

Le rôle du microscope électronique dans l'étude du mode d'action des antibiotiques

Autor(en): **Werner, G.H. / Kellenberger, E.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **4 (1948)**

Heft 4

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-306935>

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.

Institut de Physique et Institut de Botanique de l'Université de Genève
Laboratoire de Microscopie Electronique

2. Le rôle du Microscope Electronique dans l'étude du mode d'action des Antibiotiques

Par G. H. Werner et E. Kellenberger

Depuis près de dix ans que la microscopie électronique est appliquée à l'étude des objets biologiques, et spécialement des microorganismes, de nombreuses données ont été obtenues à l'aide de cet appareil, concernant la morphologie normale des bactéries. Les travaux de *Ruska* (1), de *Stuart Mudd* et son école (2), en particulier, ont permis de se faire une idée de plus en plus précise des structures fondamentales de la cellule microbienne. L'existence d'une paroi cellulaire définie, d'une membrane cytoplasmique, le mode d'attache des flagelles, ainsi que la présence de structures internes de nature nucléaire, ont été mis en évidence.

Mais si la structure normale des bactéries présente un intérêt considérable, la manière dont celles-ci répondent aux diverses actions antimicrobiennes, d'ordre sérologique ou chimiothérapique, n'est pas moins importante à connaître.

Un premier pas, dans ce domaine, a été accompli par les recherches de *Mudd* et de ses collaborateurs, recherches dans lesquelles ces auteurs se sont efforcés de découvrir comment les *anticorps* réagissent avec la cellule bactérienne. C'est ainsi qu'ils ont examiné au microscope électronique des cellules d'*Eberthella typhosa*, exposées à l'antisérum homologue de lapin (3). La combinaison spécifique avec les anticorps flagellaire et somatique se traduit morphologiquement par la formation de films d'anticorps sur les surfaces des flagelles et des parois cellulaires. D'autre part, ces mêmes auteurs ont observé au microscope électronique, l'augmentation d'épaisseur de la capsule des pneumocoques traités par l'antisérum homologue (4).

La lyse des cellules microbiennes par les *bactériophages* a été observée au microscope électronique par *Luria, Delbruck* et *Anderson* (5) et par *G. L. Clark* et ses collaborateurs (6). Les particules de virus apparaissent attachées à la paroi cellulaire tandis que le cytoplasme subit une rapide

et complète désintégration. Il ne subsiste plus que des enveloppes cellulaires vidées, où demeurent quelques reliquats cytoplasmiques.

L'action des *substances bactéricides* a également été envisagée indirectement, par cette méthode, dans les essais de «coloration sélective» de *Mudd* et *Anderson* (7). Ces auteurs ont employé en particulier des sels de métaux lourds (Pb, Ni, Hg, Ag) dont certains ont une action germicide connue. Après une courte exposition des cellules de *Vibrio cholerae* à des solutions de ces sels, ils notent un assombrissement de la membrane, tandis que le cytoplasme est coagulé, contracté, et peut diffuser hors des cellules.

On conçoit que la microscopie électronique puisse apporter aussi des renseignements précieux dans l'étude du mode d'action de substances antibactériennes plus complexes, telles que les *antibiotiques*. Depuis le développement de ces derniers, plusieurs auteurs ont déjà observé, avec les méthodes microscopiques ordinaires, des modifications morphologiques des bactéries soumises *in vitro* à l'action antibiotique.

Toutefois, si les modifications brutales, les changements considérables de dimensions, les pertes d'affinité tinctoriale, peuvent être décelés par la microscopie optique, les actions morphologiques de détail, portant sur une structure donnée de la cellule, échappent à ce moyen d'observation. C'est pourquoi l'emploi du microscope électronique peut apporter ici des données nouvelles. L'action d'un antibiotique sur la morphologie bactérienne n'est d'ailleurs pas un problème doué seulement d'intérêt théorique. On peut, par ce moyen, évaluer la rapidité d'action d'un antibiotique avec beaucoup plus de précision que ne le permettent les méthodes ordinaires de numération, de turbidimétrie et de respirométrie. En effet, pendant les premières heures de contact avec un antibiotique, le microscope électronique peut déjà, comme nous le verrons, révéler une attaque de la cellule, alors que le repiquage des germes n'atteste pas encore une nette diminution de la population microbienne, que la densité optique de la culture demeure inchangée et que la respiration est restée constante ou même s'est exaltée. D'autre part, en comparant les actions morphologiques de divers antibiotiques, on peut tenter une classification de ceux-ci; si l'on songe à l'extrême diversité chimique des antibiotiques naturels, on conçoit l'intérêt qu'il peut y avoir à ramener leur action à certains types fondamentaux.

