

EFFET DE LA PHOTOCATALYSE HETEROGENE SUR L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE LA SPIRAMYCINE ET SUR LA BIOMASSE BACTERIENNE DE *Staphylococcus xylosus*

Rahma HINDIL^{1*}, O. BEN SAID², A. ALATRACHE¹, T. TAJOURI¹ et P. AISSA²

¹Laboratoire de RMN-Physique, Ecole Supérieure des sciences et techniques de Tunis
5, Av. Taha HUSSEIN Montfleury BAB MENARA 1008 TUNIS

²Laboratoire de Biosurveillance de l'environnement, Faculté des Sciences de Bizerte
Faculté des Sciences de Bizerte, Zarzouna 7021.Tunisie. Fax : 216 72 590 566.

hendil_rahma@yahoo.fr

تأثير التحفيز الضوئي غير المتجانس على النشاط المضاد للبكتيريا للـسبيراميسين والكتلة الحيوية لبكتيريا العنقودية اكريلوزيز
للمضادات الحيوية استفعال ظاهرة البكتيريا مما ساعد على ظهور الأوبئة الغير
قابلة للعلاج من جديد. هذا السياق توظيف التحفيز الضوئي الغير متجانس كتنقية بديلة لتنظيف المياه مثل هذه
لهذا بدراسة التحلل عبر التحفيز الضوئي لمادة "السبيراميسين" مضاد حيوي الطب البيطري.
بتقييم نشاطه المضاد للجراثيم النشاط المضاد للبكتيريا تدريجيا حتى إنعدامه تماما 45 دقيقة
تم تقييم ذلك باستعمال بكتيريا من نوع العنقودية اكريلوزيز . أخيرا،
البكتيريا وأظهرت ملحوظا في امتصاصها 600 تأثير التحفيز الضوئي تعرضها التحفيز الضوئي.
الكلمات المفاتيح : التحفيز الضوئي سبيراميسين العنقودية اكريلوزيز والكتلة الحيوية للبكتيريا

RESUME

De nos jours, l'utilisation immodérée et massive des antibiotiques a conduit à l'accroissement du phénomène de l'antibiorésistance pouvant induire la réapparition des épidémies incurables. Dans ce cadre apparait la photocatalyse hétérogène comme une technologie alternative pour dépolluer les eaux contaminées par de telles molécules. Pour cela on a étudié la dégradation photocatalytique de la spiramycine, antibiotique fréquemment utilisé dans la médecine vétérinaire. Nous avons évalué par la suite son activité antibactérienne au cours de sa photocatalyse qui a révélé une perte de toute activité antibactérienne au bout de 45 minutes vis-à-vis *Staphylococcus xylosus*. Enfin, nous avons testé l'impact de ce processus sur la biomasse bactérienne du même germe dont la suspension bactérienne a montré une diminution remarquable de son absorption à 600 nm au cours du traitement.

Mots-clés : Photocatalyse, spiramycine, *Staphylococcus xylosus*, activité antibactérienne, biomasse bactérienne.

ABSTRACT

Effect of heterogeneous photocatalysis on the antibacterial activity of spiramycin and bacterial biomass of staphylococcus xylosus
: Nowadays, the widespread and immoderate use of antibiotics in various fields led to the increasing of the antibiotic resistance phenomenon that can induce the reappearance of incurable epidemics. In this context, heterogeneous photocatalysis appears as an alternative technology to clean contaminated water by such molecules. In the present work, we studied the photocatalytic decomposition of spiramycin an antibiotic commonly used in veterinary medicine. We subsequently evaluated its antibacterial activity during its photocatalysis which revealed a loss of antibacterial activity after 45 minutes against *Staphylococcus xylosus*. Finally, we tested the impact of this process on bacterial biomass of the same germ which the bacterial suspension showed a remarkable decrease in its absorption at 600 nm during treatment.

Keywords: Photocatalysis, spiramycin, *Staphylococcus xylosus*, antibacterial activity, bacterial biomass.

