

# Levée de la bactériostase due à la colimycine par adjonction de thiamine

Autor(en): **Gouda, Sobhy / Schorer, Elisabeth / Schopfer, Jean-François**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences [1948-1980]**

Band (Jahr): **15 (1962)**

Heft 1

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-738660>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

5. La réussite de la démonstration précédente tient à l'existence d'un point uni réel, donc à celle d'un nombre impair de points unis. Dans l'espace, où il y a quatre points unis, la démonstration précédente n'est pas possible. Cependant, le théorème est facile à démontrer en s'appuyant sur celui relatif au plan.

Dans une collinéation homolocale  $C$  de l'espace, soient  $\alpha$  et  $\alpha'$  deux plans correspondants; ils sont liés par une collinéation, donc par une suite de projections. Or, dans l'espace, la projection d'un plan sur un autre peut être considérée comme une homologie de l'espace; il suffit de faire passer le plan axial par l'intersection des deux plans. Cette substitution d'homologies à des projections faite, la suite des opérations qui a conduit du plan  $\alpha$  à  $\alpha'$  transforme l'espace par une collinéation  $D$ ; celle-ci n'est généralement pas la collinéation donnée  $C$ , mais entre les espaces obtenus par les collinéations  $C$  et  $D$  il y a collinéation; dans cette dernière correspondance  $E$ , le plan  $\alpha'$  est uni. Donc la collinéation  $E$  est centrale. Ainsi, deux espaces collinéaires homolocaux sont liés par une suite d'homologies. Le théorème démontré plus haut en opérant dans l'hyperespace l'est maintenant sans sortir de l'espace tridimensionnel d'opérations.

La réduction d'une collinéation à une suite d'homologies est ainsi obtenue dans tous les cas.

**Sobhy Gouda, Elisabeth Schorer et Jean-François Schopfer. —**  
*Levée de la bactériostase due à la colimycine par adjonction de thiamine.*

Nous avons déjà fait part de certains résultats obtenus, concernant *Pseudomonas fluorescens* cultivé dans différents milieux synthétiques et inhibé dans sa croissance par un antibiotique polypeptidique, la colimycine [1, 2].

Dans les milieux de culture contenant de la colimycine, il se produit une forte accumulation de certains acides cétoniques ordinairement présents en faible quantité dans ces milieux [3]. Ce sont les acides pyruvique, glyoxylique et alpha-cétoglutarique. Ces accumulations atteignent dix à vingt fois les concentrations dosées dans des milieux de culture dépourvus de colimycine.

Il suffit d'ajouter aux cultures, inhibées par l'antibiotique, une certaine quantité de thiamine pour rétablir aussitôt la prolifération du germe, sans pour autant rétablir la biosynthèse du pigment fluorescent vert, caractéristique du *Pseudomonas fluorescens* [4].

L'accumulation des acides cétoniques dans le filtrat de culture d'une part, le rétablissement de la prolifération par adjonction de thiamine au milieu de culture d'autre part, nous font supposer une inhibition de l'enzyme de décarboxylation ou l'arrêt de la synthèse du coenzyme par le germe.

Mayor et collaborateurs [5], de l'Institut de physiologie et de biochimie de Madrid, ont étudié l'action d'une série d'antibiotiques sur un système enzymatique contenant de l'apoenzyme de la décarboxylase pyruvique d'origine végétale, de la diphosphothiamine (coenzyme de la décarboxylase) et de l'antibiotique. Dans le cas particulier de la colimycine, son action inhibitrice sur ce système enzymatique a été jugée particulièrement forte.

Nos essais *in vivo*, c'est-à-dire dans des milieux de culture, apportent ainsi une nouvelle confirmation à ceux notés *in vitro*.

Le rétablissement de la croissance par adjonction de thiamine au milieu inhibé par la colimycine, ne rétablit pas pour autant la biosynthèse du pigment. Si donc l'antibiotique possède effectivement une action antidécarboxylasique, son effet ne se limite pas à cette unique fonction.

Dans le but d'évaluer l'action antidécarboxylasique, d'observer les modifications morphologiques éventuelles, de délimiter le rôle de la thiamine ajoutée *post* ou *ante inoculum* à des milieux de culture inhibés par l'antibiotique, nous avons entrepris le travail suivant.