Quelques recherches ont déjà été effectuées dans cette voie. C'est ainsi que *L. J. Weiss* (8) a étudié au microscope électronique, l'action de la pénicilline en particulier sur *Clostridium welchii*, en observant de considérables allongements de ce bacille, dont la faculté de division semble être entravée. *F. H. Johnson* (9) a étudié l'action de la tyrothri-

cine sur *Bacillus cereus*: il note une contraction du protoplasme à l'intérieur de l'enveloppe cellulaire, une désintégration de la paroi, ainsi que la présence d'enveloppes cellulaires vidées de leur contenu protoplasmique. *Mitchell* et *Crowe* (10) ont examiné au microscope électronique, la lyse des streptocoques sous l'action de la tyrocidine.

A titre d'exemple de ce genre de recherches, nous donnerons ici quelques détails sur les essais que nous avons effectués (11) pour tenter de mettre en évidence l'action de la *streptomycine* sur la cellule bactérienne. Nous avons choisi comme organisme test *Bacillus subtilis*, car ce germe est un de ceux qui présentent la plus grande sensibilité à la streptomycine. En outre, il peut croître dans des milieux synthétiques très simples et cela permet de prélever directement dans la culture les échantillons qu'on veut examiner au microscope électronique. Par là, on évite le lavage des germes par centrifugation, lavage nécessaire en cas de culture dans un milieu complexe mais qui peut achever de détériorer des structures déjà en voie de désorganisation. On prélève donc, à différents stades de la croissance, une goutte de culture qu'on dépose sur le support de collodion et évapore à 37° au vide. Un lavage à l'eau distillée permet l'élimination des substances présentes dans le milieu, tandis que les bactéries restent adhérentes au collodion. Les préparations sont ensuite soumises à l'ombrage à l'or par la méthode de *Williams* et *Wyckoff* (12), méthode qui permet d'obtenir le relief des corps bacillaires et d'apprécier leur volume d'après l'ombre qu'ils projettent.

L'étude des cultures-témoins nous a permis de confirmer les résultats obtenus par *Mudd* et son école (13) sur la morphologie du genre *Bacillus*, telle qu'elle apparaît au microscope électronique. Les bacilles présentent un cytoplasme homogène et dense, enveloppé par une paroi cellulaire bien définie. Cette paroi est intimement accolée au cytoplasme dans les cellules des cultures jeunes qui sont gonflées (fig. 1), mais légèrement séparée du cytoplasme dans les cellules des cultures âgées, moins denses (fig. 2). Nous avons noté de nombreuses figures de division, où la paroi cellulaire est continue d'un bacille à l'autre, tandis que les cytoplasmes sont réunis par un mince filament protoplasmique, le plasmodesme.

Il était intéressant, avant d'étudier l'action antibiotique, d'envisager les processus d'*autolyse* qui se déroulent dans les cultures au cours du vieillissement. Nous avons constaté que le cytoplasme subit une fonte progressive, ce qui aboutit à la formation de cellules aplaties, puis la dissolution cytoplasmique est telle qu'il ne subsiste plus que des enveloppes cellulaires collabées, entièrement vidées de leur contenu. Ces enveloppes subissent, à leur tour, une désagrégation. La fig. 3 montre les différents aspects de cette autolyse.

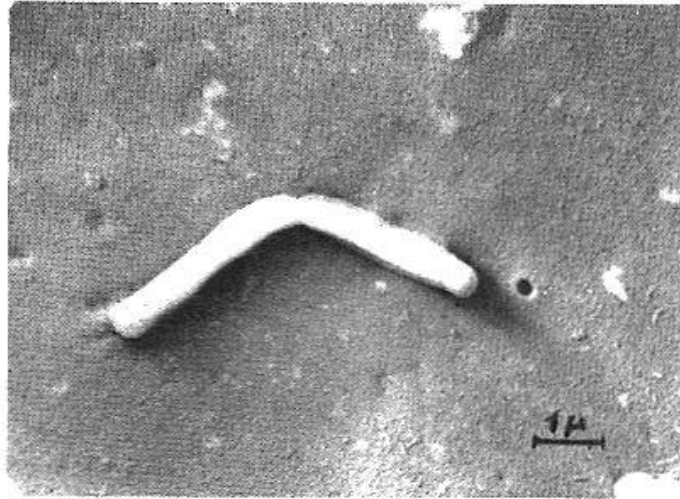


Fig. 1. *Bacillus subtilis*. Culture à son début: le cytoplasme remplit l'enveloppe cellulaire.

