

***Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques**

Coordinateurs
François Denis,
Christian Perronne



ELSEVIER

Chapitre 6

***Mycobacterium ulcerans*, agent de l'ulcère de Buruli**

Hélène Marchandin, Françoise Portaels, Philippe Van de Perre

**Importance de l'ulcère de Buruli
et principales voies de recherche**

Particularités de *M. ulcerans* et données inconnues

Épidémiologie

Aspects cliniques

Pathogénie

Diagnostic

Traitement

Prévention, stratégie de lutte et perspectives

Mycobacterium ulcerans est une mycobactérie à croissance lente responsable d'ulcérations cutanées invalidantes regroupées sous le terme d'ulcère de Buruli ou ulcère de Bairnsdale. En 1998, *M. ulcerans* a été reconnu bactérie pathogène émergente par l'Organisation mondiale de la santé.

1. Importance de l'ulcère de Buruli et principales voies de recherche

L'ulcère de Buruli se situe au troisième rang des infections mycobactériennes chez l'homme après la tuberculose et la lèpre et connaît actuellement une recrudescence en zone intertropicale. Lors de ces dernières années, les taux de détection de la maladie se sont avérés souvent supérieurs à ceux de la lèpre et parfois localement supérieurs à ceux de la tuberculose. Si les premiers cas d'ulcère de Buruli ont été observés dès 1897 par Cook en Ouganda, les travaux de recherche concernant cette maladie et son agent infectieux sont de réalisation relativement récente et s'articulent autour de plusieurs axes visant pour la majorité d'entre eux à améliorer les connaissances épidémiologiques et les moyens de traitement de l'ulcère de Buruli.

2. Particularités de *M. ulcerans* et données inconnues

M. ulcerans présente un certain nombre de particularités qui font de cette espèce un membre à part au sein de la famille des mycobactéries. *M. ulcerans* est une mycobactérie extracellulaire dans la phase active de la maladie, qui possède une séquence d'insertion spécifique, l'IS2404, et qui produit une toxine lipidique, nécrosante et immunosuppressive, la mycolactone. Toutefois, de nombreuses données sont encore inconnues. En effet, bien que le rôle de certains insectes aquatiques soit actuellement une des voies vraisemblables de transmission de *M. ulcerans*, le mode de transmission et le réservoir naturel de *M. ulcerans* n'ont toujours pas été totalement élucidés malgré de nombreuses investigations menées dans ce sens. La voie de biosynthèse de la mycolactone reste également à explorer.

Des études génomiques ont permis de démontrer que *M. ulcerans* aurait évolué à partir de *M. marinum*. Sur un plan phylogénétique, ces deux espèces sont les plus proches de *M. tuberculosis*. Les similarités observées au niveau génétique contrastent donc de manière très importante avec les différences observées tant au niveau phénotypique qu'au niveau clinique.

3. Épidémiologie

3.1. Distribution géographique, fréquence, âge et sexe

Les premiers cas d'ulcère de Buruli sont rapportés par Sir Albert Cook en 1897 qui les observe en Ouganda. Toutefois, le premier cas publié est un cas australien décrit en 1948 dans la région de Bairnsdale par MacCallum qui

relie l'infection à la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants. Le nom d'ulcère de Buruli sera attribué à la maladie en référence au nom d'une région d'Ouganda où de nombreux cas ont été décrits dans les années 1950. L'ulcère de Buruli, ou ulcère de Bairnsdale, est actuellement présent sur quatre continents (Amérique, Afrique, Asie et Océanie) et touche une trentaine de pays situés en zone intertropicale (Fig. 6.1). La maladie sévit principalement en Afrique et en Australie et continue de s'étendre particulièrement en Afrique de l'Ouest sous forme endémique. Plusieurs cas ont été décrits en dehors de la zone intertropicale (en Amérique et en Europe) chez des voyageurs ou des personnes ayant travaillé en zone d'endémie. Quelques cas ont également été rapportés en Chine, au Japon et dans le sud de l'Australie (Fig. 6.1). La fréquence de l'ulcère de Buruli est vraisemblablement encore largement sous-estimée puisque les données épidémiologiques ne tiennent compte que du dépistage passif des patients se présentant à un dispensaire. Cette maladie sévissant souvent dans des zones reculées, il est probable que beaucoup de patients ne consultent pas les services de santé et préfèrent le recours à la médecine traditionnelle. Les derniers rapports font état d'un cumul de 158 cas australiens et 15 037 cas africains en 1999. Les pourcentages de patients



Figure 6.1. Répartition mondiale des cas d'ulcère de Buruli.

Les points noirs représentent la trentaine de pays touchés par la maladie : Angola, Australie, Bénin, Bolivie, Burkina Faso, Cameroun, Chine, Congo, Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana, Guinée, Guinée équatoriale, Guyane française, Inde, Indonésie, Japon, Kiribati, Liberia, Malaisie, Mexique, Nigéria, Ouganda, Papouasie-Nouvelle Guinée, Pérou, République démocratique du Congo, Sierra Leone, Sri Lanka, Soudan, Surinam, Togo.

atteints de la maladie au sein de certaines communautés peuvent être très élevés, jusqu'à 22 % dans une communauté au Ghana. Les cas sont le plus souvent observés en zone rurale et, dans plus de 50 % des cas, chez les enfants d'âge inférieur à 15 ans. Chez les adultes, les femmes sont plus souvent atteintes que les hommes.

L'infection par le VIH ne semble pas être un facteur de risque d'acquisition de l'ulcère de Buruli si l'on considère le faible nombre de co-infections par le VIH et *M. ulcerans* qui sont observées mais elle jouerait un rôle péjoratif sur l'évolution clinique des formes ostéomyélitiques.

