

Infection et fertilité - *Corynebacterium seminale* : point de vue du bactériologiste

P. RIEGEL¹, JP. LEPARGNEUR²

¹Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, ² Centre de Diagnostic Biologique, Laboratoire des Carmes, Toulouse

RESUME

Les corynébactéries sont des bacilles Gram positif caractérisés par une forme irrégulière. Elles sont fréquemment isolées de divers prélèvements notamment de patients présentant une infection urogénitale. Nous présentons deux études effectuées dans deux laboratoires différents ayant pour but de déterminer la nature exacte des corynébactéries isolées du sperme de patients consultant pour infertilité du couple. Nous avons particulièrement recherché *Corynebacterium seminale* (synonyme *C. glucuronolyticum*) qui est une espèce décrite en 1995 à partir de souches isolées de prélèvements urogénitaux. La première étude effectuée à partir de 420 patients a permis de reconnaître que *C. seminale* était l'espèce la plus fréquemment isolée avec un fort comptage bactérien. Les autres espèces de corynébactéries sont plus souvent rencontrées avec un faible comptage. La deuxième étude basée sur 1902 examens spermatiques a montré que *C. seminale* est plus fréquemment corrélée avec une anomalie du spermogramme que les autres espèces de corynébactéries. Ces études démontrent que le pouvoir pathogène des espèces formant les corynébactéries n'est pas similaire et incite à des études complémentaires de pathogénicité prenant en compte l'identification de ces espèces.

Mots clés : *Corynebacterium seminale*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, homme, fertilité, infections génitales.

I. INTRODUCTION

Les bactéries corynéformes appartiennent à la flore normale de la peau et des muqueuses. Il est d'usage de les regrouper sous les termes de corynébactéries ou de diphthéroïdes par analogie morphologique avec l'agent de la diphtérie. Elles sont pour la plupart considérées comme non pathogènes à l'exception de *C. diphtheriae* et d'*Arcanobacterium haemolyticum*. Ces termes génériques sont utilisés en raison de l'absence fréquente d'une identification au stade de l'espèce. La taxonomie moléculaire a permis récemment de décrire de nouveaux genres et espèces parmi ce groupe bactérien. D'un point de vue clinique, il a été intéressant de constater que ces espèces corynéformes ainsi redéfinies avaient un site anatomique de prédilection et pouvaient être responsable d'une pathologie infectieuse en rapport avec ce site. Une de ces nouvelles espèces, *Corynebacterium seminale* (synonyme *C. glucuronolyticum*) a été décrite en 1995 à partir de souches isolées de la sphère urogénitale chez des patients présentant une pathologie infectieuse [5, 9]. La présence de corynébactéries à partir de tels prélèvements avait déjà été décrite dans la littérature mais sans spécification des espèces isolées. Il nous a semblé important de définir le rôle pathogène spécifique de *C. seminale* en le comparant avec celui

Correspondance : P. Riegel, Institut de Bactériologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg
Tel : 03 90 24 37 55, Fax : 03 88 25 11 13,
e-mail : philippe.riegel@medecine.u-strasbg.fr

Communication au XVIIème Congrès de la SALF, 7-9 décembre 2000, Bordeaux.

des autres corynébactéries. Nous avons réalisé deux études concernant l'identification des coreynéobactéries isolées de spermocultures de patients consultant pour infertilité. Les résultats exposés permettront une discussion sur l'intérêt de l'identification précise de ces bactéries isolées de tels échantillons cliniques.

II. MATERIEL ET METHODES

Etude 1 : Cette étude a concerné 420 hommes consultant au CECOS de Strasbourg (Dr Clavert) pour infertilité du couple. Le sperme a été obtenu par masturbation après désinfection soigneuse du gland. Il a été ensemencé immédiatement sur milieu Trypticase-Soja (Bio-Mérieux, Marcy L'etoile, France) supplémenté par 5% de sang de mouton puis envoyé à l'Institut de Bactériologie, Faculté de Médecine de Strasbourg (Dr Riegel). Des dilutions de 10 en 10 ont été effectuées à fin de comptage bactérien. Les cultures ont été incubées à 37°C en aérobiose. Les souches bactériennes ont été identifiées par tests biochimiques exposés dans la littérature récente [9] et par analyses des acides gras volatiles pour certaines souches. Dans cette étude, l'identification complète des corynébactéries a été effectuée quelque soit le comptage. L'identification des autres bactéries a été effectuée pour un comptage supérieur ou égal à 10⁴ cfu/ml.