INTRODUCTION

Depuis leur première apparition en 1929 (Planchon *et al.*, 2006), les antibiotiques ont été employés dans divers domaines. En effet, outre leur utilisation dans la médecine humaine pour des fins curatives et préventives (Badiaga S. et Gerbeaux P., 2006;

Asseray *et al.*, 2009), elles ont de même servi comme facteurs de croissances dans les élevages (Mary et Barton, 2000) , et utilisées dans le cadre de l'agrochimie afin de perfectionner la production des plantes (Rang *et al.*, 2003). Les antibiotiques à usages humains aboutissent dans un premier temps dans les stations de traitement des eaux polluées (STEP)

(Bound et Voulvoulis, 2005). Lors des processus d'épuration ces molécules ne sont pas totalement éliminées et elles finissent par être rejetées dans les eaux de surfaces (Santos *et al.*, 2008). Les antibiotiques à usage vétérinaire quant à eux sont épandus sur les champs avec les excréments animaux soit ils atteignent directement les eaux de surface par drainage (Jorgensen et Halling-Sorensen, 2000). Ce qui justifie la présence de leurs résidus avec des teneurs notables dans les eaux de surface (Córdova-Kreylos *et al.*, 2006). Or, vu leur nature organique, ces composés ne sont pas complètement éliminés (Calza *et al.*, 2010). Cependant, leur présence dans divers systèmes aquatiques va augmenter la prévalence des souches résistantes qui vont pouvoir se développer sans compétition (Puyt, 2002) suite à l'élimination des bactéries sensibles et vont causer par la suite l'accroissement de l'antibiorésistance (Collignon, 1999 ; Dubois *et al.*, 2001 ; Sagan *et al.*, 2005 ; Martinez, 2009). Ce phénomène représente de nos jours un sujet d'inquiétude fortement ressentie par la collectivité. Ce qui amené à chercher des moyens de lutte contre de tels problèmes. Dans ce cadre apparaissent les Procédés d'Oxydation Avancés (POA) comme des solutions efficaces pour dépolluer les eaux contaminées par de telles molécules (Alatrache *et al.*, 2010 ; Palominos *et al.*, 2008)

En effet, ces technologies d'oxydation permettent l'activation catalytique et photochimique du

processus oxydatif assurant la production efficace des radicaux hydroxyles, espèces connues par leur pouvoir fort oxydant (Legrini *et al.*, 1993 ; Prados *et al.*, 1995) La photocatalyse hétérogène l'une de ces techniques d'oxydation a été appliqué avec succès pour dégrader plusieurs molécules de nature organique (Pichat et Tarr, 2003 ; Herrman *et al.*, 1999 ; Ollis *et al.*, 1993), représentant ainsi un moyen efficace sur le plan technique, économique et écologique (Bolton et Caster, 1994)

La présente étude a comme principal objectif de tester l'impact du processus photocatalytique sur la dégradation d'un antibiotique de la classe des macrolides, utilisé de manière massive en médecine vétérinaire : la spiramycine (Kummerer, 2001) Cette molécule est caractérisée par un cycle lactonique (Fig.1) réunissant des oses par des liaisons glucosidiques (Ellis, 2006) en plus d'une fonction aldéhyde extranucléaire situé sur le carbone 18 et d'un mycaroside de mycaminose en position 5 (Ellis, 2006). Il existe trois isomères de spiramycine suivant le groupement porté par le carbone n°3 du cycle (Kernbaum, 1982). Ainsi, elle est présentée sous la forme d'un mélange regroupant : la spiramycine I avec un groupement hydroxyle, le 3-éthanoate (Spiramycine II) et le 3-propanoate (Spiramycine III) (Horie *et al.*, 1995).

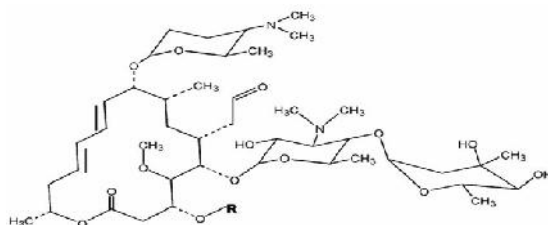


Figure1. Structure chimique de la molécule de spiramycine (Molinari, 2006).

