

Anaérobies strictes

1. QU'EST CE QUE LES ANAÉROBIES STRICTES

Découverte

L'existence de bactéries incapables de cultiver en présence de dioxygène est connue depuis fort longtemps, tant dans l'environnement que dans certains produits pathologiques. Leur culture en milieu anaérobie simples comme la gélose VF, le montre aisément.

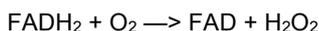
Ces bactéries sont inhibées et tuées par l'Oxygène atmosphérique.

Causes de la toxicité du dioxygène de l'air

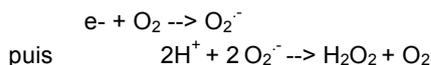
En présence de dioxygène, il y a formation de molécules particulières, les peroxydes.

Ces peroxydes sont entre autres : l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée...

Une réaction est particulièrement importante pour la production d' H_2O_2 : c'est la réaction de l'oxygène avec les coenzymes flaviniques comme $FADH_2$:



Il semble aussi que la dernière réaction de la respiration, la réduction de l'Oxygène, donne dans un premier temps des ions superoxydes :



Pourquoi les peroxydes sont-ils toxiques et comment les éliminer ?

Ces peroxydes sont des oxydants puissants qui détruisent les molécules organiques (DNA, protéines) et qu'il faut éliminer par des enzymes comme :

- la superoxyde dismutase
- la catalase
- les peroxydases.

D'ailleurs ces peroxydes sont utilisés par le macrophage notamment pour tuer les cellules étrangères.

Les êtres vivants qui ne possèdent pas ces enzymes meurent en présence d'oxygène et sont donc anaérobies strictes. Ceux qui en possèdent peu ou seulement des peroxydases cultivent préférentiellement en anaérobiose (*Streptococcus*, *Lactobacillus*).

Cette interprétation est une approche classique qui sera un jour éclairée par d'autres données : il existe en effet des anaérobies strictes catalase positive !

Certaines bactéries ont même **EOS** (*Extrêmement Oxygen sensible*) : elles ne peuvent survivre, même brièvement, en présence d'une faible concentration de dioxygène. Ces EOS sont très nombreuses dans la flore fécale et appartiennent souvent aux archées.

2. MÉTHODES D'ÉTUDE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES

2.1. Méthodes pour obtenir et conserver l'anaérobiose

a. Maintien de l'anaérobiose

Le but fondamental est d'éliminer l'oxygène.

Mais il faut de plus éviter qu'il ne revienne : le conditionnement est donc essentiel avec :

- des tubes à section étroite
- des milieux gélosés où l'oxygène diffuse mal
- des milieux sous paraffine ou vaseline
- des enceintes hermétiques ou jarres ou des hottes anaérobies.



b. Par régénération des milieux

C'est le procédé de dégazage le plus simple : l'ébullition assure par diminution de la solubilité des gaz avec l'augmentation de la température, le départ du dioxygène (et des autres gaz de l'air).

c. Anaérobiose par réduction chimique du dioxygène

Par molécules réductrices dans le milieu

Des molécules peuvent être ajoutées dans le milieu en assurant une certaine anaérobiose. On les utilise donc en combinaison avec d'autres méthodes comme la régénération. Ces molécules ne doivent pas être toxiques pour les microorganismes.

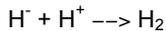
On utilise la **CYSTÉINE** ou des morceaux d'organes contenant de la CYSTÉINE (Cerveau, rein, foie...). En effet la cystéine est réductrice : deux molécules de cystéines s'unissent par un pont disulfure en libérant deux électrons.

On utilise aussi le **THIOGLYCOLATE** de sodium (retrouvé dans les milieux pour hémocultures) appelé en nomenclature systématique **ACIDE MERCAPTOÉTHANOÏQUE** de formule $\text{HS-CH}_2\text{-COOH}$.

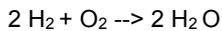
Par l'hydrogène en jarre

La génération de l'hydrogène (2) est obtenue par réaction d'ions H^+ de l'eau sur l'hydrure (sous forme de borohydrure) :

$\text{BH}_4^- \rightarrow \text{BH}_3 + \text{H}^-$ (ion hydrure : un proton entouré de deux électrons donc chargé -) ou



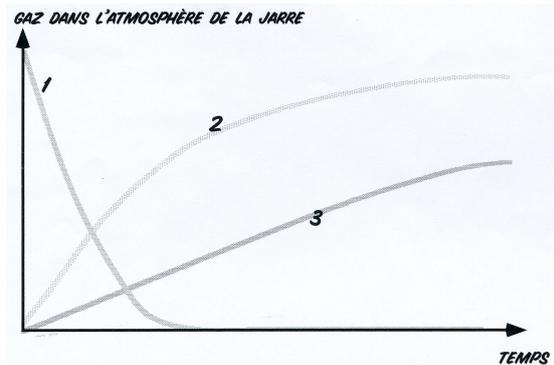
L'hydrogène réagit avec l'oxygène (1) en présence d'un catalyseur afin d'éviter l'explosion pour donner de l'eau.



En règle générale, un dégagement de dioxyde de carbone (3) est réalisé en même temps car il favorise la culture de ces bactéries.

Les systèmes commercialisés comme GasPack®, sont formés d'un sachet contenant deux comprimés contenant l'un le borohydrure de sodium et de l'acide citrique, le deuxième de l'hydrogénocarbonate de sodium et de l'acide citrique comme dans les comprimés effervescents. L'addition d'eau permet la réaction et impose le placement rapide du sachet dans la jarre et sa fermeture. Il convient d'éviter une flamme proche à cause du dihydrogène.

Ces systèmes semblent aujourd'hui abandonnés ou d'usage limité.



Système Generbag Biomérieux

Le système Generbag Mérieux permet d'obtenir l'anaérobiose par simple ouverture d'un sachet dont la composition n'est pas connue (peut être du fer métallique pulvérisé) mais qui comprend un réducteur de l'atmosphère et un générateur de dioxyde de carbone.

GENbox



- 1/ Placer les boîtes de Pétri dans la jarre.
- 2/ Pour GENbox anaer, ajouter l'indicateur d'anaérobiose.
- 3/ Ouvrir le sachet aluminium et sortir le générateur :
 - 1 générateur pour la jarre GENbox 2,5L.
 - 3 générateurs pour la jarre GENbox 5,5 L.
- 4/ Placer **immédiatement** le(s) générateur(s) dans la jarre. **Ne pas ajouter d'eau ni de catalyseur.**
- 5/ Positionner le couvercle et fermer **immédiatement** la jarre en appuyant simultanément sur les systèmes de fermeture opposés : A et A' puis B et B'. Incuber.

GENbag



- 1/ Placer les boîtes de Pétri dans l'enveloppe.
- 2/ Préparer le support :
 - inscrire toute indication utile à l'emplacement prévu,
 - pour GENbag anaer, ajouter l'indicateur d'anaérobiose.
- 3/ Ouvrir le sachet aluminium, sortir le générateur et le fixer sur le support avec la pince.
- 4/ Introduire **immédiatement** le support + générateur dans l'enveloppe. **Ne pas ajouter d'eau ni de catalyseur.**
- 5/ Positionner la barrette de fermeture sur l'enveloppe, à l'emplacement correspondant au générateur utilisé. Sceller **immédiatement** l'enveloppe et incubé.

d. Par une atmosphère gazeuse artificielle

L'air est éliminé par des gaz purs : azote par ex.

Des milieux sont conditionnés sous azote comme le milieu pour la galerie API20A.

Les enceintes anaérobies sont de même sous une atmosphère artificielle.



Générateur d'atmosphère Anavac

Pour culture de germes anaérobies ou microaérophiles
Économique : aucun catalyseur chimique nécessaire
Rapide : génère une atmosphère anaérobie en moins de 3 minutes

Générateur d'atmosphère par programmation de cycles de purge et de remplissage.
L'oxygène contenu dans l'air est remplacé par l'azote ou le dioxyde de carbone selon les quantités programmées et la bouteille connectée.

Rapide

Génère une atmosphère anaérobie ($O_2 < 0,05\%$) en moins de 3 min.
La vitalité des souches est préservée.

Simple à utiliser

Programmable au clavier avec gestion automatique des cycles de purge et de remplissage par un gaz de remplacement (azote, dioxyde de carbone). Contrôle de la purge jusqu'à 2 mbar pour éviter tout risque de lyse cellulaire.

Traçabilité

Transfert des données via RS 232 sur PC.

Économique

Les méthodes traditionnelles (boîte à gants ou jarre anaérobie classique) nécessitent un investissement initial ou en consommables important. L'investissement initial d'un générateur Anavac est limité et ne nécessite aucun consommable.

Montage simplifié

Raccords rapides avec clapet anti-retour pour déconnecter la jarre en fin de cycle et la placer en incubateur.
Jarre anaérobie capacité 2,5 L, livrée avec un rack pour 12 boîtes de pétri et raccords de connexion.



www.bioblock.com

Générateur d'atmosphère Anavac
RS0110 livré complet avec Jarre HT€
3546,00

Jarre d'anaérobie supplémentaire
RS012Y livrée avec porteur de 11 boîtes de pétri HT€
436,00

Il existe aussi des enceintes de travail anaérobies :

Incubateur grande capacité, 80 l, 425 boîtes **Anaérobie stricte**

Confort de travail **Chargement sur glissière** **Sas automatique**

Un système complet et fiable, largement automatisé : grâce à la combinaison d'une boîte à gants, d'un incubateur et d'un sas. Anaérobie stricte (moins de 10 ppm d' O_2) grâce à la filtration continue de l'atmosphère à travers une cartouche palladium et un dessiccant. Mélange anaérobique : N_2 : 85 % (pureté mini 99,99 %, humidité maxi 3 ppm), H_2 : 10 %, CO_2 : 5 % (dans une bouteille de gaz non fournie).

