

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
FACULTE DE MEDECINE ANNABA
DEPARTEMENT DE PHARMACIE

COURS DE MICROBIOLOGIE
4^{ème} ANNEE PHARMACIE

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE

ELABORE ET PRESENTE PAR Pr DJAHMLI.N

L'année pédagogique : 2019/2020

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE

I- HISTORIQUE :

- En 1821, Bretonneau a individualisé la diphtérie et en a signalé l'aspect contagieux.
- en 1883, Klebs décrit l'agent responsable dans les fausses membranes d'angines diphtériques et en 1884 Loeffler réussit à cultiver la bactérie, puis montre son pouvoir pathogène expérimental pour le cobaye.
- En 1888, Roux et Yersin démontrent le rôle de la toxine.
- En 1890, Behring découvre l'antitoxine et en 1923, Ramon produit l'anatoxine.
- En 1970 enfin, est précisé le mécanisme moléculaire d'action de la toxine.

II-POUVOIRE PATHOGENE :

1- PHYSIOPATHOLOGIE :

Corynebacterium diphtheriae se multiplie préférentiellement dans les couches superficielles de certains épithéliums : rhinopharynx, plus rarement larynx ou peau ; on peut aussi le retrouver au niveau des conjonctives.

La multiplication s'accompagne d'adénopathies satellites, mais n'entraîne pas de bactériémie.

Les enzymes et la toxine produite, provoquent localement une réaction inflammatoire avec formation d'un exsudat épais ; la fausse membrane. La toxine diffusant à distance du siège de la multiplication bactérienne, par voie sanguine, va atteindre différents tissus, bloquer la synthèse des protéines dans les cellules cibles, et être responsable de complications (cardiaques, nerveuses....)

2-- CLINIQUE :

L'infection se manifeste par des lésions locales dues à une colonisation des tissus par la bactérie et à des manifestations générales à distance dues à l'action de la toxine.

1-Angine diphtérique:

- **Angine commune:** la forme la plus fréquente : Après une période d'incubation de 2-5j, survient une période d'invasion marquée par ; asthénie, anorexie, courbature, fièvre rare, pâleur importante, et des adénopathies sous-maxillaires qui précèdent la phase d'état: les fausses membranes apparues en 24-48h de couleur blanchâtre, crème très adhérente lisse épaisse, puis irrégulière, grisâtre envahissant toute la gorge. La muqueuse buccale est non ulcérée et non hémorragique.
- **Angine maligne:** la forme hypertoxique, rencontrée dans 17-23% des cas, s'installe directement ou après une angine commune non ou mal traitée. caractérisée par: fièvre, altération de l'état général, pâleur intense, hypotension, diarrhées.....

Les fausses membranes sont de couleur grisâtre, verdâtre ou noirâtre, parfois hémorragique et fétide

2- autres localisations :

Il existe d'autres localisations de la diphtérie dont la plus connue est la diphtérie laryngée ou **croup** avec le risque d'asphyxie par obstruction des voies respiratoires nécessitant une trachéotomie. Les localisations nasales (plus fréquentes chez le nourrisson), oculaires, auriculaires ou cutanées sont généralement moins sévères.

III- BACTÉRIOLOGIE :

1- MORPHOLOGIE :

Corynebacterium diphtheriae est un bacille à Gram positif, non ramifié, non sporulé, non capsulé et immobile. Les bactéries se présentent souvent en forme de massue et groupées en amas donnant des images en palissade, en paquets d'épingles ou en lettres de l'alphabet. Certaines techniques de coloration (Del Vecchio ou Ernst-Neisser) mettent en évidence des granulations métachromatiques à l'intérieur des corps bactériens. Ces aspects morphologiques sont assez caractéristiques et différent de ceux des corynebactéries dites commensales, qui apparaissent plus courtes et plus trapues.

2- CARACTERES BIOCHIMIQUES :

Des caractères biochimiques (catalase +, urée -, glucose +, saccharose -, dextrine +, nitrate réductase +, H₂S +) distinguent le bacille diphtérique des autres corynebactéries.

3- CULTURE :

La culture, en atmosphère aérobie ou anaérobie, exige la présence de nombreux facteurs de croissance (du fer en particulier) et par conséquent nécessite des milieux riches.

1-Le **milieu de Loeffler** au sérum coagulé est le milieu classique utilisé pour l'isolement de *Corynebacterium diphtheriae*.

2-Le **milieu GHT** (gélose, hémoglobine, tellurite) est rendu sélectif par l'adjonction de tellurite de potassium, dont la présence inhibe le développement de la plupart des bactéries habituellement présentes dans le rhino-pharynx. Sur ce milieu, les colonies de *C. diphtheriae* sont noires à cause de la réduction du tellurite. Selon l'aspect des colonies, on distingue différentes variétés dénommées *gravis*, *mitis* ou *intermedius*.

3-Le **milieu de Tinsdale**, également sélectif, contient du sang laqué, de la cystéine et du tellurite. La production d'H₂S (à partir de la cystéine) donne au milieu une coloration noire autour des colonies de *C. diphtheriae* qui sont elles-mêmes également noires à cause de la réduction du tellurite.