Spiramycine I, R : H

Spiramycine II, R : COCH₃

Spiramycine III, R : COCH₂CH₃

MATERIELS ET METHODES

Photocatalyse de la solution de spiramycine

Une solution de spiramycine de concentration 25mg.L⁻¹ a été déposée au sein d'un photocatalyseur contenant les catalyseurs : Dioxyde de titane le TiO₂ P25 ainsi que le TiO₂ PC500 de 4g.L⁻¹ de concentration et exposée à une lampe émettant une lumière UV à 365nm et à une puissance électrique de 36W. La photocatalyse de la solution a été initiée par une heure de catalyse qui permet l'adsorption de la spiramycine au niveau de ses sites. Par la suite on a évalué l'activité antibactérienne de cet antibiotique

tout au long du traitement : (à t₀, après 1h de catalyse, après 15min de photocatalyse, après 30 min de photocatalyse, après 45min de photocatalyse).

Activité antibactérienne de la solution de spiramycine photocatalysée

Souche bactérienne utilisée

Pour évaluer l'activité antibactérienne de la spiramycine au cours de la photocatalyse, on a choisi une souche bactérienne pathogène appartenant à l'espèce *Staphylococcus xylosus* isolée à partir des sédiments de la lagune de Bizerte à proximité de la station d'épuration Sidi Hmed (Fig. 2). C'est une coque à Gram positif fréquemment isolée de la peau

des mammifères et occasionnellement de la peau humaine (Molinari *et al.*, 2006). Elle est encore isolée

dans l'environnement, dans les ateliers de transformation

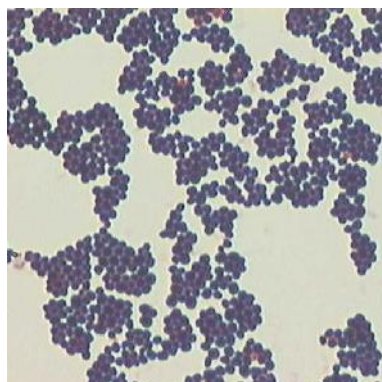


Figure 2 : Photo de *Staphylococcus xylosus* (G100*1.25)

en agroalimentaire et à partir des produits carnés et laitiers. Elle est d'ailleurs utilisée comme ferment dans la fabrication de ces produits ou elle contribue à leurs qualités sensorielles. Sa capacité à coloniser la peau est certainement (Molinari *et al.*, 2006).

Préparation de la suspension bactérienne

Après repiquage de la souche bactérienne *Staphylococcus xylosus* sur boîtes de pétrie contenant le milieu Tryptone Caséine-Soja, et incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies bactériennes ont été prélevées et suspendues dans 5mL d'eau physiologique (9‰) pour former une suspension bactérienne dense.

Dénombrement des UFC (unités formant colonie)

A partir de la suspension bactérienne mère, plusieurs dilutions décimales ont été préparées (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). 10µL de chaque suspension a été étalé sur deux boîtes de pétri; lesquelles sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Les Unités Formant Colonies (UFC) sont par la suite comptées.

Préparation des puits

L'étude de l'activité antibactérienne de la solution de spiramycine a été réalisé par la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose Mueller-Hinton. Après 15mn de l'étalement de 10µL de la suspension bactérienne mère sur des boîtes de Mueller-Hinton, cinq puits d'environ 10mm de diamètre ont été réalisés à l'aide de pipettes pasteur stériles et remplis par 1µL de la solution de spiramycine prélevée à chaque intervalle de temps de l'exposition au photocatalyseur. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibitions au tour des puits ont été mesurés (San Martin *et al.*, 2000 ; Ben Said *et al.*, 2008)

