

Activité antibactérienne d'un antibiotique polyéther carboxylique, le lasalocide et ses complexes.

Fatima-Zahra Khardli¹, Amina Melhaoui¹, Taibi Ben Hadda¹ Maria Daoudi ² et Mostafa Mimouni^{1*}

¹ Laboratoire de Chimie des Matériaux, Département Chimie, Faculté des Sciences, d'Oujda, 60000 Oujda, Maroc.

² Laboratoire de Chimie Organique, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz, Fès Maroc.

* Auteur pour correspondance: E-mail: Mimouni_8@yahoo.ca, Tél : 212 67 85 74 86
Fax : +212 37 77 20 67.

Remerciements

Nos vifs remerciements sont adressés à Mr. Le Professeur Georges Jeminet du **CNRS**, investigateur de ce thème de recherche. A l'**AUF** (Agence universitaire de la francophonie) et à l'Université Mohamed Premier (**UMP**), (**FSO PGR-UMP-BH-2007**) pour leurs financement. Une partie de ce travail a été réalisé dans le cadre de la convention CNRS-CNRST 03/02.

Résumé

Dans cet article nous avons réalisé des tests *in vitro* de l'activité d'un antibiotique polyéther carboxylique, le lasalocide acide (AH) ainsi que ses complexes de cations monovalents (NMe_4^+ , Li^+ , K^+ , Na^+ , Tl^+ , Rb^+ , Cs^+) divalents (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) et trivalents (Gd^{3+} , La^{3+}) contre trois souches de staphylocoque gram+ (*Staphylococcus xylois* (**STX**), *Staphylococcus aureus* (**STA**), *Staphylococcus coagulase+* (**STC**) et un bacille (*Bacillus megaterium* (**BAM**)) à caractère pathogène. Les CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) ont été déterminées par la méthode de la microdilution et les valeurs obtenues sont de l'ordre du ng/mL. Ces résultats révèlent une activité antibactérienne soulignée et montrent clairement l'apport prononcé du métal dans l'activité, particulièrement en faveur du complexe du thallium.

Mots clés : Lasalocide, Complexes; *Staphylococcus xylois* (**STX**), *Staphylococcus aureus* (**STA**), *Staphylococcus coagulase+* (**STC**), *Bacillus megaterium* (**BAM**).

Summary

In this article we carried out the *in-vitro* antibacterial screening of the carboxylic antibiotic polyether; lasalocid acidic (AH) like its complexes of monovalent cations (NMe_4^+ , Li^+ , K^+ , Na^+ , Tl^+ , Rb^+ , Cs^+) divalents (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) and trivalents (Gd^{3+} , La^{3+}) against three strains of *staphylococcus* Gram + (*Staphylococcus xylois* (**STX**), *Staphylococcus aureus* (**STA**), *Staphylococcus coagulase+* (**STC**) and a *Bacillus megaterium* (**BAM**)) in pathogenic matter. The MIC's were determined by the micro dilution method and the values obtained are in order of the ng/mL range. These results reveal an underlined activity and clearly showed the marked contribution of metal in the activity, particularly for the thallium complex.

Key-words: Lasalocid, complex, *Staphylococcus xylois* (**STX**), *Staphylococcus aureus* (**STA**), *Staphylococcus coagulase+* (**STC**), *Bacillus megaterium* (**BAM**).

Introduction

Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et souvent responsables d'infections contractées dans les hôpitaux (infections nosocomiales), (Institut Pasteur, 2007). Leur habitat naturel est constitué par les flores cutanées et muqueuses humaines et animales. Les staphylocoques sont des Cocci à Gram positif classiquement disposés en amas. Une vingtaine d'espèces de la familles de staphylocoques sont actuellement identifiées, dont l'espèce principale : *Staphylococcus aureus* (plus communément appelé staphylocoque doré). Une autre espèce qu'on ne peut pas nier son importance, c'est *Staphylococcus xylosus* (bactérie mentionnée comme une espèce dominante dans les ateliers de fabrication (Genoscope). Au sein de cette espèce, il existe une grande diversité de souches; certaines d'entre elles sont isolées du lait et du jambon cru et présentent un risque pour le consommateur par production des entérotoxines D, C ou E (Genoscope). D'autres souches de *S. xylosus* pathogènes et opportunistes pour l'animal sont décrites comme multi-résistantes à divers antibiotiques (Genoscope).