4- STRUCTURE ANTIGENIQUE ET SUBSTANCES ELABOREES

C. diphtheriae possède des antigènes O polysaccharidiques, communs à toutes les souches, et des antigènes protéiques de surface K, définissant des types sérologiques (mais le sérotypage n'est pas standardisé et est peu utilisé).

5- BACTERIOPHAGES

C. diphtheriae produit des bactériocines qui permettent le typage des souches.

IV- TOXINE DIPHTERIQUE :

Corynebacterium diphtheriae élabore une puissante toxine protéique (exotoxine) constituée d'une chaîne polypeptidique de 62 kD contenant 2 ponts disulfures dont la séquence des acides aminés est connue. On lui distingue 2 fragments A et B :

- le fragment B (38 kD) permet la fixation sur un récepteur cellulaire
- et le fragment A (24 kD) est le support de l'activité toxique.

Après fixation de la toxine, le fragment A, clivé par des enzymes membranaires, libère dans le cytoplasme une activité enzymatique (ADP ribosylase) qui, en présence de NAD cellulaire, inhibe le facteur d'élongation EF2 nécessaire à la constitution des chaînes polypeptidiques : les synthèses protéiques de la cellule s'en trouvent donc bloquées.

La toxine n'est produite que par les souches possédant le gène "*tox+*" qui est fourni par un bactériophage β . Ce gène est inhibé par un répresseur chromosomique qui est actif en présence de fer. La toxine n'est donc produite que si la concentration du milieu en fer est inférieure à 100 $\mu\text{g/l}$ (à noter : la croissance optimale de la bactérie nécessite cependant des concentrations en fer plus élevées).

Les effets pathogènes de la toxine peuvent être mis en évidence par injection sous-cutanée au cobaye d'une suspension de bacilles diphtériques. L'animal meurt en 48 à 72 heures porteur :

- au point d'inoculation d'un oedème blanc, mou, gélatineux avec adénopathie satellite
- et à distance d'une hypertrophie avec congestion hémorragique des capsules surrénales.

L'injection de toxine seule ne provoque que les lésions à distance mais est également létale.

La toxine formolée et chauffée perd son pouvoir toxique mais conserve son pouvoir antigénique : elle devient ainsi l'**anatoxine** qui, purifiée, est utilisée comme vaccin antidiphtérique.

V- ÉPIDÉMIOLOGIE

La diphtérie est une maladie strictement humaine. On ne trouve les bactéries responsables ni dans l'environnement, ni chez l'animal, et la contagion est donc exclusivement interhumaine.

La maladie a pratiquement disparu dans les pays développés mais sévit encore dans les pays du tiers monde où la mortalité est de 5 à 10%.

VI- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le diagnostic biologique de la diphtérie nécessite la mise en évidence d'une souche toxigène de *Corynebacterium diphtheriae*.

A - Prélèvements :

Le prélèvement de gorge pour la recherche de *C. diphtheriae*, doit être pratiqué devant toute angine, à fausses membranes. Le prélèvement doit être effectué sous contrôle visuel et avant tout traitement :

- les fausses membranes prélevées à l'écouvillon ou à la pince au niveau du pharynx
- écouvillonnage à la périphérie de la fausse membrane (amygdale, voile, luette)
- plus rarement écouvillonnage nasal, de sérosités cutanées ou conjonctivales, en fonction du tableau clinique

Le prélèvement doit être acheminé au laboratoire sans délai, avant dessèchement ; il doit comporter au moins deux écouvillons (examen direct et culture).

B- Examen direct :

On procédera sur les frottis :

- à une coloration de Gram classique, à la recherche de bacilles à la morphologie évocatrice,
- à une coloration de Del Vecchio ou d' Ernst-Neisser pour la recherche de corpuscules métachromatiques.

C- Culture :

- milieu de Loeffler : Le bacille diphtérique se développe rapidement, en tout cas plus vite que les bactéries hôtes du naso-pharynx et il importe donc d'examiner les cultures après 6, 12 et 18 heures d'étuve. On procède à un raclage de la surface du milieu qu'on étale sur lame. Après fixation, on colore par la technique de Gram sans recolorer par la fuchsine et on examine pour détecter la présence de bacilles "diphtérimorphes", qui constitue une forte présomption de diphtérie.

-On procède alors à un isolement sur milieu riche contenant du tellurite pour inhiber la culture des germes commensaux (milieu de Tinsdale ou milieu GHT). Les colonies suspectes apparaissent grises ou noires selon les types. On les repique sur milieux d'identification pour étudier les caractères biochimiques.

D- Recherche du pouvoir toxigène :

Il est indispensable de prouver que la souche de *Corynebacterium* isolées est un *C. diphtheriae* producteur de toxine.

Cette recherche peut être réalisée selon deux méthodes :

***In vivo* :**

-soit par la mise en évidence du **pouvoir léthal** par inoculation au cobaye (on inocule un cobaye avec une suspension de la souche isolée pour observer à l'autopsie les lésions caractéristiques)

-soit par recherche du pouvoir **dermo-nécrotique** après injection intradermique sur flancs rasés d'un cobaye.