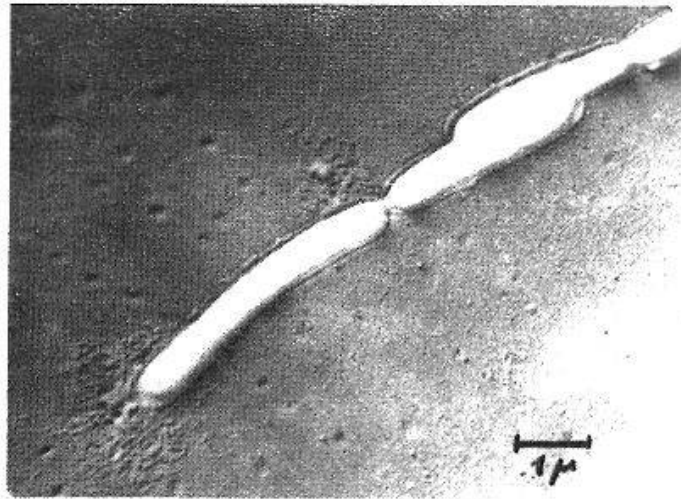


Fig. 2. *Bacillus subtilis*: culture plus âgée: on voit le repli de la membrane.

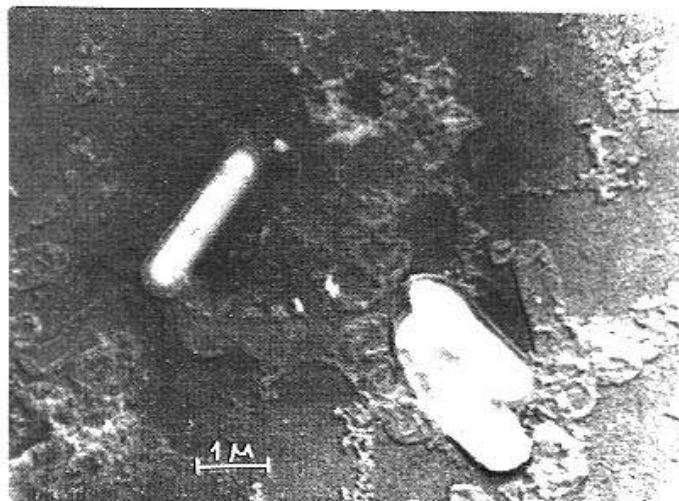


Fig. 3. Autolyse des bacilles. Fonte cytoplasmique, enveloppes cellulaires vides en voie de destruction.

Au cours du vieillissement des cultures, des spores peuvent également apparaître. Ce sont des formes de petites dimensions, dont la paroi n'est pas discernable du contenu, et dont le volume est très considérable, ce qu'atteste leur ombre portée (fig. 4).

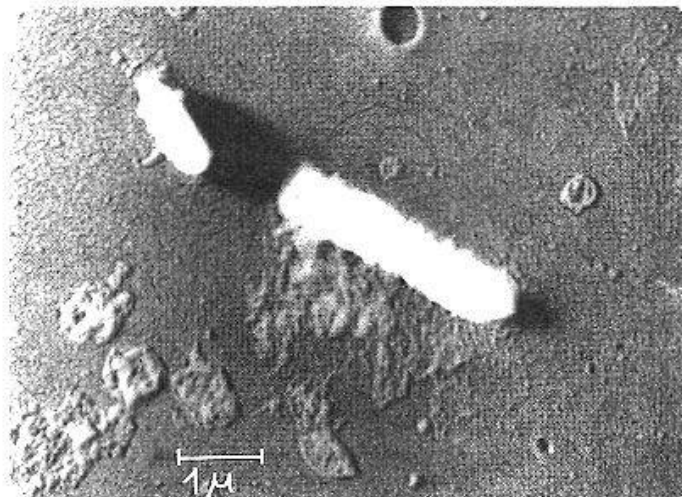


Fig. 4. Culture âgée, bacille et spore volumineuse.

Pour étudier l'action de la streptomycine, nous avons ajouté aux cultures en phase de croissance active – contenant donc une abondante population microbienne – des quantités de streptomycine (sous forme de complexe avec CaCl_2 ou de sulfate) variant entre 25, 100, 500 et 1000 unités par ml. La concentration bactériostatique capable d'empêcher la croissance microbienne lorsqu'elle est présente au moment de l'inoculation est de 50 unités par ml, mais, dans nos essais, la densité de la population bactérienne – nécessaire pour permettre des observations suffisantes – justifiait l'emploi de doses plus élevées. Des prélèvements sont ensuite effectués dans de nombreuses cultures, après des durées variables de contact avec l'antibiotique.

