl-2</i> (+) transfectants ^d | <i>bcl-2</i> (-) transfectants ^e |
|-----------------------------|---------------------|---|---|
| 266.9 ± 11.4 | 444.4 ± 11.6 * | 290.3 ± 5.2 | 410.6 ± 12.9 * |

^a using DEVD-AMC as a substrate (this substrate is cleaved by caspases 3, 6, 7 and 8)

^b cells incubated for 4 days with 2 mM gentamicin

^c untransfected cells not exposed to gentamicin

^d cells transfected with a *bcl-2* gene-containing vector

^e cells transfected with a control vector

Statistical analysis:

* significantly larger than control cells ($p < 0.001$) and than *bcl-2*(+) transfected cells ($p < 0.001$)

Effet de Z-VAD.fmk, un inhibiteur des caspases, sur l'apoptose induite par la gentamicine dans les cellules MDCK

gentamicin-treated cells^b

| control cells ^a | no Z-VAD.fmk ^b | plus Z-VAD.fmk ^c |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 2.9 ± 0.7 | 22.9 ± 1.9 * | 1.4 ± 0.6 |

% of TUNEL (+) nuclei

^a no treatment (cells incubated with Z-VAD.fmk alone for the 2 last days of culture did not show significant change in apoptotic index).

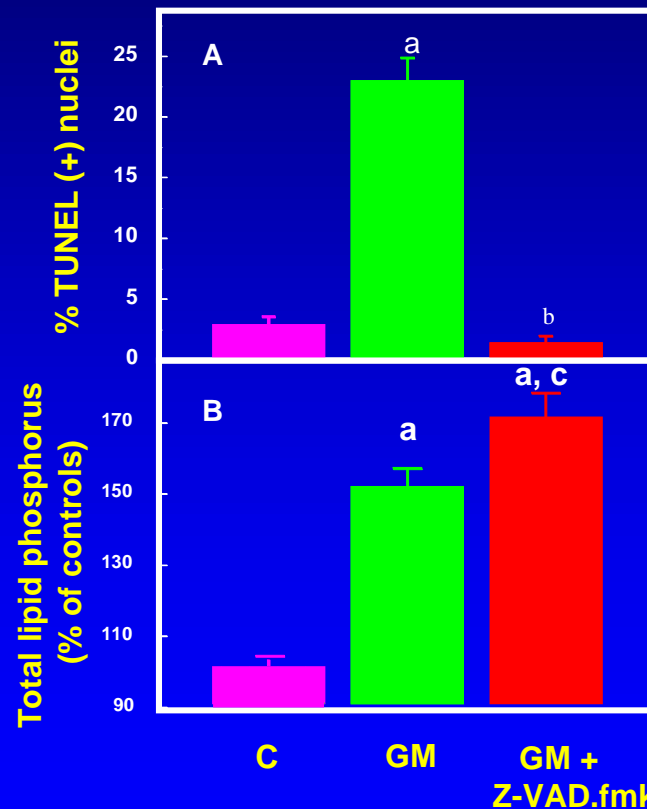
^b cells were treated for 4 days with 2 mM gentamicin only.

^c cells were treated for 2 days with 2 mM gentamicin and incubation was then carried on in the same medium supplemented with 50 µM Z-VAD.fmk for 2 additional days .

Statistical analysis:

* significantly larger than control (p < 0.001).

Effet de Z-VAD.fmk sur l'apoptose et la phospholipidose induite par la gentamicine dans les cellules MDCK



a, significantly larger than control.
b, significantly lower than gentamicin treated cells.
c, significantly larger than gentamicin treated cells.

Conclusions de la 3ème partie

- ⇒ L'hypothèse d'une induction de l'apoptose par inhibition de la synthèse protéique par les aminoglycosides est exclue.
- ⇒ Bcl-2 diminue l'apoptose induite par les aminoglycosides.
- ⇒ L'inhibition de l'activité des caspases par surexpression de Bcl-2 ou par Z-VAD.fmk protège contre l'apoptose induite par les aminoglycosides.

Conclusions générales

Conclusions générales (I)

1. Les aminoglycosides utilisés en clinique induisent de l'apoptose aux doses thérapeutiques chez l'animal.

⇒ effet chez l'homme?

2. L'apoptose induite par les aminoglycosides chez l'animal peut être reproduite dans des modèles de cellules en culture.

⇒ toxicité intrinsèque des différents aminoglycosides?

Conclusions générales (II)

3. L'apoptose induite par les aminoglycosides peut être modulée par Bcl-2 et des inhibiteurs de caspases.

⇒ effet chez l'animal?

4. L'apoptose peut être un marqueur précoce de la toxicité cellulaire.

⇒ évaluation de la toxicité cellulaire de nouvelles molécules?

Remerciements ...

Ce travail a été soutenu par:

- **Vaincre les maladies lysosomales, France**
- **la Société Belge d'infectiologie et de microbiologie clinique (GlaxoWellcome grant)**
- **Hoechst Marion Roussel Belgium**