

Annie Borgne-Sanchez



Impact des médicaments contaminants
environnementaux sur les fonctions
mitochondriales et le métabolisme

ANR 09-CESA-014-01

Programme PHARMECO

Dr Bernard Fromenty, INSERM U991, Univ Rennes 1

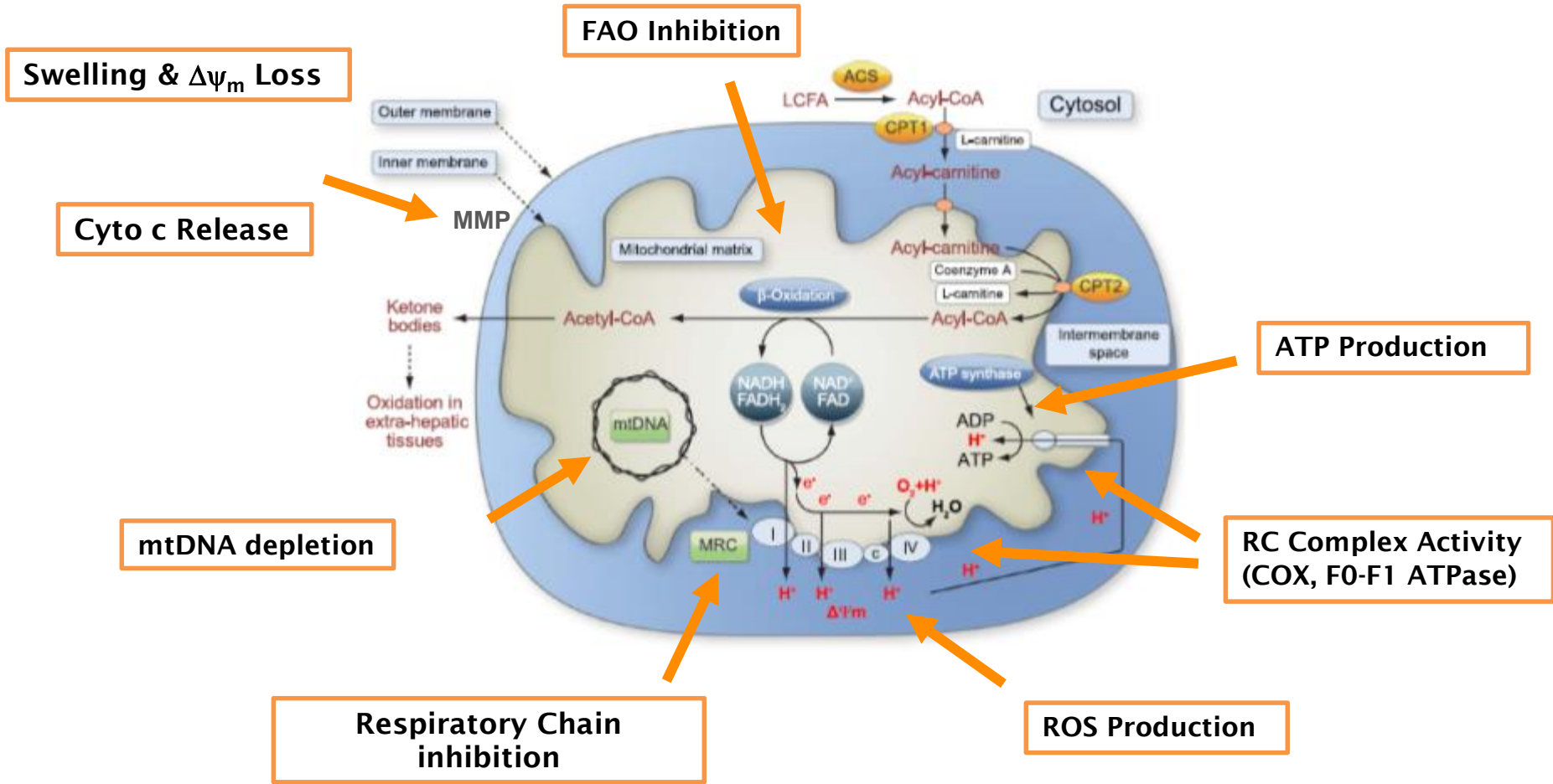
&

Mitologics SAS, Hôpital Robert Debré, Paris

aborgne.sanchez@mitologics.com

- De nombreux **médicaments contaminent les eaux de surface** et peuvent se retrouver dans **l'eau de boisson** (systèmes de purification peu efficaces)
- Les classes de médicaments le plus souvent retrouvées dans l'environnement sont les **antibiotiques, antalgiques et anti-inflammatoires**
- Des études indiquent des concentrations de médicaments contaminants pouvant atteindre **1 µg/L**
- **L'impact sur la santé animale et humaine** d'une exposition chronique à ces résidus médicamenteux est peu connu