Les modifications morphologiques sont extrêmement rapides: au bout de quelques heures de contact on n'observe pratiquement plus de bacilles d'aspect normal. Ces modifications peuvent se résumer comme suit: a) apparition de bacilles à turgescence très considérable, dont le cytoplasme remplit si étroitement l'enveloppe cellulaire que cette dernière n'est plus discernable. Le volume de ces cellules est important, ce qui se traduit par une ombre portée particulièrement grande (fig. 5 et 6). Par analogie avec les spores, dont le volume est également grand, nous les avons nommées: «formes sporiques». Très souvent, ces formes sporiques sont groupées en chaînes.

b) Dans d'autres bacilles, en général isolés, on assiste à une contraction extrême du cytoplasme à l'intérieur de l'enveloppe cellulaire (fig. 7

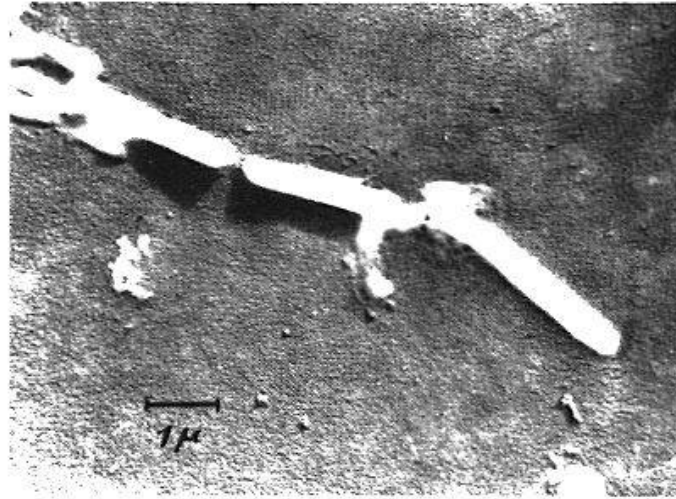


Fig. 5. Action de la streptomycine. Formes «sporiques» en chaîne.

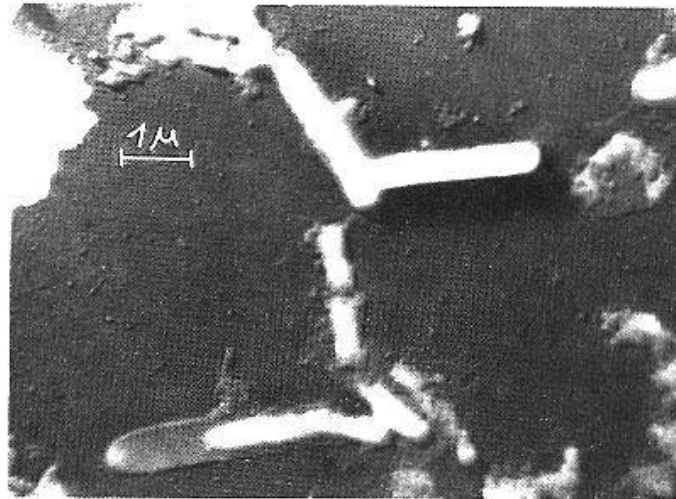


Fig. 6. Action de la streptomycine. Forme «sporique» et sortie du cytoplasme à un pôle.

et 8). Le cytoplasme semble alors être un mince filament occupant une enveloppe cellulaire trop grande pour lui. D'autre part, si on suit le contour de cette dernière, on constate qu'elle présente souvent des discontinuités.

c) Enfin, le phénomène le plus frappant – et que nous avons constaté avec une fréquence égale aux deux premiers – est la sortie du cytoplasme hors de l'enveloppe cellulaire qu'il laisse vide. Cette sortie peut s'effectuer de diverses manières: à un pôle (fig. 6); latéralement, le cytoplasme semblant s'écouler hors du sac que constitue l'enveloppe cellulaire (fig. 9), ou encore, cette dernière peut s'ouvrir par le milieu et laisser ainsi échapper le cytoplasme (fig. 10). Le résultat de ces expulsions est la présence, dans la préparation, de cytoplasmes entièrement nus, plus ou moins détériorés, parfois enroulés sur eux-mêmes et voisinant avec des parois cellulaires vidées (fig. 11). La transformation des cellules de

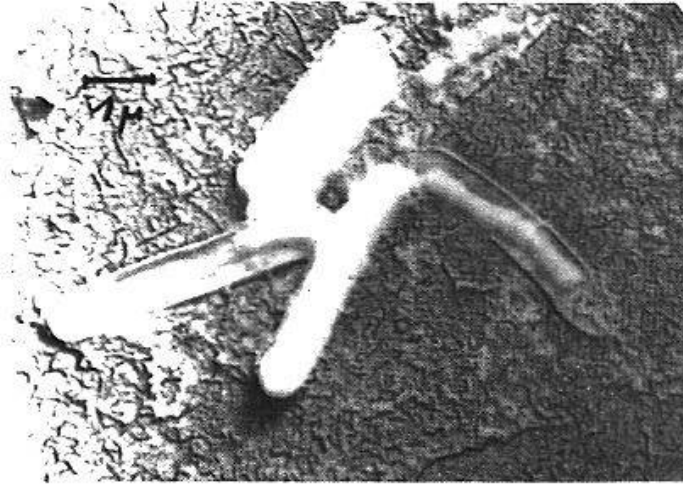


Fig. 7. Action de la streptomycine. Contraction du cytoplasme, membrane discontinue.