3.2. Influence de l'environnement et mode de transmission

Le réservoir de *M. ulcerans* ainsi que son mode de transmission à l'homme sont longtemps demeurés totalement inconnus. Le biotope hydrotellurique fut en premier suspecté d'être étroitement lié à la survenue de cas endémiques de la maladie, ceux-ci étant principalement observés dans des zones géographiques peu drainées, marécageuses, éventuellement après survenue d'inondations importantes. La recrudescence du nombre de cas d'ulcère de Buruli observés dans certaines régions après réalisation de divers travaux de déforestation ou de construction s'accompagnant de modifications de l'environnement naturel (construction de canaux d'irrigation pour la riziculture au Bénin, construction de barrages ou création de lacs artificiels, création d'un terrain de golf irrigué par des eaux usées en Australie...) a permis de confirmer le lien entre la survenue de la maladie et le biotope hydrotellurique. Toutefois, un contact direct avec le milieu aquatique n'est pas strictement indispensable à l'infection par *M. ulcerans*.

Dans un second temps, différentes techniques de PCR ont été appliquées à la recherche du réservoir environnemental de *M. ulcerans*. Elles ont permis la détection de séquences nucléotidiques spécifiques de *M. ulcerans* dans l'environnement (eau, boues, détrit, végétaux aquatiques, poissons et insectes) sans que l'on puisse toutefois isoler les souches bactériennes en culture. Des infections naturelles sont décrites chez l'animal en Australie (koala, opossum, alpaga), les lésions étant identiques à celles observées chez l'homme.

L'élucidation du mode de transmission de l'ulcère de Buruli est actuellement en progression grâce à des travaux réalisés sur les insectes et des mollusques aquatiques suspects d'être respectivement vecteurs et réservoirs de *M. ulcerans*. Ces travaux, conduits par Marsollier et al., reposent sur deux types d'observations : tout d'abord, la détection par PCR des séquences IS2404, à ce jour reconnues comme étant spécifiques de *M. ulcerans*, dans des broyats de certains insectes capturés en Côte d'Ivoire et, pour la première fois, l'isolement en culture de deux souches de *M. ulcerans* à partir de ces broyats. Ensuite, des travaux d'infection en laboratoire de certaines punaises d'eau par *M. ulcerans* ont permis de démontrer que les mycobactéries étaient localisées dans les glandes salivaires de ces insectes sans apparition de lésions des tissus infectés. Ces punaises d'eau appartiennent à l'espèce *Naucoris cimicoides*, elles sont carnivores et peuvent transmettre l'infection à la souris dans un modèle expérimental. Toutefois, ces insectes ne peuvent s'infecter directement à partir des végétaux aquatiques contaminés et l'intervention d'un hôte intermédiaire dans la chaîne de transmission de *M. ulcerans* est fortement suspectée ;

cet hôte pourrait être représenté par des mollusques herbivores. De même, le rôle d'autres insectes aquatiques dans cette transmission reste à explorer. L'ulcère de Buruli constitue la première mycobactériose dont un des modes de transmission implique des insectes. Le rôle de certains organismes, comme des petits poissons, crustacés, mollusques et amibes, dans la filtration et/ou la concentration de *M. ulcerans* a été évoqué mais jamais démontré. Dans l'état actuel des connaissances, le mode de transmission de *M. ulcerans*, bien que non totalement élucidé, pourrait être schématisé comme dans la Fig. 6.2. Les insectes aquatiques capables de voler pourraient être à l'origine de la

