

Diagnostic par PCR de l'infection due à *Mycobacterium ulcerans*: à propos de trois cas observés en Guyane Française.

A. Ménard (1), P. Couppié (2), D. Sainte-Marie (2) & R. Pradinaud (2)

(1) Service des maladies infectieuses et tropicales, CHU Nord, chemin des Bourrelys, 13015 Marseille, France. Tél:04-91-96-89-35. Email : ameliemenard@hotmail.com
(2) Service de dermatologie, Centre hospitalier de Cayenne, Guyane Française.

Manuscrit n°2472/DT 6. "Dermatologie tropicale". Reçu le 25 septembre 2002. Accepté le 27 novembre 2003.

Summary: Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection by PCR : about three cases observed in French Guiana.

Mycobacterium ulcerans infection is the third most important mycobacterial infection in the world. It has been described in many different countries including French Guiana. The diagnosis of *M. ulcerans* infection by culture is often difficult because culture is hard to perform in endemic areas and their sensitivity is not reliable. As a result the diagnosis of this infection is often delayed. However, molecular methods are now available to diagnose rapidly infections by *M. ulcerans* and distinguish it from other mycobacteria. We report three cases of skin infection due to *M. ulcerans* observed in French Guiana. Diagnosis was initially made by polymerase chain reaction and was confirmed later by culture (in two patients) and inoculation to mice (in one patient). A faster diagnosis of *M. ulcerans* infection should lead to a better prognosis of this infection.

Résumé :

L'infection due à *Mycobacterium ulcerans* est une maladie de plus en plus répandue dans le Monde, principalement en Afrique de l'Ouest mais aussi dans certains pays d'Amérique latine comme la Guyane Française. Le seul argument formel du diagnostic est la culture, qui est difficilement applicable en zone d'endémie et manque de sensibilité. Récemment la biologie moléculaire a beaucoup amélioré le diagnostic de l'infection par *Mycobacterium ulcerans*. Nous rapportons 3 cas d'infections dues à *Mycobacterium ulcerans* observés en Guyane française. Le diagnostic a été fait par PCR, puis confirmé par une culture positive (deux cas) ou l'inoculation à la souris (un cas). La réduction du délai diagnostique de l'infection par *Mycobacterium ulcerans*, à l'aide de la biologie moléculaire, devrait permettre d'améliorer le pronostic de cette mycobactériose grâce à un traitement adapté plus précoce.

Buruli ulcer
Mycobacterium ulcerans
diagnosis
PCR
polymerase chain reaction
French Guiana
South America

ulcère de Buruli
Mycobacterium ulcerans
diagnostic
PCR
amplification génique en chaîne
Guyane française
Amérique du Sud

Introduction

Au cours des dernières années, l'ulcère dû à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli) est apparu comme une cause de plus en plus importante de morbidité dans le monde (11). En zone d'endémie le diagnostic est clinique, évoqué devant toute ulcération nécrotique rapidement extensive, mais la phase pré-ulcérate peut poser des problèmes de diagnostic différentiel. L'amplification génique par PCR du gène codant l'ARN 16S ribosomique a révolutionné l'approche diagnostique et taxonomique en bactériologie. Elle permet de réduire le délai diagnostique de l'infection par *Mycobacterium ulcerans* et, par là-même, d'améliorer le pronostic de cette affection (1). Nous rapportons trois cas d'infection par *M. ulcerans* observés en Guyane Française qui illustrent l'intérêt de la PCR dans le diagnostic de cette mycobactériose.

Patients et méthodes

Les patients ont été pris en charge dans le service de dermatovénérologie du Centre hospitalier de Cayenne, en Guyane Française, durant la période de novembre 1998 à décembre 1999. Le diagnostic a été évoqué devant une infection cutanée chronique résistante à une antibiothérapie adaptée au spectre bactérien des infections cutanées les plus courantes (streptocoques, staphylocoques). Chaque patient a bénéficié d'une biopsie cutanée des berges de l'ulcère ayant fait l'objet d'un examen anatomo-pathologique dans le laboratoire d'anatomopathologie du Centre hospitalier de Cayenne (Dr C. SARROUY), et d'un examen direct après coloration de Zielh dans le laboratoire de bactériologie du Centre hospitalier de Cayenne (Dr P. COTTELON). L'examen histologique était considéré comme évocateur d'une infection cutanée par une mycobactérie devant la présence