Effet de la photocatalyse sur la croissance bactérienne

Pour étudier l'impact de la photodégradation sur la biomasse bactérienne du germe bactérien testé, une suspension bactérienne a été préparée dans une solution de phosphate buffer. Trois volumes de 150mL chacun ont été utilisés pour évaluer cet effet. Le premier est mis en contact avec le catalyseur TiO₂ P25 supporté pendant 120min, le deuxième est exposé aux irradiations UV ($\lambda = 365\text{nm}$) de même pendant 120min, le troisième a été mis en contact avec la plaque support du catalyseur TiO₂ P25 couplée avec les irradiations UV-A. Le long de chaque expérience, un prélèvement a été effectué toutes les 15min pour procéder à l'absorbance à 600nm.

RESULTATS

Etude de l'activité antibactérienne de la spiramycine

L'estimation de l'activité antibactérienne de la suspension dont le nombre de cellules initiales était de $4,15 \cdot 10^6$ UFC.mL⁻¹, a été réalisé en mesurant le diamètre du halo d'inhibition de la croissance de la souche bactérienne étalée autour du puits contenant la solution de spiramycine avant et après photocatalyse.

Evaluation de l'activité antibactérienne de la spiramycine photocatalysée

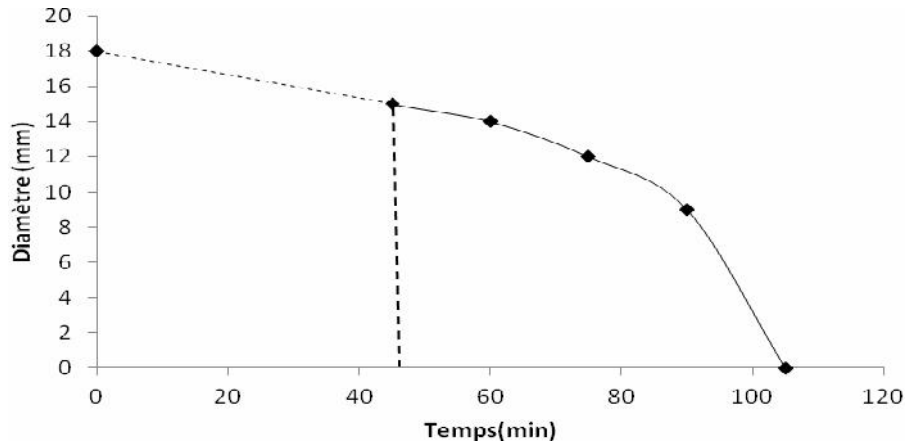
Au bout de 1h de contact avec les catalyseurs (TiO₂ P25 et TiO₂PC500), nous avons assisté à une diminution notable des diamètres des zones d'inhibition : 14mm en utilisant le catalyseur TiO₂ P25 et 15mm en utilisant le PC500 (Fig.3 a et b).

Effet de la photocatalyse sur la biomasse bactérienne de *Staphylococcus xylosus*

La figure 4 permet de comparer les effets des irradiations UV et de la photocatalyse sur la biomasse

bactérienne traitée. Elle montre bien que le processus photocatalytique a présenté un effet beaucoup plus important. En fait, nous avons assisté à une nette diminution de l'absorbance à 600nm de la

suspension mesurée après 120 min d'exposition à la lumière UV.