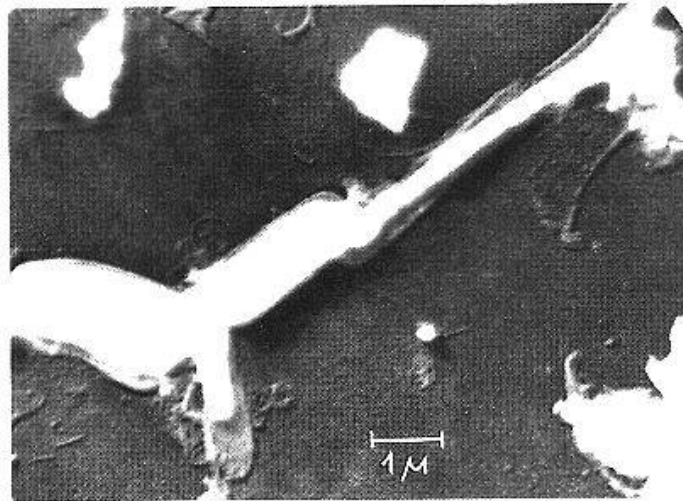


Fig. 8. Contraction du cytoplasme sous l'action de la streptomycine.

Bacillus subtilis en «stromas» vidés de leur contenu, sous l'action de la streptomycine, a d'ailleurs été déjà observée, en microscopie optique, par *Levaditi* et *Henry* (14).

Il y a des raisons de croire que la contraction du cytoplasme à l'intérieur de l'enveloppe cellulaire précède chronologiquement sa sortie. Quant aux formes «sporiques», on pourrait supposer qu'elles représentent des bacilles doués de résistance à l'action antibiotique. En réalité, en présence de doses élevées, et à la suite d'un contact suffisamment long, la plupart semblent subir, à leur tour, les phénomènes de contraction et de sortie du cytoplasme. D'autre part, lorsqu'on effectue un repiquage en milieu neuf d'une culture ayant subi un long contact avec la streptomycine et ne contenant, à côté des formes pratiquement détruites, que des bacilles «sporiques», la culture nouvelle présente uniquement des bacilles à aspect morphologique tout-à-fait normal et aucune de ces formes sporiques. Soumis de nouveau à l'action de la streptomycine,

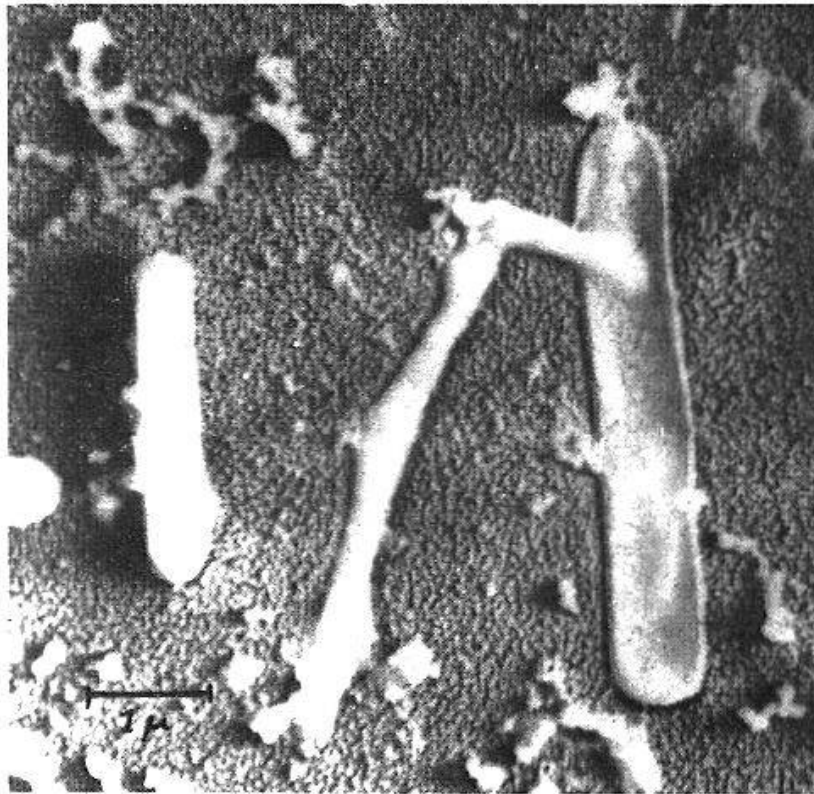


Fig. 9. Sous l'action de la streptomycine, le cytoplasme s'écoule hors de l'enveloppe cellulaire.

