

Zeitschrift: Saussurea : journal de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 6 (1975)

Artikel: Action de la colimycine sur la perméabilité d'*Escherichia coli*, mise en évidence de la décharge d'acides aminés libres
Autor: Steinheil, Christine / Schorer, Elisabeth
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099079>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 18.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Action de la colimycine sur la perméabilité d'*Escherichia coli*, mise en évidence de la décharge d'acides aminés libres

CHRISTINE STEINHEIL, ELISABETH SCHORER
& JOCELYNE CORNU

Résumé

STEINHEIL, CH., E. SCHORER & J. CORNU (1975). Action de la colimycine sur la perméabilité d'*Escherichia coli*, mise en évidence de la décharge d'acides aminés libres. *Saussurea* 6: 335-342.

La décharge d'acides aminés libres par *Escherichia coli* B sauvage sous l'action de la colimycine a pu être mise en évidence par dosage colorimétrique. Préalablement, nous avons pu démontrer, en mesurant la décharge de matériel absorbant à 260 m μ que, dans nos conditions d'expérience, cette action est bien due à une altération de la perméabilité cellulaire et non à une lyse complète des bactéries.

Abstract

STEINHEIL, CH., E. SCHORER & J. CORNU (1975). Action of colimycin on the permeability of *Escherichia coli*, demonstration of the release of free amino acids. *Saussurea* 6: 335-342. In French.

The release of free amino acids by *Escherichia coli* B wild type, under the influence of colimycin could be shown by colorimetric measurements. Earlier, we demonstrated by measuring the absorbance at 260 m μ of the released material, that the action was definitely due to an alteration of the cellular permeability and not to a complete lysis of the bacteria.

Introduction

L'action d'antibiotiques sur la décharge d'acides aminés libres a été démontrée pour des organismes Gram positifs (GALE & TAYLOR, 1947). SALTON (1951), recherchant les substances déchargées dans le milieu par *Escherichia coli* après addition de bromure de cétyle-triméthyle-ammonium (un détergent cationique, comme la colimycine), trouve du matériel absorbant à 260 m μ , mais ne décèle pas d'acide glutamique. Une étude de MANDELSTAM (1958) révèle pourtant que l'acide glutamique est l'acide aminé le plus concentré dans diverses souches d'*E. coli*.

TEMPEST & al. (1970) démontrent que le pool des germes Gram positifs contient environ vingt fois la concentration d'acides aminés libres présents chez les bactéries Gram négatives, mais que, qualitativement, la composition des deux pools est très semblable.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'action de la colimycine sur la perméabilité d'*E. coli*, un organisme Gram négatif, et d'analyser plus particulièrement (par chromatographie sur film et dosage colorimétrique) le contenu en acides aminés libres du matériel déchargé. Il nous a paru qu'il fallait montrer que la colimycine, dans les conditions de nos expériences, avec les temps de contact et doses de colimycine choisis, causait bien une altération de la perméabilité cellulaire et non une lyse complète des bactéries. Nous avons pour cela utilisé les mesures de matériel déchargé absorbant au spectrophotomètre UV à 260 m μ .

Matériel et méthodes

Matériel

Germe

Escherichia coli B sauvage de la collection du Laboratoire de bactériologie du Département de biologie végétale, Université de Genève.

Milieux

Milieu I: milieu de culture. Pour 1000 ml d'eau distillée: NH₄Cl, 0.5 g; (NH₄)₂SO₄, 0.5 g; KH₂PO₄, 13.6 g; MgSO₄, 20 mg; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6 H₂O, 0.156 mg; glucose, 2 g; pH fixé à 7.2; stérilisation à l'autoclave 30 minutes à 115°C.

Milieu II: milieu pour la concentration des germes en acides aminés et le traitement à la colimycine. Pour 1000 ml d'eau distillée: NH₄Cl, 0.5 g; (NH₄)₂SO₄, 0.5 g; KH₂PO₄, 13.6 g; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6 H₂O, 0.156 mg; glucose 2.167 g; chloramphénicol, 20 mg; pH fixé à 6.5; stérilisation à l'autoclave 30 minutes à 115°C (avant addition du chloramphénicol).

Antibiotiques

Colimycine sous forme de méthane sulfonate, 80 mg = 1 000 000 unités (Laboratoire Roger Bellon, Neuilly).

Chloramphénicol Ph. H. VI tout pur (Siegfried, Zofingue).

Méthodes

Mode de culture

On inocule 0.4 ml d'une préculture de 24 heures dans 60 ml de milieu I. Les cultures sont faites dans des erlenmeyers de 150 ml, à 37°C pendant 11 heures, ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance.

Les germes sont ensuite centrifugés à 4500 g pendant 10 minutes, lavés dans du tampon phosphate à pH 6.5 et repris dans 60 ml de milieu II. Après 2 heures à

37°C, la colimycine est ajoutée à raison de 100 µg par ml. Le témoin est constitué par 60 ml d'une même suspension sans colimycine.