La boîte à gants
Grand volume de travail, 860 l, L x H x P int (cm) = 110 x 76 x 80
Aménagement complet avec étagères, prises de courant, éclairage intérieur.

L'incubateur
Volume de rangement 80 l, L x H x P (cm) = 44 x 56 x 25
À température réglable ou fixe à 35°C. Sécurité surchauffe.
Équipé de porte coulissante, directement accessibles dans la boîte à gants.

Le sas
Volume intérieur 38 x 23 x 37 cm. Ouverture 27 x 29 cm.
Purge du sas sous azote (bouteille non fournie).

Le tableau de commande
Permet de suivre et de commander en automatique ou manuel toutes les opérations.
Indique l'état anaérobie (ou non) des différentes parties de la station.
Un simple bouton commande l'automatisme de l'élimination de l'oxygène dans le sas et le rééquilibrage des pressions en moins de 2 min.
Dimensions cm (hors tout) : 154 x 76 x 80 - Poids kg : 226.
Alimentation : 220 V - 50/60 Hz.

Remarque

Il existe des molécules permettant de "mesurer" le niveau de l'anaérobiose, le rH₂. Ce sont des colorants existants sous deux formes selon l'État rédox du milieu, des indicateurs rédox. Un des plus connus c'est le bleu de méthylène qui est bleu en présence de dioxygène et blanc en milieu réduit.

2.2. Techniques d'isolement

a. Isolement en profondeur (technique ancienne)

On utilise une série de géloses VF sans recharger entre elles et sans stériliser la pipette. Il faut 6 géloses pour une souche pure et 12 pour un mélange. On préfère aujourd'hui d'autres techniques mais la conservation des souches est ainsi très efficace sans précautions particulières. La récupération des bactéries impose de casser stérilement le tube.

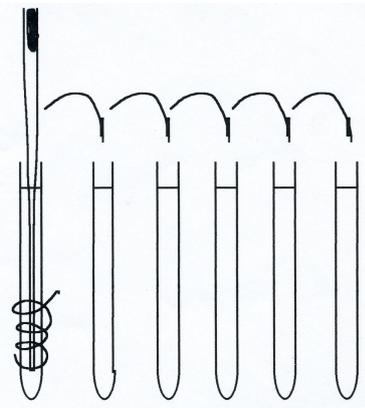
Technique d'isolement en profondeur

Milieu utilisé : gélose VF

Nombre de géloses nécessaires : - pour une souche pure :
- pour un mélange :

Technique :

- régénérer les tubes nécessaires et les refroidir vers 45°-50°C.
- prélever le produit à ensemercer à l'aide d'une Pipette Pasteur fermée
- ensemercer la première gélose VF en la plongeant puis en remontant par un mouvement hélicoïdal.
- continuer sans recharger dans la deuxième gélose, la troisième etc ... pour réaliser l'épuisement.



b. Isolement en surface (technique à utiliser aujourd'hui)

Non sélectif

L'isolement se fera sur milieux riches comme la gélose au SANG frais ou la GC + PV. Il devra être incubé en anaérobiose en jarre.

Sélectif

Des antibiotiques permettent d'assurer une sélectivité à l'isolement :

ex : Kanamycine + Vancomycine pour l'isolement des bacilles gram négatif du genre Bacteroides.

Pour les bactéries sporulées, on peut facilement éliminer les formes végétatives et les autres bactéries par chauffage 10 minutes à 80°C.

2.3. Technique pour l'État frais

Une effilure de pipette Pasteur recueille un peu de bouillon étuvé. On coupe cette pipette et on la place sur une lame. On obture les extrémités avec de la paraffine fondue. Cette **technique ancienne** n'est pas facile à mettre en oeuvre dans des conditions de sécurité optimales.

Certains auteurs préconisent l'état frais luté tel qu'il était réalisé antan pour toutes les bactéries. Or le lutage risque de provoquer la formation d'aérosols, chauffe la lame, prend du temps : **la mobilité sera beaucoup plus facile à détecter sur un état frais classique (bouillon anaérobie) pourvu qu'il soit observé très rapidement.**

2.4. Milieux de culture

Considérations générales

Ce sont des **bactéries exigeantes** : l'apport de **facteurs de croissance** est nécessaire en particulier **l'hémine** ou la **vitamine K1** pour certains germes. Le sang (ou le sang laqué) est donc un bon candidat pour l'enrichissement, d'autant qu'il apporte la catalase.

L'apport de **substances réductrices** est utile (cystéine, thioglycolate...) au maintien de l'anaérobiose.

Milieux de base

Milieu de Schaedler :

- peptones et extrait de levure
- glucose
- tampon TRIS
- hémine
- Chlorhydrate de L-Cystéine
- Vitamine K3

Milieu TGY (trypticase-Glucose-Yeast)

- peptones et extrait de levure
- glucose
- thioglycolate de sodium (réducteur)

Milieu VF (viande foie)

Milieu VL (viande levure)

Milieux liquides (enrichissement-culture)

Bouillon de Schaedler

Bouillon VF ou VL

Milieu de Rosenow :

- peptones
- chlorhydrate de cystéine
- glucose
- chlorure de sodium
- indicateur d'Andrade (fuchsine acide)
- marbre blanc (carbonate de calcium neutralisant les ions H⁺)
- morceau de cervelle

La lecture de ce milieu est très empirique : gaz visible par décollement du bouchon de paraffine, fermentation du glucose (virage au rouge), réduction du milieu (virage au vert et à l'incolore).

Milieux solides d'isolement

Gélose au sang frais

(base : Columbia, Schaedler...)

Gélose VF

qui reste le milieu de choix pour la conservation des anaérobies strictes.

Milieu TSC (Tryptone-Sulfite-Cyclo-sérine)

Ce milieu est utilisé pour l'isolement de *Clostridium perfringens* des eaux.

- tryptone
- citrate de fer ammoniacal
- disulfite de sodium (générateur de sulfite)
- cyclosérine (antibiotique)
- agar-eau

Milieu de Willis

- base Columbia
- lactose
- rouge neutre
- émulsion de jaune d'oeuf
- (éventuellement : néomycine pour inhiber les Entérobactéries)

On peut étaler sur une demi-boîte du sérum anti *Cl. perfringens* pour inhiber l'action enzymatique.

2.5. Identification

Les milieux anciens utilisés sont aujourd'hui détrônés par des techniques miniaturisées, et plus particulièrement par des méthodes mettant en évidence des enzymes en aérobiose. La chromatographie en phase gazeuse peut être utilisée parfois.

Milieux classiques pour l'identification

- **bouillon TY avec addition de glucide** ou CTA... avec problème de réduction de l'indicateur. Il faut ajouter alors ajouter de l'indicateur le lendemain pour apprécier l'acidification. (vieux technique !)

Galerie API20A

La galerie API20A est calquée sur la galerie API20E mais l'inoculation est faite avec un bouillon de Schaedler (additionné de tryptophane) fortement ensemencé et conditionné sous azote. L'incubation est anaérobie.

On recherche la fermentation

- de nombreux glucides (indicateur de pH : BCP)
- l'Uréase,
- la production d'indole
- l'hydrolyse de l'Esculine avec un problème de distinction entre H₂S et Esculine que la fluorescence de l'Esculine sous UV permet de résoudre.
- la gélatinase.





Galerie API32 A

Cette galerie est basée sur un inoculum important et une incubation courte et AÉROBIE.

Les recherches sont donc essentiellement enzymatiques :

Uréase, ADH, diholosidases, Aminopeptidases, etc...



Chromatographie en phase gazeuse (historique)

La chromatographie en phase gazeuse est utilisée de deux façons en microbiologie et trouve une application particulièrement importante pour les anaérobies :

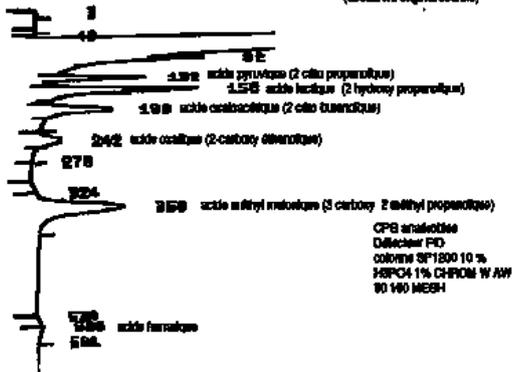
- identification et dosage des produits de fermentations
- identification et dosage des produits volatils (AG en général) de la cellule entière.

Les profils obtenus, dans des conditions qui doivent être parfaitement standardisées, conduisent à l'identification par comparaison avec des profils standards établis par ailleurs.

Des difficultés techniques et la nécessité d'une base de données importante, ralentissent considérablement l'utilisation de cette technique ancienne en routine.

Ex : CPG de Clostridium difficile :

Chromatographie des produits de fermentation de Clostridium difficile
(document original scanné)



Utilisation d'inhibiteurs (Anaérodiscs Biomérieux) pour les Gram négatifs (à titre historique)

Une technique ancienne permettait d'identifier les Gram négatifs avec l'utilisation d'antibactériens :

- des antibiotiques : Kanamycine 1000 µg, Pénicilline 2 U, Colimycine 10 µg, Érythromycine 60 µg, Rifampicine 15 µg, Vancomycine 5 µg.
- des molécules : bile 5 mg, Vert brillant 100 µg.

La technique utilisée mettait en jeu des disques sur une gélose au sang incubée en anaérobiose.

N'oublions pas qu'il faut ABSOLUMENT VÉRIFIER QUE LA SOUCHE EST ANAÉROBIE STRICTE AVANT d'identifier. La technique la plus fiable est l'absence de culture sur gélose au sang frais anaérobie.