d'un infiltrat lympho-histiocytaire dermique avec une nécrose éosinophile hypodermique. Au stade chronique, l'examen devait montrer la présence d'un granulome géantocellulaire. Un fragment de la biopsie cutanée a été envoyé par chronopost dans le service de bactériologie du centre hospitalier universitaire d'Angers (Pr B. CARBONNELLE) afin d'effectuer une PCR pour *Mycobacterium ulcerans* et une mise en culture sur milieux de Bactec et de Lowenstein. Une inoculation à la souris était aussi réalisée selon les techniques exposées dans le travail de B. C. ROSS et coll (in: 11).

Le traitement était chirurgical. Un traitement médical par antimycobactériens a complété le traitement chirurgical dans les formes sévères.

Résultats

Le premier cas était celui d'une femme de 43 ans qui présentait une ulcération chronique de la jambe droite évoluant depuis dix mois et apparue après un traumatisme sur un grillage dans la région de Kourou. Il n'existait pas de signes généraux et locaux inflammatoires. La biopsie cutanée a montré des bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) à l'examen direct, et une nécrose éosinophile associée à un infiltrat lympho-histiocytaire dermo-hypodermique à l'examen histologique. La PCR pour *Mycobacterium ulcerans* était positive. Les cultures sur milieux de Bactec et de Lowenstein restaient stériles trois mois plus tard et une souris inoculée sur huit présentait des signes d'infection par cette mycobactérie après trois mois. La patiente a bénéficié d'une exérèse chirurgicale de son ulcère sans récurrence après deux ans.

Le second patient était un homme de 57 ans qui présentait depuis quatre mois, après un traumatisme lors d'un débroussaillage dans l'est de la Guyane, une dermo-hypodermite nodulaire disséminée à la jambe droite et au bras droit dans un contexte d'altération fébrile de l'état général. Ces nodules ont fistulisé à la peau, réalisant dans un second temps des ulcères creusants. Ce patient avait reçu quatre cures d'antibiotique sans succès. La biopsie cutanée a montré de très rares BAAR à l'examen direct. L'aspect histologique était compatible avec celui d'une infection par mycobactérie. La PCR pour *Mycobacterium ulcerans* était positive. Les cultures sur milieux de Bactec étaient positives après 5 semaines. Celles effectuées sur milieu de Lowenstein et par inoculation sur souriceau restaient stériles trois mois plus tard. Le patient a guéri très lentement après une intervention chirurgicale délabrante, suivi d'une antibiothérapie par rifampicine et clofazimine pendant 6 mois. Un an plus tard, il n'existait pas de récurrence, mais de lourdes séquelles, du fait d'une diminution de l'amplitude articulaire de sa cheville et de son coude droits.

La troisième patiente était une femme de 37 ans qui présentait depuis trois mois une dermo-hypodermite de la jambe gauche non inflammatoire, chronique, apparue après une chute dans les cascades de Fourgassier, à l'est de la Guyane. La biopsie cutanée réalisée n'a pas montré de BAAR à l'examen direct. L'examen histologique montrait la présence d'un granulome géantocellulaire. La PCR pour *Mycobacterium ulcerans* était positive. Les cultures sur milieux de Bactec étaient positives après 5 semaines d'incubation. Celles effectuées sur milieu de Lowenstein sont restées négatives. L'examen des souriceaux a permis de mettre en évidence des signes caractéristiques d'infection par *M. ulcerans* trois mois après l'inoculation. La patiente a bénéficié d'une exérèse complète de sa lésion, sans récurrence à deux ans.

Discussion

Après la tuberculose et la lèpre, l'infection par *Mycobacterium ulcerans* est la troisième des mycobactérioses les plus courantes chez le sujet immunocompétent. Ces dernières années, cette pathologie est rapidement apparue comme une cause de plus en plus importante de morbidité dans le monde. À titre d'exemple, en Afrique de l'Ouest, la prévalence atteint 15 % dans certains villages de Côte d'Ivoire (7). En 1997, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) l'a reconnu comme une maladie réémergente. En juillet 1998, à Yamoussoukro, un programme de lutte mondiale contre cette affection a été mis en route par l'OMS (1).