- Le foie est une cible majeure de la toxicité induite par les xénobiotiques
- La toxicité hépatique des médicaments est souvent liée à la formation de métabolites réactifs via les cytochromes P450 (stress oxydant) et/ou à des altérations mitochondriales
- L'obésité est associée à des troubles métaboliques tels que diabète, dyslipidémie et diverses lésions hépatiques (stéatose et stéatohépatite)
- Des études indiquent que l'obésité augmente le risque d'hépatotoxicité médicamenteuse (dysfonction mitochondriale préexistante?)



From Begriche *et al.* J. Hepatol. (2011)

Il s'agissait de déterminer si:

- 1. L'exposition chronique à un cocktail de médicaments retrouvés dans l'eau (boisson/surface) pouvait présenter des effets délétères sur le foie (mitochondries) et les paramètres biologiques sanguins**
- 2. Il existe une différence d'effets dans un contexte d'obésité et de stéatose hépatique**
- 3. Quels sont les mécanismes éventuels**

Modèles animaux:

Souris WT vs ob/ob (déficiente en leptine):

- obèse et diabétique
- stéatose spontanée



Ob/ob

WT

Médicaments sélectionnés:

<i>Antalgique</i>	Paracétamol (Acetaminophen) Caféine
<i>AINS</i>	Acide salicylique Phénazone (Antipyrine) Diclofénac Ibuprofène
<i>Antibiotique</i>	Erythromycine Roxithromycine Sulfaméthoxazole
<i>Anticonvulsif</i>	Carbamazépine
<i>Psychoactif</i>	Cotinine