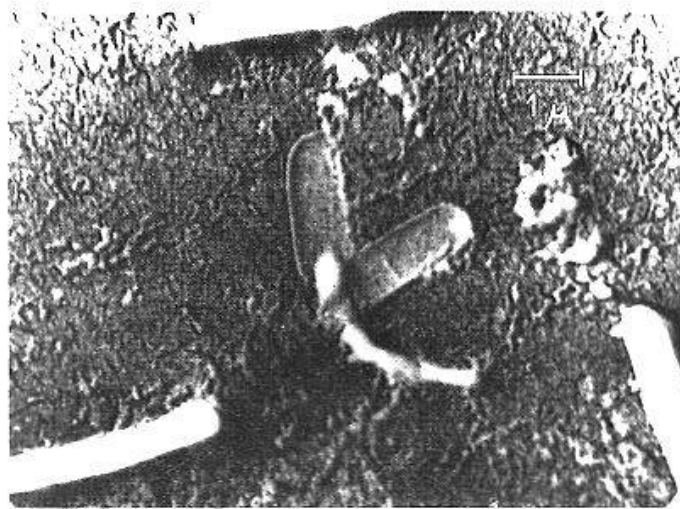


Fig. 10. Sortie du cytoplasme hors de l'enveloppe cellulaire sous l'action de la streptomycine.

ces germes ainsi «sélectionnés» présentent les mêmes modifications d'ensemble que les bacilles des cultures-témoins, jamais traitées auparavant.

Si l'on peut ainsi éliminer l'idée d'une résistance particulière de certains germes qui affecteraient la forme «sporique», il est néanmoins impossible de déterminer ce qui, dans un bacille soumis à l'action de la streptomycine, le fait réagir par l'une ou l'autre modification morphologique. Les formes «sporiques» semblent prédominer dans les bacilles

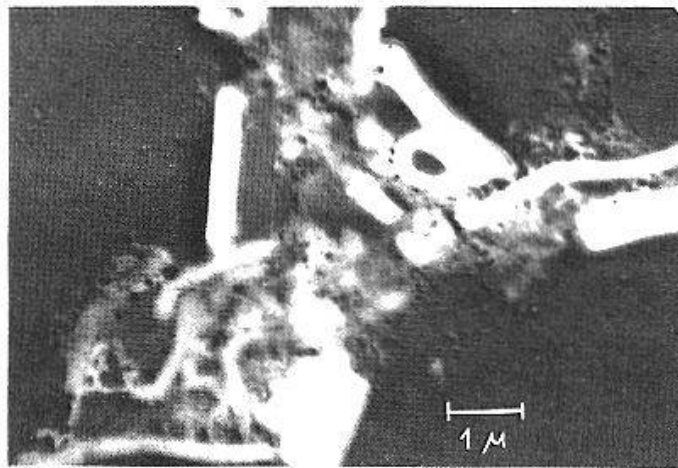


Fig. 11. Long contact avec la streptomycine, cytoplasmes nus et plus ou moins désagrégés.

réunis en chaînes, c'est-à-dire ceux qui sont en train de se diviser; c'est peut-être là une indication...

Quoiqu'il en soit, les nombreux clichés que nous avons obtenus, et dont nous ne pouvons présenter ici qu'une petite portion, attestent que la streptomycine a sur la cellule de *Bacillus subtilis* une action morphologique rapide et considérable.

A titre de comparaison, nous avons également étudié au microscope électronique, et sur le même bacille, l'action d'un antiseptique, l'éthylmercurithiosalicylate de sodium («Merthiolate» Lilly) dilué au 1:10 000. Après quelques minutes de contact déjà, la cellule bactérienne montre une désorganisation complète: destruction de la membrane et coagulation du cytoplasme (fig. 12).

Ces faits démontrent l'action bactéricide de ce composé par opposition à l'action antibactérienne moins brutale et plus complexe de la streptomycine.

