

Etude « in vitro » de quelques antibiotiques ionophores et de certains de leurs dérivés. II. Caractérisation des propriétés ionophores des composés dans un système modèle, pour les ions Na^+ et K^+

S. CAFFAREL-MENDEZ, Colette DEMUYNCK, G. JEMINET

Laboratoire de Chimie Organique Biologique (UA 485 du CNRS),
UFR de Recherche scientifique et technique,
Université de Clermont-Ferrand II, B.P. 45, 63170 Aubière, France.

Summary. *In vitro* study of several ionophore antibiotics and some of their derivatives. II. Characterization of the ionophore properties of the compounds in a model system for Na^+ and K^+ ions.

Transport of Na^+ and K^+ by different carboxylic polyether antibiotics and some of their derivatives was measured in a triphasic water/chloroform/water model system.

Monensin, nigericin, narasin and lasalocid proved to be efficient K^+ carriers, while grisorixin, alborixin and X 14547A gave lower ionic fluxes. Furthermore, the structural modifications of nigericin, grisorixin and lasalocid reduced the ionophore properties of the corresponding natural metabolite. Monensin was also characterized as a good Na^+ carrier.

Cation transport results were in keeping with those of a previous study on the end-products of rumen fermentation. In both cases monensin, nigericin, narasin and lasalocid were the most efficient compounds.

Les antibiotiques polyéthers carboxyliques, isolés de souches de *Streptomyces*, appartiennent à un groupe de composés dénommés « ionophores » qui possèdent la propriété de former des complexes liposolubles, électriquement neutres, avec les cations Na^+ , K^+ et/ou Ca^{++} , Mg^{++} . Ils facilitent, sous cette forme, la migration de ces cations à travers les membranes cellulaires (Westley, 1982). Chacun de ces composés présente généralement une sélectivité de transport en faveur d'un cation. Les gradients de concentration, présents de part et d'autre des membranes, sont ainsi dissipés pour certains de ces cations et pour les protons (mécanisme par antiport $\text{H}^+ \leftrightarrow \text{M}^+$), les activités biologiques observées sont la conséquence des modifications induites dans les cellules (Bergen et Bates, 1984).

Ces molécules sont principalement actives contre les bactéries à Gram + (Bakker, 1979) ; de plus, ce sont des coccidiostats efficaces utilisés en aviculture (Ruff, 1982). Cet intérêt commercial est accru par le fait qu'ils agissent également

comme des facteurs de croissance chez les Ruminants (Durand, 1982 ; Bergen et Bates, 1984). Bien que la famille de ces ionophores compte actuellement plus de 90 représentants isolés et caractérisés, seule la monensine est autorisée pour cette dernière application.

Dans le cadre d'une étude générale menée sur le mode d'action de ces composés (Bolte *et al.*, 1986), nous avons étudié différents antibiotiques polyéthers carboxyliques produits au laboratoire, à partir des souches déposées, et quelques-uns de leur dérivés obtenus par hémisynthèse. Leur action a été précédemment testée, sur les fermentations du rumen (Caffarel-Mendez *et al.*, 1986), en utilisant une technique « *in vitro* » décrite par Jouany et Thivend (1986). Il était intéressant de caractériser, dans une étude complémentaire, les propriétés ionophores de ces molécules vis-à-vis de Na^+ et K^+ , dont le transport est vraisemblablement impliqué dans l'effet inhibiteur sur le développement de certaines bactéries du rumen (Bergen et Bates, 1984). Cette étude a été effectuée à l'aide d'un système modèle à trois phases eau/chloroforme/eau. Les résultats obtenus sont discutés en relation avec les tests biologiques évoqués.

Matériel et méthodes.

Antibiotiques étudiés. — Les structures des 8 ionophores bactériens et des 3 dérivés qui sont inclus dans ce travail se trouvent rassemblées sur la figure 1.

Le lasalocide **8** est un produit commercial (Sigma) et la préparation de son dérivé acétylé **9** a été mise au point précédemment (Westley *et al.*, 1973). Les autres ionophores sont obtenus par culture en fermenteur de 20 l des souches de *Streptomyces* déposées (banques ATCC ou NRRL) ou du laboratoire (LAB) mentionnées ci-après : monensine **1** (souche ATCC 15413) ; nigéricine **2** (NRRL B 1865) ; grisorixine **4** (LAB 2142) ; alborixine **6** (LAB 3840) ; narasine **7** (NRRL B 8092) ; X 14547A **10** (NRRL 8167) ; A 23187 ou calcimycine (NRRL 3882). Les conditions de culture et de purification ne seront pas détaillées ; elles sont contenues dans les publications précédentes du laboratoire (Bolte *et al.*, 1982, et références citées).