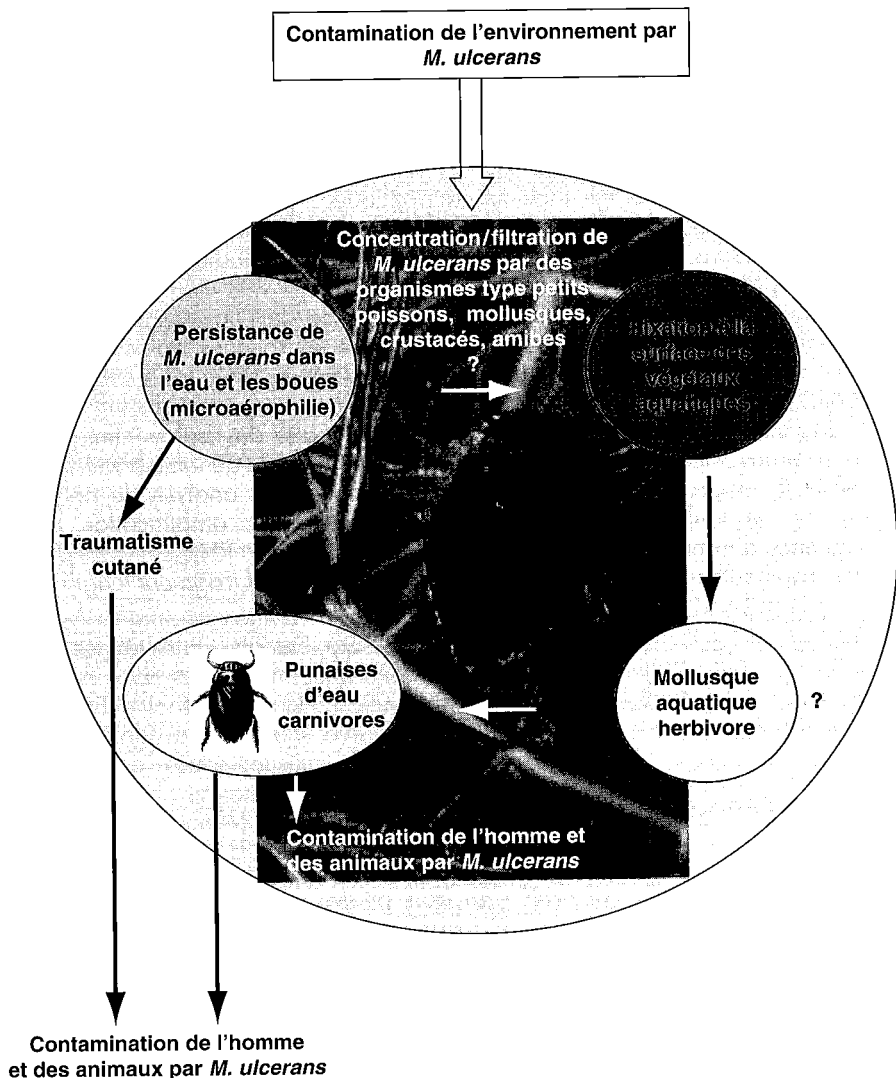


Figure 6.2. Représentation schématique de l'état actuel des connaissances sur le mode de transmission de *M. ulcerans*.

contamination de l'homme et des animaux soit dans le milieu aquatique, soit dans le milieu extérieur.

L'existence d'autres voies de contamination reste à explorer comme la contamination aérienne après formation d'aérosols. La contamination passe donc souvent inaperçue. Elle se fait par voie transcutanée, que ce soit après piquûre d'insectes ou par un autre mécanisme traumatique, l'existence d'un traumatisme étant un facteur de risque pour l'acquisition de cette infection. La transmission interhumaine est exceptionnelle. Plusieurs cas font état de la survenue de lésions d'ulcère de Buruli sur le site d'un traumatisme cutané, par exemple après une injection hypodermique, un coup de fusil, une blessure par pierre ou une écharde. Récemment, un cas d'ulcère de Buruli a été décrit après morsure humaine, la morsure ayant uniquement permis l'inoculation des tissus sous-jacents par *M. ulcerans* préalablement présent à la surface cutanée.

3.3. Épidémiologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire appliquées à des fins épidémiologiques n'ont malheureusement pas permis de faire progresser les connaissances dont nous disposons sur le mode de transmission de la maladie et ce, pour deux raisons principales :

- jusqu'à très récemment, aucune souche isolée de l'environnement n'était disponible et donc aucune comparaison entre les souches isolées de l'environnement et celles cultivées à partir des prélèvements cliniques n'avait pu être réalisée ;
- diverses techniques ont été appliquées au typage des isolats cliniques de *M. ulcerans* : amplification de séquences répétées dans le génome bactérien par rep-PCR, électrophorèse en champ pulsé, ribotypage, analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction après amplification de la séquence d'insertion spécifique de *M. ulcerans* : IS2404-RFLP, polymorphisme des fragments amplifiés par PCR aléatoire ou *amplified fragment length polymorphism* (AFLP).

Aucune de ces techniques n'a jusqu'alors permis une discrimination suffisante entre les isolats pour contribuer aux études épidémiologiques sur l'ulcère de Buruli. En effet, seuls les isolats provenant de différents continents ont pu être distingués.

4. Aspects cliniques

L'ulcère de Buruli est une infection chronique nécrosante de la peau et de la graisse sous-cutanée qui évolue en trois phases : une phase pré-ulcéralive sous la forme d'un nodule, un placard ou un œdème indolore sans signes généraux d'infection, une phase ulcéralive avec de vastes ulcérations cutanées et une phase de cicatrisation, pas toujours spontanée, qui engendre des séquelles parfois très invalidantes (Fig. 6.3, voir atlas couleurs page 294).

À côté de cette forme « classique », qualifiée par certains auteurs de « nouvelle lèpre », deux autres formes sont de plus en plus fréquemment décrites : des formes mixtes ou multifocales associant des nodules ou des placards à des ulcérations et des formes disséminées ou à localisation osseuse,

particulièrement graves à cause des complications de type ostéomyélique (jusqu'à 14 % des cas) pouvant conduire à des amputations (Fig. 6.3, voir atlas couleurs page 294).

Le siège des lésions est principalement localisé aux membres, les membres inférieurs étant au moins deux fois plus souvent atteints que les membres supérieurs. Les lésions de la tête et du tronc ne représentent qu'environ 8 % des lésions recensées d'ulcère de Buruli. Enfin, les paumes des mains et les plantes des pieds ne sont quasiment jamais le siège des ulcérations dues à *M. ulcerans* bien qu'au premier rang des parties du corps exposées à l'environnement. Des cas récurrents ont été décrits. Les lésions surviennent soit sur les parties du corps atteintes initialement (environ 5 à 30 % des cas selon les études) et sont attribuées à une excision chirurgicale insuffisante, soit à distance de la ou des lésion(s) initiale(s) à la suite d'une dissémination par voie hématogène ou lymphatique. La sévérité et le type des lésions semblent être variables selon les régions géographiques considérées ; ainsi, les formes en plaques et les ostéomyélites sont actuellement décrites sur le continent africain exclusivement. Il semblerait donc que des différences de niveau de virulence existent entre les isolats, les souches africaines étant les plus virulentes par rapport aux souches d'Amérique du Sud, d'Australie et de Chine.

Quoi qu'il en soit, les répercussions économiques, sociales et familiales de ces lésions sont très importantes puisque les séquelles engendrées par la maladie rendent les patients handicapés physiques permanents. De plus, l'absence de fièvre et le caractère indolore de la lésion initiale entraînent un diagnostic relativement tardif, celui-ci étant posé dans plus de 95 % des cas au stade ulcéré, c'est-à-dire à un stade nécessitant une intervention chirurgicale relativement lourde avec ablation des tissus nécrosés.