Cette maladie a été signalée dans la plupart des pays de la zone inter-tropicale en Afrique, dans le Pacifique occidental, en Asie et en Amérique du Sud (9, 10). Un cas a déjà été rapporté en Guyane Française (5).

L'ulcère de Buruli pose des problèmes diagnostiques et thérapeutiques. Les seconds sont la conséquence des difficultés diagnostiques dans la mesure où le seul traitement, la chirurgie, est d'autant plus efficace et moins délabrant qu'il est précoce. Pourtant, il existe de nombreux moyens diagnostiques : recherche de BAAR à l'examen direct, examen histologique, culture sur milieux adaptés, inoculation à la souris et maintenant la biologie moléculaire. Mais tous ont des limites en terme de sensibilité, de spécificité, de délai ou de faisabilité.

L'examen direct en microscopie optique, après coloration à l'auramine et/ou coloration de Ziehl-Neelsen, a une sensibilité médiocre puisqu'elle oscille entre 13 % et 60 % (6, 7). De plus la spécificité est mauvaise puisqu'il n'est pas possible de faire la différence entre les différentes mycobactéries. Cette étape du diagnostic microbiologique reste néanmoins indispensable, surtout en zone d'endémie. Il semblerait que sa sensibilité soit augmentée s'il est pratiqué sur une biopsie, les mycobactéries se trouvant au centre et en profondeur de l'ulcération (6, 9). Dans nos cas, l'examen direct des biopsies cutanées a été positif deux fois sur trois.

Plusieurs auteurs ont souligné les difficultés rencontrées pour isoler *M. ulcerans* en culture primaire à partir d'échantillons cliniques (6, 7). Ces derniers sont souvent conservés et transportés dans de mauvaises conditions en zone tropicale. Un échantillon destiné à la mise en culture doit être prélevé dans des zones riches en bacilles (base nécrosée et bords de l'ulcération) et en bonne quantité, grâce à une biopsie réalisée au bistouri. Il doit être conservé à +4 °C dans un tube stérile ou immédiatement introduit dans un milieu de transport adapté type Bactec (8). La congélation, au contraire, n'est pas recommandée, comme pour les autres mycobactéries, très sensibles aux cycles de congélation et de dégel (4). *Mycobacterium ulcerans* pousse très lentement (en 8 à 15 semaines ou plus) et la culture est très peu sensible (15 % à 34 % des cas) mais spécifique (2, 9). Il existe un important contraste entre la grande richesse de certains frottis en BAAR et la négativité fréquente ou la faible positivité des primo-isolements (moins de 50 % des frottis positifs) (3, 9). Dans notre expérience de trois cas, le diagnostic a été confirmé dans deux cas avec un délai diagnostique de cinq semaines (culture positive sur milieu de Bactec ou Lowenstein) et, dans deux cas, par un effet cytopathogène après inoculation au souriceau.

L'examen anatomopathologique est d'un grand apport pour le diagnostic. Il met en évidence une nécrose éosinophile massive homogène, ischémique avec des lésions vasculaires majeures au niveau dermo-hypodermique et, parfois, au niveau graisseux. Une réaction macrophagique et, parfois, géantocellulaire existe à la périphérie de la nécrose, mais cette réaction inflammatoire demeure modérée et limitée. Cet

aspect histologique caractéristique a été décrit dans nos trois cas. Mais, selon GUARNER *et al.*, il est observé dans 55 % des cas seulement (6).

Nous n'avons pas effectué de tests sérologiques car il n'y a pas de diagnostic sérologique fiable en routine. Une étude retrouve une séropositivité chez 70,5 % des malades, mais aussi chez 37 % des sujets sains (3).

Les techniques de biologie moléculaire, et en particulier la PCR, permettent une détection rapide des mycobactéries. ROGALL *et al.* ont montré que l'amplification de la séquence 16S ARNr individualise, en position 1248, une guanine, nucléotide spécifique, permettant de différencier *Mycobacterium ulcerans* de *Mycobacterium marinum* (adénine en 1248) (11). Plus récemment, une équipe australienne a découvert 2 séquences cibles IS2404 et IS2606 sur l'ADN (numéro d'accès Genbank AF003002) contenant 12 paires de base chacune et codant respectivement une protéine de 327 et 445 acides aminés (13, 14). Ces mêmes auteurs viennent d'élargir cette méthode aux séquences directement adjacentes aux IS2404 et IS2606, ce qui permet d'augmenter la spécificité à 100 %, la sensibilité à 66,7 % et la reproductibilité. Ils ont, de plus, remis en cause la notion de variabilité géographique initialement suspectée pour cette mycobactérie (12). Ils retrouvent en effet le même polymorphisme de restriction et un séquençage identique pour des souches provenant d'Australie, de Papouasie-Nouvelle-Guinée ou du Surinam, chez l'homme comme chez l'animal. Ils nomment cette méthode la 2426PCR (13). Plus d'actualité, la Nested PCR de la région 2404 a été récemment validée par une équipe américaine (12).

