

Chapitre 3

Microbiologie fondamentale

Pr. Françoise Portaels

M. ulcerans appartient à un groupe de mycobactéries potentiellement pathogènes pour l'homme et l'animal. On les appelle parfois “ mycobactéries opportunistes ” ou “ agents pathogènes occasionnels ”. On trouve la plupart des espèces appartenant à ce groupe presque partout dans la nature et elles peuvent devenir pathogènes dans des circonstances particulières. Certaines d'entre elles n'ont été que rarement (ex. : *M. malmoense*) ou même jamais (ex. : *M. ulcerans*) isolées de l'environnement. Néanmoins, le profil épidémiologique des maladies qu'elles provoquent donnent à penser qu'elles sont présentes dans la nature (23).

Des techniques de biologie moléculaire ont permis de détecter récemment *M. ulcerans* dans des échantillons d'eau recueillis en Australie (42, 43) et dans des insectes récoltés sur les racines de plantes aquatiques ramassées dans des marécages des régions d'endémie du Bénin et du Ghana (33). *M. ulcerans* n'a cependant pas pu être cultivé à partir des échantillons prélevés dans l'environnement. Il est possible, mais pas facile, d'isoler *M. ulcerans* dans des cultures primaires à partir d'échantillons cliniques.

Isolement par culture primaire

Plusieurs auteurs ont parlé des difficultés à isoler *M. ulcerans* en culture primaire à partir d'échantillons cliniques (44, 45). Malgré de nombreux essais, on n'a jamais réussi à la cultiver à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement, bien qu'on ait isolé une grande variété d'autres mycobactéries (43). Plusieurs raisons pourraient expliquer la difficulté, voire l'impossibilité, de cultiver cette bactérie à partir d'échantillons provenant de la clinique ou de l'environnement.

Echantillonnage

Souvent, il ne convient pas. Les échantillons cliniques doivent être recueillis sur des sites où les bacilles foisonnent en général, comme la base nécrosée de la lésion et les bords creusés de l'ulcère, y compris le tissu sous-cutané. Dans l'environnement, les échantillons doivent être prélevés là où l'on suppose que *M. ulcerans* est concentrée, par exemple par des organismes filtrants, et là où cette bactérie se révèle la plus apte à la survie. Dans les régions tropicales, les échantillons de surface sont soumis à de fortes températures et à la lumière ultraviolette, ce qui affecte la viabilité des bacilles, comme on l'a démontré en laboratoire. Dans les sites plus profonds, comme au fond des marais, les UV ne pénètrent pas et la température est plus faible et plus stable. De plus, la concentration en oxygène y est réduite : *in vitro*, les conditions micro-aérophiliques favorisent la multiplication de *M. ulcerans* (46).

Transport au laboratoire

M. ulcerans se développe au mieux à 32 °C, sur un milieu de culture classique pour les mycobactéries, et elle est très sensible aux températures plus élevées. Un jour à 41 °C tue plus de 90% des bacilles et, pour certaines souches, une température de 37 °C permet d'obtenir le même résultat (33). Meyers et al. ont également observé que la croissance à 32 °C était retardée après une exposition d'un jour à 37 °C et complètement inhibée après exposition à 40 °C pendant 10 jours (47). La température lors du transport vers le laboratoire joue donc un rôle critique, notamment pour les échantillons recueillis dans les pays tropicaux où elle peut dépasser 37 °C pendant des périodes prolongées.

Dans de nombreuses études, les cultures primaires ont été entreprises des jours, voire des semaines, après le prélèvement des échantillons. Dans l'idéal, il faut traiter les échantillons dans la journée où ils sont recueillis, afin d'obtenir un maximum de cultures primaires positives. Lorsque ce n'est pas faisable, on les conservera à +4 °C ou sur un milieu de transport. La congélation n'est pas recommandée, *M. ulcerans* étant, à l'instar d'autres mycobactéries (*M. leprae* ou *M. lepraemurium* par ex.), très sensible aux cycles de congélation et de décongélation (48).