b

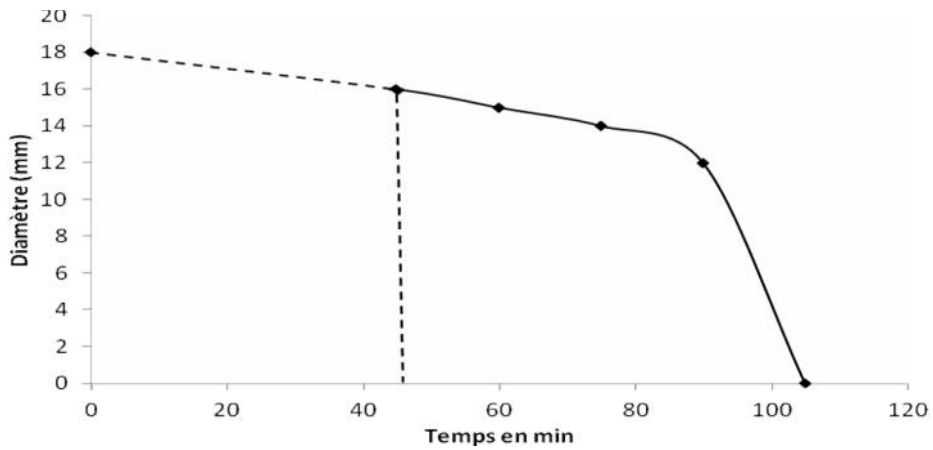


figure3 : Evolution de l'activité antibactérienne de la spiramycine après catalyse (----) et photocatalyse(—) : catalyseur type: TiO₂ P25(a) ; TiO₂ PC500 (b)

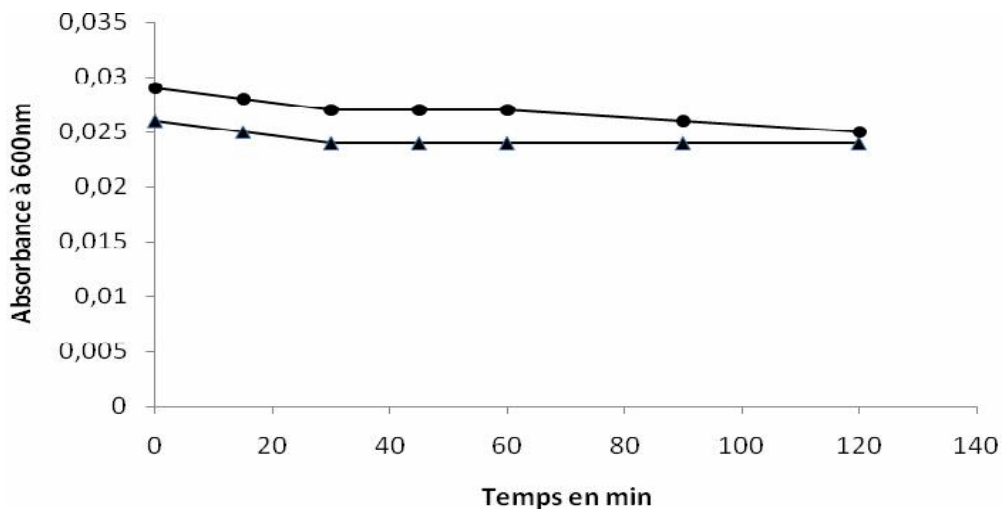


Figure 4 : Diminution de l'absorption à 600nm de la biomasse cellulaire de *Staphylococcus xylosus* après irradiations UV et photocatalyse : ● irradiations UV en absence de catalyseur, (▲) UV+TiO₂

DISCUSSION

La persistance de l'activité antibactérienne pendant un certain temps de la photocatalyse témoigne que la molécule n'est pas complètement minéralisée et de ce fait elle est encore active (Rang *et al.*, 2003). Ces résultats attestent que la modification structurale de la molécule par le processus photocatalytique (Mansouri *et al.*, 2007) agit forcément sur son activité antibactérienne (Palominos *et al.*, 2008). Nous devons signaler aussi qu'au bout de 45min de photocatalyse, la spiramycine ne montre plus aucune activité antibactérienne. Ceci se traduit par la disparition de zone d'inhibition autour du puits contenant l'antibiotique exposé au photocatalyseur durant 45min confirmant ainsi une éventuelle minéralisation complète de la spiramycine.

En outre, nous soulignons une atténuation plus intense de l'activité antibactérienne de la spiramycine exposée au photocatalyseur employant le TiO₂ P25 comme catalyseur que lorsqu'on utilise le TiO₂ PC500, laquelle semble être en rapport avec sa morphologie cristallographique plus efficace pour la dégradation des macrolides (Liu *et al.*, 2002).