Le dérivé O-acétyl **3** de la nigéricine est préparé par action de l'anhydride acétique dans la pyridine à 0 °C. Il est purifié par chromatographie sur colonne (gel de silice Merck 0,063-0,200 mm, éluant éther-cyclohexane 80 : 20). L'éther méthylique de la grisorixine **5** est obtenu à partir d'un mélange réactionnel mis au point par Fukuyama *et al.* (1979) [$\text{CH}(\text{OCH}_3)_3$, CH_3OH , acide camphre sulfonique, solvant CH_2Cl_2 , 25 °C]. La purification du composé est effectuée dans les mêmes conditions que pour **3** mais avec l'éluant acétate d'éthyle-cyclohexane 60 : 40.

La structure de tous les composés est confirmée par spectrométrie de masse (FAB) pour la masse molaire exacte et les fragmentations caractéristiques et par spectrométrie de RMN ^1H et ^{13}C à 300 MHz pour l'analyse des enchaînements structuraux.

Transport dans une membrane liquide épaisse. — Les valeurs des flux ioniques mesurés sont fonctions des conditions expérimentales : forme de la cellule, agitation, température, concentrations relatives cation/ionophore..., c'est la raison

pour laquelle un protocole rigoureusement identique a été mis au point pour tous les ionophores étudiés.

La cellule de transport utilisée dans nos travaux (Bolte *et al.*, 1982) est un tube en U dont les deux branches mesurent 100 mm, la base 50 mm, et le diamè-