#### *Méthodes et techniques.*

*Pseudomonas fluorescens* a été cultivé dans un milieu synthétique (*m*) dont la composition est la suivante:

Phosphate dipotassique . . . . .	0,3 g
Sulfate de magnésium . . . . .	0,3 g
Lactate de sodium . . . . .	2,0 g
Glycine . . . . .	0,5 g
Eau distillée . . . . .	ad 1000 ml

A partir de ce milieu de base ( $m$ ), nous avons préparé les variantes suivantes:

$(m+c)$  = milieu de base + 4 gammas/ml de colimycine \*)

$(m+B_1)$  = milieu de base + 250 gammas/ml de thiamine \*\*)

$(m+c+B_1)$  = milieu de base + 4 gammas/ml de colimycine +  
250 gammas/ml de thiamine.

Ces milieux ont été répartis dans des erlenmeyers de 150 ml à raison de 40 ml par flacon et stérilisés pendant 20 minutes à une température de 120° C.

Les milieux ont été inoculés à raison de 0,25 ml d'une suspension bactérienne prélevée à partir d'une subculture de 24 heures en milieu  $m$ . Les cultures ont été soumises à une agitation constante dans une étuve réglée à 25° C.

C'est à partir de ces cultures que nous avons prélevé aseptiquement, à intervalles réguliers, 5 ml de culture.

Cette suspension a été soumise aux tests suivants:

- 1) lecture du degré néphélométrique,
- 2) mesure du pH après centrifugation,
- 3) dosage des acides cétoniques du filtrat,
- 4) examen microscopique des germes du culot de centrifugation, après coloration au violet de gentiane.

#### *Néphélométrie.*

Les 5 ml de milieu de culture sont introduits aseptiquement dans des éprouvettes standardisées stérilisées. L'intensité du trouble bactérien a été évaluée par la méthode néphélométrique en utilisant un appareil de Pulfrich, muni d'un filtre vert L2 et du verre dépoli 4.

#### *pH.*

La mesure du pH, faite à l'aide d'un pHmètre Beckmann, a été effectuée après centrifugation des germes pendant 15 minutes à 5.000 tours/minute, sur une centrifugeuse Christ.

\*) Méthane sulfonate de Colimycine, Roger Bellon, Paris.

\*\*\*) Chlorhydrate de thiamine, Hoffmann-La Roche, Bâle.

*Acides cétoniques.*

Pour l'extraction des acides cétoniques de nos filtrats, nous avons utilisé la méthode mise au point par Cavallini [6, 7], soit la formation de dérivés de la dinitrophénylhydrazine. Les dinitrophénylhydrazones extraites par des solvants divers et séchées sous vide, sont remises en solution dans un tampon phosphate et subissent une chromatographie sur papier.

Les divers dérivés des acides cétoniques, ainsi séparés, sont dosés par spectrophotométrie selon la méthode d'Isherwood [8, 9], après élution.

*Résultats.**Néphélométrie.*

La colimycine possède une action nettement bactériostatique à la dose utilisée dans nos milieux. Dans le milieu  $m+c$ , la bactériostasie est définitive et le degré néphélométrique n'augmente pratiquement pas. Dans le milieu  $m+c+B_1$ , le germe surmonte l'action bactériostatique au bout de 36 heures et la culture atteint 24 heures plus tard la concentration observée dans les milieux témoins ( $m$  et  $m+B_1$ ).

L'introduction de thiamine *post inoculum* dans le milieu de culture  $m+c$ , après des temps de contact de 60 et de 108 heures avec l'antibiotique, lève la bactériostasie plus rapidement dans la culture la plus jeune (fig. 1).

*pH.*

Le pH est en grande partie le reflet de la prolifération. Dans les milieux de culture colimycinés, l'ammoniaque libérée par la désamination de la glycine est en quantité très faible. L'introduction de ions ammonium n'augmente pas la prolifération.

D'une façon générale, la colimycine retarde l'alcalinisation du milieu. L'adjonction de thiamine abaisse le pH du milieu de culture (fig. 2).