1) *Mise en évidence d'une altération de la perméabilité par mesure de la décharge de matériel absorbant à 260 mµ*

a) *Principe de l'expérience*

Après action de 100 µg/ml de colimycine pendant 2 h 30, nous devrions obtenir les densités optiques suivantes (absorption à 260 mµ):

- D.O. I pour n_1 germes/ml vivants (après plusieurs expériences nous avons pu évaluer n_1 comme étant approximativement égal à $N/4$, N étant le nombre de germes dans le témoin sans colimycine);
- D.O. II pour $(n_1 + n_2)$ germes/ml au total dans la suspension, c'est-à-dire vivants et atteints par la colimycine;
- D.O. III pour n_2 germes/ml dans le cas où l'antibiotique causerait la lyse totale des germes.

Si (D.O. I + D.O. III)–D.O. II est équivalent à zéro, tous les germes atteints sont lysés.

Si (D.O. I + D.O. III)–D.O. II est supérieur à zéro, les germes atteints ne sont pas lysés mais ont, du moins certains, subi une altération de la perméabilité cellulaire.

b) *Expérience*

Obtention de D.O. I et D.O. II. Après passage des germes pendant 2 heures à 37°C dans le milieu II, deux échantillons sont préparés:

- I. Culture témoin: 60 ml de cette suspension de germes, diluée 4 fois de manière à obtenir n_1 germes/ml, reçoivent 1 ml d'eau distillée stérile.
- II. Culture traitée: 60 ml de la suspension initiale non diluée sont additionnés de 1 ml d'une solution de colimycine à 6000 µg/ml: la concentration finale d'antibiotique est donc de 98.3 µg/ml.

Après 2 h 30 à 37°C, deux comptages sont faits, $N/4$ (culture témoin) et n_1 (culture colimycinée), pour vérifier l'égalité des deux termes ($n_1 = N/4$), puis les germes sont éliminés par centrifugation à 4500 g pendant 10 minutes et le surnageant centrifugé une seconde fois à 12.000 g pendant 10 minutes.

$$\begin{aligned} \text{Résultats des comptages: } N/4 &= 2.2 \cdot 10^8 \text{ germes/ml} \\ n_1 &= 1.1 \cdot 10^8 \text{ germes/ml} \end{aligned}$$

Donc, $N = 8.8 \cdot 10^8$ germes/ml et $n_2 = N - n_1 = 7.7 \cdot 10^8$ germes/ml (nous discuterons plus loin le fait que $N/4$ soit supérieur et non égal à n_1).

Parallèlement, les D.O. des surnageants de la dernière centrifugation sont lues au spectrophotomètre Beckman DB-G à 260 m μ contre le milieu II:

- D.O. I = 0.63,
- D.O. II = 1.12.

Obtention de D.O. III. Une culture de 11 heures dans 60 ml de milieu I est diluée de manière à obtenir environ $7.7 \cdot 10^8$ germes/ml = n_2 (vérification par un comptage: $5.7 \cdot 10^8$ germes/ml). On procède de la manière suivante à la lyse artificielle des bactéries contenues dans 24 ml de cette suspension.

Les 24 ml sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes. Le culot est congelé, puis pilé pendant 5 minutes avec un volume équivalent de sable de quartz stérile (sable de quartz p.a. Merck, lavé et calciné). Il est de nouveau congelé et pilé pendant 5 minutes; cette opération est faite deux fois.

Afin de vérifier si la bactéricidie est totale, une goutte du culot est étalée sur bouillon de viande "DIFCO" agarisé. Après incubation, un comptage révèle environ 2000 germes.

Le culot est ensuite lavé 3 fois dans 8 ml de milieu II (par centrifugation à 4500 g pendant 10 minutes); les surnageants sont chaque fois recueillis et l'ensemble centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes, pour éliminer toute trace de sable de quartz.

Densité optique du surnageant à 260 m μ : D.O. III = 0.90.

2) Action de la colimycine sur la décharge d'acides aminés libres

Après 2 h 30 d'incubation avec ou sans colimycine (voir "mode de culture"), les germes sont éliminés par centrifugation. (Des comptages des cultures témoin et colimycinée ont préalablement été faits à 0 minute et 2 h 30.) Nous avons procédé aux opérations suivantes.

Extraction des acides aminés. Pour chaque surnageant, les acides aminés contenus dans 52 ml sont fixés sur colonne d'amberlite sous forme H⁺ (colonne de 1.7 cm de diamètre x 9 cm de hauteur) puis élués par un excès (150 ml) de NH₄ OH 1.5 N.