Les souches de l'espèce *Staphylococcus aureus* (producteur d'une coagulase) sont les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine et vétérinaire. En effet les staphylocoques "à coagulase-négative" (principalement *Staphylococcus epidermidis*), sont moins pathogènes. La souche de *staphylococcus aureus* partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales. Elle est également au deuxième rang des bactéries responsables d'intoxications alimentaires en France, après les salmonelles. Le traitement des infections dues à ces souches est difficile en raison de la prévalence élevée des souches multirésistantes aux antibiotiques dont la prévalence varie entre 20 et 50% des souches en fonction des services hospitaliers (Institut Pasteur 2007).

Aux États-Unis comme en Europe (Canadian Paediatric Society, 2006), la

présence de staphylocoque doré méthycillinorésistant (SDMR) chez les patients hospitalisés est un problème endémique dans de nombreux établissements (Muto C.A., 2003), (Boyce J. M, et al., 2004). Une infection à SDMR grave peut être traitée par plusieurs antibiotiques, tel que la vancomycine associé à un bêtalactamine, la gentamicine ou la rifampicine. L'usage généralisé des antibiotiques et des fluoroquinolones en particulier accroît le risque de colonisation par le SDMR chez l'individu et la transmission de SDMR d'un individu à l'autre (Muto et al. 2003, Boyces et al.2004). Il faudrait éviter une antibiothérapie et une prophylaxie excessives ou inappropriées.

Il a été souligné que dans certains pays 40 % des souches staphylocoques présentent une résistance intermédiaire ou sont résistantes à la pénicilline par production de pénicillinase (Swenson J. M. et Hill, B.C., 1986). Le système européen de surveillance de la résistance antimicrobienne (EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System) qui étudie le problème d'émergence de la résistance antimicrobienne (Bronzwaer SLAM et al, 1999) stipule que environ 90% des staphylocoques peuvent être éliminés par des antibiotiques, les 10% restant appelés MDR (Multi-Drug-Resistant) développent une résistance farouche.

Le genre *Bacillus* (famille des *Bacillaceae*) apparaît extrêmement hétérogène sur le plan génétique (% de G + C varie de 32 à 69%) (Euzéby J. P. 2007). Les bacilles sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires. En effet, certaines espèces de *Bacillus* produisent des spores dont la surface est hydrophobe ce qui leur permet d'adhérer fortement à divers matériaux et de résister aux procédés de nettoyage (Euzéby J. P. 2007). C'est le cas notamment des spores de *Bacillus cereus* qui

s'attachent très bien aux surfaces en acier inoxydable et qui posent de graves problèmes dans les industries alimentaires (Euzeby J. P. 2007).

Notre objectif est de chercher de nouveaux antibiotiques d'origine naturelle modifié ou non pour palier à ce problème de résistance. Notre choix s'est porté sur le lasalocide (X-537A), un antibiotique polyéther carboxylique isolé d'une souche de *streptomyces lasaliensis* (Berger J et al. 1951). Il est régulièrement utilisé comme facteur de croissance chez les bovins (Bergen, W. G. et D. B. Bates, 1984), (Van Nevel, C. J., et Demeyer D. I., 1988) ou comme agent anticoccidien chez les volailles. Cet antibiotique est un ionophore, capable de faciliter le transport cationique à travers les systèmes membranaires (Bolte Jean et al. 1982).

L'European Medicines Agency (**EMA**) (Veterinary Medicines and Inspections, 2004) a décrit le lasalocide comme étant l'un des ionophores les plus étudiés malgré sa haute toxicité, ce qui limite son usage dans la médecine humaine. Le sel sodium est absorbé rapidement et éliminé complètement par voie fécale. Jusqu'à la concentration de 2 mg/kg, le sel de sodium du lasalocide n'induit aucune mutation de gène donc ne provoque aucun dommage sur l'ADN.

Pour toutes ces raisons citées au préalable, nous nous sommes engagés dans l'étude du lasalocide acide, convaincus que cet ionophore doit ses propriétés non pas à sa fonction carboxylique acide, mais aux multiples éthers cycliques fonctionnalisés. La variation du métal coordonnant devrait nous permettre d'étudier les variations des propriétés antibactériennes en fonction de la nature du métal.