3. LES BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES

La taxonomie des anaérobies strictes n'est pas aussi évidente qu'il n'y paraît. En effet, une bactérie cultivant habituellement en aérobiose peut devenir anaérobie stricte par perte de gènes essentiels à la vie aérobie. Il n'est donc pas surprenant de trouver des *Streptococcus* ou des *Lactobacillus* anaérobies strictes ! Nous avons pu ainsi trouver un *Lactobacillus* identifié comme *acidophilus* (en API20A) dans une selle normale... trouvant là une source possible pour la flore vaginale !

Ajoutons que de très nombreux anaérobies strictes ne sont pas cultivables aujourd'hui ou ne sont cultivables que dans des conditions physicochimiques particulières, en particulier pour les archées.

L'habitude est de distinguer les sporulés sous la dénomination de "flore tellurique" des autres anaérobies strictes.

On verra que le qualificatif de tellurique est très certainement faux.

3.1. Place des anaérobies strictes dans la classification

Dans la classification de Bergeys, les anaérobies strictes (médicales) sont trouvées dans de nombreux groupes (en vert : quelques souches sont concernées) :

En orange : la plupart sont anaérobies strictes

En violet : quelques anaérobies strictes.

phylum XIII : Firmicutes	Class I : Clostridia	Ordre I : Clostridiales	famille des Clostridiaceae
			famille des Peptostreptococcaceae
			famille des Eubacteriaceae
			famille des Peptococcaceae
			famille des Acidominococcaceae
	Class II : Mollicutes	Ordre I : Mycoplasmatales	famille des Mycoplasmataceae
		Ordre V : Incerta sedi	famille des Erysipelotrichaceae (genre Erysipelothrix)
	Class III : Bacilli	Ordre I : Bacillales	famille I des Bacillaceae (genres Bacillus, Amphibacillus, Virgibacillus...)
			famille II des Planococcaceae
			famille IV des Listeriaceae (genre Listeria et Brochothrix)
			famille V des Staphylococcaceae (genres Staphylococcus, Gemella...)
			famille VII des Paenibacillaceae
		Ordre II : Lactobacillales	famille I des Lactobacillaceae (genres Lactobacillus, Pediococcus...)
			famille II des Aerococcaceae
famille IV des Enterococcaceae (genres Enterococcus...)			
famille V des Leuconostocaceae			
famille VI des Streptococcaceae (genres Streptococcus, Lactococcus)			
phylum XIV : Actinobacteria	Class III : Actinobacteria		
	sous-classe V Actinobacteridae	Ordre I : Actinomycétales	
		sous-ordre VI Micrococceinae	famille I des Micrococccaceae (genre Micrococcus, Arthrobacter, Rothia, Stomatococcus...)
			famille V des Brevibacteriaceae (genre Brevibacterium...)
			famille IX des Dermatoocccaceae (genre Dermacoccus, Kytococcus...)
			famille XI des Jonesiaceae (genre Jonesia...)
		sous-ordre VI Corynebacterineae	famille I des Corynebacteriaceae (genre Corynebacterium)
			famille IV des Mycobacteriaceae (genre Mycobacterium)
			famille V des Nocardiaceae (genres Nocardia, Rhodococcus)
		sous-ordre XI Streptomycineae	famille puis genre Streptomyces etc
		Ordre II : Bifidobacteriales	famille I des Bifidobacteriaceae (genres Bifidobacterium, Gardnerella)
phylum XVI : Chlamydiae			

phylum XVII : Spirochaetes	Class I : Spirochaetes	Ordre I : Spirochaetales	famille I des Spirochaetaceae (genre Spirochaeta, Borrelia, Treponema)
			famille II des Serpulinaceae
			famille III des Leptospiraceae (genre Leptonema et Leptospira)
phylum XX : Bacteroidetes	Class I : Bacteroidetes	Ordre I : Bacteroidales	famille I des Bacteroidaceae (genre Bacteroides...)
			famille III des Porphyromonadaceae (genre Porphyromonas)
			famille IV des Prevotellaceae (genre Prevotella)
	Class II : Flavobacteria	Ordre I : Flavobacteriales	famille I des Flavobacteriaceae (genres Flavobacterium, Weeksella...)
Class III : Sphingobacteria	Ordre I : Sphingobacteriales	famille I des Sphingobacteriaceae (genre Sphingobacterium...)	
phylum XXI : Fusobacteria	Class I : Fusobacteria	Ordre I : Fusobacteriales	famille I des Fusobacteriaceae (genre Fusobacterium...)

3.2. Les bacilles gram positif anaérobies strictes : *Clostridium* de la flore "tellurique"

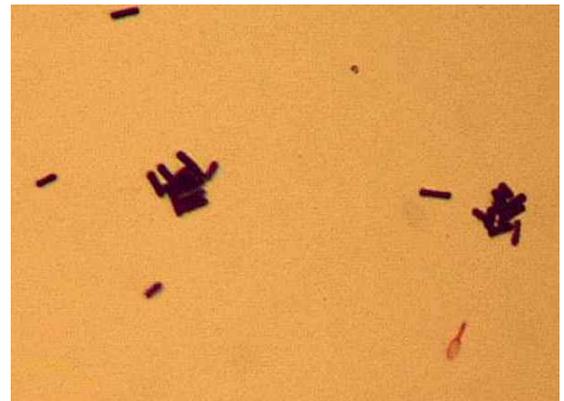
Les *Clostridium* sont des bacilles anaérobies strictes et sporulés.

On parle de flore tellurique c'est à dire du sol. Cette dénomination ne signifie pas que les *Clostridium* soient des hôtes normaux du sol... En effet les *Clostridium* sont des hôtes des matières fécales et les retrouver dans le sol peut être dû à la contamination fécale bien plus qu'au saprophytisme !

La taxonomie des *Clostridium* va évoluer rapidement avec l'invention de nouveaux genres ou familles...

Les souches pathogènes sont relativement rares. Les grandes maladies sont :

- le botulisme
- le tétanos
- les myonécroses ou gangrènes gazeuses
- les infections post antibiotiques à *C. difficile*



a. *Clostridium botulinum* et le Botulisme

Historique

Empoisonnement par des haricots verts - Extraits de Anatomie, physiologie, hygiène par M. Oria et J. Raffin classe de 3e (programme d'octobre 1958). Ed. HATIER

En 1943, une famille est gravement intoxiquée par une salade de haricots verts provenant de **conserves familiales**. Douze heures après le repas, des vomissements et une diarrhée font penser à une indigestion banale. Deux jours après, apparition alarmante de troubles visuels, avec surdité, crampes musculaires, impossibilité de mastiquer. Le plus jeune enfant meurt asphyxié par paralysie respiratoire.

Les autres membres, transportés à l'hôpital, sont sauvés grâce au masque à oxygène, à l'injection de sérum et d'anatoxine botulique (séroanatoxinothérapie).

Le contenu d'un bocal de ces mêmes conserves donné à des souris les a rapidement tuées. Il s'agissait d'une intoxication par la toxine botulique. Cette famille avait déjà consommé sans accident d'autres bocaux de la même conserve, mais après cuisson de dix à vingt minutes.

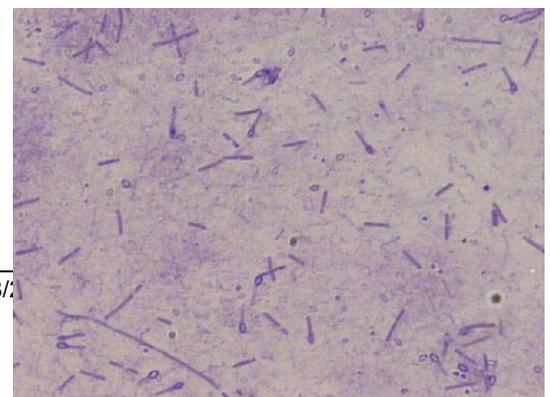
Deux à trois semaines de soins auront été nécessaires pour obtenir la guérison.

Botulisme : le cas du Hainaut belge en 1895 - Extrait de Bactériologie médicale R. Fasquelle – éditions médicales FLAMMARION – 1969

Découverte du germe

Nous sommes le 14 décembre 1895, à Ellezelles dans le Hainaut belge ; toute la population est en émoi.

La veille s'était déroulé l'enterrement d'un important notable, président de la société de musique. à l'issue de la cérémonie, comme il est de bonne tradition, la veuve avait invité, à l'estaminet du village, les musiciens à participer à un copieux repas de funérailles. Les boissons étaient abondantes, la chère de qualité : un magnifique jambon, en particulier, avait été très goûté ; et minuit



avait déjà sonné au clocher qu'on entendait encore les derniers éclats des chants qui, selon la coutume, avaient accompagné la célébration des mérites du disparu.

Mais, ce matin, l'atmosphère était bien différente.

Déjà, en pleine nuit, le silence habituel des rues avait été rompu par le bruit de nombreux pas sur les pavés de pierre ; d'urgence, le médecin avait été appelé en plusieurs maisons, auprès de musiciens atteints de violentes douleurs abdominales, de diarrhée, de vomissements.

Maintenant que toute la petite ville était éveillée, la nouvelle courait de bouche en bouche : la plupart des membres de la société de musique étaient au plus mal, et présentaient de curieux symptômes ; d'abord ils se plaignaient de troubles de la vue ; ils avaient le regard fixe ; ils ne pouvaient relever leurs paupières supérieures. Les médecins appelés concluaient à des paralysies oculaires bilatérales et symétriques.

Ensuite les malades accusaient une soif ardente, un étranglement de la gorge ; quand ils essayaient de boire, le liquide était rejeté par le nez ; leur voix était sourde ; ils avaient une peine intense à avaler. Les praticiens parlaient d'inhibition des sécrétions muqueuses, de paralysies du voile du palais, des muscles du pharynx et du larynx, de l'œsophage.

D'autres musiciens avaient un intense météorisme, faisant penser à une occlusion intestinale, ou encore des troubles urinaires. La paralysie semblait ainsi gagner les muscles de l'intestin et de la vessie.