Milieu de transport

L'unité de Mycobactériologie de l'Institut de Médecine d'Anvers (Belgique) a mis au point trois milieux de transports (S, P et P5). Le S est un milieu de Dubos sélectif avec adjonction d'antibiotiques comme Saxegaard l'a décrit pour l'isolement de *M. paratuberculosis* à partir de tissus intestinaux de chèvre (49). Le P est un milieu de Dubos avec adjonction de PANTA^a, comme celui qu'on utilise pour l'isolement de *M. tuberculosis* avec le système BACTEC. Les taux de cultures positives pour des échantillons transportés en du milieu S ou P sont identiques (50). Compte tenu de la préférence de *M. ulcerans* pour les faibles teneurs en oxygène, on a mis au point un nouveau milieu de transport semi-solide (P5) en ajoutant 0,5% d'agar au milieu P. 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-alcoolrésistants viables présents dans l'inoculum. Le P5 est cependant supérieur aux milieux S et P, car il donne la possibilité d'obtenir des cultures positives après 7 semaines de conservation, contre 3 semaines pour S et P. Environ 90% des cultures primaires sont positives en moins de trois mois d'incubation à 32°C.

Méthodes de décontamination

M. ulcerans est sensible aux méthodes de décontamination. Toutes celles utilisées actuellement pour son isolement à partir d'échantillons cliniques (Petroff, NALC-NaOH) ou pour l'isolement de mycobactéries à partir d'échantillons de l'environnement (Petroff, acide oxalique) (51) ont un effet nocif sur la viabilité de *M. ulcerans* (52). Cela explique au moins en partie les difficultés rencontrées dans la culture de ce micro-organisme à partir d'échantillons cliniques et les échecs lorsqu'on part d'échantillons de l'environnement qui, par définition, requièrent des méthodes énergiques de décontamination pour éliminer tous les autres micro-organismes. En outre, il est possible que les échan-

^a Mélange de cinq antibiotiques (polymyxine B, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprime et azlocilline).

tillons de l'environnement soient moins riches en bacilles que les échantillons cliniques. De fait, les frottis obtenus à partir d'échantillons cliniques et colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen montrent en général des amas de bacilles acido-alcoolorésistants (4+ selon l'échelle de l'American Thoracic Society) (53), tandis que les échantillons de l'environnement donnent rarement des frottis positifs (Portaels F, données non publiées, 1998). Les méthodes énergiques appliquées sur des échantillons pauvres pourraient donc être fatales au succès de la mise en culture de *M. ulcerans*.

Milieux de culture

Le milieu de Löwenstein-Jensen est celui qui convient le mieux parmi les milieux solides classiquement utilisés pour la culture des mycobactéries. Les milieux d'Ogawa et de Middlebrook sont moins adaptés. Le pH optimal pour *M. ulcerans* varie de 5,4 à 7,4 (54).

Conditions d'incubation

L'incubation à 32 °C est essentielle pour l'isolement de *M. ulcerans* en culture primaire. La concentration en oxygène est un autre facteur important. On a démontré récemment qu'une teneur réduite en oxygène favorisait la croissance de cette bactérie, ce qui laisse supposer une préférence microaérophile (46).

Caractéristiques de *M. ulcerans* in vitro

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente. Son temps de génération est d'environ 20 heures, le même que pour d'autres espèces de mycobactéries à croissance lente (55). Les cultures primaires peuvent prendre de 6 à 8 semaines, comme pour le bacille tuberculeux, mais les sous-cultures deviennent en général positives en deux semaines, suivant le nombre de BAAR dans l'inoculum.

On identifie facilement *M. ulcerans* au moyen des protocoles classiques d'identification (56). Plusieurs caractéristiques phénotypiques la différencient des autres espèces de mycobactéries à croissance lente. Très peu de souches croissent à 37 °C. L'organisme résiste à l'isoniazide, mais la plupart des souches sont inhibées par l'hydroxylamine et le p-nitrobenzoate. Les autres espèces à croissance lente qui sont sensibles à l'hydroxylamine et au p-nitrobenzoate le sont également à l'isoniazide (54). Certains caractères phénotypiques semblent différencier les souches africaines, australiennes et nord-américaines (57). Les souches africaines présentent en général une activité de la phosphatase acide, mais pas les souches d'autres origines.