5. Pathogénie

À ce jour, les connaissances ne nous permettent pas de savoir si toutes les personnes infectées développeront la maladie. Toutefois, lorsque l'ulcère de Buruli se déclare, la pathogenèse de la maladie peut être schématisée comme dans la Fig. 6.4. Une fois introduit dans le tissu sous-cutané, *M. ulcerans* prolifère et élabore une toxine ayant une affinité pour les tissus graisseux. La nécrose qui en résulte constitue un excellent terrain pour la prolifération de *M. ulcerans*, lui permettant dans certains cas d'atteindre l'os par contiguïté. La toxine produite par *M. ulcerans* a été purifiée et caractérisée ; son rôle dans la virulence des souches de *M. ulcerans* et la pathogenèse de l'ulcère de Buruli est majeur. Il s'agit d'une toxine lipidique dont la structure est celle d'un macrolide dérivé d'un polykétide. Cette toxine nécrosante, immunosuppressive et cytostatique a été appelée mycolactone. Il s'agit de la première toxine de ce type purifiée à partir d'une bactérie pathogène. Récemment, Small et al. ont démontré qu'il existe en fait plusieurs variants de la mycolactone, retrouvés chez des isolats d'origines géographiques différentes, sans toutefois pouvoir relier la production de ces variants à un niveau de virulence particulier des isolats les produisant ou à la gravité de l'ulcère de Buruli engendré. Très récemment, Stinear et al. ont identifié les bases génétiques de la mycolactone en découvrant six gènes nécessaires et suffisants à la synthèse de cette toxine

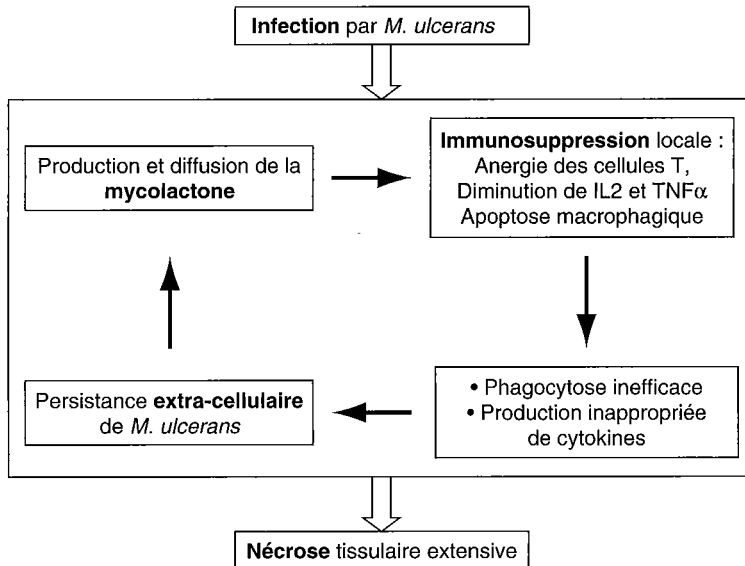


Figure 6.4. Représentation schématique de l'état actuel des connaissances sur l'implication de la mycolactone dans la pathogenèse de l'ulcère de Buruli.

et en caractérisant le plasmide portant ces gènes. Cette découverte représente une avancée importante des connaissances sur l'ulcère de Buruli car elle démontre pour la première fois que la virulence d'une mycobactérie peut être à médiation plasmidique, identifiant ainsi une nouvelle cible potentielle dans la lutte contre l'ulcère de Buruli. De nombreux travaux sont actuellement en cours de réalisation pour identifier la voie de biosynthèse de cette toxine mais aussi pour évaluer les perspectives vaccinales que peut offrir cette molécule. Au cours de la phase de nécrose, la réponse immunitaire de l'hôte est incapable de détruire *M. ulcerans*, et l'intradermoréaction à la buruline, un extrait brut de lysat de *M. ulcerans*, reste négative. Le mécanisme de survenue de la phase de cicatrisation demeure inconnu. À ce stade, l'intradermoréaction à la buruline se positive, ce qui suggère que l'hôte est alors en mesure de développer une réaction immunitaire à médiation cellulaire.

L'implication d'autres facteurs de virulence dans la pathogenèse de l'ulcère de Buruli semble tout à fait probable. En effet, des activités enzymatiques phospholipase C et phospholipase D, déjà associées à la virulence de plusieurs autres espèces de mycobactéries, ont été mises en évidence chez *M. ulcerans*.

6. Diagnostic

6.1. Diagnostic clinique

La diversité des formes cliniques de l'ulcère de Buruli rend le diagnostic clinique relativement délicat, surtout en ce qui concerne les formes non ulcérées. Toutefois, ce diagnostic peut être posé par du personnel soignant expérimenté

travaillant en zone d'endémie d'ulcère de Buruli. Pour chacune des présentations cliniques de l'ulcère de Buruli, de nombreux diagnostics différentiels sont à envisager, que ceux-ci soient d'origine infectieuse bactérienne (actinomycose, autres mycobactérioses...) ou parasitaire (leishmaniose, onchocercose...) ou d'origine non infectieuse (ulcères phagédéniques, ulcères veineux, kystes, lymphadénites, cancers...).

Ce diagnostic clinique repose essentiellement sur l'aspect et le site des lésions, leur caractère souvent indolore, mais aussi sur l'âge des patients, leur lieu d'habitation et la notion d'un éventuel séjour en zone d'endémie (Tableau 6.1).

6.2. Diagnostic biologique

Il comprend deux volets : l'examen histopathologique et le diagnostic bactériologique. Le développement de différentes techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic biologique de l'ulcère de Buruli a permis de raccourcir le délai d'obtention des premiers résultats, mais ces techniques ne sont pas à la portée de tous les laboratoires, notamment dans les pays en voie de développement. De plus, le diagnostic histopathologique et/ou bactériologique traditionnel reste indispensable pour confirmer l'existence de foyers d'ulcère de Buruli dans des régions jusque-là considérées comme non endémiques.