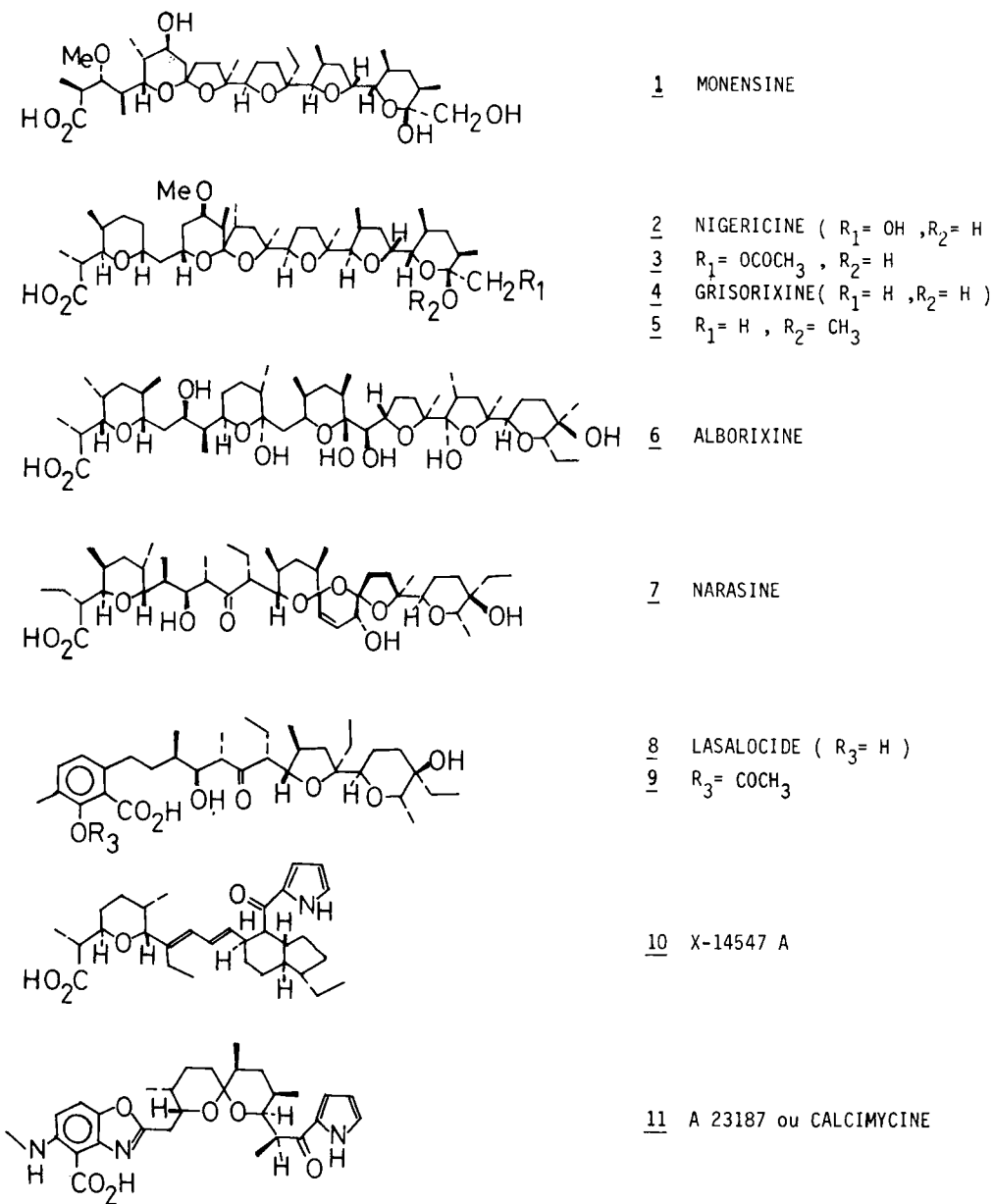


FIG. 1. — Structure des composés étudiés avec représentation des configurations absolues.

tre intérieur 11 mm. L'ensemble est thermorégulé à $25,0 \pm 0,1$ °C par une circulation d'eau à travers une chemise. La cellule contient deux phases aqueuses I et II de 5 ml séparées par une phase chloroformique de 9 ml.

Les phases aqueuses sont agitées par des agitateurs mécaniques constitués d'une baguette de verre (\varnothing 3 mm), terminée par une pale de 6×3 mm mue par un moteur électrique synchrone tournant à 600 tours/min. Les pales sont situées à mi-hauteur des deux phases. La phase chloroformique est agitée par un agitateur magnétique cylindrique (\varnothing 2 mm, longueur 10 mm), tournant à 600 tours/min également.

Dans les conditions initiales de mesure, la phase aqueuse I contient du KCl ou du NaCl à la concentration 10^{-2} M et est tamponnée avec de la tricine. Des variations du domaine de pH entre 6 et 10 sont obtenues par addition soit de HCl 0,1N soit d'hydroxyde de tétrabutylammonium (solution aqueuse à 10 %). A l'interface eau/chloroforme, le cation est extrait par l'ionophore insoluble dans l'eau ; le complexe formé migre ensuite par un processus de diffusion simple vers l'autre interface où le cation est libéré dans la phase aqueuse II dont le pH est maintenu à 7,0 par la tricine (10^{-2} M).

La phase organique qui simule une membrane est constituée par du chloroforme Normapur Prolabo préalablement saturé d'eau ; l'ionophore y est mis en solution initialement sous la forme acide libre rigoureusement contrôlée, à la concentration 10^{-3} M.

Pour chaque valeur du pH imposé dans la phase aqueuse I, la cinétique d'apparition des ions K^+ ou Na^+ dans la phase II est mesurée par spectrophotométrie d'émission atomique (spectrophotomètre Perkin-Elmer 420). Pour cela, un échantillon de 0,5 ml est prélevé et remplacé par la même quantité de tricine 10^{-2} M. En l'absence d'ionophore, aucun apport de cation n'est observé dans la phase II. Le seuil de détection est 0,02 ppm.

Dans les expériences de compétitions Na^+/K^+ qui sont évoquées, les conditions opératoires restent les mêmes sauf pour NaCl et KCl qui sont présents simultanément dans la phase I, à la concentration 10^{-2} M. L'absence d'interférences entre les ions Na^+ et K^+ a été vérifiée.

Pour chaque valeur du pH, le flux d'ions J exprimé en $nmole.s^{-1}.cm^{-2}$ est déterminé à partir d'un graphique où sont portées les concentrations ioniques détectées dans la phase II en fonction du temps. Ce flux augmente d'abord, ce qui correspond à l'établissement du régime quasi stationnaire, puis reste constant. C'est cette dernière valeur qui est retenue. La précision sur la mesure est estimée à 5 %.

Résultats

L'ensemble des résultats est rassemblé sur la figure 2 (a-f), où l'on a représenté le flux J en fonction du pH de la phase aqueuse I pour 10 composés. La calcimycine **11** n'y figure pas car dans ces conditions expérimentales on ne détecte aucun transport de Na^+ et K^+ par cet ionophore ; il en est de même pour **6** et **10** en ce qui concerne Na^+ . On observe que le transport est

dépendant du pH dans tous les cas, mais les courbes diffèrent d'un composé à l'autre.