*Acides cétoniques.*

Il se produit une accumulation lente, mais progressive, d'acides cétoniques en présence de colimycine. Cette accumulation est d'ailleurs importante, comparée au nombre de germes présents dans les milieux

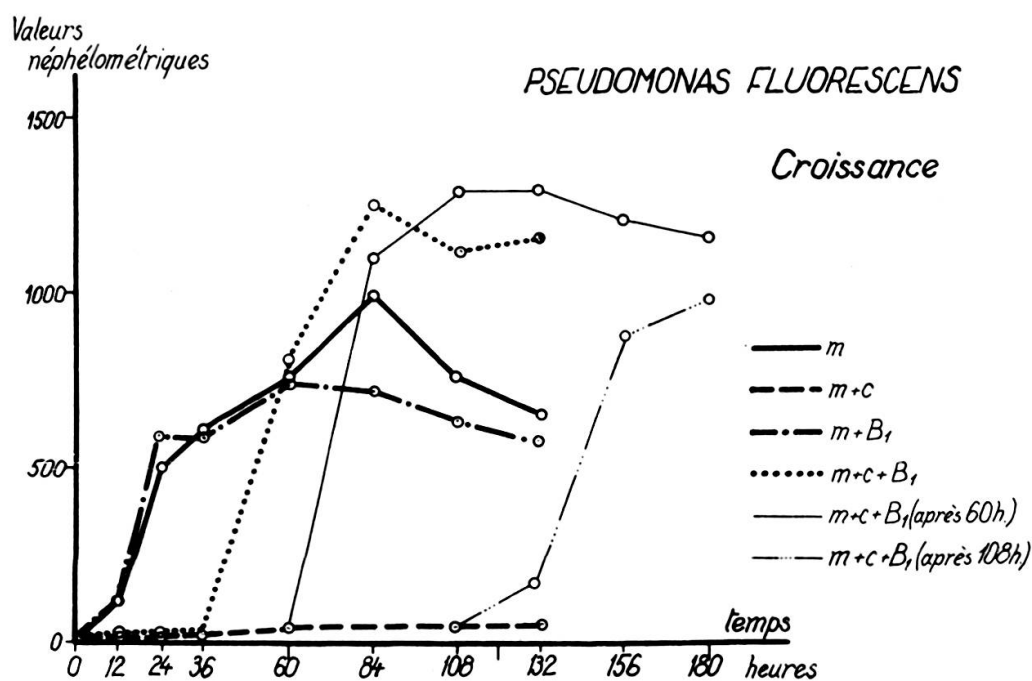


Fig. 1.

Mesures néphéométriques de la croissance.

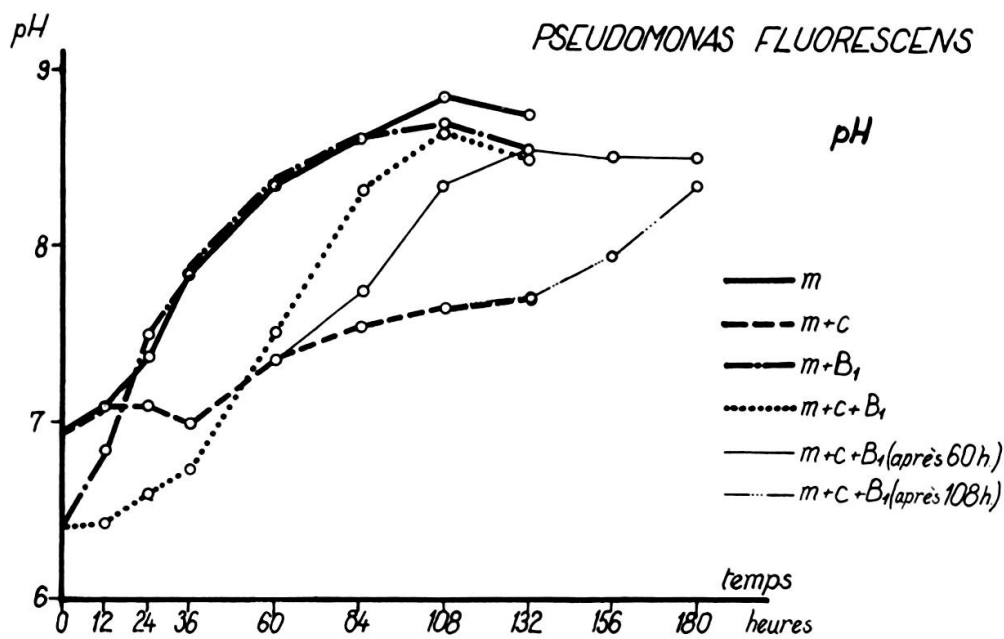


Fig. 2.

pH des milieux de culture après centrifugation.

inhibés. L'adjonction de thiamine diminue cette quantité. Le germe a cependant toujours tendance à accumuler les acides cétoniques en présence de colimycine.

Nous avons régulièrement trouvé les deux isomères pyruviques, glyoxyliques, ainsi que le dérivé de l'acide alpha-cétoglutarique. Une substance réagissant avec la dinitrophénylhydrazine de  $R_f$  70, non identifiée a été régulièrement observée sur nos chromatogrammes.