Ces résultats nous permettent d'affirmer que la photocatalyse peut jouer un rôle important dans l'atténuation de l'activité antibactérienne de la spiramycine et même son élimination.

En effet en présence d'ultra-violet, le dioxyde de titane est devenu un oxydant puissant qui a minéralisé l'antibiotique. En outre, de tels résultats mettent en évidence l'importance de la photocatalyse comme un moyen de lutte contre l'émergence de l'antibiorésistance, puisque chaque exposition à un antibiotique permet aux bactéries d'acquérir de la tolérance et de la résistance de plusieurs façons.

Concernant la décroissance de la biomasse bactérienne de *Staphylococcus xylosus*, nous avons remarqué que ce phénomène a été observé d'une façon plus spectaculaire en procédant à la photocatalyse ; ce qui met en évidence l'efficacité de ce processus dans la dépollution des eaux contaminées par des bactéries pathogènes. En effet, la diminution de la biomasse bactérienne observée peut être due à l'effet que produit le processus photocatalytique sur les protéines bactériennes. En fait ces protéines jouent de multiples fonctions dans la cellule. Elles affectent plusieurs processus dont la division cellulaire et la réparation de l'ADN en plus de leur rôle architectural. Des études réalisées sur des protéines bactériennes extraites de *E.coli* (Goulhen *et al.*, 2009) ont montré que ces dernières après une photocatalyse de 1h révèlent une dégradation imparable de leurs structures. En outre, ces tests ont prouvé que l'attaque des protéines par le processus photocatalytique n'est pas spécifique, et par suite elle peut être appliquée à d'autres bactéries ainsi qu'aux virus puisque leurs capsides sont composées de

protéines (Goulhen-Chollet, 2009) . Nous signalons à ce propos, qu'il existe beaucoup de facteurs qui affectent ce processus photocatalytique, comme la dose des rayons UV, qui exige de ce fait une détermination performante (Fujishima *et al.*, 1999 ; Pichat *et al.*, 2003) la qualité de l'eau traitée, le temps d'exposition et l'espèce du microorganisme à détruire, ainsi que le type de rayon.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que la photocatalyse peut jouer un rôle important dans la diminution progressive du pouvoir antibactérien de la spiramycine et même. En outre, de tels résultats mettent en évidence l'importance de la photocatalyse comme un moyen de lutte contre l'émergence de l'antibiorésistance, puisque chaque exposition à un antibiotique permet aux bactéries d'acquérir de la tolérance et de la résistance de plusieurs façons. De plus de tels résultats encouragent à appliquer progressivement le procédé photocatalytique dans la désinfection des eaux contaminées, lequel met en œuvre le rôle important joué par le dioxyde de titane P25 photoassocié par les irradiations UV-A pour faire face à l'émergence immodérée des bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- Alatrache A., Laoufi N. A., Pons M. N., Van Deik J. et Zahraa O., 2010. Tylosin abatement in water by photocatalytic process. *Wat. Sci.Technol*, 62 : 435-441.
- Asseray N., Bleher Y., Poirier Y., Hoff J., Boutoille D., Bretonniere C., Lombraill P. et Potel G., 2009. L'antibiothérapie aux urgences, évaluation par une approche qualitative et quantitative. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 39 : 203-208.
- Badiaga S. et Gerbeaux P., 2006. Antibiothérapie aux urgences *Réanimation*, 15 : 514-52.
- Bolton J.R. et Caster S. R., 1994. Aquatic and surface photochemistry. *Lewis Publishers*, 467.
- Bound J. P. et Voulvoulis., 2005. Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom. *Environ. Health. Perspect*, 113 : 1705-1711.
- Ben Said O., Goñi-Urriza M. S., El Bour M., Dellali M., Aissa P. et Duran R., 2008. Characterization of Aerobic Polycyclic aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria From Bizerte Lagoon Sediments, Tunisia. *J. Appl. Microbiol*, 104 : 987-997.
- Collignon P., 1999. Vancomycin-resistant enterococci and use of avoparcin in animal feed: is there a link? *Med. J. Australia.*, 171 : 144-146.
- Córdova-Kreylos A.L., Cao Y., Green P.G., Hwang H.M., Kuivila K.M., La Montagne M.G., Van De Werfhorst L.C., Holden P.A. et Scow K.M.,