Toutefois, que ce diagnostic fasse appel aux techniques traditionnelles ou aux techniques moléculaires, certaines étapes sont capitales afin de rendre le diagnostic possible : il s'agit principalement de la qualité de l'échantillon à

Tableau 6.1

Éléments du diagnostic de l'ulcère de Buruli

Critères cliniques : en zone d'endémie, ils peuvent suffire à une personne expérimentée pour poser le diagnostic d'ulcère de Buruli	
• Habitat, séjour ou voyage en zone d'endémie	Zone intertropicale
• Âge du patient	Enfant d'âge inférieur à 15 ans
• Localisation des lésions	Membres, principalement les membres inférieurs
• Aspect caractéristique des lésions	Nodule, papule, placard, ulcérations plus ou moins vastes à bords décollés, souvent indolores...
Critères biologiques : le diagnostic d'ulcère de Buruli sera posé si au moins deux des quatre critères suivants s'avèrent positifs	
• Examen direct après coloration de Ziehl-Neelsen	Présence de BAAR, localisation essentiellement extracellulaire
• Culture	Positive à <i>M. ulcerans</i> : culture lente, à 32 °C, scotochromogène, résistante à l'isoniazide...
• Aspect histopathologique	Nécrose extensive, panniculite, cellules graisseuses fantômes, vascularite, amas de BAAR
• PCR spécifique de <i>M. ulcerans</i> (IS2404)	Obtention d'un amplicon de taille attendue

analyser, des conditions de transport des échantillons au laboratoire et des conditions de culture.

6.2.1. Prélèvements

Le prélèvement à réaliser dépend de la forme clinique de l'ulcère de Buruli. D'une manière générale, il convient d'éviter le recueil des exsudats cutanés par écouvillonnage, l'examen microscopique de ce type de prélèvement présentant une sensibilité relativement faible.

Les lésions non ulcéraives sont excisées et le prélèvement se fera au centre présumé des lésions.

Pour les lésions ulcéraives, les prélèvements de choix sont des biopsies de la base nécrosée et des bords creusés de l'ulcère comprenant du tissu sous-cutané. En cas d'infection osseuse, des prélèvements obtenus par curetage osseux sont recommandés.

6.2.2. Diagnostic anatomopathologique

Il permet l'obtention de résultats dans des délais relativement brefs. Les tissus prélevés doivent être fixés dans du formol. Les coupes et les colorations sont réalisées par les méthodes habituelles utilisant notamment les colorations à l'hématoxyline-éosine et au Ziehl-Neelsen. Les analyses histopathologiques révèlent une ulcération de l'épiderme avec une néo-épithélisation des bords de l'ulcère, le derme et le tissu sous-cutané montrent des zones de nécrose extensive, le pannicule adipeux est inflammatoire et les cellules graisseuses apparaissent comme des cellules fantômes, les parois des vaisseaux sanguins sont épaissies et leur lumière rétrécie, des amas de bacilles peuvent être observés (Fig. 6.5, voir atlas couleurs page 295).

6.2.3. Diagnostic bactériologique

6.2.3.1. Transport au laboratoire

La température optimale de croissance de *M. ulcerans* est de 32 °C. Toutefois, *M. ulcerans* est très sensible aux températures plus élevées qui peuvent soit le tuer, soit retarder sa croissance déjà lente. La température lors du transport vers le laboratoire joue donc un rôle critique, notamment pour les échantillons recueillis dans les pays tropicaux. Le transport au laboratoire doit être rapide. Les meilleurs résultats de cultures sont obtenus lorsque les échantillons sont mis en culture directement après leur prélèvement (> 80 % de positivité). Si les échantillons ne peuvent être traités dans la journée, ils devront être conservés à +4 °C ou mieux l'utilisation d'un milieu de transport sera vivement conseillée. La congélation n'est pas recommandée car *M. ulcerans* est très sensible aux cycles de congélation et de décongélation. Trois milieux de transports adaptés à *M. ulcerans* sont actuellement disponibles (S, P et P5). Ces trois milieux sont des milieux de Dubos rendus sélectifs par adjonction d'antibiotiques. Seul le milieu P5 est un milieu semi-solide permettant le maintien de faibles teneurs en oxygène favorisant la culture de *M. ulcerans* et permettant l'obtention de cultures positives jusqu'à sept semaines après le prélèvement, contre trois semaines pour les deux autres types de milieux de transport. Ces trois milieux donnent des résultats comparables avec environ

40 % de cultures primaires positives. Le succès des cultures primaires ne dépend pas du temps passé dans le milieu de transport, mais du nombre de bacilles acido-alcoolo-résistants viables présents initialement dans l'inoculum.

6.2.3.2. Méthodes de décontamination

La viabilité de *M. ulcerans* est affectée par toutes les méthodes de décontamination actuellement utilisées pour son isolement à partir d'échantillons cliniques. Le choix de la méthode sera donc adapté au cas par cas, en fonction du taux de contamination potentiel des échantillons à analyser. La technique utilisant la N-acétyl-L-cystéine, bien que tuant environ 30 % des bacilles, donne les meilleurs résultats.

6.2.3.3. Examen direct

Les techniques classiquement utilisées pour les autres mycobactéries, coloration de Ziehl-Neelsen et à l'auramine, permettent la mise en évidence d'amas de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) dans les échantillons analysés (Fig. 6.6, voir atlas couleurs page 295). Leur localisation est principalement extracellulaire. Elles permettront également de confirmer le caractère acido-alcoolo-résistant et d'observer la morphologie bactérienne à partir des cultures (Fig. 6.7B et C, voir atlas couleurs pages 295, 296).