Pour la monensine 1, jusqu'à pH 7,5 la valeur du flux ionique est nettement supérieure pour Na^+ , puis la sélectivité s'inverse, le flux pour K^+ augmente jusqu'à atteindre $0,54 \text{ nmole.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ à pH 9,5. Pour tous les autres composés la sélectivité est en faveur de K^+ .

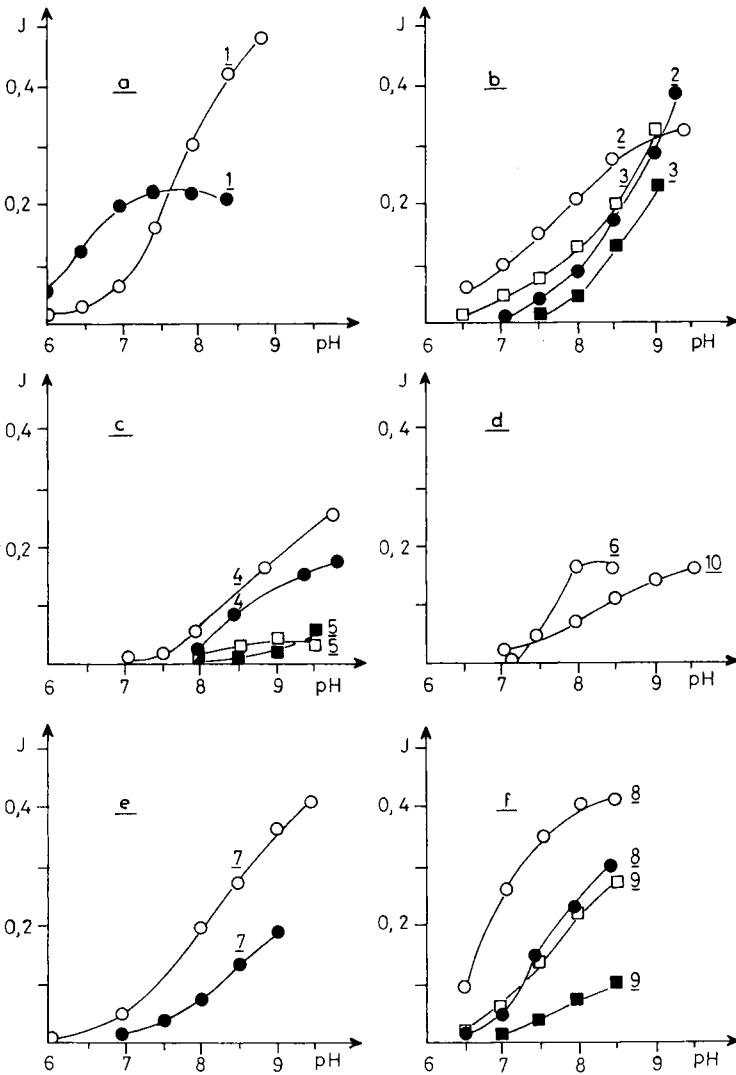


FIG. 2. — Courbes de transport représentant le flux ionique J (en $\text{nmole.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$), mesuré dans la phase aqueuse II en fonction du pH de la phase aqueuse I.

K^+ : ○ ionophore bactérien □ dérivé
 Na^+ : ● — id — ■ — id —

Dans la zone de pH 7-8, on distingue quatre transporteurs efficaces du potassium : il s'agit des composés monensine **1**, nigéricine **2**, narasine **7** et lasalocide **8**. Dans ce test, les autres métabolites bactériens grisorixine **4**, alborixine **6**, X 14547A **10**, entraînent des flux d'ions beaucoup plus faibles. Les modifications structurales de bout de chaîne effectuées sur les composés **3**, **5** et **9** diminuent les propriétés ionophores si l'on se réfère au composé non modifié.

Quelques essais ont été effectués en mettant en présence simultanément les deux cations dans la phase I à la concentration 10^{-2} M. Dans ces conditions, pour la monensine **1** seul Na^+ est transporté sur toute la gamme de pH étudiée ; inversement, on observe un transport de K^+ pour les autres composés. Ceci montre que la compétition pour la formation du complexe à l'interface phase I/chloroforme est toujours favorable à l'ion le mieux extrait de la phase aqueuse, ceci a été montré quantitativement pour la monensine par la mesure des constantes d'extractions (Bolte *et al.*, 1986).