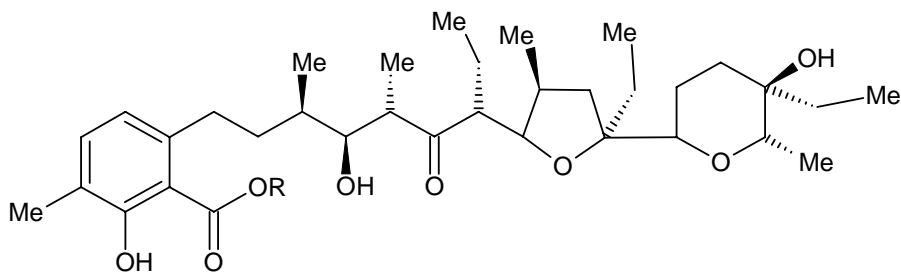
Nous avons modifié systématiquement la structure de la molécule mère commercialisée par coordination avec des métaux de valence diverses I, II ou III. Et ceci dans le but de mettre en évidence l'impact de la coordination sur l'activité anti-staphylocoque et anti-bacillus.

Ces tests ont été réalisés sur trois souches pathogènes Gram positif:

Staphylococcus xylophilus (**STX**), *Staphylococcus aureus* (**STA**), *Staphylococcus coagulase+* (**STC**) et un bacille, *Bacillus megaterium* (**BAM**). L'identification des bactéries a été réalisée à l'aide de galeries API.

Préparation des produits à tester

Le lasalocide est commercialisé sous forme de sel de sodium (ANa) mais de pureté moyenne (95 à 99% Sigma). Une première étape consiste à le purifier par chromatographie sur colonne de silice avec un éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle). Le sel est ainsi transformé par acidification en lasalocide acide (AH). La forme anionique (ANMe₄) est obtenue par addition de base (de tetraméthyle ammonium) mole à mole à la forme acide. Les formes complexées (AM, A₂M, A₃M) sont préparées par extraction phase aqueuse- phase organique). Tous les composés obtenus sont dosés par potentiométrie dans le méthanol, AH par une base de tetrabutyle ammonium (ANMe₄) et les complexes par l'acide perchlorique; la pureté trouvée est très satisfaisante (99,9%). La procédure de synthèse des complexes de routine dans notre laboratoire, est décrite en détail, dans plusieurs de nos publications antérieurs (Hébrant M. et al., 1991), (Mimouni M. et al., 1996), (Mimouni M., 1998); (Lyazghi R. et al., 1992). Les composés ainsi synthétisés sont bien identifiés par différentes méthodes analytiques et spectroscopiques usuelles à Clermont Ferrand (France). Certains de ces composés ont été fournis généreusement par Mr. Georges Jeminet (Ex Directeur de recherche au CNRS au laboratoire SEESIB, Clermont-Ferrand, France) (Figure 1)



Formes acide, anionique et complexées du lasalocide	
1 : R = NMe ₄	8 : R = Mn
2 : R = Li	9 : R = Mg
3 : R = Na	10 : R = Sr
4 : R = K	11 : R = Ba
5 : R = Tl	12 : R = Gd
6 : R = Rb	13 : R = La
7 : R = Cs	14 : R = H

Figure 1 : Structure du lasalocide et ses complexes

Méthode de détermination des CMI

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la CMI concentration minimale inhibitrice (Jones R.N. et al, 1985). Plusieurs méthodes permettent la détermination de la CMI d'un antibiotique, les plus utilisés étant les méthodes de dilution (effectuées en milieu liquide ou en milieu solide) ou la méthode de diffusion (basée sur l'application de disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester).