6.2.3.4. Culture

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente qui présente un certain nombre d'exigences et de préférences culturelles (température, teneur en oxygène). Le diagnostic bactériologique de l'ulcère de Buruli par culture est donc délicat. La culture primaire de *M. ulcerans* à partir des échantillons cliniques reste difficile, les pourcentages de cultures primaires positives étant étroitement corrélés à la qualité du prélèvement, ainsi qu'aux conditions de conservation et de transport des échantillons. Quelle que soit la technique utilisée, la température optimale de développement de *M. ulcerans* est de 32 °C (30–33 °C) et il ne se cultive pas, à l'exception de très rares souches, à 37 °C ;

La culture de *M. ulcerans* peut être réalisée :

- sur milieu de Löwenstein-Jensen : les colonies obtenues sont rugueuses et jaunâtres (Fig. 6.7A, voir atlas couleurs page 295). La croissance visible de la bactérie nécessite le plus souvent six à huit semaines d'incubation à 32 °C ;
- en milieu liquide dans le système Bactec® : l'obtention de cultures primaires positives sera optimisée par adjonction dans le milieu de culture de jaune d'œuf à la concentration finale de 1,25 % et par application d'une atmosphère de culture dont la teneur en oxygène est réduite à 2,5 %.

La culture est donc longue, délicate et non contributive au diagnostic qui est essentiellement clinique. Cependant, il reste très important de pouvoir cultiver *M. ulcerans* à partir de différents prélèvements d'origine environnementale, animale ou humaine afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cette infection.

6.2.3.5. Tests cultureux et biochimiques d'identification de *M. ulcerans*

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente : six à huit semaines pour les cultures primaires, environ 15 jours pour les subcultures. Les colonies sont pigmentées en jaune et les tests de photoréactivité montrent que la bactérie est

scotochromogène, la pigmentation se développant que les cultures soit placées dans l'obscurité ou à la lumière (Fig. 6.7A, voir atlas couleurs page 295). Elle ne réduit pas les nitrates et ne possède pas de catalase. L'hydrolyse du Tween 80 est négative. Elle est résistante à l'isoniazide et sensible à l'hydroxylamine et au p-nitrobenzoate. Certaines souches africaines possèdent en outre une activité enzymatique de type phosphatase acide.

6.2.3.6. Techniques moléculaires

Depuis 1997, différentes techniques d'amplification génique par PCR ont été appliquées au diagnostic des infections à *M. ulcerans*. La principale est basée sur l'amplification d'une portion du gène codant pour l'IS2404 après une étape de lyse thermo-alcaline de la bactérie puis une étape d'extraction et de purification de l'ADN. Outre la rapidité d'obtention des résultats, cette technique présente une spécificité de 100 % et une sensibilité de 96 % par rapport à la culture. Elle est également très utile pour établir le diagnostic quand la culture et les analyses histopathologiques sont négatives pour *M. ulcerans*. Comme pour toutes les techniques d'amplification génique, ce diagnostic moléculaire nécessite un matériel spécifique, des locaux adaptés et du personnel qualifié. Les principaux inconvénients sont la possibilité d'obtention de résultats faussement négatifs dus à la présence éventuelle d'inhibiteurs de l'amplification et, à l'inverse, la possibilité d'obtention de résultats faussement positifs par contamination des prélèvements.

6.2.4. Interprétation

Compte tenu des limites de chacune des techniques de diagnostic biologique, notamment de la sensibilité variable de ces techniques selon le stade clinique, le diagnostic biologique d'ulcère de Buruli ne sera posé que si au moins deux des critères suivants s'avèrent positifs :

- présence de BAAR sur frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen ;
- culture positive à *M. ulcerans* ;
- histopathologie évocatrice des biopsies ;
- obtention d'un signal d'amplification par PCR spécifique de *M. ulcerans*.

Une synthèse des critères cliniques et biologiques permettant de poser le diagnostic d'ulcère de Buruli est présentée dans le Tableau 6.1.

6.2.5. Diagnostic biologique indirect

Peu de données sont actuellement disponibles sur la réponse immunitaire des patients à l'infection par *M. ulcerans* et il n'existe, à ce jour, aucun test sérologique permettant de diagnostiquer une telle infection. Deux protéines de 70 kDa et 38/36 kDa, identifiées récemment, constitueraient deux antigènes candidats pour le développement d'un test sérologique spécifique de *M. ulcerans*.

7. Traitement

7.1. Traitement chirurgical

Actuellement, seul le traitement chirurgical a une efficacité prouvée. Il ne peut cependant être réalisé que dans certains centres médicaux disposant de

plateaux techniques et de personnel spécialisés. Il comprend l'excision des lésions puis des sutures pour les lésions non ulcérées localisées, ou l'ablation des tissus malades suivie de greffes cutanées pour les ulcères et les lésions non ulcérées étendues (oedèmes, plaques). Cependant, pour les malades présentant un stade très avancé d'ulcère de Buruli avec atteintes osseuses, l'ablation des tissus atteints nécessite parfois l'amputation. Les hospitalisations ainsi que la rééducation sont alors longues, l'incapacité physique définitive et les conséquences économiques et sociales préjudiciables tant pour le malade que pour sa famille.

La physiothérapie est indispensable pour éviter les cicatrices rétractiles et les déformations des membres, l'utilisation d'attelles de posture est notamment conseillée ; des interventions chirurgicales réparatrices peuvent être envisagées dans les cas les plus invalidants, incluant les cas d'atteinte faciale ou génitale.

