

## L'ULCERE DE BURULI : ATTENTION AUX ATTEINTES OSSEUSES ! A PROPOS DE 33 CAS OBSERVES AU BENIN

V. LAGARRIGUE, F. PORTAELS, W.M. MEYERS, J. AGUIAR

**RESUME** • L'infection à *Mycobacterium ulcerans* est connue par ses atteintes cutanées. Cette affection peut également provoquer des ostéomyélites. Ces atteintes sont peu étudiées dans la littérature bien que leur fréquence puisse atteindre 14 p. 100 des cas. Au Bénin, les auteurs ont colligé entre 1996 et 1999 33 observations d'ostéomyélites à *Mycobacterium ulcerans* confirmées bactériologiquement et/ou histologiquement. L'atteinte osseuse est survenue dans 64 p. 100 des cas durant la première année d'évolution de la maladie. Les localisations sont dans 70 p. 100 des cas au niveau des extrémités. Les patients avaient une médiane de deux localisations osseuses (de 1 à 5 os atteints) et le nombre d'os atteints n'était pas corrélé à la durée d'évolution de la maladie. Parmi l'ensemble des ostéomyélites, 41 p. 100 étaient sous-jacentes à une lésion cutanée et 59 p. 100 étaient d'origine métastatique. Seulement 16 p. 100 des ostéomyélites présentaient des germes de surinfection, qui ne sont donc pas nécessaires à la constitution d'une ostéite de contact à *Mycobacterium ulcerans*. Les manifestations cliniques étaient le plus souvent frustes à type de tuméfaction locale, non inflammatoire et peu douloureuse. L'état général est bien conservé dans 79 p. 100 des cas. L'examen histologique a permis de préciser le type de lésions osseuses provoquées par *Mycobacterium ulcerans*. Pour la première fois, la culture de *Mycobacterium ulcerans* a pu être réalisée à partir de prélèvement osseux. Les résultats bactériologiques et histologiques permettent d'avancer des hypothèses physiopathologiques. Le rôle de la toxine de *Mycobacterium ulcerans* est évoqué.

**MOTS-CLES** • Afrique Noire - Bénin - Ulcère du Buruli - *Mycobacterium ulcerans*.

### **BURULI ULCER: RISK OF BONE INVOLVEMENT A 33-CASE SERIES IN BENIN**

**ABSTRACT** • Skin lesions are the best known manifestations of *Mycobacterium ulcerans* infection. However osteomyelitis is not uncommon with incidences as high as 14 p. 100 having been reported. The literature contains little specific data on bone lesions. This report describes a series of 33 patients presenting bacteriologically and/or histologically confirmed osteomyelitis induced by *Mycobacterium ulcerans*. In 64 p. 100 of cases, bone involvement occurred within the first year of the disease. In 70 p. 100 of cases, the site of involvement was on extremities. The median number of sites per patient was two (range, 1 to 5) and the number of bones was not correlated with the duration of disease. Overall, 41 p. 100 of bone sites occurred locally beneath skin lesions and 59 p. 100 were distant metastases. Osteomyelitis was associated with other germs in only 16 p. 100 of cases and superinfection was not a prerequisite for development of bone involvement. Clinical manifestations were usually low-grade with non-inflammatory, slightly painful local mass. The patient's general health status was unaffected in 79 p. 100. Histological examination allowed identification of the type of bone lesions induced by *Mycobacterium ulcerans*. For the first time, bone biopsy specimens were cultured. Based on bacteriological and histological findings, several postulations can be made about underlying pathophysiological mechanisms. The role of Buruli toxin is dealt with in the discussion.

**KEY WORDS** • Black Africa - Benin - Buruli Ulcer - *Mycobacterium ulcerans*.

Med. Trop. • 2000 • 60 • 262-266

- Travail du Centre Sanitaire et Nutritionnel Gbemonten de Zagnanado (V.L., J.A., Infirmière), Bénin, de l'Institut de Médecine Tropicale (F.P. Professeur, Docteur en Sciences, Chef de l'Unité de Mycobactériologie) d'Anvers, Belgique et de Head Mycobacteriology Unit (W.M.M., Docteur en Médecine), Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, USA.
- Correspondance : V. LAGARRIGUE, Religieuse de l'Assomption, BP 12, Abomey, Bénin • Fax : 00 229 50 02 59 • e-mail : portaels@itg.be •
- Article sollicité.