Dans ce travail nous avons utilisé la méthode de microdilution effectuée en milieu liquide sur microplaques, cette technique nous a permis d'économiser non seulement le milieu de culture mais surtout les produits à tester. Le milieu liquide utilisé

est celui de Mueller- Hinton (BIOKAR DIAGNOSTICS-Beauvais-France) à pH = 7,4 ± 0,2. Pour éviter l'interférence du solvant, l'antibiotique est utilisé après dilution en Bouillon Mueller- Hinton (BMH) des solutions mères de façon à garder une concentration du DMSO ne dépassant pas les 0,5% dans les solutions finales (Jagannath et al. 1995). Dans le BMH distribué dans les cupules d'une plaque de microtitration stérile, les composés sont incorporés en solution à des concentrations croissantes de raison 2. Chaque dilution a été placée en contact d'un inoculum bactérien en phase de croissance exponentielle avec une concentration d'environ 10⁴ à 10⁵ UFC/mL, obtenu à partir d'une culture en bouillon de 18 heures à 37 °C et diluée au 1/100. Dans les mêmes conditions, une culture témoin (sans antibiotique) a été réalisée simultanément pour vérifier que les souches sont en phase exponentielle même après 18 heures d'incubation. Après incubation à 37°C pendant 18 à 20 heure en atmosphère ordinaire on obtient un trouble satisfaisant, la CMI est indiquée par le puit qui contient la plus faible concentration du composé à tester et où aucune croissance n'est visible à l'oeil nu. Des corrections de dilutions successives sont nécessaires afin de remonter à la CMI finale.

Résultats et discussion

En général l'activité du lasalocide contre les trois souches décroît dans le sens (*STA*) > (*BAM*) > (*STC*) > (*STX*). Pour toutes les souches, la meilleure CMI trouvée est celle pour le complexe de thallium (composé 5 ATl) de 9 à 97 ng/ml.

Pour la souche (*STX*) la CMI passe de 9 ng/ml à 2,2 mg/ml donc une vaste variation de l'activité suivant le métal coordonné. Pour la souche (*STA*) très peu de variation avec la coordination; plusieurs complexes ont en moyen une CMI de l'ordre de 50 ng/ml. La gamme de variation des CMI pour les souches (*STC*) et (*BAM*) est plus élevée et se situe entre 170 et 350 ng/ml.

Le rôle de la complexation est de figer la molécule dans une configuration bien

définie, ceci permet de mieux diriger le ou les sites pharmacophores responsables de l'activité. Ce qui explique l'augmentation ou la chute de l'activité antibactérienne suivant le métal complexé. D'après les résultats trouvés le lasalocide est d'autant plus actif sur les souches à caractère hydrophile que hydrophobe (H. Latrache, Euzeby J.P). Ce qui reflète entre autre la propriété restreinte du lasalocide et de ses complexes qui passe de la forme linéaire ouverte à la forme englobée fermée. En effet les hétéroatomes du lasalocide s'orientent vers l'intérieure et rentre en interaction avec le métal, les groupements méthyles sont dirigés vers l'extérieure en formant une calotte externe hydrophobe. C'est cette calotte externe qui permet de franchir la barrière membranaire aisément. Bien sur ceci n'est possible que par la présence dans la molécule du lasalocide de plusieurs rotamers.

Cet arrangement du complexe devrait garantir quelques avantages, tels qu'une diffusion plus facile à travers les milieux à caractère lipophile (membrane) ou le prolongement du spectre d'activité de l'antibiotique parent.

CMI (ng/mL)				
Composés	Souches			
	(STX)	(STA)	(STC)	BAM)
1. A NMe ₄	635	108	173	346
2. A Li	571	97	156	311
3. A Na	293	25	319	160
4. A K	NF	69	307	138
5. A Tl	9	16	97	52
6. A Rb	1292	55	352	88
7. A Cs	692	118	189	377
8. A ₂ Mn	262	36	264	70
9. A ₂ Mg	584	34	504	135
10. A ₂ Sr	138	47	139	73

11. A ₂ Ba	1185	79	596	159
12. A ₃ Gd	2218	38	1884	310
13. A ₃ La	223	46	689	183
14. AH	643	48	289	77

Tableau de l'inhibition de la croissance bactérienne par la lasalocide et ses complexes.

Conclusion

En conclusion, l'apport de la complexation est bien prononcé puisque les différences des CMI entre les formes complexées et les formes libres AH et ANMe₄ sont très significatives. Parmi les quatre souches étudiées, il est certain que le lasalocide et ses complexes seront les antibiotiques de choix contre la souche pathogène (*STA*). Pour chaque souche nous avons une sélectivité soulignée pour un complexe donné.