TABLEAU 1.

*Concentration des acides cétoniques dosés dans le filtrat de culture après 36 heures.*

Acides cétoniques gamma/ml	<i>m</i>	<i>m + c</i>	<i>m + B<sub>1</sub></i>	<i>m + c + B<sub>1</sub></i>
pyruvique . . . . .	1,9	7,0	1,6	19,5
alpha-cétoglutarique .	0,2	0,2	0,1	0,2
glyoxylique . . . . .	0,5	0,4	0,4	1,0

TABLEAU 2.

*Concentration des acides cétoniques dosés dans le filtrat de culture après 108 heures.*

Acides cétoniques gamma/ml	<i>m</i>	<i>m + c</i>	<i>m + B<sub>1</sub></i>	<i>m + c + B<sub>1</sub></i>
pyruvique . . . . .	4,0	64,0	3,0	7,0
alpha-cétoglutarique .	0,2	10,0	0,2	0,3

Nous n'avons pas noté d'accumulation d'acide glyoxylique à ce stade de la culture.

### *Morphologie.*

En présence de l'antibiotique, des variations morphologiques très importantes sont observées. L'adjonction de thiamine, tout en rétablissant la croissance, ne rétablit pas la forme initiale. Les germes cultivés dans des milieux inhibés par la colimycine, mais cependant

contenant de la thiamine, semblent moins atteints, car les germes possèdent une certaine homogénéité qui n'existe pas chez les germes cultivés dans des milieux avec antibiotique, mais sans thiamine.

L'importance de ces modifications réside dans leur irréversibilité. La transformation est définitive.

#### *Pigmentation.*

Dans tous les cas où l'antibiotique a été introduit, la perte de la pigmentation est définitive [4].

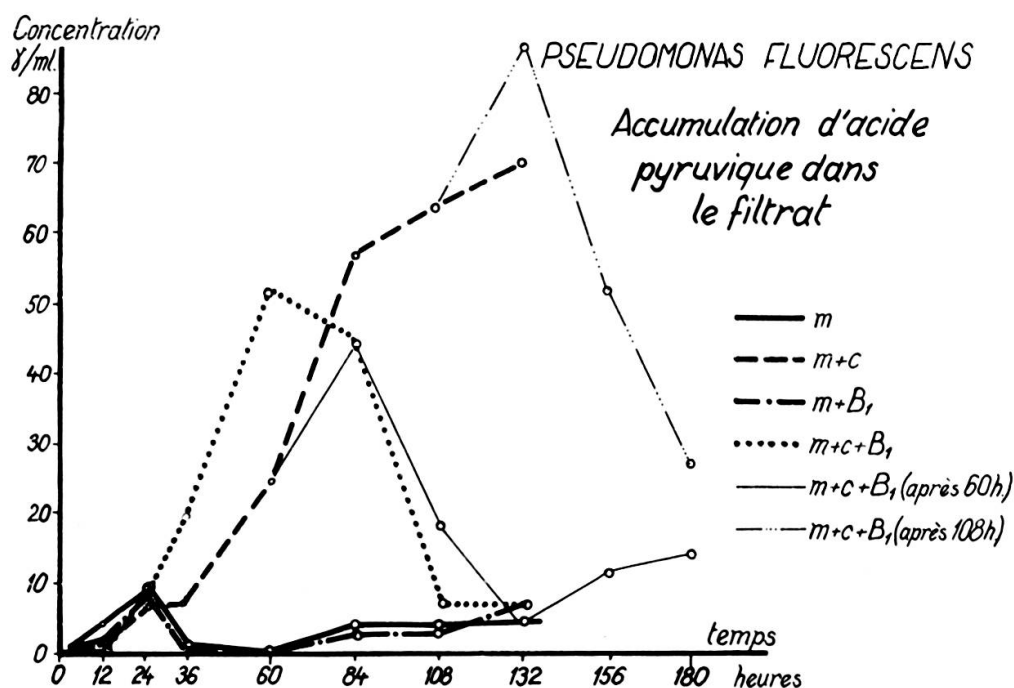


Fig. 3.

Evolution du taux d'acide pyruvique dosé dans les milieux de culture, d'après les méthodes de Cavallini et d'Isherwood.