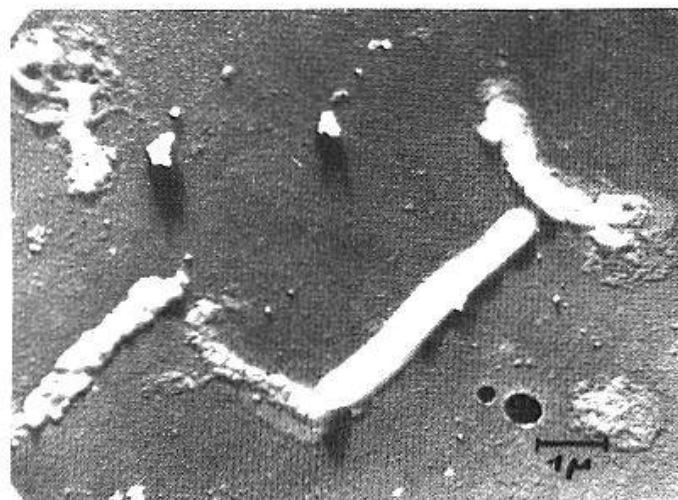


Fig. 12. Action du «Merthiolate» Lilly: désorganisation complète de la cellule bactérienne.

La Streptomycine et le «Merthiolate» nous ont été généreusement fournis par la maison Eli Lilly and Co., Indianapolis, à laquelle nous adressons nos vifs remerciements.

Résumé

La microscopie électronique a fourni de nombreux renseignements inédits sur la structure de la cellule bactérienne et sur son organisation. Elle permet, en outre, l'étude des transformations morphologiques que subissent les microorganismes sous l'action de divers traitements antibactériens: effet des antisérums homologues, des bactériophages spécifiques et des substances bactéricides. Quelques résultats ont déjà été obtenus dans cette voie. Ces altérations morphologiques ne sont probablement d'ailleurs que la signature de perturbations métaboliques dont les modalités nous échappent encore.

L'action des substances antibiotiques (pénicilline, tyrocidine, streptomycine) peut également être étudiée au moyen du microscope électronique. A titre d'exemple, les auteurs exposent leurs recherches sur l'effet de la streptomycine sur la cellule de *Bacillus subtilis*. La morphologie normale du bacille est décrite. En présence de concentrations diverses de streptomycine, les cellules bacillaires subissent des altérations rapides et considérables: 1° turgescence du cytoplasme qui s'applique étroitement contre la paroi; 2° contraction extrême du cytoplasme à l'intérieur de l'enveloppe cellulaire; 3° sortie du cytoplasme hors de l'enveloppe, cette dernière restant vide et souvent discontinue. Les formes turgescents («sporiques») ne sont pas des formes résistantes et peuvent subir, après un certain temps de contact, les autres altérations décrites (contraction et sortie du cytoplasme).

Cet effet de la streptomycine est comparé avec la destruction, plus brutale et moins spécifique, du bacille par un antiseptique («Merthiolate» Lilly).

Zusammenfassung

Die Elektronen-Mikroskopie hat zahlreiche neue Kenntnisse von der Bakterienzelle und ihrer Anordnung gebracht. Außerdem erlaubt diese Methode, die strukturellen Veränderungen der Mikroorganismen unter dem Einfluß verschiedener Behandlungen zu studieren: Wirkung der homologen Antiseren, der spezifischen Bakteriophagen und der bakteriziden Stoffe. Bereits sind in dieser Richtung einige Ergebnisse erzielt worden. Diese morphologischen Veränderungen sind wahrscheinlich nur das äußere Zeichen metabolischer Störungen, deren Prozesse noch unbekannt sind.

Die Wirkung der Antibiotika (Penicillin, Tyrocidin, Streptomycin) kann mit dem Elektronen-Mikroskop ebenfalls beobachtet werden. Als

Beispiel erwähnen die Verfasser ihre Nachforschungen über die Wirkung des Streptomycins auf die Zelle von *Bacillus subtilis*. Zuerst wird die normale Struktur des *Bacillus* beschrieben. Bei Vorhandensein verschiedener Konzentrationen von Streptomycin erleiden die Zellen des *Bacillus* rasche und bedeutende Veränderungen: 1. Turgescenz des Cytoplasmas, das eng an die äußere Zellwand gedrückt ist; 2. starke Zusammenziehung des Cytoplasmas innerhalb der Zellhaut; 3. Ausbruch des Cytoplasmas aus dieser Zellhaut, die leer bleibt und oft Zerstückelungen aufweist. Die turgeszenten («sporischen») Formen sind keine widerstandsfähigen Organismen und können nach einer gewissen Kontaktzeit die anderen, beschriebenen Veränderungen (Kontraktion und Austreten des Cytoplasmas) erleiden.

Diese Wirkung des Streptomycins wird von den Verfassern mit der brutaleren und weniger spezifischen Zerstörung des *Bacillus* durch einen antiseptischen Stoff («Merthiolat» Lilly) verglichen.