2006. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California Salt Marsh Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 : 3357-3366.
- Calza P., Marchisio S., Medana C. et Baiocchi C., 2010. Fate of antibacterial spiramycin in river waters. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 : 1539-1550.
- Dubois M., Fluchard D., Sior E. et Delahaut P., 2001. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 753 : 189-202.
- Ellis J. B., 2006. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ. Pollut.*, 144 : 184-189.
- Fujishima A., Hashimoto K. et Watanabe T., 1999. TiO₂ Photocatalysis. Fundamentals and Applications. Tokyo, Japan.
- Goulhen-Chollet F., Josset S., Keller N., Keller V. et Lett M.C., 2009. Monitoring the bactericidal effect of UV-A photocatalysis : A first approach through 1D and 2D protein electrophoresis. *Catal. Today*, 147 : 169-172.
- Herrman J. M., Guillard C., Arguello M., Tejedor A., Piedra I., Fernandez-Alba A., 1999.
- Horie M., Oka H., Nakazawa H., Harada K. I. et MacNeil J. D., 1995. Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture. *Arlington* : 165.
- Jorgensen S., Halling-Sorensen B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40 : 691-699.
- Kernbaum S., 1982. La spiramycine-Utilisation en thérapeutique humaine. *Sem. Hop. Paris*, 58 : 289-297.
- Kummerer K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere*, 45: 957-969.
- Legrini, E. Oliveros, A.M. Braun.,1993. Photochemical Processes for Water Treatment, *Chem. Rev.*, 93: 671-698.
- Liu I., Lawton L. A., Cornish B. et Roberston P. K. J., 2002. Mechanistic and toxicity studies of photocatalytic oxidation of microcystin-LR. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 148 : 349-354p.
- Mansouri L., Bousselmi L. et Ghrabi A., 2007. Degradation of recalcitrant organic contaminants by solar photocatalysis. *Water sciences technologie*, 55 : 119-125.
- Mary D et Barton., 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.*, 13 : 279-299.
- Martinez J. L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and antibiotic resistance determinants. *Envir. Poll.*, 157 : 2893-2902.
- Molinari R., Pirillo F., Loddo V. et Palmisano L., 2006. Heterogeneous photocatalytic degradation of pharmaceuticals in water by using polycrystalline TiO₂ and a nanofiltration membrane reactor. *Catal. Today*, 118 : 205-213.
- Palominos R., Freer J., Mondaca M. A. et Mansilla H. D., 2008. Evidence for hole participation during the Photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 193 : 139-145.
- Pichat P. et Tarr M. A., 2003. *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants*, New York . 77-119p.
- Planchon S., Leroy S., Chambon C., Chafsey I., Hébraud M. et Talon R., 2006. Physiologie de la croissance en biofilm de *Staphylococcus xylosus* par une approche protéomique. *11èmes JSMTV - Clermont Fd* : 169-170.
- Prados M., Paillard H. et Roche P., 1995. Hydroxyl radical oxidation processes for the removal triazine from natural water, *Ozone-Science & Engineering*, 17: 183-194.
- Puyt J.D., 2002. Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire: bases de l'antibiothérapie. *Pfizer santé animale* : 201.
- Rang H. P., Dale M. M. et Ritter J. M., 2003. *Pharmacology*, 4th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Sagan C., Salvador A., Dubreuil D., Poulet P. P., Duffault D. et Brumpt I., 2005. Simultaneous determination of metronidazole and spiramycin I in human plasma, saliva and gingival crevicular fluid by LC-MS/MS. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, 38 : 298-306.
- San Martin B., Canon H., Quiroz A. et Hernandez P., 2000. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 15 : 1.
- Santos J. L., Aparicio I., Callejon M. et Alonso E., 2008. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J. Hazard.*, 164 : 1509-1516.