#### *Discussion.*

Nous notons des modifications de deux sortes: les unes inhérentes à la multiplication du germe, qui peuvent être surmontées par l'adjonction de thiamine; les autres, d'ordre métabolique (biosynthèse du pigment), morphologique (dimensions des germes) qui, sans être d'une importance vitale, sont des transformations stables, transmissibles et sont dues à une mutation induite ou innée.



Cette dépendance à l'égard de la thiamine devient définitive chez le mutant, même en absence de l'antibiotique. Le mutant isolé, repiqué et remis dans le milieu de culture synthétique ne pourra désormais proliférer qu'en présence de traces de thiamine dans son milieu de culture. Cette modification du pouvoir naturel de biosynthèse de la thiamine, ainsi que celle de la biosynthèse du pigment sont intéressantes, car elles résultent d'une transformation génétique assez exceptionnelle dans le cas des antibiotiques.

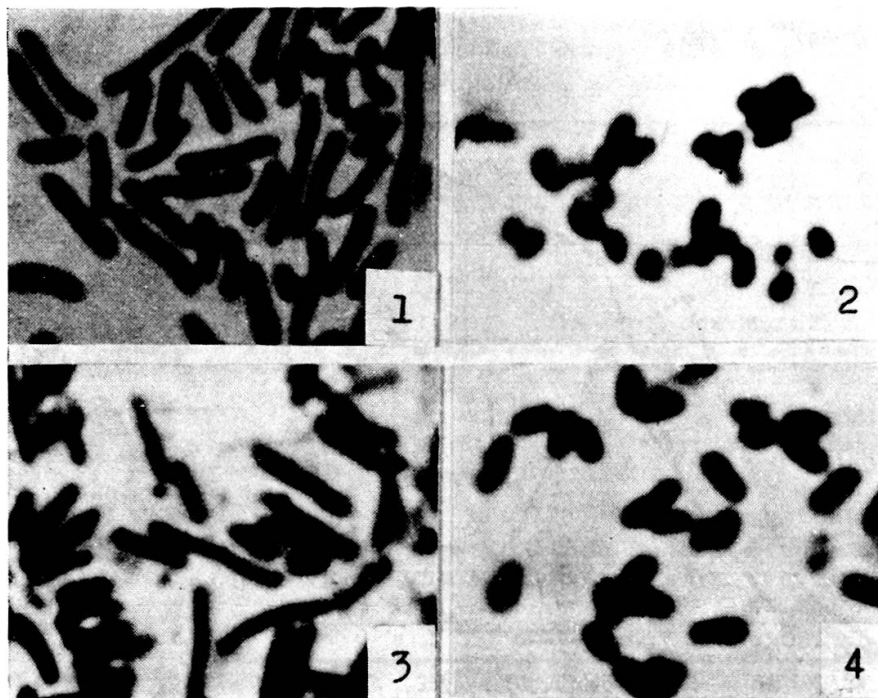


Fig. 4.

*Pseudomonas fluorescens* colorés au violet de gentiane  
provenant de cultures âgées de 36 heures.

1 = (*m*), 2 = (*m*+*c*), 3 = (*m*+*B*<sub>1</sub>), 4 = (*m*+*c*+*B*<sub>1</sub>).

Grossissement: × 2800 (Photographies: E. Boy de la Tour).

L'utilisation d'autres antibiotiques, tels que le chloramphénicol, par nous, ou la pénicilline, l'auréomycine, la streptomycine par nos prédécesseurs n'ont jamais donné de transformations génétiques durables, mais uniquement des inhibitions partielles ou totales de la prolifération, dans le cas de *Pseudomonas fluorescens*.

*Conclusions.*

L'action de la colimycine sur *Pseudomonas fluorescens* peut se résumer ainsi:

Une forte inhibition de la croissance accompagnée par une accumulation d'acides cétoniques. La bactériostase et l'accumulation d'acides cétoniques sont levées par adjonction de thiamine.

Une transformation profonde et définitive de certains caractères reconnus au germe sauvage, soit:

Modification de la forme et des dimensions de la bactérie,  
Perte du pouvoir de biosynthèse du pigment,  
Dépendance vis-à-vis de la thiamine,  
Différence dans l'aspect des suspensions bactériennes.

Nous exprimons à M. le professeur Fernand Chodat nos remerciements pour les précieux conseils qu'il nous a donnés au cours de ce travail, accompli dans son Institut.