Malgré que nous soyons aux étapes préliminaires de ce travail, les résultats obtenus inspirent la reconduction des investigations aux tests de résistance bactérienne. Une application concrète de ces résultats est fort possible dans l'industrie sanitaire hospitalière ou ménagère.

Bibliographie

Bergen W. G., Bates D. B., (1984). Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action *J. Anim. Sci.* 58:1465–1483.

Berger J., Rachelin A.I., Scott W.E., Sternbach L.H., Goldberg M.W., (1951), The isolation of three new cristalline antibiotics from streptomycetes. *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (11),5295-5298.

Bolte J., Demuynck C., Jeminet G., Juillard J. et Tissier C. (1982). Étude comparée de trois antibiotiques ionophores: X.537 A (lasalocide), A.23187(calcimycine) et X.14547 A. Complexation des cations IA et IIA, transport de Ca⁺⁺.*Rev. Can. Chim. Can. J. Chem.* 60(8), 981-989.

Boyce J.M., Havill NL, Kohan C, Dumigan DG, Ligi CE. (2004). Do infection control measures work for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Infect Control Hosp Epidemiol*; 25, 395-401.

Bronzwaer S., Goettsch W, Olsson –Liljequist B, Wale M.C.J., Vatopoulos A.C., Sprenger M.J.W., (1999). European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) objectives and organisation. *Eurosurveillance*; 4(4), 41-4.

Canadian Paediatric Society, Le contrôle et le traitement du staphylocoque doré méthicillino-résistant dans les établissements de santé pédiatriques du Canada, 2006
<http://www.cps.ca/francais/enonces/ID/ID06-01.htm>.

European Medicines Agency (EMA), Veterinary Medicines and Inspections, (report 2004), pp 1-10. <http://www.emea.eu.int>. Euzéby J.P.,

Dictionnaire de bactériologie vétérinaire :
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bacillus.html>.

Genoscope, <http://www.genoscope.cns.fr/spip/Staphylococcus-xylosus-bacterie.html>.

Hébrant M., Pointud Y., Juillard, J. (1991). Thermodynamics of reactions in heterogeneous systems (water-organic phases) between the ionophore monensin and alkali-metal cations. *J. Phys. Chem.* 95(9); 3653-3662.

Institut Pasteur, Les maladies infectieuses: les staphylococcies, (2007), <http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/staphylo.html>.

Jagannath C., Reddy V. M., Gangadharam P. R. (1995). Enhancement of drug susceptibility of multi-drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethambutol and dimethyl sulphoxide. *J. Anti. Chem.* 35, 381-390.

Jones, R.N.; Barry, A.L.; Gavin, T.L.; Washington, J.A. (1985), Manual of Clinical Microbiology ASM, in : Balows, A; Hausler, W.J.; Shadov, H.J. (Eds), Washington, D.C., pp. 972.

Latrache H. http://www.pasteur.ma/symposium_workshop/HAMADI.pdf.

Lyazghi R., Cuer A., Dauphin G., Juillard J. (1992). Interactions between metal cations and the ionophore lasalocid. Part 9. Structural study of the free acid, anion and potassium complex salt in chloroform and methanol, using ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II.* 35-42.

Mimouni M., Hébrant, M. Dauphin, G. Juillard J. (1996). Monovalents cations salts of the bacterial ionophore monensin in methanol. Structural aspect from NMR experiments. *J. Chem. Res. (M)* 1416.

Mimouni M., (1998). Etude thermodynamique et structurale des interactions des ionophores d'origine bactérienne (lasalocide, monensine et calcimycine) avec des cations monovalents, divalents et trivalents) en solution. Thèse de Doctorat d'Etat, es-sciences, Faculté des Sciences Mohamed Ier, N° 213/98.

Muto C.A., Jernigan J.A., Ostrowsky B.E., Richet H.M., Jarvis W.R., Boyce J.M., Farr B.M., (2003). SHEA Guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 24, 362-386.

Swenson, J.M., Hill, B.C. (1986). Thornsberry, screening pneumococci for penicillin resistance. *C. J. Clin. Microbiol.*, 24, 749-752.

Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer (1988). Manipulation of rumen fermentation pp. 387–443 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. ed. P. N. Hobson. Elsevier Science Publishers, LTD, Essex, England.