***In vitro* :**

-Réaction d'immunoprécipitation en milieu gélosé en présence d'un sérum antitoxique spécifique (**test d'Elek**). On ensemence parallèlement sur la surface du milieu gélosé la souche à étudier entre 2 souches de référence (Tox+ et Tox-) ,puis on dépose perpendiculairement une bande de papier filtre imbibée de sérum antitoxine diphtérique .on observe l'apparition d'arcs de précipitation, qui, s'ils sont spécifiques, doivent rejoindre les arcs observés avec la souche Tox+. Le délai de lecture est de 1 à 6 jours.

-Biologie moléculaire (PCR) : qui recherche le gène Tox soit sur prélèvement, soit sur souche avec des couples de primers permettant de rechercher les sous unités A et B, elle permet un diagnostic rapide.

E- Diagnostic indirect :

Il n'existe pas de sérodiagnostic permettant de porter a posteriori un diagnostic de diphtérie. Par contre, on peut mesurer l'immunité antitoxique et non antimicrobienne.

VII-SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES ET TRAITEMENT

1- sensibilité aux antibiotiques :

C. diphtheriae est sensible aux pénicillines G et A et aux céphalosporines de 3ème génération injectables, à l'érythromycine et à la majorité des antibiotiques actifs sur les germes à Gram positif ; ce pendant, des souches résistantes à l'érythromycine, à la clindamycine, aux tétracyclines ont été rencontrées.

2- traitement :

Le diagnostic biologique de certitude demande plusieurs jours et il est préférable de commencer le traitement dès que le diagnostic est suspecté.

Le traitement curatif repose sur la sérothérapie antidiphthérique qui doit être instituée rapidement car l'antitoxine n'a plus d'effets quand la toxine s'est fixée sur les cellules. On utilise des doses de 40.000 à 100.000 UI injectées. On y adjoint une antibiothérapie par pénicilline ou érythromycine pour détruire la source de toxine.

Le traitement préventif repose sur la vaccination par l'anatoxine. Elle nécessite 3 injections sous cutanées avec rappel après un an puis tous les cinq ans. Elle est presque toujours associée (vaccinations antitétanique, antipoliomyélitique, anticoquelucheuse...).

AUTRES CORYNEBACTERIES

Les bactéries du genre *Corynebacterium* autres que le bacille diphtérique ("coryneformes") sont de plus en plus souvent impliquées dans des infections nosocomiales ou iatrogènes survenant chez des sujets immunodéprimés ou perfusés, sondés ou cathétérisés.

Ces bactéries, généralement considérées comme contaminant le prélèvement étaient, jusqu'à ces dernières années, peu étudiées. Actuellement cependant, d'importants progrès pour leur classification et leur identification devraient permettre aux bactériologistes et aux cliniciens de s'en préoccuper davantage.

PRINCIPALES ESPÈCES

- <i>Corynebacterium</i>	<i>pseudodiphthericum</i> <i>ulcerans</i> <i>xerosis</i> <i>striatum</i> <i>jeikeium</i> <i>pseudotuberculosis</i> <i>pilosum</i> <i>cystidis</i> <i>urealyticum</i> <i>minutissimum</i>	- <i>Arcanobacterium</i>	<i>haemolyticum</i>
		- <i>Actinomyces</i>	<i>pyogenes</i>
		- <i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>
		-	

HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

L'habitat normal de ces corynebactéries est tantôt la peau et les muqueuses de l'homme, tantôt celles de l'animal et tantôt l'environnement et en particulier les sols.

Les infections qu'elles provoquent sont :

- respiratoires (*C. pseudodiphthericum*, *C. xerosis*, *C. striatum*, *R. equi* ...)
- oto-rhino-laryngologiques (*C. ulcerans*, *A. haemolyticum*, *C. pseudotuberculosis* ...)
- cutanées (*C. minutissimum*, *C. tenuis*, *A. pyogenes*, *C. xerosis*, *C. striatum* ...)
- urinaires (*C. urealyticum*, *C. cystidis*, *C. pilosum* ...)
- septicémiques avec parfois endocardite (*C. jeikeium* et beaucoup d'autres)

CRITÈRES D'IDENTIFICATION

Ils sont assez mal caractérisés. Ils sont fondés sur un certain nombre de caractères tels que pigmentation, présence d'uréase, de nitrate réductase et diverses autres enzymes et fermentations sucrées. Une galerie miniaturisée récemment commercialisée facilite les identifications mais toutes les souches isolées ne sont pas reconnues et l'appellation "coryneforme" est encore utile.

Pour interpréter la mise en évidence d'un de ces coryneformes et donner à sa présence une signification pathologique, il faut tenir compte :

- du terrain : malade hospitalisé, traité pour néoplasie, aplasique, soumis à des manoeuvres instrumentales ou perfusé ...
- des données bactériologiques : culture pure ou largement dominante, présence à l'examen direct, isolements répétés...
- du prélèvement : hémoculture, expectorations, urines, écouvillonnage pharyngé ou lésions cutanées...

... car il existe encore des coryneformes contaminants.