Conclusion

Cinquante ans après la première description dans la littérature médicale et cent ans après le premier cas observé par COOK en Ouganda, l'infection par *Mycobacterium ulcerans* est devenue une maladie de plus en plus préoccupante. Les difficultés thérapeutiques pourraient être diminuées par la possibilité d'un diagnostic plus précoce de cette infection. C'est probablement l'association de l'examen anatomo-pathologique et de la biologie moléculaire qui est la plus intéressante comme le prouvent les trois cas rapportés ici.

Remerciements

Au professeur Eric CAUMES pour la relecture critique de cet article, au Dr SARROUY et son équipe pour la réalisation des examens anatomo-pathologiques, au service du Dr COTTELOU pour la réalisation des examens bactériologiques et au professeur B. CARBONNELLE et son équipe pour la réalisation des techniques de biologie moléculaire.

Références bibliographiques

1. AA - Rapport de la Conférence internationale sur la lutte et la recherche relative à l'ulcère de Buruli. Yamoussoukro (Côte d'Ivoire) 6-8 juillet 1998.
2. DEGA H, CHOSIDOW O, BARETE S, CARBONNELLE B, GROSSET J & JARLIER V - Infection à *Mycobacterium ulcerans*. *Ann Méd Interne*, 2000, **151**, 339-344.
3. 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**, 158-164.
4. DRANCOURT M, JARLIER V & RAOULT D - The environmental pathogen *Mycobacterium ulcerans* grows in amphibian cells at low temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**, 6403-6404.
5. DE GENTILE PL, MAHAZA C, ROLLAND F, CARBONNELLE B, VERRET JL & CHABASSE D - Ulcère cutané à *Mycobacterium ulcerans*: à propos d'une observation en provenance de Guyane Française. *Bull Soc Pathol Exot*, 1992, **85**, 212-214.
6. GUARNER J, BARTLETT J, WHITNEY EA, RAGHUNATHAN PL, STIENSTRA Y *et al.* - Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Emerg Infect Dis*, 2003, **9**, 651-656.
7. MARSTON BJ, DIALLO MO, HORSBURGH CR Jr, DIOMANDE I, SAKI MZ *et al.* - Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Côte d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 219-224.
8. PALOMINO JC, OBIANG AM, REALINI L, MEYERS WM & PORTAELS F - Effects of the decontamination methods and culture conditions on viability of *M. ulcerans* in the BACTEC system. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 402-408.
9. PETTIT JH, MARCHETTE NJ & REES RJ - *Mycobacterium ulcerans* infection; clinical and bacteriological study of the first cases recognized in South East Asia. *Br J Dermatol*, 1966, **78**, 187-197.
10. PSZOLLA N, SARKAR MR, STRECKER W, KERN P, KINZL L *et al.* - Buruli ulcer: a systemic disease. *Clin Infect Dis*, 2003, **37**, 78-82.
11. ROGALL •, FLOHR T & BOTTFGER EC - Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *Gen Microbiol*, 1990, **136**, 1915-1920.
12. STIENSTRA Y, VAN DER WERF TS, GUARNER J, RAGHUNATHAN PL, SPOTTS WHITNEY EA *et al.* - Analysis of an IS2404-based nested PCR for diagnosis of Buruli ulcer disease in regions of Ghana where the disease is endemic. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**, 794-797.
13. STINEAR T, DAVIES JK, JENKIN GA, PORTAELS F, ROSS BC *et al.* - PCR method for rapid genotype analysis of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**, 1482-1487.
14. STINEAR T, ROSS BC, DAVIES JK, MARINO L, ROBINS-BROWNE RM *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**, 1018-1023.