Concentrations retrouvées
dans des eaux de boisson

10 ng/L
10²
10³

Concentrations retrouvées
dans des eaux usées

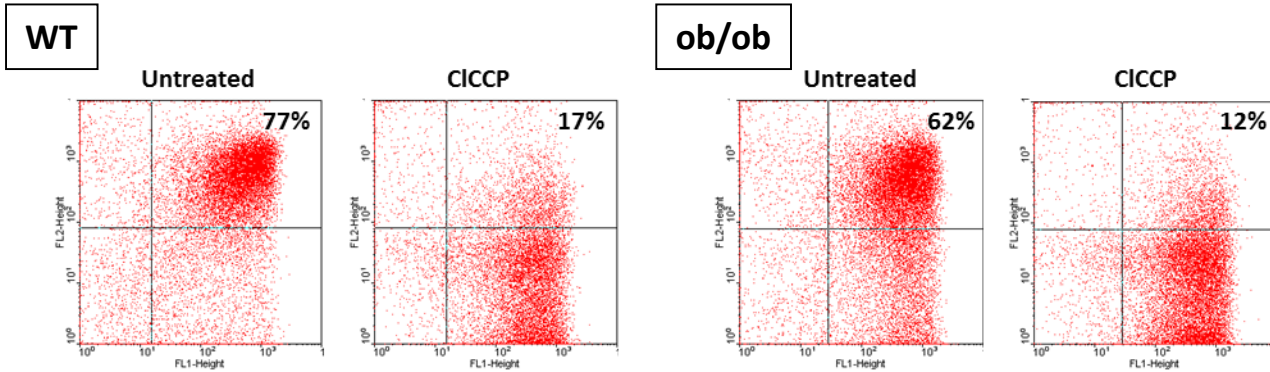
10⁴
10⁵

Doses infra-thérapeutiques

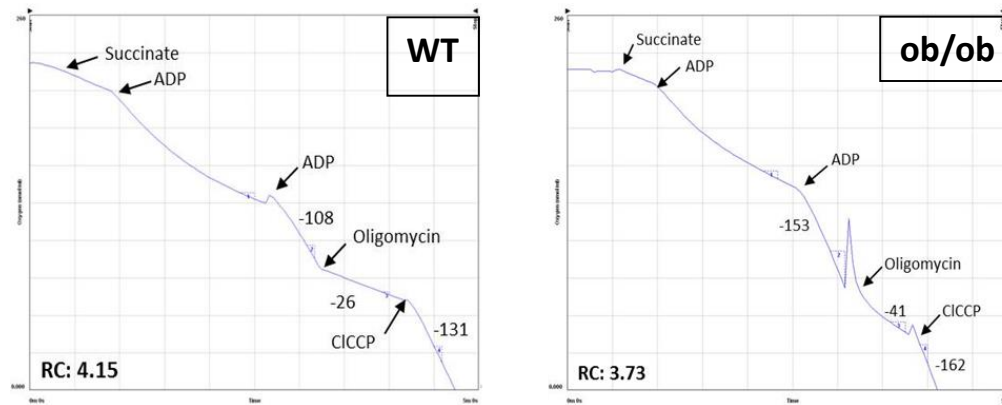
10⁶

Testés à (0.01), 0.1 et 1 mg/L

$\Delta\psi_m$
(JC-1)



O₂ consumption
(Clark electrode)

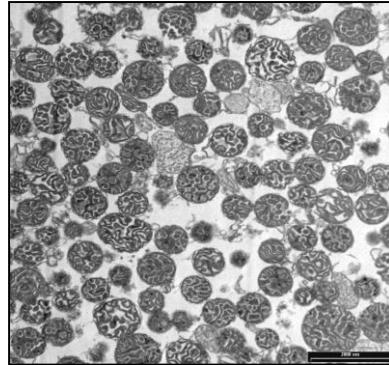


- Ob/ob liver:**
- ✓ lower amount of polarized mitochondria compared to WT
 - ✓ lower RCR, partial OxPHOS uncoupling

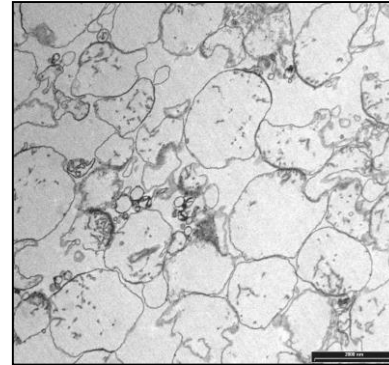
Ultrastructure

WT

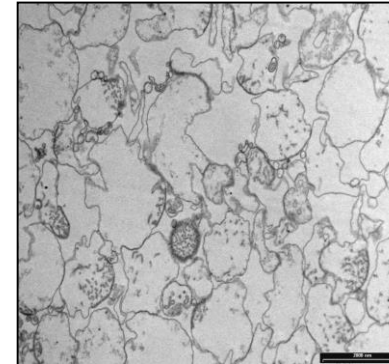
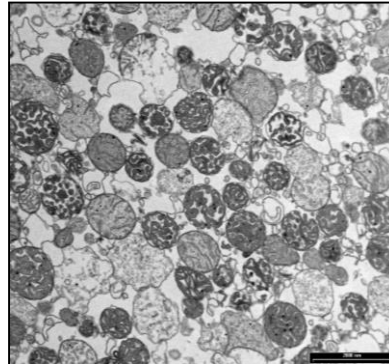
Untreated