7.2. Traitement médicamenteux

M. ulcerans est sensible aux thérapeutiques antimycobactériennes traditionnelles, à l'exception de l'isoniazide et de l'éthambutol, ainsi que de la clofazimine utilisée dans le traitement de la lèpre. L'efficacité de plusieurs molécules antimycobactériennes a été testée in vitro sur diverses souches de *M. ulcerans*. Ces études ont démontré que la rifampicine, la clarithromycine, l'amikacine, l'ofloxacine, la sparfloxacine et la ciprofloxacine présentaient une activité in vitro sur *M. ulcerans*. D'autres études menées in vivo chez la souris ont démontré l'inefficacité de la sparfloxacine et de la minocycline ; elles ont également souligné que l'activité de la clarithromycine sur *M. ulcerans* était uniquement bactériostatique, des infections survenant chez la souris à l'arrêt du traitement. Seules la rifabutine, la rifampicine, la streptomycine et l'amikacine constitueraient donc des candidats potentiels pour le traitement antibiotique de l'ulcère de Buruli chez l'homme. D'une manière générale, ces antibiotiques sont considérés comme inefficaces dans les stades tardifs d'ulcère de Buruli. Cette inefficacité semble principalement liée à une mauvaise diffusion des antibiotiques dans les tissus adipeux sous-cutanés peu vascularisés et nécrosés dans lesquels se localise *M. ulcerans*.

Cependant, ces antibiotiques, utilisés en association, peuvent arrêter la progression de la maladie s'ils sont administrés à un stade précoce. Ils sont également utilisés en peropératoire pour éviter la dissémination par voie hématogène de l'infection. En postopératoire, ces traitements pourraient également prévenir les rechutes.

7.3. Autres traitements liés aux caractéristiques de *M. ulcerans*

La sensibilité à la chaleur de *M. ulcerans* a conduit à envisager l'utilisation de températures élevées pour traiter les lésions d'étendue limitée. La guérison de ces lésions est favorisée par la réalisation d'un échauffement local continu à 40 °C pendant plusieurs semaines, que celui-ci soit associé ou non à un acte chirurgical d'exérèse. Cet échauffement est le plus souvent réalisé à l'aide de manchons à circulation d'eau chaude adaptés à la zone à traiter.

Certains auteurs ont également pensé que l'oxygénothérapie hyperbare serait efficace sur *M. ulcerans* qui préfère la microaérophilie mais, à ce jour, les résultats obtenus chez l'homme se sont avérés décevants.

8. Prévention, stratégie de lutte et perspectives

Aucun traitement préventif n'est actuellement disponible. Seule la vaccination par le bacille de Calmette et Guérin (BCG) semblerait induire une protection contre l'ulcère de Buruli ou tout du moins permettrait de retarder le délai d'apparition des symptômes. En revanche, l'efficacité de cette vaccination a été démontrée dans la prévention des complications ostéomyélitiques chez les enfants présentant un ulcère de Buruli.

Les mesures préventives sont, quant à elles, liées aux contacts avec le biotope hydrotellurique. Il faut éviter, autant que faire se peut, les contacts avec les eaux stagnantes et marécageuses.

La stratégie de lutte contre l'ulcère de Buruli passe donc par deux voies principales :

- la réalisation de campagnes d'informations afin de permettre un diagnostic plus précoce de l'ulcère de Buruli, à un stade où les traitements antibiotiques peuvent s'avérer encore efficaces ou bien pour assurer la prise en charge de lésions d'étendue limitée pour lesquelles les actes chirurgicaux ne seraient pas trop mutilants ;

- la coordination de la recherche afin de mieux connaître cette maladie et son agent causal et, de ce fait, mieux les prévenir et les combattre. Il reste en effet encore à élucider totalement le mode de transmission de l'ulcère de Buruli et à identifier les vecteurs et réservoirs potentiels de *M. ulcerans* pour tenter d'enrayer la recrudescence de cas d'ulcère de Buruli, notamment en Afrique de l'Ouest, en appliquant des mesures préventives adaptées.

Par ailleurs, et dans une toute autre voie de recherche, le séquençage total du génome de *M. ulcerans* qui est en cours de réalisation devrait fournir un grand nombre d'informations utiles pour lutter contre l'ulcère de Buruli. La recherche de traitements performants non chirurgicaux semble également indispensable.

Points forts

1. Agent infectieux : l'ulcère de Buruli, encore appelé ulcère de Bairnsdale, est causé par une mycobactérie atypique, *Mycobacterium ulcerans*.

2. Importance : l'ulcère de Buruli se situe au troisième rang des infections mycobactériennes chez l'homme derrière la tuberculose et la lèpre. *M. ulcerans* a été reconnu bactérie pathogène émergente par l'OMS en 1998. Dans certaines régions du monde, l'incidence de l'ulcère de Buruli dépasse celle de la tuberculose. Actuellement, l'ulcère de Buruli a été identifié dans une trentaine de pays.

3. Transmission : bien que le rôle des punaises aquatiques comme vecteurs de *M. ulcerans* soit fortement suspecté, le mode de transmission de la maladie n'est pas encore totalement élucidé.
4. Patients : la majorité des patients sont des enfants vivant dans des zones rurales à proximité de rivières ou de marais. L'infection par le VIH n'est pas un facteur de risque d'acquisition de l'ulcère de Buruli.
5. Clinique : l'ulcère de Buruli débute par un nodule, une papule ou un œdème cutané indolore qui peut évoluer vers de vastes ulcérations dont la cicatrisation engendrera des séquelles parfois très invalidantes avec amputations ou perte d'organes. Les membres, particulièrement les membres inférieurs, sont préférentiellement le siège de ces lésions. *M. ulcerans* peut aussi causer des formes osseuses et ostéoarticulaires graves.
6. Pathogénie : le rôle de la mycolactone, exotoxine lipidique, nécrosante, immunosuppressive et cytostatique produite par *M. ulcerans*, est majeur dans la pathogenèse de l'ulcère de Buruli.
7. Diagnostic : le diagnostic est principalement clinique ; le diagnostic bactériologique fait appel aux mêmes techniques que celui des autres mycobactérioses : examen direct après coloration de Ziehl-Neelsen, culture et techniques moléculaires. Ces dernières offrent de nouvelles perspectives pour le diagnostic précoce de l'ulcère de Buruli.
8. Traitement : le traitement antibiotique est inefficace sur les lésions évoluées et le traitement proposé actuellement est purement chirurgical avec excision des lésions et nécessite, dans les cas les plus graves, des hospitalisations de longue durée et très coûteuses. Seuls une détection et un traitement précoces permettent de prévenir l'apparition des complications.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier très sincèrement Anne-Catherine Artigues pour la réalisation de certaines photographies numériques illustrant ce chapitre, ainsi que Karin Janssens pour son aide concernant la rédaction de ce manuscrit.