Les infections à *Mycobacterium ulcerans*, communément appelées ulcère de Buruli, sont après la tuberculose et la lèpre, l'affection humaine à mycobactérie la plus fréquemment rencontrée en zone intertropicale chez le patient immunocompétent (1, 2). Cette maladie, décrite en Australie en 1948 (3), touchait principalement l'Afrique centrale où de grands foyers existaient dans les années soixante. Cette pathologie est en pleine expansion en Afrique de l'ouest depuis les

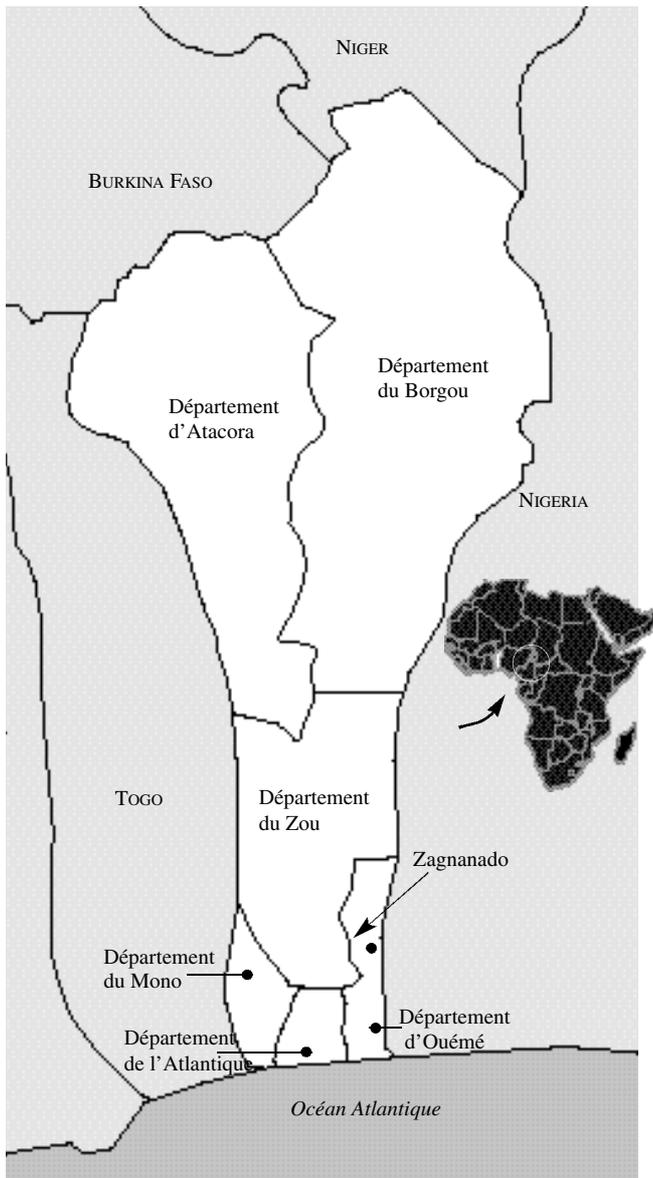


Figure 1 - Carte du Bénin et localisation de la ville de Zagnanado.

années quatre-vingts. Le premier cas publié en Côte d'Ivoire date de 1978 (4). En 1997, le nombre de malades était estimé à plus de 10 000. Au Bénin, dans le département du Zou (Fig. 1). Une étude effectuée sur les cas traités à Zagnanado (5) a montré que le taux de détection passive de l'ulcère de Buruli était, en 1996, de 24,2 pour 100 000 habitants, supérieur à celui de la tuberculose. Ces chiffres révèlent en partie l'ampleur du problème de santé publique causé par l'ulcère de Buruli. Si le mode de contamination n'est pas encore clairement établi, il est certain que cette mycobactérie est présente dans l'environnement, à partir duquel l'homme se contamine. Cette maladie n'est pas contagieuse (5), son expansion ne s'explique donc pas par l'existence d'une épidémie.

L'ulcère de Buruli a une douzaine d'éponymes différents (6), mais cette appellation classique souligne le fait que cette maladie est essentiellement connue par ses

atteintes cutanées, notamment ces grands ulcères aux bords décollés caractéristiques de la maladie. Cette appellation prête à penser que l'affection est uniquement dermatologique. Cependant, elle peut également provoquer des atteintes osseuses qui font la gravité de l'affection : elles restent très peu étudiées dans la littérature médicale bien qu'elles deviennent de plus en plus fréquentes et puissent atteindre 14 p. 100 des cas. Ce travail a pour objectif de préciser les caractéristiques des ulcères de Buruli avec lésions osseuses.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Patients.