CaCl₂ 50 μ M



ob/ob



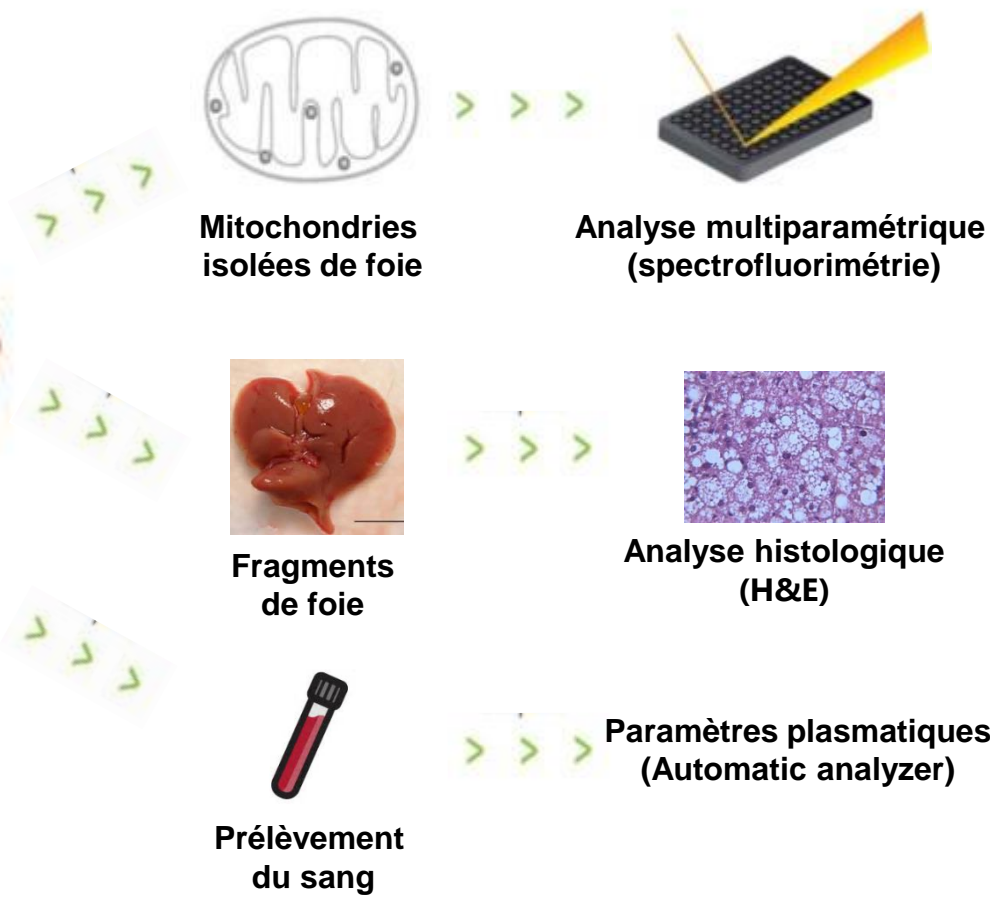
Ob/ob liver : numerous swollen and distorted mitochondria with lighter matrix

Cocktail dans l'eau de boisson pendant 4 mois (0.01), 0.1, 1 mg/L



Ob/ob

WT



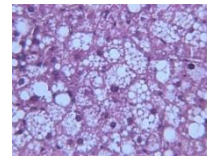
Mitochondries isolées de foie



Analyse multiparamétrique (spectrofluorimétrie)



Fragments de foie



Analyse histologique (H&E)



Prélèvement du sang

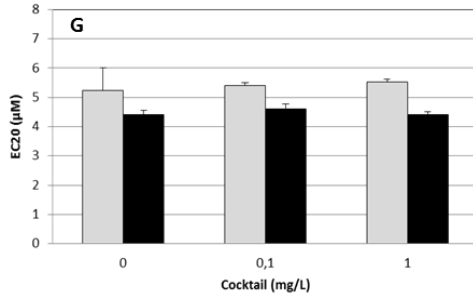
Paramètres plasmatiques (Automatic analyzer)

- ✓ Swelling (DO)
- ✓ $\Delta\Psi_m$ (Rh123)
- ✓ Cons d'O₂ (CI, CII, FAO) (MitoXpress)
- ✓ mtROS (MitoSox)

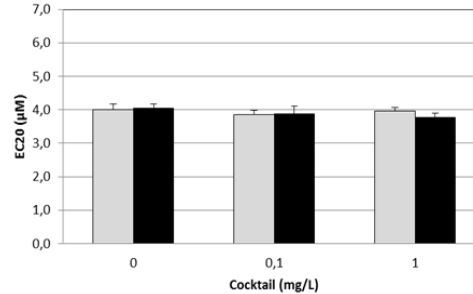
- ✓ Stéatose

- ✓ ALT
- ✓ AST
- ✓ Cholesterol
- ✓ Triglycerides
- ✓ Glucose
- ✓ Insuline

Ca-induced swelling



Ca-induced $\Delta\Psi_m$ loss

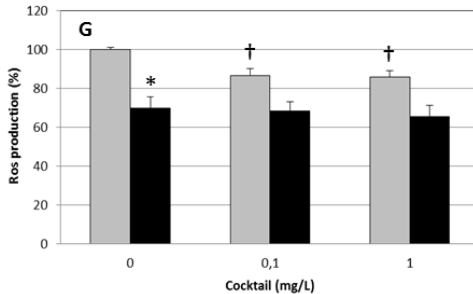


Compared to WT mt:

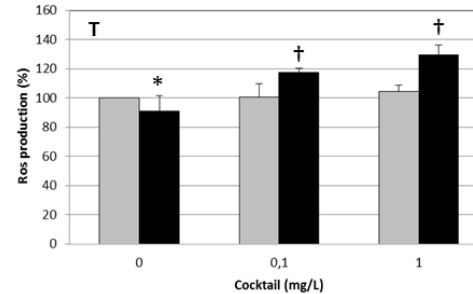
Ob/ob mt are more sensitive to Ca

No effect of treatment

Basal ROS



Antimycin-induced ROS



Compared to WT mt:

Ob/ob mt produce lower basal mtROS

Cocktail effect:

Decrease of basal mtROS in WT mt

Increase of Antimycin-induced mtROS in ob/ob

WT (□)

Ob/ob (■)

N= 4-8 per group

G: genotype effect

T: treatment effect

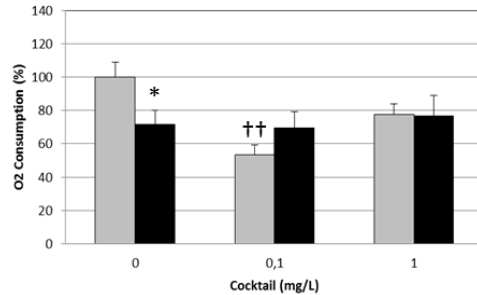
GxT: interaction genotype & treatment

*: p<0.005

** : p<0.001

Malate/glutaminate

Respiration, complex I



WT (□)
Ob/ob (■)

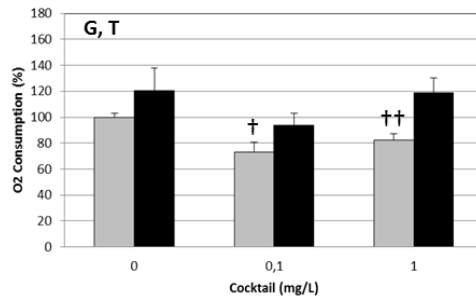
N= 4-8 per group

G: genotype effect
T: treatment effect
GxT: interaction gen & treat

*: p<0.005
**: p<0.001

Succinate

Respiration, complex II



Compared to WT:

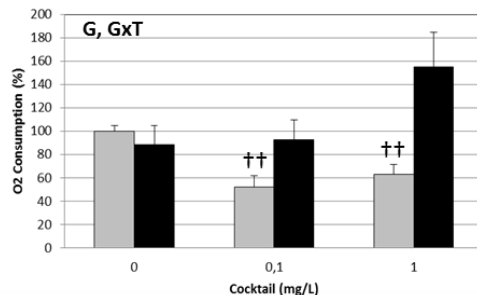
Lower CI-driven respiration in ob/ob

Cocktail effect:

Lower O2 consumption in WT mt (especially at 0.1 mg/L)

Plamitate

Respiration, FAO



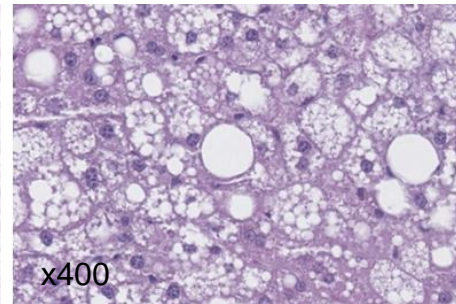
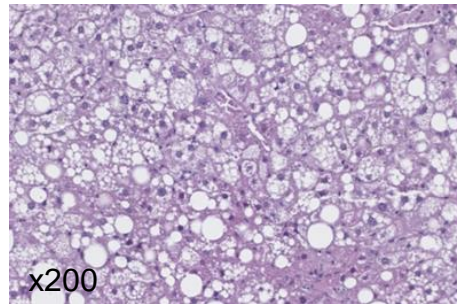
Increase of FAO-driven respiration in ob/ob mt (at 1 mg/L)