Concentration des éluats. Evaporation à sec (sous vide, à 50°C) au Rotavapor Büchi. Les résidus sont repris dans 1 ml de propanol 10% additionné d'une goutte d'HCl 0.5 N. On obtient ainsi les solutions témoin et colimycinée à analyser.

Chromatographie sur film des acides aminés, dans des cuves "sandwich" "EASTMAN":

- phase solide: silicagel sur film "EASTMAN" n° 6061;
- dépôt: 0.01 ml des solutions témoin et colimycinée;
60 μ g de colimycine;
12 μ g de chloramphénicol.

(Les quantités des antibiotiques sont calculées en fonction de leur présence maximale éventuelle dans un surnageant concentré.)

- phase mobile: butanol/acide acétique/eau, 80/20/20 (v:v);

- migration: 10 cm à 30°C, pendant 2 h 40;
- révélation: solution de ninhydrine hydrindantine pH 4.7 selon MOORE & STEIN cités par BOISSONNAS (1950).

Dosage colorimétrique du total des acides aminés déchargés: 0.01 ml des solutions témoin et colimycinée sont analysées selon la technique décrite par BOISSONNAS (1950):

- révélateur: ninhydrine hydrindantine pH 4.7;
- lectures au spectrophotomètre à 570 m μ , contre de l'eau distillée.

Pour chaque solution de ninhydrine nouvellement préparée, nous avons établi une courbe étalon leucine (extinction à 570 m μ en fonction des μ g de leucine testés) de manière à pouvoir convertir toutes les mesures en μ g de leucine: cela nous a permis de faire une meilleure comparaison des résultats entre différentes expériences.

Résultats et discussion

1) Mise en évidence d'une altération de la perméabilité bactérienne

Valeurs des densités optiques à 260 m μ retenues d'après le principe précédemment décrit:

- D.O. I = 0.63;
- D.O. II = 1.12;
- D.O. III = 0.90;
- (D.O. I + D.O. III) – D.O. II = Δ = 0.41.

La différence Δ obtenue est donc positive et assez importante.

Discussion

Le nombre de germes vivants après action de la colimycine ($1.1 \cdot 10^8$ par ml) est égal à la moitié du nombre de germes vivants estimés ($2.2 \cdot 10^8$ par ml). En admettant à la limite que la décharge par les vivants dans la culture traitée (voir II) soit D.O. I/2 = 0.315, la différence Δ obtenue serait de 0.095, donc quand même positive.

Mais les deux facteurs suivants ont certainement contribué à abaisser la différence Δ qui devrait donc être supérieure à 0.41 (pour D.O. I) ou 0.095 (pour D.O. I/2):

- il y a encore environ 2000 germes par goutte de culot de bactéries traitées au sable de quartz: cette concentration est faible par rapport à la concentration initiale, mais tout de même appréciable;

- le nombre de germes ($n_2 = 5.7 \cdot 10^8$ par ml) qui ont subi le traitement de lyse est inférieur au nombre effectif ($n_2 = 7.7 \cdot 10^8$ par ml) de germes atteints par la colimycine qui ont déchargé une partie du matériel donnant la D.O. II.

Nous pouvons donc conclure qu'une quantité plus ou moins grande de germes atteints par la colimycine n'est pas lysée; elle a donc effectivement subi une altération de la perméabilité.

2) Action de la colimycine sur la décharge d'acides aminés libres

- Comptages: ils confirment l'action antibiotique de la colimycine:
 - à 0 min: $4.4 \cdot 10^8$ germes/ml;
 - à 2 h 30 (culture témoin): $3 \cdot 10^8$ germes/ml;
 - à 2 h 30 (culture colimycinée): $4 \cdot 10^7$ germes/ml.

- Chromatographie sur film (voir schéma ci-contre).

La colimycine ne se retrouve pas dans la solution colimycinée (pas de différence entre témoin et colimyciné), et le chloramphénicol n'est de toute façon pas révélé à cette concentration.

Cinq taches (toutes roses, sauf la n° 2 qui est violette) ont été obtenues, identiques pour les solutions témoin et colimycinée. Nous avons tenté ultérieurement, lors d'essais complémentaires faits dans les mêmes conditions, mais après concentration des germes en acide glutamique, de déterminer les acides aminés contenus dans ces taches. Des analyses (par chromatographie unidimensionnelle sur film avec différents acides aminés de référence et par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose) nous ont permis d'émettre les hypothèses suivantes quant à leur nature:

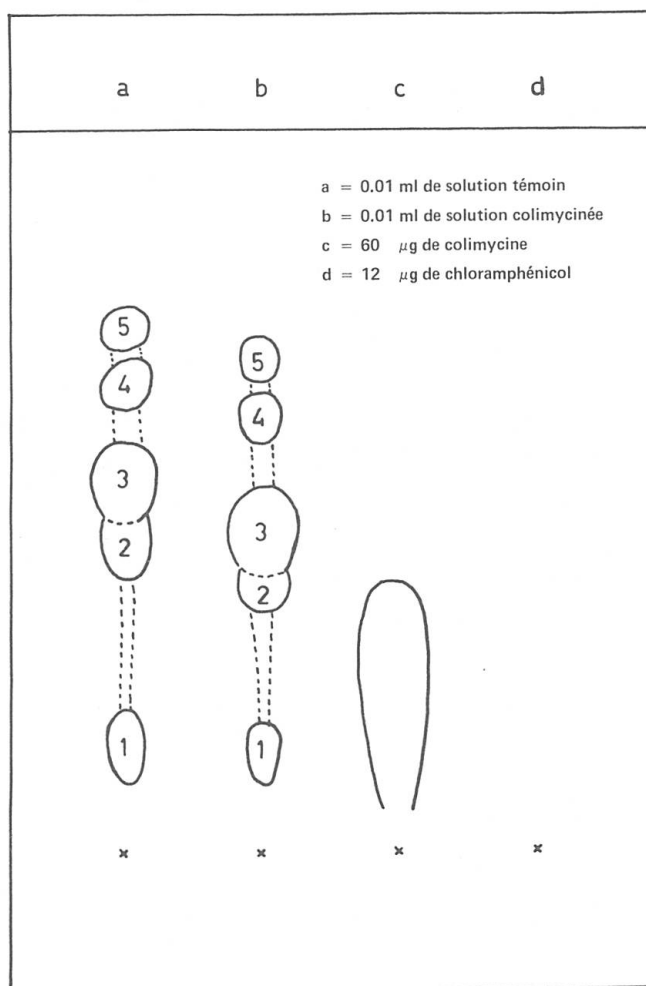
- Tache 1: lysine; taurine; histidine et/ou cystéine;
 2: glutamine; acide aspartique;
 3: acide glutamique; glycine ou sérine; alanine; acide γ -amino-butyrrique(?);
 4: valine;
 5: leucine.

Il y a donc une variété relativement importante d'acides aminés qui sont déchargés dans le milieu.

Aucune différence n'étant décelable entre témoin et colimyciné, la méthode chromatographique n'est pas assez sensible pour mettre en évidence l'action de la colimycine. Il fallait donc entreprendre un dosage colorimétrique.

- Dosage colorimétrique

Nature de l'échantillon	E à 570 $m\mu$	Equivalent en μg leucine
Solution témoin	0.478	35.42
Solution colimycinée	1.094	82.65
Di = différence entre solutions colimycinée et témoin	0.606	45.92



L'action de la colimycine sur la décharge d'acides aminés est nette: la culture témoin libère moins de 43% des acides aminés déchargés par la culture colimycinée.

Nous mentionnerons pour terminer quelques essais faits:

- en concentrant préalablement les germes en acide glutamique: compte tenu du nombre de germes atteints par la colimycine, il semble que la Di soit sensiblement égale, mais que la décharge, aussi bien dans les cultures témoin que colimycinée soit plus importante avec des germes concentrés en acide glutamique (le milieu II ne contenant pas d'acide glutamique, le témoin préalablement concentré en cet acide aminé le décharge au cours du temps dans le milieu (BRITTEN & McCLURE, 1962).
- sans concentration des germes en acides aminés (c'est-à-dire sans traitement au chloramphénicol): la quantité d'acides aminés déchargés est beaucoup plus faible, de même que la Di.

Notons que, sans chloramphénicol, les germes se multiplient au cours du temps, d'où une plus grande quantité de germes déchargeant dans le milieu, surtout chez le témoin.

Le dosage colorimétrique nous a donc permis de mettre en évidence, dans différentes conditions, la décharge d'acides aminés libres par *E. coli* B sauvage en quantité nettement plus importante après traitement à la colimycine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOISSONNAS, R. A. (1950). Dosage colorimétrique des acides aminés séparés par chromatographie sur papier. *Helv. Chim. Acta*, 33, fasc. VI, n° 250: 1975-1982.
- BRITTEN, R. J. & F. T. MCCLURE (1962). The amino acid pool in *Escherichia coli*. *Bact. Rev.* 26: 292-321.
- GALE, E. G. & E. S. TAYLOR (1947). The assimilation of amino acids by bacteria. (2) The action of tyrocidin and some detergent substances in releasing amino acids from the internal environment of *Streptococcus faecalis*. *J. Gen. Microbiol.* 1: 77-86.
- MANDELSTAM, J. (1958). The free amino acids in growing and non growing populations of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 69: 103-110.
- SALTON, M. R. J. (1951). The absorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *J. Gen. Microbiol.* 5: 391-404.
- TEMPEST, D. W., J. L. MEERS & C. M. BROWN (1970). Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *J. Gen. Microbiol.* 64: 171-185.