Riassunto

Il microscopio elettronico ha dato delle numerose informazioni inedite sulla struttura della cellula batterica e sulla sua organizzazione. Inoltre, esso permette lo studio delle trasformazioni morfologiche alle quali sono sottoposti i micro-organismi sotto l'azione dei diversi trattamenti antibatterici: effetto dei sieri omologhi, dei batteriofaghi specifici e delle sostanze battericide. Alcuni risultati sono già stati ottenuti in questo campo. D'altra parte queste alterazioni morfologiche non sono probabilmente che la conseguenza di perturbazioni metaboliche, delle quali le modalità ci sono ancora sconosciute.

L'azione delle sostanze antibiotiche (penicillina, tirocidina, streptomycina) può essere anche studiata mediante il microscopio elettronico. Gli AA. danno come esempio le loro ricerche sull'effetto della streptomycina sulla cellula di *Bacillus subtilis*. La morfologia normale del bacillo è descritta. Di fronte a concentrazioni diverse di streptomycina, le cellule bacillari subiscono delle alterazioni rapide e notevoli: 1. turgenza del citoplasma, il quale si applica strettamente alla parete, 2. contrazione estrema del citoplasma all'interno della membrana cellulare, 3. fuoruscita del citoplasma dall'involucro cellulare, quest'ultimo rimanendo vuoto e spesso discontinuo. Le forme turgenti («sporiche») non sono forme resistenti e possono subire, dopo essere rimaste per un tempo in contatto, le altre alterazioni descritte (contrazione, fuoruscita del citoplasma).

Quest'effetto della streptomycina è paragonato colla distruzione, più brutale e meno specifica, del bacillo da un antiseptico («Merthiolate» Lilly).

Summary

Electron microscopy has provided bacteriologists with many new informations concerning the morphology of the bacterial cell and its organization. Besides, this technique allows the observation of structural modifications of the microorganisms submitted to various treatments: action of homologous antisera, of specific bacteriophages, of germicides. Some results have been obtained in this field. Likely, the structural injuries observed are the traduction of unknown metabolic disturbances.

The action of antibiotics (penicillin, tyrodicin, streptomycin) may also be observed with the aid of the electron microscope. For instance, the authors present their researches related to the effect of streptomycin on the cell of *Bacillus subtilis*. The normal morphology of this bacillus is described. In contact with various concentrations of streptomycin, the cells undergo swift and marked alterations: 1° appearance of cells of highly turgescient character, the cytoplasm of which is intimately applied against the cell wall; 2° extreme shrinkage of the cytoplasm inside the cellular envelope; 3° extrusion of the cytoplasm from the cellular envelope, which remains empty and presents often interruptions. The turgescient («sporical») form is not a resistant one and may, in the long run, undergo the other described injuries (shrinkage and extrusion of cytoplasm).

This effect of streptomycin is compared by the writers with the more brutal and less specific destruction of the bacillus caused by a germicide («Merthiolate» Lilly).

1. *Ruska, H.*: Arch. exper. Zellforsch. **22**, 673, 680 (1939). – 2. *Mudd, S.*: Nature **161**, 302 (1948); *Mudd, S.*, et *Anderson, T. F.*: J. amer. med. Assoc. **126**, 561, 632 (1944). – 3. *Mudd, S.*, et *Anderson, T. F.*: J. Immunol. (Am.) **42**, 251 (1941). – 4. *Mudd S.*, *Heinmets, F.*, et *Anderson, T. F.*: J. exper. Med. (Am.) **78**, 327 (1943). – 5. *Luria S. E.*, *Delbruck, M.*, et *Anderson, T. F.*: J. Bacter. (Am.) **46**, 57 (1943). – 6. *Baylor, M. R. B.*, *Severens, J. M.*, et *Clark, G. L.*: J. Bacter. (Am.) **47**, 277 (1944). – 7. *Mudd, S.*, et *Anderson, T. F.*: J. exper. Med. (Am.) **76**, 103 (1942); J. amer. publ. Health Assoc. **33**, 167 (1943). – 8. *Weiss, L. J.*: Proc. Indiana Acad. Sci. **52**, 27 (1942). – 9. *Johnson, F. H.*: J. Bacter. (Am.) **47**, 551 (1944). – 10. *Mitchell, P. D.*, et *Crowe, G. R.*: J. gen. Microbiol. **1**, 85 (1947). – 11. *Kellenberger, E.*, et *Werner, G. H.*: Experientia 1948. sous presse. – 12. *Williams, R. C.*, et *Wyckoff, R. W. G.*: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **58**, 265 (1945). – 13. *Mudd, S.*, *Polevitzky, K.*, *Anderson, T. F.*, et *Chambers, L. A.*: J. Bacter. **42**, 251 (1941). – 14. *Levaditi, C.*, et *Henry, J.*: Bull. Acad. Nat. Méd. **1947**, 131, 169.