FAO activity stimulated in ob/ob mice

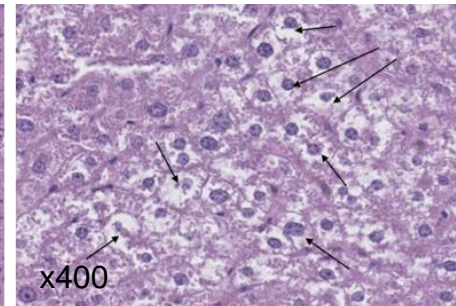
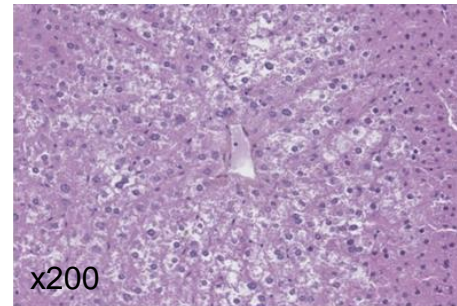
ob/ob

Liver histology

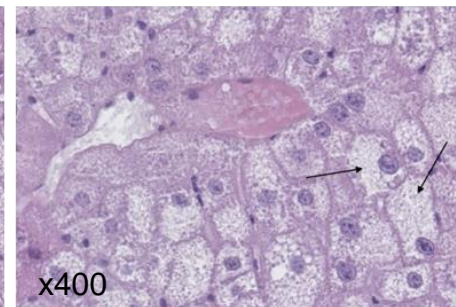
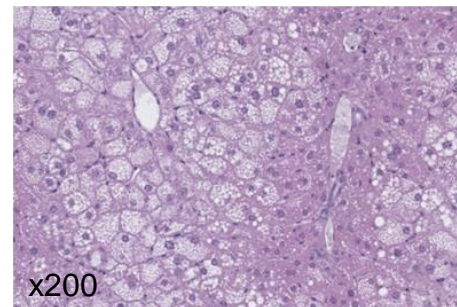
(N= 6)



Untreated



0.1 mg/L

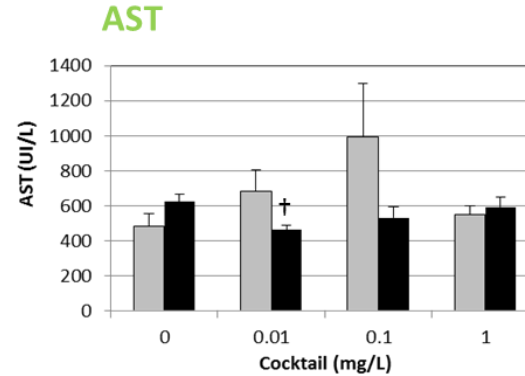
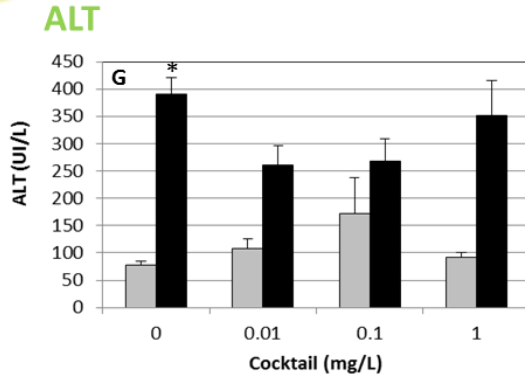


1 mg/L

WT liver: no significant alterations (<10% steatosis)

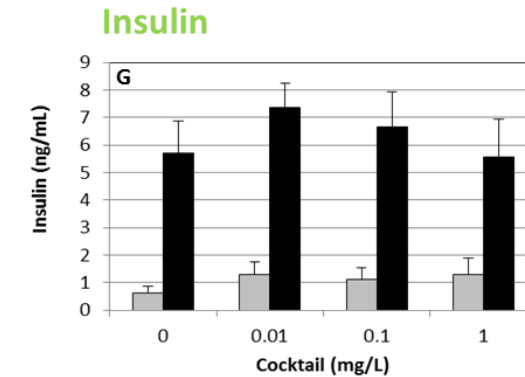
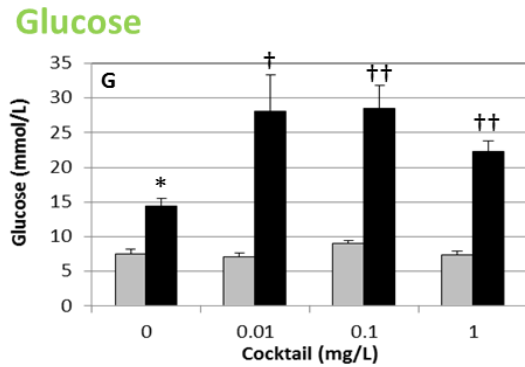
Ob/ob liver: massive steatosis but lipid deposition decreased with treatment (FAO stimulation)
clarification of cytoplasm in some treated mice