Etude 2 : Cette étude a concerné 1902 patients qui ont consulté en activité libérale pour infertilité du couple. Le sperme a été obtenu et traité au laboratoire des Carmes à Toulouse (Dr JP Lepargneur) dans les mêmes conditions que pour l'étude 1. La recherche de *Corynebacterium seminale* a été effectuée dans le cas d'un comptage bactérien total supérieur ou égal à 10⁴ cfu/ml. Cette identification était basée sur la morphologie bactérienne et l'activité β -glucuronidase de la corynébactérie isolée.

III. RESULTATS

Etude 1 :

Le tableau 1 montre les résultats obtenus. Pour les échantillons contenant au moins 10⁴ cfu/ml, il a été trouvé une espèce corynéforme prédominante chez 48 % de ces échantillons. On retrouve en majorité les streptocoques (25%) et les staphylocoques (20%) non patho-

gènes dans les autres échantillons. Parmi les corynébactéries, *C. seminale* est l'espèce la plus souvent isolée avec un fort comptage (34% des corynébactéries). Dans la majorité des cas, *C. seminale* était associée avec une autre bactérie mais de comptage plus faible. Les autres espèces sont présentes à moins de 14% en sachant que le groupe G ainsi que les *Actinomyces* sp sont constitués de plusieurs espèces génomiques distinctes. En comparant les identifications des corynéformes trouvés à fort comptage et à comptage faible, la présence de *C. seminale* est plus souvent associée avec un fort comptage que les autres espèces corynéformes identifiées (p<0.02).

Parmi les 17 souches isolées avec un fort comptage chez les 40 donneurs, nous n'avons pas isolé *C. seminale*. Il est remarquable de constater que la différence entre les espèces isolées chez les patients et celles isolées chez les donneurs n'est significative que pour *C. seminale*.

L'activité β -glucuronidase est caractéristique de l'espèce *C. seminale* parmi les espèces corynéformes. Les 31 souches de *C. seminale* possédaient cette activité qui a été retrouvée pour trois autres corynéformes (*Corynebacterium* sp, *Actinomyces* sp et *Propionibacterium* sp), soit une spécificité de 93% et une valeur prédictive positive de 86%. Parmi les trois autres souches positives, deux (*Actinomyces* sp et *Propionibacterium* sp) pouvaient être facilement distinguées par la morphologie bactérienne et la culture.

Etude 2 :

La flore bactérienne a été étudiée pour les échantillons contenant un fort comptage ($\geq 10^4$ cfu/ml).

C. seminale est l'espèce corynéforme la plus fréquemment isolée et a été retrouvée chez 2,7% de ces échantillons à fort comptage. Les autres corynéformes sont dispersés dans plusieurs espèces et sont retrouvés dans 5,3 % de ces échantillons. Dans cette étude, la totalité des échantillons contenant *C. seminale* sont monomicrobiens à l'inverse de 50% des échantillons contenant un autre corynéforme (Tableau 2).

Concernant les résultats du spermogramme pour les échantillons contenant un fort comp-

Tableau 1 : Identification des bactéries isolées du sperme chez 420 patients et 40 donneurs (étude 1).

identification	Patients positifs (total patients n=420)		Donneurs positifs (total donneurs n=40)
	≥10 ⁴ cfu/ml	< 10 ⁴ cfu/ml	≥ 10 ⁴ cfu/ml
C. seminale	15 (3,6%)	16 (3,8%)	0 (0%)
CDC groupe G	6 (1,4%)	15 (3,6%)	0
C. amycolatum	2 (0,5%)	14 (3,3%)	0
Corynebacterium sp (8 espèces)	18 (4,3%)	22 (5,2%)	1 (2,5%)
Dermabacter hominis	0 (0%)	6 (1,4%)	0
Actinomyces sp	2 (0,5%)	2 (0,5%)	0
Brevibacterium sp	0 (0%)	1 (0,2%)	0
Propionibacterium sp	1 (0,2%)	0 (0%)	0
Total des positifs corynébactéries	44 (10,5%)	76 (18,1%)	1 (2,5%)
enterobactéries	6 (1,4%)	-	4 (10%)
streptocoques	23 (5,5 %)	-	4 (10%)
entérocoques	1 (0,2%)	-	0 (0%)
staphylocoques	18 (4,3%)	-	8 (20%)
Total des positifs toutes bactéries	92 (21,9%)	-	17 (42%)

Tableau 2 : Paramètres du spermogramme en fonction des espèces corynéformes isolées chez 1902 patients (étude 2).