## BIBLIOGRAPHIE

1. MARTIN, R., B. SUREAU, Y. CHABBERT et B. HUTINEL. La Colimycine. *Revue médicale française*, fév. 1959, t. 40, n° 2.
2. DAUTREVAUX, M. et G. BISERTE. Structure de la Colimycine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, t. XLIII, n° 4, 495-504.
3. GOUDA, S. et F. CHODAT. Contribution à la connaissance du mécanisme d'action de la colistine. *VI<sup>es</sup> Journées biochimiques latines, Genève. Communications scientifiques*, 1961, 35.
4. CHODAT, F. et S. GOUDA. Contribution à l'étude du pigment de *Pseudomonas fluorescens*. *Path. Microbiol.*, 1961, 24, 840-847.
5. MAYOR, F., M. CASCALES, A. DIEZ, F. FERRANDIZ, P. MARCOS et A. SANTOS-RUIZ. Inhibición por antibioticos de la l-glutamato descarboxilasa y de la piruvato carboxilasa. *VI<sup>es</sup> Journées biochimiques latines, Genève. Communications scientifiques*, 1961, 57.
6. CAVALLINI, D., N. FRONTALI et G. TOSCHI. Determination of Keto-acids by partition chromatography on filter. *Nature*, 1949, 163, 568.
7. — N. FRONTALI et G. TOSCHI. Keto-acids content on human blood and urine. *Nature*, 1949, 164, 792-793.
8. ISCHERWOOD, F. A. et D. M. CRUIKSHANK. The estimation of 2-4 dinitrophenylhydrazones on paper chromatography. *Nature*, 1954, 173, 121.
9. — et C. S. HANES. Separation and estimation of organic acids on paper chromatography. *Biochem. J.*, 1955, 55, 824-830.

*Laboratoire de Microbiologie et Fermentations.  
Institut de Botanique générale  
de l'Université de Genève.*

*Résumé.*

La colimycine, antibiotique polypeptidique, possède une nette action bactériostatique sur *Pseudomonas fluorescens*. Cette action se manifeste par une forte accumulation de certains acides cétoniques (acides pyruvique, glyoxylique et alpha-cétoglutarique) et est attribuée à une inhibition de l'enzyme de décarboxylation ou de la synthèse du coenzyme de décarboxylation. L'introduction de thiamine dans les milieux de culture lève l'effet bactériostatique de l'antibiotique et diminue la concentration des acides cétoniques accumulés. La colimycine modifie définitivement certains caractères reconnus au germe sauvage, soit:

modification de la forme et des dimensions de la bactérie,  
perte du pouvoir de biosynthèse du pigment,  
dépendance vis-à-vis de la thiamine,  
différence dans l'aspect des suspensions bactériennes.

*Summary.*

Colimycine is a polypeptidic antibiotic, possessing a high bacteriostatic activity on *Pseudomonas fluorescens*. This effect manifests itself by a high accumulation of cetonic acids (pyruvic, glyoxylic and alpha-ketoglutaric acids) and is attributed to an inhibition of the decarboxylic enzyme or on the synthesis of the cocarboxylase enzyme. The introduction of thiamin in the culture medium releases the bacteriostatic effect of colimycine and decreases the concentration of the accumulated cetonic acids. Colimycine transforms definitively some characteristics belonging to the wild type of *Pseudomonas fluorescens*:

modification of the form and the dimensions of the bacteria,  
loss of the ability of the bacteria to synthesize the pigment,  
thiamin requirement,  
differences in the aspect of bacterial suspensions.

*Zusammenfassung.*

Colimycin, ein polypeptidisches Antibiotikum, hat eine stark bakteriolytische Wirkung auf *Pseudomonas fluorescens*, indem es eine erhöhte Anreicherung gewisser Ketosäuren (Brenztranbensäure, Glyoxylsäure und alphaketoglutar-säure) bewirkt. Diese Wirkung ist auf eine Hemmung des Decarboxylationsenzym oder der Synthese des Decarboxylationscoenzym zurückzuführen. Durch Zugabe von Thiamin zu den Kulturmedien, wird die bakteriostatische Wirkung des Antibiotikum aufgehoben und die Konzentration der angehäuften Ketosäuren erniedrigt. Colimycin ändert gewisse Charaktere der wilden Form. Einige charakteristische Eigenschaften der Wildform von *Pseudomonas fluorescens* werden durch Colimycinwirkung definitiv verändert:

Veränderung der Form und Grösse,  
Verlust der Fähigkeit der Pigmentbiosynthese,  
Thiaminabhängigkeit,  
Veränderung des Ansehens der Bakteriensuspensionen.

---