Plasma Parameters



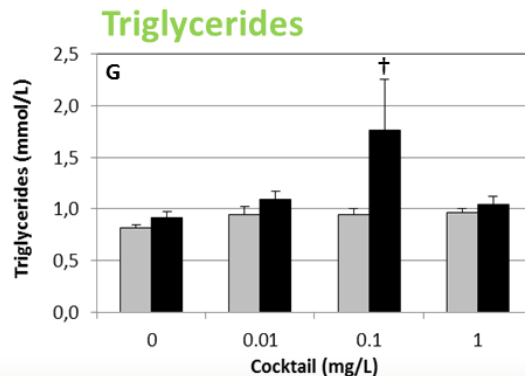
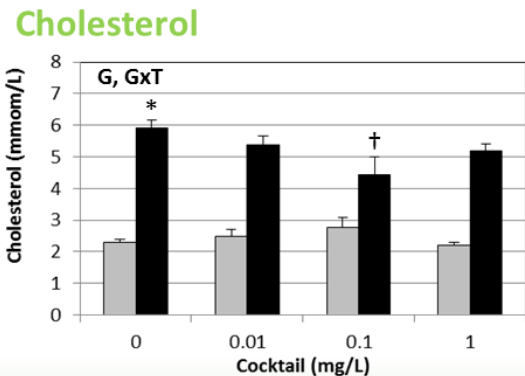
WT (□)
Ob/ob (■)

N= 8



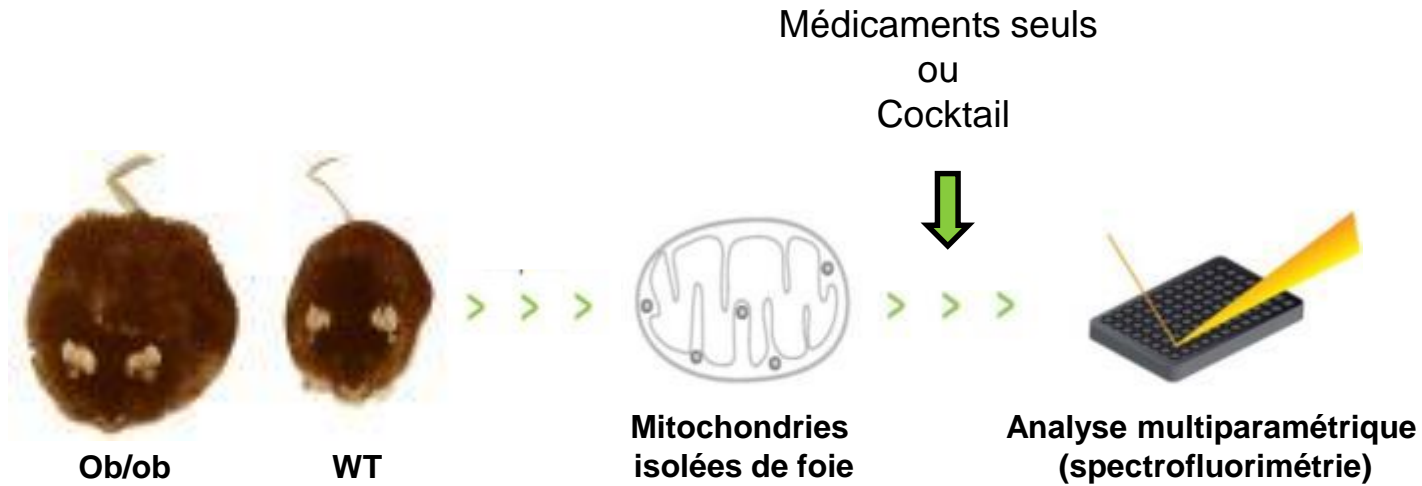
Compared to WT:
Elevated ALT in ob/ob (hepatic cytolysis)
Hyperglycemia
Hyperinsulinemia
Hypercholesterolemia

Cocktail effect:
In WT: slight ALT, AST increase
In ob/ob: increased glycaemia & triglycerides
decreased ALT, AST, cholesterol



G: genotype effect
T: treatment effect
GxT: interaction gen & treat

*: p<0.005
**: p<0.001



Souris non traitées

- ✓ Swelling (DO)
- ✓ $\Delta\Psi_m$ (Rh123)
- ✓ Cons d'O₂ (CI, CII, FAO) (MitoXpress)
- ✓ mtROS (MitoSox)