Paramètres du spermogramme	C. seminale	Autres corynébactéries
Comptage ≥ 10 ⁴ cfu/ml	2,7 %	5,3 %
Mobilité des spermatozoïdes ≥ 50 %	25,4 %	45 %
pH > 7,8	17,6 %	16 %

tage bactérien, une mobilité normale des spermatozoïdes est retrouvée pour seulement 25,4% des échantillons contenant *C. seminale* contre 45% pour les échantillons avec d'autres corynébactéries. Le pH est supérieur à 7,8 pour 18% des échantillons à *C. seminale* contre 16% pour les autres corynéformes, mais le pH de la majorité des échantillons à *C. seminale*

est supérieur à 7,5.

IV. DISCUSSION

Les résultats exposés ci-dessus sont les premiers concernant une identification précise au stade de l'espèce des corynébactéries isolées du sperme de patient consultant pour infertilité du couple. Ils montrent que *C. seminale* est l'espèce majoritairement isolée en cas de fort comptage au contraire des autres corynébactéries qui sont souvent rencontrées à faible comptage. Une anomalie du spermogramme semble aussi être plus fréquente dans le cas d'une présence de *C. seminale*.

La discussion repose sur des questions dont les réponses données par la littérature méritent d'être analysées. Quelle est la relation entre bactériospermie et anomalie du spermogramme et plus encore de la fertilité ? La plupart des études ne trouvent pas de corrélation entre la présence de bactéries dans le sperme et une altération des paramètres du spermogramme

[1, 6, 7, 12] ou de la fertilité [10]. Une différence semblerait pourtant être notée avec la présence de *Ureaplasma* [12]. De même, des expériences d'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes *in vitro* en présence de diverses bactéries n'ont pu mettre en évidence une relation [8]. Du point de vue du bactériologiste, il semble cependant y avoir deux grandes restrictions à la validation de ces travaux. La première est souvent l'absence de prise en compte d'un comptage bactérien minimum pour affirmer une présence anormale de ces bactéries. Il est évident qu'un faible nombre de bactéries peut se trouver dans le sperme même après une toilette soigneuse et une miction avant l'éjaculation. A partir d'un échantillon *a priori* non stérile, le comptage bactérien est primordial pour l'interprétation clinique de l'analyse microbiologique. La deuxième restriction est l'absence dans presque toutes les publications d'une identification au stade de l'espèce. Il est maintenant admis suite aux récents travaux de classifications effectués par taxonomie moléculaire que des espèces différentes auparavant rangées sous un même nom générique présentent aussi des différences de pathogénicité. Les corynébactéries sont un exemple que nous développons ici mais il en est de même avec les streptocoques β -hémolytiques ou ceux dits verdissants. Ces différences taxonomiques reflètent-elles l'existence de facteurs de pathogénicité particuliers ? L'espèce *C. seminale* est caractérisée par la production d'une β -glucuronidase qui n'est retrouvée parmi les autres corynébactéries que chez les espèces *C. renale* et *C. cystitidis*, responsables d'infections urogénitales chez les bovins. Il est à signaler que *C. seminale* a été aussi retrouvée à partir de tels prélèvements chez l'animal [3]. *C. seminale* présente un Camp test positif qui signifie la présence de phospholipases cytolytiques. Environ la moitié des souches de *C. seminale* produisent une uréase qui augmentent le pH local par transformation de l'urée en ammoniac. Enfin, une résistance très fréquente de *C. seminale* aux macrolides et aux tétracyclines peut permettre la sélection de cette espèce. Les corynébactéries sont-elles connues comme responsables d'infections génitales chez l'homme ? La plupart des études montrent en effet la présence fréquente de corynébactéries dans des

échantillons prostatiques [2, 4]. Les corynébactéries pourrait constituer le groupe bactérien le plus important isolé à partir de tissus prostatiques [2].

Très récemment, *C. seminale* a été décelée directement par amplification génique dans des sécrétions d'origine prostatique [11]. La présence des corynébactéries dans des foyers d'infection génitale a été ainsi démontrée par des études utilisant différentes approches méthodologiques.