Quelques malades éprouvaient même une sorte de parésie (paralysie légère) de la racine des membres. Tous étaient en proie à une fatigue extrême ; mais ils n'avaient pas de fièvre.

La rumeur d'un empoisonnement criminel, par les bavardages du concierge de l'hôtel de ville, gagnait les bureaux de la municipalité.

Au surplus, les jours suivants, la survenue de trois morts obligeait à en référer en haut lieu.

Tel le détective, van Ermengen débarque dans le pays (une petite valise jaune à la main, probablement) ; il interroge ; il enquête.

Rapidement, il écarte l'hypothèse du crime : qui pourrait en vouloir à toute une société de musique ?

Il apprend que tous les musiciens malades, vers la fin du banquet, avaient mangé une portion du jambon cru : « Aucun de ceux qui avaient laissé d'en prendre n'avait été indisposé ».

Mais, première énigme : quelques habitants de la cité, qui n'avaient pas participé au banquet, ont été malades. Van Ermengen se renseigne ; il découvre que ces personnes « dans l'intervalle entre l'heure du repas et le moment où les graves accidents appelèrent l'attention sur le rôle néfaste que le jambon avait joué, avaient pris de cette viande ; et ils avaient été frappés des mêmes troubles morbides ». Tout paraît donc accuser le jambon.

Deuxième énigme : un bon tiers des musiciens a échappé à tout accident. Van Ermengen les interroge, chacun en particulier ; certains n'ont pris que du lard, ou une quantité très minime de maigre ; on comprend qu'ils aient échappé à l'empoisonnement. Mais les autres racontent avoir pris trois, quatre portions ! Van Ermengen a enfin l'explication : au sortir de table, ils avaient évacué leur dîner.

Comme pour les excuser, il ajoute, de façon charmante : « Les convives avaient usé largement de vins et de spiritueux divers ; et tous les musiciens, à la fin de ce repas de funérailles, se trouvaient en état d'ébriété manifeste ».

L'autopsie des trois morts ne révèle la trace d'aucun toxique connu. Au contraire, l'examen microbiologique du jambon montre la présence de bacilles. Van Ermengen arrive à cette conclusion : « Il est hautement vraisemblable qu'un poison a pris naissance sous l'influence de ces microorganismes spécifiques, qui ont végété dans le jambon, pendant qu'il plongeait dans la saumure, laquelle offrait des conditions favorables pour le développement des espèces anaérobies ».

Historique du botulisme

Avant la découverte du germe de van Ermengen, les médecins allemands, au XVIIIe siècle, avaient rapporté des intoxications collectives par du boudin avarié, d'où le nom de botulisme (botulus : boudin).

Depuis 1895, le botulisme a été observé en tous pays ; aux États-Unis, il a été rencontré le plus souvent à partir de conserves de légumes et de fruits ; en Allemagne, la majorité des cas est attribuée aux conserves de viandes ; en Russie, les poissons séchés jouent un pareil rôle.

En France, le botulisme, habituellement rare, a marqué une recrudescence pendant l'occupation allemande de 1940-44, en raison de la préparation des conserves ménagères dans la clandestinité.

En dehors des formes typiques, analogues à celles d'Ellezelles, sont signalées des formes frustes (formes ambulatoires de Legroux), marquées par quelques troubles oculaires, de la constipation, une sécheresse des muqueuses, et des formes foudroyantes ; l'exemple le plus typique est le suivant : une maîtresse de maison ouvre un bocal contenant une conserve d'asperges qu'elle avait préparée au printemps précédent ; elle la goûte ; ne la trouvant pas savoureuse, elle charge le jardinier de la jeter ; celui-ci, moins délicat, mange les asperges ; il meurt dans la nuit ; le surlendemain, sa patronne le suit dans la tombe.

La maladie

Le botulisme est une intoxication alimentaire, c'est à dire une maladie due à l'ingestion d'une toxine dans les aliments, toxine produite par la multiplication de la bactérie dans l'aliment. La bactérie en cause est *Clostridium botulinum* et quelques genres proches.

Cette maladie est redoutable car mortelle car la toxine bloque la transmission des potentiels d'action du neurone au muscle déclenchant une paralysie.

La toxine est thermolabile. Elle n'est que partiellement digérée lors de l'ingestion et est absorbée par l'intestin ce qui est exceptionnel pour des protéines.

Les conditions de la production de toxine par *C. botulinum* sont : anaérobiose, concurrence limitée par d'autres bactéries, absence de nitrites, pH neutre à alcalin. Deux produits sont concernés : les **conserves mal stérilisées** et les **jambons de porc crus** (le bacille passe de l'intestin du porc à la viande lors de l'abattage de l'animal)

Il existe 6 à 7 types immunologiquement différents de toxines.

Méthodes d'étude

Il s'agit essentiellement d'une expertise soit à partir de l'aliment, soit à partir d'un prélèvement du malade ou du cadavre. On peut rechercher la bactérie, mais on recherche plutôt la toxine par toxinotypie.

La toxinotypie est l'identification d'une toxine par des techniques immunologiques.

Le principe de base est de tester une dilution du produit sur un animal en ajoutant des solutions d'Ac neutralisatrices de types différents de toxine (A à F)

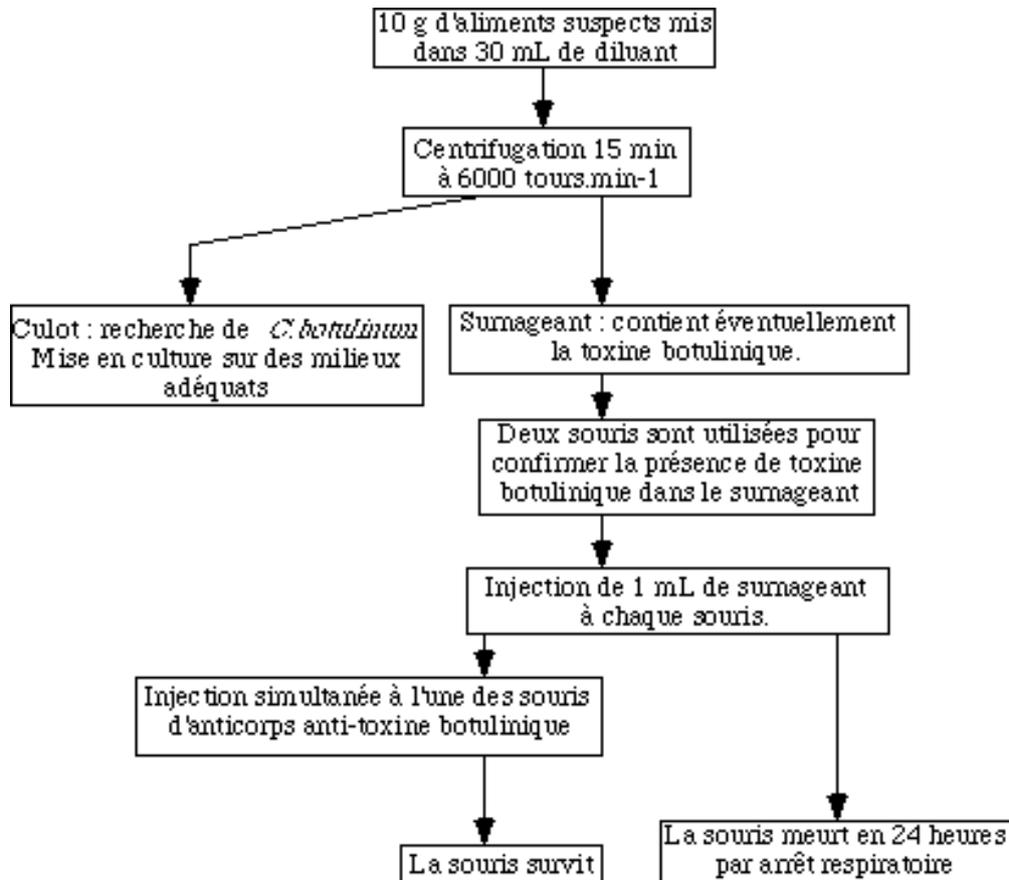
La technique peut être la suivante :

1°/ broyat du produit suspect et filtration

2°/ répartition du filtrat et adjonction des sérums connus. On conserve deux témoins, l'un est laissé tel quel (positif), l'autre est chauffé (négatif)

3°/ Injection d'un aliquote de chaque tube à un lot d'animaux (souris, cobaye)

4°/ Bilan des survivants.



Identification d'une toxine botulinique dans un aliment (Travaux de Mr Sebald)

Ex de résultats :

- Témoin mort Témoin chauffé vivant
produit + anti-toxine A,C,D,E,F : morts
produit + anti-toxine A : vivant
Conclusion : toxine botulinique de type B
- Témoin mort Témoin chauffé mort
produit + anti-toxine A,B,C,D,E,F : morts
Conclusion : toxine ou toxique thermorésistant différent de la toxine botulinique
- Témoin mort Témoin chauffé vivant
produit + anti-toxine A,B,C,D,E,F : morts
Conclusion :
 - toxine ou toxique thermolabile différent de la toxine botulinique OU
 - toxine trop concentrée (diluer le filtrat)
 - deux toxines botuliniques ensemble.

Traitement

Sérothérapie et anatoxinothérapie

L'injection d'anticorps antitobotuliniques (sérothérapie) est dans un premier temps polyvalente puis ciblée en fonction des résultats de la toxinotypie.

En général, une injection d'anatoxines est réalisée dans le même temps, en un lieu différent pour éviter la réaction avec les anticorps, pour provoquer la réaction immunitaire du patient. Les anticorps produits prendront le relais des anticorps externes injectés.

Prophylaxie

La prophylaxie repose sur

- traitement des jambons au sel nitrité, abattage de l'animal à jeun depuis 48 heures (pour limiter le passage dans le sang des spores de *C. botulinum*)
- stérilisation industrielle contrôlée des conserves (contrôle plus strict des conditions de stérilisation)

b. *Clostridium tetani* et le Tétanos

(bacille de Nicolaïer)

Historique

En raison de ses symptômes si spéciaux, le tétanos a été individualisé de tout temps.