Discussion et conclusion.

Le système eau/ CHCl_3 /eau est utilisé par de nombreux auteurs depuis les premières expériences de Ashton et Steinrauf (1970). Il s'agit d'une mesure physico-chimique qui permet de caractériser l'aptitude au transport cationique d'une molécule soluble uniquement dans les solvants organiques. Le mécanisme du transfert ionique implique la succession des étapes suivantes :

- formation d'un complexe neutre, ionophore déprotoné-cation, à l'interface phase I/ CHCl_3 ;
- diffusion du complexe dans la phase organique ;
- dissociation du complexe à l'interface phase II/ CHCl_3 ;
- diffusion en retour de l'ionophore sous la forme acide.

Dans son principe, le mode d'action reste le même s'il s'agit d'une membrane biologique (Taylor *et al.*, 1982). Il existe cependant des différences importantes qui sont liées à la nature de l'interface eau/phospholipides chargés, à l'épaisseur de la bicouche (50-70 Å), à la présence simultanée des cations Na^+ , K^+ , Mg^{++} et Ca^{++} à des concentrations différentes et plus ou moins associés aux sites biologiques.

Des mesures de flux ionique ont été effectuées sur des bicouches phospholipidiques planes artificielles ou B.L.M. pour la grisorixine **4**, en présence de $^{42}\text{K}^+$ (Amblard *et al.*, 1985). On observe que les courbes de flux en fonction du pH sont du même type que celles notées sur la figure 2. Les BLM sont acceptées comme des modèles proches des systèmes biologiques. Nous considérons donc que les résultats décrits ici constituent une première caractérisation, acceptable, des propriétés ionophores des composés. Il convient de remarquer cependant que les pH utilisés dans cette technique de transport ne doivent pas être directement comparés à ceux des milieux biologiques, les phénomènes de dissociation aux interfaces se situant très vraisemblablement dans des zones de pH différentes. A notre connaissance, ce problème difficile à traiter n'a pas été étudié. L'intérêt de la méthode est sa relative facilité de mise en œuvre qui autorise des comparaisons

entre de nombreuses molécules ; les autres techniques faisant appel à des membranes artificielles phospholipidiques nécessiteraient un travail important et très spécialisé, pour le même type d'investigations.

La série des composés mentionnés sur la figure 1 a été testée préalablement *in vitro* sur les principaux produits de la fermentation dans le rumen (Caffarel-Mendez *et al.*, 1986). Si l'on s'intéresse au résultat principal, la nigéricine **2** et la narasine **7** ont, comme la monensine **1** et le lasalocide **8**, augmenté la part représentée par l'acide propionique, aux dépens de celles des acides acétiques et surtout butyrique, dans le mélange des acides gras volatils. Le lasalocide O-acétyl **9** conserve une action significative également. Le même effet a été observé avec la grisorixine **4** et l'alborixine **6** mais à un degré moindre puisque le seuil de signification n'a pas été atteint. X 14547A **10**, nigéricine O-acétyl **3** et grisorixine O-méthyl **5** n'ont eu aucune action. On observe que ces résultats coïncident presque exactement avec l'aptitude des composés à transporter efficacement K⁺ dans notre système modèle ; ceci est en particulier vrai pour **1**, **2**, **7**, **8** considérés comme des facteurs de croissance potentiels dans les tests *in vitro* sur le rumen. Le cas de la monensine **1** est particulier puisque ce composé est un transporteur efficace à la fois de Na⁺ et de K⁺.

Comme l'analysent très bien Bergen et Bates (1984), les transports ioniques susceptibles d'affecter les bactéries à Gram (+) sensibles du rumen, sont fonctions des différences de pH (interne et externe) et de concentrations cationiques pour K⁺ et Na⁺ (internes et externes). Pour les cellules bactériennes en croissance, un échange Na⁺_{ext.} ↔ K⁺_{int.} pourrait être induit par la monensine, les autres composés favorisant préférentiellement l'échange H⁺_{ext.} ↔ K⁺_{int.}. Nous nous proposons d'approfondir cette hypothèse sur une bactérie modèle, à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (RMN), technique non invasive qui permet de mesurer le pH_{int.} (sonde au ³¹P) et de suivre le mouvement de Na⁺ notamment (sonde au ²³Na) (Delort *et al.*, en cours).