Nos deux études démontrent que l'implication des espèces formant les corynébactéries dans des infections potentielles de la sphère urogénitale n'est pas identique et incitent à des études complémentaires de pathogénicité *in vitro* et *in vivo* prenant en compte une identification précise de ces espèces.

REFERENCES

1. BERGER R.E., KARP L.E., WILLIAMSON R.A. *et al.*: The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 1982, 37 : 557-564.
2. BERGER R.E., KRIEGER J.N., ROTHMAN I. *et al.*: Bacteria in the prostate tissue of men with idiopathic prostatic inflammation. *J. Urol.*, 1997, 157 : 863-865.
3. DEVRIESE L.A., RIEGEL P., HOMMEZ J. *et al.*: Identification of *Corynebacterium glucuronolyticum* strains from the genital tract of humans and pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38 : 4657-4659.
4. DRACH G.W.: Problems in diagnosis of bacterial prostatitis : gram-negative, gram-positive and mixed infections. *J. Urol.*, 1974, 111 : 630-636.
5. FUNKE G., BERNARD K.A., BUCHER C. *et al.*: *Corynebacterium glucuronolyticum* sp. nov. Isolated from male patients with genitourinary infections. *Med. Microbiol. Lett.*, 1995, 4 : 204-215.
6. GRANOUILLET R., GAUDIN O.G., LAURENT J.C. *et al.*: Etude de la flore microbienne spermatique chez des patients consultant pour stérilité. *Sem. Hôp. Paris*, 1982, 58 : 1129-1133.
7. HILLIER S.L., RABE L.K., MULLER C.H. *et al.*: Relationship of bacteriologic characteristics to semen indices in men attending an infertility clinic. *Obstet. Gynecol.*, 1990, 75 : 800-804.
8. MAKLER A., URBACH Y., LEFLER E. *et al.*: Factors affecting sperm motility. VI. Sperm viability under the influence of bacterial growth in human ejaculates. *Fertil. Steril.*, 1981, 35 : 666-670.

9. RIEGEL P., RUIIMY R., DE BRIEL D. *et al.* : *Corynebacterium seminale* sp. nov., a new species associated with genital infections in male patients. J. Clin. Microbiol., 1995, 33 : 2244-2249.
10. STOVALL D.W., BAILEY L.E., TALBERT L.M. : The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing in vitro fertilization : effects on fertilization and pregnancy rates. Fertil. Steril., 1993, 59 : 197-201.
11. TANNER M.A., SHOSKES D., SHADED A. *et al.* : Prevalence of corynebacterial 16S rRNA sequences in patients with bacterial and « nonbacterial » prostatitis. J. Clin. Microbiol., 1999, 37 : 1863-1870.
12. TOTH A., LESSER M.L. : Asymptomatic bacteriospermia in fertile and infertile men. Fertil. Steril., 1981, 36 : 88-91.

a high C. seminale count in contrast with 45% of specimens containing similar counts of other corynebacteria.

These studies demonstrate that the isolation rates from human genital specimens and their clinical implications are different according to the species isolated. Microbiologists should be aware of the need to accurately identify these corynebacteria for further in vitro or in vivo studies on genital infections.

Key-words: *Corynebacterium seminale*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *infertility*, *semen*.

ABSTRACT

Infection and fertility - *Corynebacterium seminale*: a microbiological point of view

P. RIEGEL, J.P. LEPARGNEUR

The authors present two independent studies designed to identify corynebacteria isolated from the semen of patients consulting for infertility. Corynebacteria were identified by conventional biochemical and physiological tests and by determination of volatile fatty acids. In the first study based on 420 patients, the commonest species were *Corynebacterium seminale* (synonym *C. glucuronolyticum*) found in 7.4% of specimens, CDC group G (5%) and *C. amycolatum* (3.8%). Of the 92 semen specimens with more than 103 cfu/ml, 44 were positive for corynebacteria, including 15 *C. seminale* strains, whereas streptococci, staphylococci and enterobacteriaceae were found in 23, 18 and 6 of the 420 specimens, respectively. The presence of *C. seminale* was more frequently associated with a high bacteria count than the other corynebacteria ($p < 0.02$). In the second study, we compared the presence of corynebacteria in the semen of 1,902 patients with semen indices. *C. seminale* was present at levels greater than 103 cfu/ml in 2.7% of these specimens, while several other species of corynebacteria were detected in 5.3% of cases. Normal motility was found in only 25.4% of semen specimens with