Compound EC20 (μM)	WT						ob/ob					
	Swelling	$\Delta\Psi_m$ loss	Resp CII	Resp CI	Resp FAO	ROS	Swelling	$\Delta\Psi_m$ loss	Resp CII	Resp CI	Resp FAO	ROS
Acetaminophen	>400	237	372	>400	>400	>400	>400	379	>400	>400	>400	>400
Antipyrine	>400	>400	>400	275	>400	>400	>400	>400	>400	599	>400	>400
Caffeine	>400	330	>400	>400	181 ^a	>400	>400	>400	>400	292	305 ^{**a}	>400
Carbamazepine	>400	262	201	388	>400	>400	>400	386 [*]	394	313	341	>400
Cotinine	>400	>400	>400	>400	234 ^a	>400	>400	>400	>400	>400	246 ^a	>400
Diclofenac	>400	160	31	23	47	>400	>400	253 [*]	26	19	11 ^{**}	>400
Erythromycin	>400	361	285	>400	207 ^a	>400	>400	440	239	297 ^a	203 ^a	>400
Ibuprofen	>400	>400	>400	93	277	>400	>400	>400	>400	104	71 [*]	>400
Roxithromycin	>400	186	>400	>400	138 ^a	>400	>400	348 [*]	>400	209	77 ^{*a}	222
Salicylic acid	>400	319	306	>400	>400	>400	>400	450	416	>400	>400	>400
Sulfamethoxazole	>400	>400	331	>400	220 ^a	>400	>400	>400	470	586	>400	>400

*: p<0.05 (Mann & Whitney test)
a: acceleration of oxygen consumption

Mitochondria from ob/ob mice presented:

- higher sensitivity to diclofenac, ibuprofen and roxithromycin on FAO parameter
- Lower sensitivity to carbamazepine, diclofenac and roxithromycin on $\Delta\Psi_m$

Compound EC20 (μM)	WT						ob/ob					
	Swelling	ΔΨm loss	Resp CII	Resp CI	Resp FAO	ROS	Swelling	ΔΨm loss	Resp CII	Resp CI	Resp FAO	ROS
Mixture EC20 (mg/L)	>5	>5	1.6 ^a	3.5 ^a	0.4 ^a	>5	>5	>5	1.4 ^a	2.2 ^a	1.1 ^{*a}	>5

*: p<0.05 (Mann & Whitney test)
 a: acceleration of oxygen consumption

Cocktail induced acceleration of O₂ consumption (CI, CII, FAO)

Mitochondria from ob/ob mice presented lower sensitivity to the cocktail for FAO

In vitro, cocktail effect could not be predicted from the effect of each individual drug

In vivo effect could not be predicted by the effect of the cocktail on mitochondria (drug metabolism, drug-drug interactions)

Effets long terme du cocktail:

WT:	Inhibition de la chaîne respiratoire et légère augmentation des taux de transaminases (augmenter les temps d'exposition?)
Ob/ob:	Augmentation de la production de ROS stimulée par AA Stimulation de la FAO Augmentation de l'hyperglycémie Modification de la stéatose

Cette étude a permis de montrer pour la première fois que:

- une exposition à des doses faibles de médicaments pouvait entraîner des **perturbations in vivo au niveau des mitochondries et du métabolisme**
- la sensibilité et le mécanisme pouvait **varier chez des animaux obèses/diabétiques**

Des **investigations supplémentaires** sont nécessaires afin de déterminer si la perturbation des fonctions mitochondriales pourrait expliquer certains des effets observés. Il serait également important de savoir **quels sont les médicaments** particulièrement impliqués in vivo.

INSERM U991

Bernard Fromenty
Karima Begriche
Thomas Gicquel

MITOLOGICS

Nelly Buron
Mathieu Porceddu
Célestin Roussel

Univ St Joseph (Liban)
Viviane Trak-Smayra

Article à consulter:

Buron N, Porceddu M, Roussel C, Begriche K, Trak-Smayra V, Gicquel T, Fromenty B, and Borgne-Sanchez A. Chronic and low exposure to a pharmaceutical cocktail induces mitochondrial dysfunction in liver and hyperglycemia: Differential responses between lean and obese mice. (2017) *Environ Toxicol* 32, 1375-1389.

Merci pour votre attention