Pour le cas de la calcimycine **11**, on note que cet ionophore a eu un comportement original dans les tests sur le rumen puisqu'elle a entraîné une augmentation de la production de butyrate au détriment du propionate, ce qui permettrait d'envisager cette molécule comme additif alimentaire chez la vache laitière, si sa toxicité n'était pas strictement limitative. Nous avons observé l'inaptitude au transport de Na⁺ et de K⁺ de cette molécule. Dans les mêmes conditions, c'est par contre un ionophore des cations divalents Mg⁺⁺ et Ca⁺⁺ (Bolte *et al.*, 1983). Ceci suggère un mode d'action sur le rumen différent des autres composés et à notre connaissance ce type de remarque n'a jamais été mentionné.

En conclusion, la démarche générale entreprise, qui associe les tests sur le rumen et une caractérisation physico-chimique des composés, permet d'avoir une vue originale sur le mode d'action des antibiotiques polyéthers carboxyliques et autorise, par ailleurs, la recherche de nouvelles molécules intéressantes.

Reçu en février 1987.
Accepté en mai 1987.

Références

- AMBLARD G., SANDEAUX R., SANDEAUX J., GAVACH C., 1985. Transport of potassium ions across planar lipid membranes by the antibiotic, grisorixin : I. The equilibrium state and self-diffusion K^+ fluxes. *J. Membrane Biol.*, **88**, 15-23.
- ASHTON R., STEINRAUF L. K., 1970. Thermodynamic consideration of the ion transporting antibiotics. *J. mol. Biol.*, **49**, 547-556.
- BAKKER E. P., 1979. Ionophore antibiotics, 67-97. In *Antibiotics*, Vol. V, part I, Springer Verlag, Berlin.
- BERGEN W. G., BATES D. B., 1984. Ionophores : their effect on production efficiency and mode of action. *J. anim. Sci.*, **58**, 1465-1483.
- BOLTE J., DEMUYNCK C., JEMINET G., JUILLARD J., TISSIER C., 1982. Etude comparée de trois antibiotiques ionophores : X 537A (Lasalocide), A 23187 (Calcimycine) et X 14547A. Complexation des cations IA et IIA, transport de Ca^{++} . *Can. J. Chem.*, **60**, 981-989.
- BOLTE J., CAFFAREL-MENDEZ S., DEMUYNCK C., JEMINET G., 1983. Transport des ions Na^+ , K^+ , Mg^{++} et Ca^{++} à travers une membrane liquide épaisse par des antibiotiques polyéthers carboxyliques, 247-253. — In *Physical chemistry of transmembrane ion motions*, Elsevier, Amsterdam.
- BOLTE J., CAFFAREL-MENDEZ S., DAUPHIN G., DEMUYNCK C., JEMINET G., 1986. Transport de Na^+ et K^+ , à travers une membrane liquide épaisse, par la monensine et son dérivé chloro-4 phényl uréthane. *Bull. Soc. Chim.*, 370-374.
- CAFFAREL-MENDEZ S., JOUANY J.-P., DEMUYNCK C., 1986. Etude *in vitro* de quelques antibiotiques ionophores et de certains dérivés. I. Action sur les produits de la fermentation dans le rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **26**, 1295-1303.
- DELORT A. M., DAUPHIN G., JEMINET G., travaux non publiés.
- DURAND M., 1982. Orientation du métabolisme de la panse au moyen des additifs. *Ann. Zootech.*, **31**, 47-76.
- FUKUYAMA T., WANG C. L. J., KISHI Y., 1979. Total synthesis of monensin. 2. Stereo-controlled synthesis of the right half of monensin. *J. amer. Chem. Soc.*, **101**, 260-262.
- JOUANY J. P., THIVEND P., 1986. *In vitro* effects of avoparcin on protein degradability and rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **15**, 215-229.
- RUFF M. D., 1982. Veterinary applications, 304-332. In *Polyether antibiotics*. Vol. 1. Marcel Dekker, New York.
- TAYLOR R. W., KAUFFMAN R. H., PFEIFFER D. R., 1982. Cation complexation and transport by carboxylic acid ionophores, 103-184. In *Polyether antibiotics*. Vol. 1. Marcel Dekker, New York.
- WESTLEY J. W., OLIVETO E. P., BERGER J., EVANS R. H., GLASS R., STEMPEL A., TOOME V., WILLIAMS T., 1973. Chemical transformations of antibiotic X-537A and their effect on antibacterial activity. *J. med. Chem.*, **16**, 397-403.
- WESTLEY J. W., 1982. Polyether antibiotics, notation and classification. 1-20. In *Polyether antibiotics*. Vol. 1. Marcel Dekker, New York.
-