Il est curieux de noter qu'Ambroise PARÉ attribuait les contractures à une irritation des nerfs périphériques.

Les très nombreux cas de tétanos observés au cours des guerres de l'Empire (à la suite notamment des batailles d'Iéna, de Bautzen, de Dresde) mirent en valeur l'épidémicité de l'affection et discuter sa contagiosité.

En 1884, les Italiens CARLE et RATTONE montrèrent que l'inoculation du pus d'une plaie d'un tétanique dans le nerf sciatique ou le muscle d'un lapin détermine le tétanos

En 1885, NICOLAÏER prouva que l'inoculation sous-cutanée de terre de jardin à l'animal provoque le tétanos, et qu'à partir du point d'inoculation on peut assurer le passage en série de la maladie; en même temps, il isola dans les lésions locales un germe spécial, « un bacille en épingle », qu'il ne put cultiver.

En 1887, KITASATO révéla la raison de cet échec: le germe en épingle ne pousse que sur les milieux anaérobies.

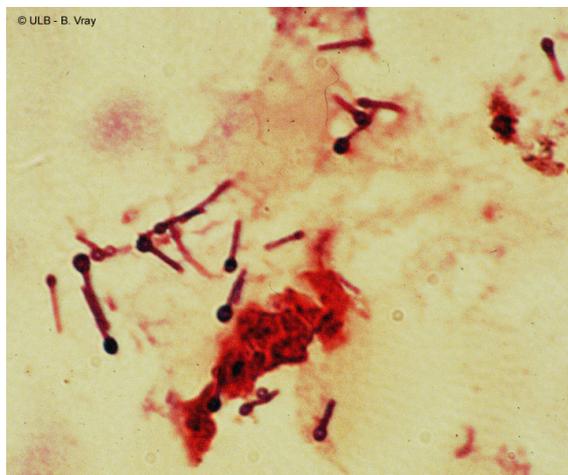
En 1890, KNUD FABER révéla que le filtrat de culture du germe, au même titre que la culture entière, reproduit les signes du tétanos; le bacille tétanique possède donc une exotoxine. La même année, Behring et Kitasato constatèrent chez les animaux qui avaient reçu de petites doses de la toxine atténuée, l'apparition d'une antitoxine.

En 1892, ROUX et VAILLARD mirent au point la préparation du sérum antitétanique chez le cheval.

On sait que c'est en 1923 que Gaston RAMON réussit à transformer la toxine en anatoxine, et rendit donc possible la vaccination antitétanique.

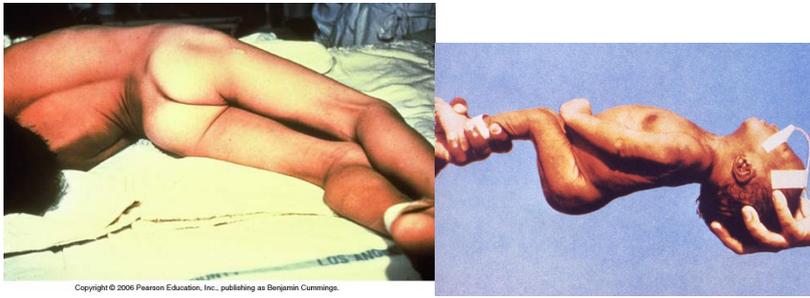
La maladie

Le tétanos est une intoxication suivant une **infection limitée** par *Clostridium tetani* à la suite de son introduction accidentelle dans l'individu. (ancien nom : *Plectridium tetani*)



Cette pénétration est particulièrement redoutée devant des plaies contaminées par de la terre, du crottin de cheval... mais peut survenir après des soins dentaires, des brûlures, des opérations abdominales... montrant que des **bacilles commensaux** peuvent être à l'origine d'un tétanos.

Cette maladie est redoutable car souvent mortelle : la toxine bloque la transmission des potentiels d'action inhibiteurs des motoneurons de la moelle épinière dans le système nerveux central conduisant à des contractions ininterrompues des muscles.



Signe clinique classique du Tétanos (contractions en arc de cercle du malade) chez l'adulte ou l'enfant (CDC)

Il existe un seul type immunologique de la toxine.

Méthodes d'étude

La recherche de la bactérie est rarement pratiquée car les signes sont clairs (connus depuis Hippocrate). Elle est possible par immunochromatographie.

Traitement

Le traitement met en jeu avant tout des soins intensifs et l'injection d'anticorps antitétaniques

Prophylaxie

Depuis 1923, la vaccination est possible grâce à l'invention par RAMON, de l'anatoxine tétanique (vaccination). La vaccination systématique a quasiment fait disparaître la maladie. Elle survient toutefois chez des personnes âgées (piqûre de rosier à la retraite...) ayant perdu leur immunité.

c. Infections à *Clostridium perfringens*

La maladie

Les *Clostridium perfringens* peuvent provoquer des infections sous-cutanées mais sont surtout redoutés dans l'attaque du muscle : la **myonécrose**. Le caractère très gazogène de cette bactérie et l'altération profonde des tissus provoquée ont nommé cette affection **gangrène gazeuse**. L'action destructrice du *Clostridium* est redoutable et peut conduire à une mort d'autant plus rapide qu'il libère des toxines. L'origine de la bactérie est - soit la flore commensale - soit la flore tellurique (accident, guerres) mais souvent à partir d'une contamination fécale du sol.

Un traumatisme est nécessaire :

- - fractures
- - interventions chirurgicales orthopédiques (hanche)
- - interventions chirurgicales abdominales (digestives et gynécologiques)
- - injections médicamenteuses en particulier chez les toxicomanes
- - manœuvres abortives.

L'action de la bactérie est si puissante (enzymes, toxines...) qu'il est parfois impossible de faire quoi que ce soit ... La mort survient alors en moins de 24 heures.

L'amputation est parfois la seule solution, quand un membre est atteint, pour éviter la progression mortelle de la bactérie.

La bactérie

Clostridium perfringens est une **bactérie immobile et capsulée** (particulièrement dans les produits pathologiques).

Tous les *C. perfringens* élaborent une toxine α qui est une **phospholipase de type C** (lécithine donne diglycérade + phosphoryl choline). ($M = 50 \text{ kg/mol}$) mais à des degrés divers. Le *Clostridium perfringens* de type A, principal agent pathogène chez l'homme, est le plus grand producteur. Cette phospholipase provoque hémolyse et lécithinase sur gélose au jaune d'oeuf.

Elle est neutralisée par un sérum correspondant. L'hémolyse peut présenter deux zones :

- - une zone d'hémolyse nette étroite
- - une zone d'hémolyse floue importante autour de la précédente.



Clostridium perfringens produit de l'hydrogène sulfuré d'odeur caractéristique à partir des acides aminés soufrés ou à partir de substrats minéraux comme les sulfites.

Il fermente le lactose. (voir milieu de Willis)

Traitement

Il a mis en jeu un sérum mais la fixation rapide de la toxine dans les tissus le rend très discutable. Des antibiotiques sont actifs sur *Clostridium perfringens* : bétalactamines, métronidazole.

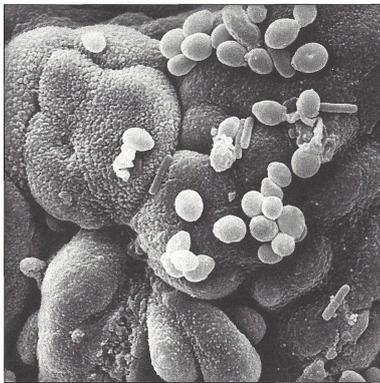
Remarque : d'autres *Clostridium* donnent des maladies très similaires sinon identiques. (*C. septicum*)

d. Colites à *Clostridium difficile*

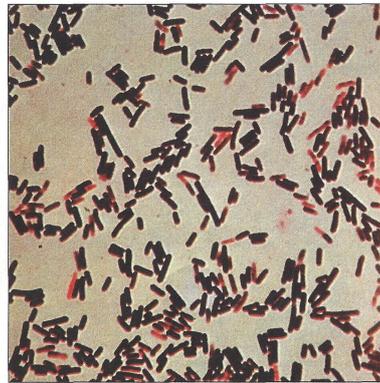
(quelques images issues d'un article de Kamel ABBADI, Opéron n°53)

Bactérie et maladie

Clostridium difficile est retrouvé dans les matières fécales de plus de 70% des nouveaux nés, et 3% des individus adultes réalisent un portage sain au niveau des intestins, colon et rectum essentiellement.