L'étude a été réalisée à partir d'observations d'ostéomyélites recrutées au centre sanitaire et nutritionnel Gbemonten de Zagnanado au Bénin entre 1996 et 1999. Cette série est constituée par l'ensemble des patients pris en charge et qui avaient bénéficié de prélèvements bactériologiques et/ou histologiques ayant permis de confirmer l'atteinte osseuse par *Mycobacterium ulcerans*. Le recueil des données s'est fait de façon rétrospective sur les dossiers médicaux du centre et de façon prospective à partir de 1998.

### Méthode.

L'étude rétrospective s'est appuyée sur les données disponibles dans les fichiers du centre. Les données recueillies sont l'âge, le sexe, la date de dépistage, la localisation des atteintes sur schéma, la durée d'hospitalisation, le compte rendu anatomopathologique et les résultats bactériologiques. Ces fiches étaient remplies le jour de la prise en charge et remises à jour à chaque intervention chirurgicale et à la fin de l'hospitalisation. L'étude prospective comportait les mêmes données et a permis de préciser pour chaque patient l'histoire de la maladie et les données environnementales.

Les prélèvements destinés à l'histologie ont été fixés dans du formol à 10 p. 100 et adressés par courrier à l'Armed Forces Institute of Pathology de Washington (AFIP, Washington DC). Chaque prélèvement a été soumis à une décalcification et inclus en paraffine. Les colorations utilisées ont été l'hématoxyline-éosine, la coloration de Ziehl-Neelsen, la coloration de Gram et la coloration de Gomori.

Les prélèvements pour examen bactériologique ont été acheminés dans le milieu de transport semi-PANTA (F. Portaels, communication personnelle) qui est un milieu semi-solide à 0,5 p. 100 d'agar additionné de polymyxine, d'amphotéricine B, d'acide nalidixique, de triméthoprime et d'azlocilline. Ce milieu permet une première décontamination des prélèvements et est favorable à la conservation de *Mycobacterium ulcerans*. Il détruit une partie des autres germes et n'autorise donc pas une étude bactériologique de la flore complète. Les produits pathologiques ont été traités en examen direct par la coloration de Ziehl-Neelsen puis mis en culture sur milieu de Lowenstein-Jensen à 33°C et 37°C. Les cultures ont été considérées négatives après un an d'incubation. Les prélèvements ont bénéficié d'une étude par amplification d'une séquence d'ADN spécifique de *Mycobacterium ulcerans* (7, 8). Le diagnostic bactériologique a été considéré comme établi chez un malade quand celui-ci présentait au moins deux tests positifs sur les trois tests utilisés (culture, Ziehl-Neelsen, PCR).

Tableau I - Localisation de 50 ostéomyélites à *Mycobacterium ulcerans* diagnostiquées chez 33 malades au centre sanitaire et nutritionnel Gbemonten de Zagnanado au Bénin entre 1996 et 1999.

Localisations	n (p. 100)
Cheville et pieds	27 (54 p. 100)
Jambe et genou	11 (22 p. 100)
Poignet et main	8 (16 p. 100)
Avant-bras et bras	4 (8 p. 100)

Les données qualitatives ont été comparées par le test du  $\chi^2$  ou le test exact de Fisher en fonction des effectifs. Les données quantitatives ont été comparées par le test de Mann-Whitney car la distribution de ces variables était non gaussienne. Une valeur de  $p = 0,05$  a été considérée comme significative.

## RESULTATS

### Aspects cliniques.

Trente-trois patients ont été inclus, dix-huit de façon rétrospective et quinze de façon prospective. L'âge médian était de 12 ans (extrêmes : 3 ans-47 ans) et le rapport hommes/femmes de 1,06. Lors du diagnostic initial, 13 p. 100 des patients ne présentaient ni cicatrice d'ulcère cutané, ni ulcère évolutif, mais une tuméfaction localisée. En revanche, six patients sur quinze inclus dans l'étude prospective, soit 40 p. 100, présentaient un antécédent d'ulcère de Buuli cutané cicatrisé. L'atteinte osseuse est survenue après la cicatrisation cutanée dans un délai médian d'un an (extrêmes : 3 mois - 3 ans) et dans 64 p. 100 des cas durant la première année d'évolution de la maladie. La médiane de durée d'évolution de la maladie lors de la prise en charge était de six mois (extrêmes : 1 semaine - 4 ans). En colligeant les 33 cas, il a été confirmé que les manifestations cliniques précoces des ostéomyélites à *Mycobacterium ulcerans* étaient souvent frustes, à type de tuméfaction locale non inflammatoire, peu douloureuse dans 80 p. 100 des cas, l'intensité de la douleur ne gênant que rarement la mobilité du membre. L'état général était bien conservé dans 79 p. 100 des cas.