Pour en savoir plus

La quasi-totalité des références citées ci-après est accessible librement sur Internet.

Le site Internet de l'Organisation mondiale de la santé donne accès à de nombreuses informations et documents sur l'ulcère de Buruli à l'adresse suivante : www.who.int/gtb-buruli/

Des ouvrages variés disponibles en version anglaise, en version française et, pour certains, en version espagnole, ainsi que des outils pédagogiques type bande dessinée peuvent être téléchargés gratuitement à partir de ce site : www.who.int/gtb-buruli/publications/index.html

Ulçère de Buruli – Infection à *Mycobacterium ulcerans* (2000). Edité par Dr Kingsley Asiedu, Dr Robert Scherpbier, Dr Mario Raviglione sous la référence WHO/CDS/CPE/GBUI/2000.1
Diagnostic de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (2001). Edité par Pr Françoise Portaels, A/Pr Paul Johnson, Dr Wayne M. Meyers sous la référence WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.4.

Prise en charge de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (2001). Edité par Dr John Buntine, Dr Kimball Crofts sous la référence WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.3

De nombreuses publications internationales concernant les différents volets de l'ulcère de Buruli et son agent infectieux, *M. ulcerans*, peuvent également être téléchargés gratuitement sur le site PubMed du National Center for Biotechnology Information à l'adresse suivante : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Bentoucha A, Robert J, Dega H, Lounis N, Jarlier V, Grosset J. Activities of new macrolides and fluoroquinolones against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 ; 45 : 3109-12.

Chemlal K, Huys G, Fonteyne PA, Vincent V, Lopez AG, Rigouts L, et al. Evaluation of PCR-restriction profile analysis and IS2404 restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification and typing of *Mycobacterium ulcerans* and *M. marinum*. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 3272-8.

Dega H, Robert J, Bonnafous P, Jarlier V, Grosset J. Activities of several antimicrobials against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ; 44 : 2367-72.

Dobos KM, Spotts EA, Marston BJ, Horsburgh CR Jr, King CH. Serologic response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium ulcerans* during Buruli ulcer disease. *Emerg Infect Dis* 2000 ; 6 : 158-64.

George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL. A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in Guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 2000 ; 68 : 877-83.

Gomez A, Mve-Obiang A, Vray B, Remacle J, Chemlal K, Meyers WM, et al. Biochemical and genetic evidence for phospholipase C activity in *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 2000 ; 68 : 2995-7.

Gooding TM, Johnson PD, Campbell DE, Hayman JA, Hartland EL, Kemp AS, et al. Immune response to infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 2001 ; 69 : 1704-7.

Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 2002 ; 68 : 4623-8.

Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK. *Mycobacterium ulcerans* infection developing at sites of trauma to skin. *Am J Trop Med Hyg* 1974 ; 23 : 919-23.

Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, Small PLC. Heterogeneity of mycolactone toxins produced by *Mycobacterium ulcerans* : implications on virulence. *Infect Immun* 2003 ; 71 : 774-83.

Palomino JC, Obiang AM, Realini L, Meyers WM, Portaels F. Effect of oxygen on growth of *Mycobacterium ulcerans* in the Bactec system. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 3420-2.

Palomino JC, Portaels F. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the Bactec system. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 402-8.

Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM. Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). *Lancet* 1999 ; 353 : 986.

Portaels F, Chemlal K, Elsen P, Johnson PDR, Hayman JA, Kirkwood R, et al. *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. In : Collins MT, Manning B, Eds. *Mycobacterial infections in domestic and wild animals*. Office International de Epizooties. Scientific and Technical Review Paris 2001 ; 20 : 252-64.

Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Steunou C, Zinsou C, Guedenon A, Meyers WM. Prophylactic effect of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against osteomyelitis in

children with *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli Ulcer). Clin Diagn Lab Immunol 2002 ; 9 : 1389-91.

Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, Stinear T, et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. Appl Environ Microbiol 1997 ; 63 : 4135-8.

Ross BC, Marino L, Oppedisano F, Edwards R, Robins-Browne RM, Johnson PD. Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 1696-700.

Stinear T, Davies JK, Jenkin GA, Hayman JA, Oppedisano F, Johnson PD. Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR. Appl Environ Microbiol 2000 ; 66 : 3206-13.

Stinear TP, Jenkin GA, Johnson PD, Davies JK. Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. J Bacteriol 2000 ; 182 : 6322-30.

Stinear T, Ross BC, Davies JK, Marino L, Robins-Browne RM, Oppedisano F, et al. Identification and characterization of IS2404 and IS2606 : two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1018-23.

Stinear TP, Mve-Obiang A, Small PL, Frigui W, Pryor MJ, Brosch R, et al. From the cover : giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. Proc Natl Acad Sci USA 2004 ; 101 : 1345-9.