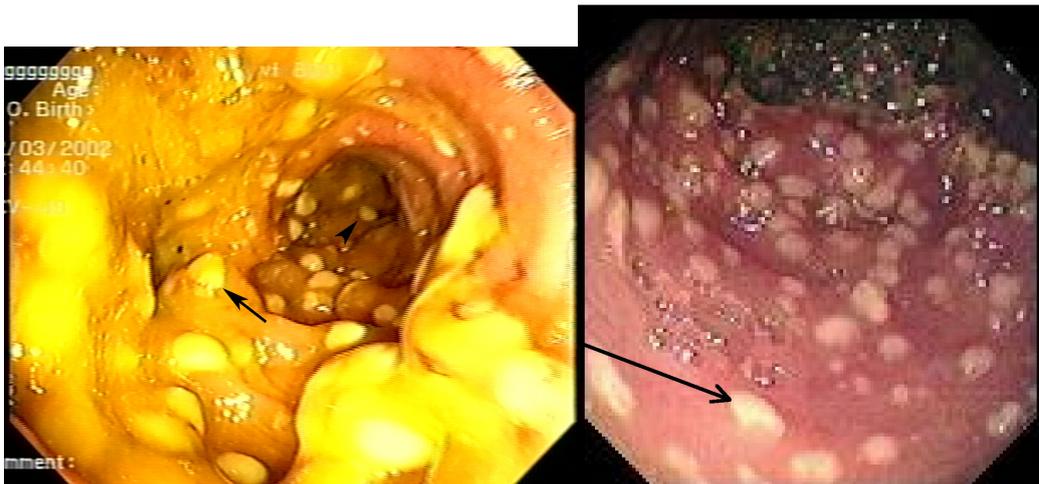
Muqueuse caecale de souris traitées par *Saccharomyces boulardii* et inoculées avec *Clostridium difficile* MEB (x 2600).
Photo : F Castex, Faculté de pharmacie, Montpellier



Clostridium difficile en microscopie optique.
Photo : Y Boussougant, Colombes

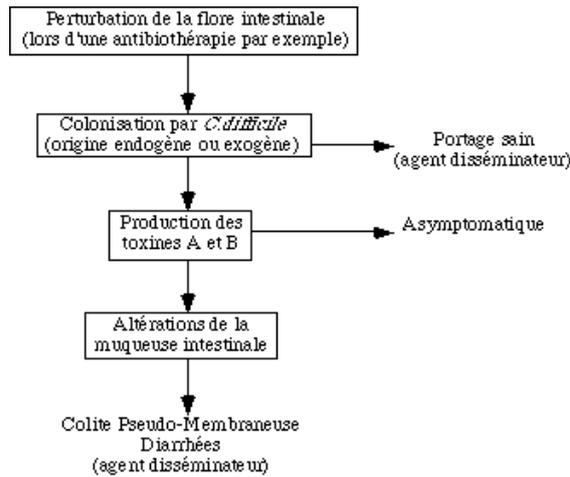
OPT100 Bio 193

L'administration d'antibiotiques peut rompre l'équilibre de la flore intestinale et conduire au développement de *Clostridium difficile* qui n'est plus en compétition avec d'autres germes. Il provoque, chez des individus affaiblis, une inflammation du colon, une diarrhée aqueuse et muqueuse très abondante et éventuellement une **colite pseudomembraneuse** pouvant être mortelle (20 % des **diarrhées post-antibiothérapie**). Ce sont de fausses membranes, constituées de débris cellulaires et de fibrine qui justifient le nom.

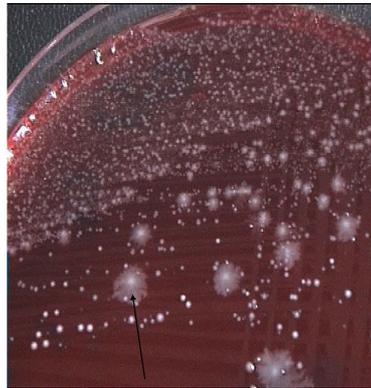


Des toxines sont en cause :

- **entérotoxine** : nécrose des cellules épithéliales de l'intestin et hémorragies intestinales (Pr de M = 500 kg mol⁻¹)
- **cytotoxine** : effet cytotoxique : arrêt de multiplication cellulaire, arrondissement par destruction du réseau d'actine par l'intermédiaire de l'inactivation de la protéine rho, détachement du support. (Pr de M = 250 kg mol⁻¹)



L'isolement est possible même s'il est délicat et la mise en évidence des toxines est indispensable pour mettre en cause la souche isolée.



La détection de *C. difficile* peut se faire sur la souche ou sur les selles suspectes. Elle se fait par la **mise en évidence de l'action des toxines A et B** :

- avec culture cellulaire : On ajoute à des cultures cellulaires un filtrat stérilisé par filtration de selles suspectes de contenir *C. difficile* (et donc les toxines excrétées) : **l'effet cytopathogène** (lyse des cellules en culture) est observé. Parallèlement on réalise sur une autre culture une inactivation des toxines par des immunosérums dirigés contre ces toxines.
- En immunochromatographie



Traitement

Il va mettre en jeu des antibiotiques adaptés.

Notons la possibilité de transplantation de microbiote intestinal de personnes saines après élimination du microbiote du malade.

Prophylaxie

Il s'agit essentiellement de repérer les porteurs asymptomatiques pour limiter la transmission de souches de *C. difficile* pathogènes. Il existe en effet des épidémies liées à des souches particulièrement pathogènes.

e. Intoxication alimentaire à *Clostridium perfringens*

Elle est liée à l'absorption d'un aliment fortement contaminé par des spores qui n'ont pas été détruites par le procédé de réchauffage utilisé et aliment qui a été conservé dans de mauvaises conditions d'hygiène ou surtout mal cuit. Il faut plus de 10^6 bactéries vivantes par g pour déclencher l'intoxication.

Les bactéries sous forme végétative et les toxines sont détruites dans l'estomac. Les spores ingérées passent dans l'intestin où elles germent. Les formes végétatives de ces souches particulières entreraient très rapidement en sporulation et produisant une entérotoxine (cristal protéique parasporal ?, enveloppe sporale excrétée en quantité excessive ?) qui provoque les troubles.

La maladie est courte et sans gravité.

3.3. La flore dite de Veillon (bactéries anaérobies strictes non sporulées)

Les autres anaérobies strictes cultivables sont essentiellement des commensales pouvant devenir pathogènes à l'occasion d'une déficience du terrain. Elles provoquent souvent des infections en association avec des bactéries aérobies.

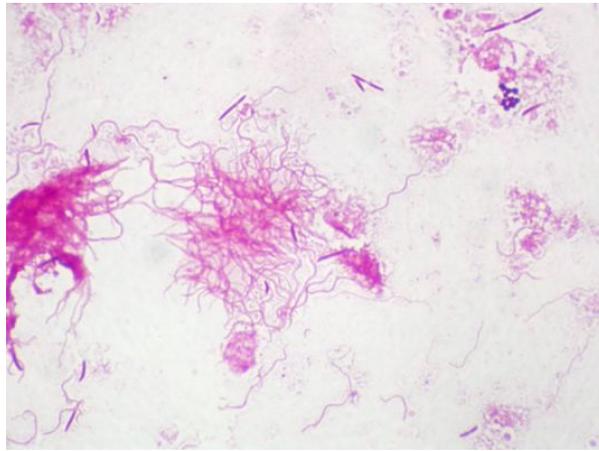
a. Classification (très simplifiée)

Bacilles gram + non sporulés:	bacilles réguliers ± allongés : <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> bacilles corynéformes : <i>Bifidobacterium</i> , <i>Propionobacterium</i> , <i>Actinomyces</i>					
Coques gram +	<i>Peptostreptococcus</i> bactéries le plus souvent très proches de <i>Streptococcus</i>					
Bacilles gram négatif	<i>Bacteroidaceae</i> : <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> etc					
	Groupe	glucose	acide butanoïque en CPG	culture en présence de bile (5 mg)	culture en présence de vert brillant (100 µg)	Pigmentation
	I <i>Bacteroides</i> du groupe fragilis	fermenté	-	+	-	-
	II genre <i>Prevotella</i>	fermenté	-	-	-	V
	III genre <i>Porphyromonas</i>	non fermenté	(-)	-	-	+
	IV <i>Bacteroides</i> autres que fragilis	non fermenté	-	V	-	-
V genre <i>Fusobacterium</i>	non fermenté	+	-	+	-	
Coques gram négatifs	<i>Veillonaceae</i>					
Spirochètes	<i>Treponema</i> anaérobies strictes comme <i>T. vincentii</i> (ou <i>Borrelia vincentii</i>)					

b. Deux exemples d'infections classiques

L'angine de Vincent.

Cette angine ulcéronécrotique associe *Fusobacterium* et *Treponema* (ou *Borrelia*) *vincentii*. Elle se traduit en particulier par une odeur particulièrement forte et pestilentielle. On traite par la pénicilline G.



Infections abdominales

On trouve souvent *Bacteroides fragilis*, en association avec *Escherichia coli* dans des infections d'origine digestive.

COMPLÉMENTS

Botulisme en Italie

LU sur la liste Hygiène, grâce à BRUNO PEIFFER, infatigable animateur. (peiffer@club-internet.fr)

Le 15 septembre 1998

Avant de prendre part à la diffusion de l'information concernant le cas de botulisme en Italie, avais pris la précaution de contacter nos amis de VEGEPRO qui sont nos grands spécialistes de produits végétaux et dont le siège se trouve justement en Italie.

Je remercie le Dr. Giorgio Perotti pour les informations qu'il m'a communiqué à ce sujet et notamment le communiqué de EUROSURVEILLANCE <http://www.eurosurv.org/main.htm#3> (en anglais) que je me suis empressé de traduire en français et dont voici le résultat :

-Un cas de botulisme est survenu dans le nord de l'Italie suite à la consommation d'une soupe végétale, qui était contaminé avec *Clostridium botulinum*. La patiente, une femme de 58 ans qui vit dans la province de Verona (région de Veneto), avait consommé la soupe ('ribollita', plat cuisiné traditionnel en Toscane) pour le déjeuner du 25 Août 1998. Les premiers symptômes apparurent six heures plus tard avec vomissement, vertige, paralysie faciale, et détresse respiratoire. Le matin suivant elle fut admise à l'hôpital local pour suspicion de botulisme. Les selles analysées au Laboratoire National De référence "Istituto Superiore di Sanit (ISS) confirmèrent la présence de spores de *C. botulinum* A.—

Une enquête fut faite par le service local de santé. Les échantillons de nourriture trouvés dans le logement de la patiente ont été analysés, notamment un bocal ouvert de ribollita. Aucune autre personne n'avait consommé le même aliment. La fille de la patiente rapportait qu'elle avait acheté le bocal de ribollita et l'avait gardé à domicile à température ambiante. Le bocal avait été ouvert une semaine avant d'être employé. Il était noté que le produit avait une mauvaise odeur, mais le patiente l'avait gardé réfrigéré après l'avoir ouvert jusqu'à 25 Août, lorsqu'elle l'avait bu. La toxine et les spores de *C. botulinum* ont été identifiées par l'ISS dans le reste de la soupe. La soupe avait été produite par une petite usine locale dans la province de Livorno en Toscane en utilisant des ingrédients organiques (sans l'emploi de produits chimiques) des légumes (pommes de terre, légumes feuillus verts, courgettes, haricots, tomates, oignons, céleri, persil), eau, huile d'olive, et sel. La soupe était contenue dans des bocaux de verre avec un poids net de 340 g, 640 g, ou 920 g et stérilisés dans un petit autoclave à 121°C pour 35 minutes. Aucune mesure de contrôle de qualité n'a été prise : le fonctionnement de l'autoclave n'était ni vérifié ni documenté. Les échantillons supplémentaires de la même soupe et autres produits de la même usine sont actuellement testés pour le botulisme. Toutes les nourritures produites ont été retirées du marché Italien et un avertissement international a été donné pour des produits susceptibles d'avoir été exportés.

L'incident illustre un risque associé d'une fabrication d'échelle locale. Ce type d'incident arrive souvent avec des ingrédients organiques, qui sont estimés être plus sains et dont on présume faussement une moins rigoureuse nécessité de traitement par la chaleur ou par le contrôle de qualité.

J'ai également pu trouver un communiqué officiel à ce sujet sur le site de Santé Canada. http://hwcweb.hwc.ca/hpb/lcdc/bid/dsd/news/nb3898_f.html. Cet épisode démontre une fois de plus que les végétaux sont autant à prendre au sérieux en tant que facteur à risque que d'autres produits. Si des personnes étaient susceptibles de recueillir d'avantage d'informations au sujet de cet incident ou si les soupes incriminées étaient trouvées et analysées suite aux différents communiqués, il serait très intéressant de le relater au sein de notre forum afin de favoriser cette enquête et également de démontrer une fois de plus l'utilité de notre réseau d'échange.

Voici une information qui vient de m'être transmise par l'intermédiaire de mon abonnement au bulletin de l'agence canadienne d'inspection des aliments.

AVERTISSEMENT DE RISQUE POUR LA SANTÉ - PRÉSENCE POSSIBLE DE TOXINES DU BOTULISME DANS LES OLIVES GÉANTES À LA TOSCANE DE MARQUE ULIVETO DEL SAPORE

OTTAWA, le 25 septembre 1998 -- L'Agence canadienne d'inspection des aliments avise les consommateurs de s'abstenir de manger des olives géantes à la toscane de marque Uliveto del Sapore fabriquées par Montalbano Industria Agroalimentare d'Italie et vendues en pots de 560 grammes (Code universel des produits (CUP) 8005100002376).

Ces olives n'ont pas reçu un traitement suffisant pour prévenir la croissance et la formation de toxines de *Clostridium botulinum*. L'ingestion de toxines produites par *C. botulinum* peut occasionner de graves troubles de santé. Jusqu'à présent, aucun cas de botulisme n'a été signalé.

Il se peut que les olives aient été distribuées à l'échelle du Canada.

Tout produit non utilisé devrait être retourné au point d'achat ou détruit.

Isabelle Laberge Agence canadienne d'inspection des aliments Ottawa

Deux cas familiaux de botulisme sévères en Ille et Vilaine liés à la consommation d'Enchiladas industrielles

Point de l'Institut de veille sanitaire, au 14 août 2008

Deux cas de botulisme familiaux sévères ont été déclarés à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (Ddass) d'Ille et Vilaine le 11 août 2008.

Les 2 cas (mère et fille) ont débuté leurs symptômes le samedi 9 août et ont été hospitalisés le jour même. Les deux patientes présentent une forme sévère de botulisme nécessitant des soins en réanimation.

Les tests biologiques sur souris réalisés au Centre National de Référence (CNR) des Bactéries Anaérobies et du Botulisme ont confirmé la présence de toxine botulique de type A dans les sérums des patientes.

Les deux patientes avaient consommé le 8 août au soir un plat mexicain d'origine industrielle : « Enchiladas au poulet » de marque Companeros. Ce plat composé de trois ingrédients : 2 galettes, un sachet avec du fromage et un sachet contenant la préparation avec du poulet a été reconstitué puis réchauffé au micro-onde. Ce produit frais qui doit être conservé au froid, aurait été conservé à température ambiante pendant 15 jours avant sa consommation. La conservation à température ambiante est une condition favorisant la production de toxine par la bactérie *Clostridium botulinum*.

La recherche de toxine botulique réalisée par le CNR dans les restes de la garniture des enchiladas (comprenant des légumes et du poulet) consommés par les patientes est très fortement positive pour la toxine de type A.

Le lot d'« Enchiladas au poulet » contaminé porte le numéro 08/190 avec une date limite de consommation au 7 août 2008. Ce produit est distribué dans les rayons frais de la grande distribution. Le lot impliqué n'a pas été distribué hors de France.

Un communiqué de presse commun de la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale de l'alimentation (DGAI) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) sur ces deux cas et l'aliment suspecté d'être à l'origine des intoxications botuliniques a été diffusé le 12 août. Des messages d'alerte ont été diffusés par les réseaux d'alerte de la DGS et de l'InVS aux professionnels de santé concernés en leur demandant de notifier toute suspicion clinique de botulisme survenant depuis le premier juillet 2008.

Un rappel du lot 08/190 a été effectué par l'industriel le 13 août. Un retrait et un rappel complémentaires des autres lots d'« Enchiladas au poulet » et « Fajitas au poulet » de même marque a été réalisé.

Le botulisme est une maladie rare en France qui fait l'objet d'une Déclaration obligatoire. Soixante-quatre cas ont été déclarés de 2004 à 2007 (21 en 2004, 23 en 2005, 9 en 2006 et 11 en 2007). Aucun des ces cas n'est décédé.

Cinq cas ont été déclarés en 2008 (dont les 2 cas d'Ille et Vilaine). Un de ces cas avait consommé un produit industriel frais de même type que les Enchiladas consommées par les deux personnes d'Ille et Vilaine ; ce produit avait également été conservé à température ambiante.

La survenue des ces cas souligne l'importance pour les consommateurs que les produits achetés au rayon frais soient conservés au froid (entre 0°C et 4°C) de l'achat jusqu'à la consommation.

La mort de Heydrich: un cas très spécial de botulisme

par H. H. MOLLARET *Médecine et Maladies infectieuses*—1986—8/9—493 à 495

L'article de Gourreau et coll. dans ce même numéro (3) sur le botulisme au Bois de Boulogne, avec la découverte fortuite dans le lac Saint-James d'une roquette datant de la dernière guerre, nous remet en mémoire un aspect médical peu connu de la mort de Reynard Heydrich, abattu à Prague le 27 mai 1942.

Nazi fanatique, Heydrich fut le responsable caché de l'incendie du Reichstag et du coup d'état des 27 et 28 février 1933, puis l'organisateur, avec Goering et Himmler, de la Nuit des Longs Couteaux. Antisémitisme forcené, il

fut l'initiateur des pogromes - dont la sinistre Nuit de Cristal - et le créateur des premiers camps de concentration; c'est lui qui entraîna la décision de la solution finale du problème juif lors de la conférence de Wannsee en 1942. Chef suprême de la police de sûreté du Reich - la Geheime Staatspolizei ou Gestapo - à partir de 1936, il fut nommé Protecteur du Reich pour la Bohême et la Moravie en septembre 1941. Neuf mois plus tard, le 4 juin 1942, il succombait des suites de l'attentat dont il avait été victime à Prague une semaine plus tôt.

Les circonstances de l'attentat « opération Anthropoïd » minutieusement préparée à Londres où la décision en avait été prise dès le 3 octobre 1941, par le Gouvernement tchèque en exil - sont bien connues (1, 2, 5): alors qu'il se rendait, sans escorte, à Prague, Heydrich, assis à l'arrière de sa voiture, fut atteint dans le dos par les éclats d'une grenade antichar qui explosa sous la roue arrière droite et déchaîna le flanc du véhicule. Le chauffeur s'étant élancé à la poursuite des agresseurs, Heydrich put conduire jusqu'à l'hôpital Bulovska où le médecin tchèque de garde, le docteur Vladimir Snadjar, fut rapidement écarté par son confrère allemand, le docteur Dick. Celui-ci tenta vainement d'extirper un éclat métallique décelé à la radio. Une intervention plus large fut faite par le professeur Hollbaum, de la Clinique allemande de Chirurgie de Prague.

Selon le récit du docteur Snadjar: « la blessure avait une longueur d'environ 8 cm et contenait quantité de saletés et de petits éclats ... la cage thoracique était ouverte, un éclat de bombe se trouvait dans la rate, le diaphragme était perforé ... J'ai dû rester dans la salle de stérilisation. Le docteur Dick, seul, assista le professeur Hollbaum au cours de l'opération ... Je ne sais rien de précis sur l'état de santé de Heydrich après l'opération. Peut-être dut-on lui enlever la rate. Je ne l'ai pas revu. Mais 10 docteur Dick affirmait qu'il allait très bien. Sa mort nous a tous surpris. Une septicémie, disait-on. Le professeur Hamperl, chef de l'institut allemand de Pathologie et le professeur Weyrich, chef de l'institut allemand de Médecine légale, rédigèrent en commun un rapport sur leurs conclusions médicales. On y lit: « La mort survint par suite de lésions des organes parenchymateux vitaux par les bactéries, éventuellement par les poisons qui y ont pénétré avec les éclats d'engins explosifs et qui se sont déposés surtout dans la plèvre, dans le diaphragme et les tissus voisins de la rate, s'y sont agglomérés et multipliés. « C'est tout ce que je peux vous dire ... » (8).

Officiellement donc, Heydrich succomba aux suites infectieuses de ses blessures, à une septicémie comme A. Decaux vient de l'écrire dans un article récent (2).

Une version bien différente de la mort d'Heydrich est apportée par O. Riche dans son livre: « La guerre chimique et biologique (7): « Légèrement blessé par une grenade, Heydrich fut immédiatement conduit à l'hôpital Bulovska. Le lendemain, après une opération qui s'était bien déroulée, il se sentit gagné par la paralysie. Les médecins ne comprirent pas ce qui se passait. Ils essayèrent différents traitements qui, tous, échouèrent et le Protecteur de Bohême-Moravie finit par succomber au terme d'une longue agonie. Les Allemands l'ignoraient: mais la grenade qui l'avait blessé contenait de la toxine botulique ».

O. Riche nous communiqua ses sources: un volume de R. Harris et J. Paxman: « A higher form of killing. The secret story of gas and germ warfare » (4), paru à Londres en 1982 et remarquablement documenté sur les recherches menées en Grande-Bretagne en matière de guerre bactériologique durant la Seconde Guerre Mondiale. C'est en grande partie à ces auteurs que nous devons les informations suivantes:

Le British Biological Warfare project remonte à février 1934 et la direction générale en fut confiée à Sir Maurice Hankey. Celui-ci s'adressa d'abord à Edward Mellanby, secrétaire du Medical Research Council, qui refusa formellement tout usage des progrès médicaux dans un but de destruction, puis à Paul Fildes *, chef de *M.R.C. bacteriological metabolic unit*, qui accepta.

En septembre 1936, Hankey proposa au *Committee of Imperial Defence*, la création d'un corps officiel d'experts pour étudier la portée de la guerre bactériologique et prendre les contre-mesures nécessaires.

En 1940, fut créé le très secret Laboratoire de Porton-Down, dont la direction fut confiée à Fildes, qui travailla dès lors en liaison étroite avec le *Strategic Air Command* et Camp David aux États-Unis.

Les recherches entreprises à Porton-Down comportèrent deux thèses dominantes: *Bacillus anthracis* et *Clostridium botulinum*: un premier programme avait envisagé la fabrication de deux, puis de cinq millions de cakes, la production massive de spores de *Bacillus anthracis* pour les contaminer, et les modalités de leur dispersion par avion au-dessus de l'Allemagne l

La dispersion par engins explosifs fut étudiée ultérieurement et l'on connaît maintenant les détails de l'expérimentation de la « bombe à anthrax », faite dans l'île de Gruinard, durant l'été 1942 par le Captain Dalby, de la *Royal Artillery*, Paul Fildes, Graham Sutton, responsable du secteur expérimental de Porton-Down et plusieurs bactériologistes de qualité: le docteur W.R. Lane, David Henderson, du Lister Institute, et Donald Woods de *l'Unit for Bacterial Chemistry* au London's Middlesex Hospital.

Fildes s'était spécialisé dans l'utilisation de l'arme «BTX», nom de code de la toxine botulique : c'est lui qui, de son propre aveu, « prépara » les deux grenades destinées à Heydrich, des grenades à main antichar n°73 sur lesquelles étaient fixées par du sparadrap des capsules contenant la toxine. Lorsque les sept parachutistes tchèques décollèrent de Tempsford le 28 décembre 1941, pour être largués près de Liditch, en Tchécoslovaquie, deux d'entre eux tenaient à la main avec une attention particulière, ces deux grenades.

Le récit de la mort de Heydrich, tel que l'a relatée le docteur Snadjar, ne mentionne aucun symptôme de botulisme; mais, selon Harris et Paxman: « après une période de calme de 1 jour au plus, Heydrich fut atteint de paralysies progressives, ne répondant à aucun traitement et il mourut le 4 juin 1942 avec les signes du botulisme ». Les auteurs énumèrent ensuite les symptômes classiques du botulisme, mais ne donnent pas la source selon laquelle ces symptômes auraient été observés chez Heydrich. Le seul témoignage reste donc celui de Fildes, qui disait volontiers, en privé, avoir contribué à la mort de Heydrich. À Alvin Pappenheimer, professeur de Microbiologie à Harvard, il aurait dit: « Heydrich's murder was the first notch on my pistol » (6)

☆☆☆

Adjoindre de la toxine botulique à une grenade antichar peut paraître aussi saugrenu que superflu, au point que la réalité même de toute cette histoire puisse être sérieusement mise en doute. Mais il faut la situer dans le

contexte de l'Angleterre en 1940-1942, époque à laquelle les Anglais redoutaient particulièrement une agression chimique ou biologique : la pasteurisation du lait et la chloration de l'eau étaient impérativement recommandées. Craignant la dispersion de toxines botuliques sur Londres, les Anglais importèrent du Canada 235.000 doses de sérum antitétanique. Lorsque les premiers V1 tombèrent sur Londres, c'est avec un immense soulagement que le Haut Commandement constata que les projectiles étaient purement explosifs et ne contenaient aucune arme biologique.

Il faut remarquer, d'autre part, que les préparatifs de l'attentat contre Heydrich, l'entraînement des parachutistes tchèques, la décision d'attaquer Heydrich à la grenade, le choix de celle-ci, se déroulèrent d'octobre jusqu'à la fin décembre 1941 en Grande-Bretagne, cependant qu'à Porton-Down, dans le même temps, Fildes mettait au point ses bombes bactériennes. Pourquoi ne pas expérimenter sur Heydrich un des engins de Fildes ?

Et, puisque Heydrich ne succomba pas à l'explosion elle-même mais au botulisme, l'adjonction de toxine à la grenade antichar ne fut finalement pas superflue.

• Paul Fildes, éminent bactériologiste, né en 1882 et mort en 1971, membre de la Royal Society, éditeur du volumineux System of Bacteriology IMRC 1931), fut l'un des fondateurs du British Journal of Experimental Pathologie, en 1920.

CONTROLE DE L'ÉTAT D'IMMUNITÉ ANTITÉTANIQUE DANS LA POPULATION DU PUY-DE-DÔME *

par D. BEYTOUT ü, T. NGUYEN TRUNG ü, H. LAVERAN Ü et A. MAMOURET-BEYTOUT Ü

•• Service d'Hygiène hospitalière (Prof. D. Beytout), Centre Hospitalier Universitaire, 28 place Henri Dunant, BP 38, F- 63001 Clermont Ferrand cedex.

" MÉDECINE ET MALADIES INFECTIEUSES Reçu le 19.06.1988. Acceptation définitive le 16.07.1988.

Nous avons, à deux reprises, fait un contrôle de l'immunité contre la toxine tétanique de la population de notre département: par une méthode ELISA (3) sur un échantillon stratifié tiré au sort parmi des sérums prélevés pour des examens de santé par les services de la mutualité agricole (population rurale) et, à la fois par ELISA et par hémagglutination passive (1, 5) (vacci test Pasteur) sur des sérums de consultants pour blessure au service d'accueil du CHU de Clermont-Ferrand (population urbaine ou suburbaine). Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Il apparaît donc que la population âgée de plus de 50 ans est dans 50 % des cas dépourvue de toute immunité, soit qu'elle n'ait jamais été vaccinée, soit qu'elle n'ait pas reçu de rappels en temps utile. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par d'autres auteurs (2, 4). Cette carence vaccinale motive une consommation considérable de gammaglobulines à l'occasion de consultations pour blessure (35 640 mL de gamma globulines ont été consommés en Auvergne en 1986 pour une population de 1 500 000 habitants environ, soit une dépense prophylactique de 1 400 000 Francs en 1 an [209 K€]).

Une campagne de vaccination, prenant pour cible la population âgée de 50 ans et plus, serait une mesure utile, onéreuse, mais sans doute rentable à moyen terme. Mais, ne pourrait-on pas être efficace à moindre frais? Peut-être suffirait-il que l'ensemble du corps médical français adopte la politique suivante:

- que les praticiens profitent de l'occasion de la consultation de toute personne âgée de 50 ans et plus, pour l'interroger sur l'état de sa vaccination antitétanique, éventuellement le contrôler par vacci-test, faire un rappel ou commencer une vaccination et lui délivrer une carte de vaccination;
- que les médecins du travail, à l'occasion du départ à la retraite ou de visites systématiques fassent de même.

Ainsi, par une mesure systématique "à l'occasion" appliquée à une population cible, une partie très importante de cette population à risque acquerrait-elle une protection vaccinale en évitant les frais qu'occasionnerait un acte isolé de vaccination ?

Ne serait-ce pas aussi une bonne façon de montrer que le corps médical ne se cantonne pas dans la médecine de soins, mais est aussi en première ligne dans le domaine de la prophylaxie?

Age	Non immunisés < 0,01 UAI	Faiblement immunisés < 0,5 UAI	Immuns ≥ 0,5 UAI	Total
20-29 ans	1 (3 %)	2	28	31
30-39 ans	4 (12 %)	5	23	32
40-49 ans	3 (9 %)	10	22	35
≥ 50 ans	37 (49 %)	13	24	74
Total	45	30	97	172

TABLEAU 1 - Immunisation de la population rurale du Puy-de-Dôme

Age	Non immunisés < 0,01 UAI	Faiblement immunisés < 0,5 UAI	Immuns ≥ 0,5 UAI	Total
20-29 ans	1	2	13	16

30-39 ans	1	3	13	17
40-49 ans	2	6	6	14
≥ 50 ans	20 (53 %)	8	10	38
Total	24	19	42	85

TABLEAU 2 - Immunisation des blessés consultant au service d'accueil (population urbaine)

Répartition par âge des cas de tétanos de l'incidence et de la létalité						
Classe d'âge	Effectif		Incidence annuelle (pour 100 000 habitants)		Létalité	
	Nombre	%	Femmes	Hommes	Nombre	%
< 60 ans	6	6	0,007	0,006	1	17
60-69 ans	10	11	0,12	0,10	1	10
70-79 ans	42	45	0,70	0,37	9	21
> 80 ans	36	38	0,81	1,15	11	31