Les patients étaient souvent porteurs de plusieurs localisations osseuses, avec une médiane de deux (extrêmes : 1 os - 5 os atteints). Les ostéomyélites étaient localisées dans 70 p. 100 des cas au niveau des extrémités (Tableau I). Dans cette étude, 41 p. 100 des ostéomyélites étaient sous-jacentes à un ulcère (ostéomyélites de contact) et 59 p. 100 n'étaient pas situées en regard d'une ulcération cutanée et ont été dites métastatiques.

### Examens anatomo-pathologiques.

Au total, 45 examens anatomo-pathologiques osseux ont été réalisés chez 28 patients. Ils ont permis de définir le type de lésions osseuses provoquées par *Mycobacterium ulcerans*. Les espaces médullaires présentaient des plages nécrotiques importantes, altérant les travées osseuses. Des micro-séquestres osseux y ont été parfois retrouvés. La moelle osseuse était œdématiée et hypocellulaire. La réaction inflammatoire était discrète, les polynucléaires neutrophiles étant peu

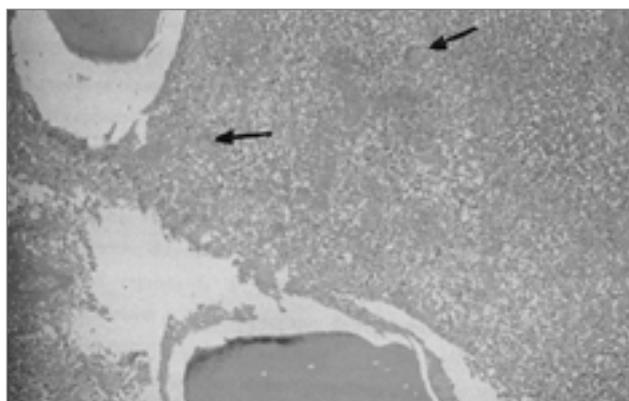


Figure 2 - Travées osseuses érodées et présence de BAAR (bacilles acidoalcoolorésistants) en amas (Coll. W. Meyers).

nombreux, sauf en cas de surinfection. Bien que non spécifique, une réaction granulomateuse médullaire a été fréquemment observée, surtout à la phase subaiguë ou chronique d'organisation. Si parfois des cellules géantes multinucléées étaient présentes, il n'a jamais été mis en évidence de nécrose caséuse (Fig. 2). Des zones de fibrose ont été observées dans les processus chroniques d'organisation. Des bacilles acidoalcoolorésistants (BAAR) ont été retrouvés au sein des plages de nécrose dans 76 p. 100 des cas (Fig. 3). La coloration de Gomori, à la recherche de structures mycosiques, a toujours été négative. En revanche, la coloration de Gram sur coupes histologiques a permis de mettre en évidence chez neuf patients une ostéomyélite à *Mycobacterium ulcerans* associée à d'autres germes. Il s'agissait de coques Gram positif dans six cas, de bacilles Gram négatif dans un cas et d'une flore polymorphe dans deux cas.

### Examens bactériologiques.

La culture de *Mycobacterium ulcerans* a pu être réalisée à partir de prélèvements osseux chez trois patients différents. Les résultats des quarante prélèvements osseux ayant bénéficié d'une coloration de Ziehl-Neelsen et d'une PCR spécifique de *Mycobacterium ulcerans* sont indiqués sur le

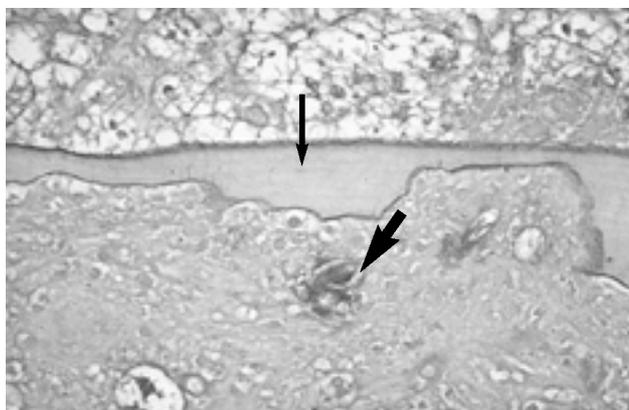


Figure 3 - Travée osseuse présentant des signes de résorption avec un aspect érodé (petite flèche). Présence de BAAR (bacilles acidoalcoolorésistants) en amas (grosse flèche).

Tableau II - Résultats des recherches de BAAR (bacilles acido-alcoolorésistants) par coloration de Ziehl-Neelsen et des PCR spécifique de *Mycobacterium ulcerans* sur 40 prélèvements osseux réalisés durant l'étude prospective au centre sanitaire et nutritionnel Gbemonten de Zagnanado au Bénin entre 1996 et 1999.

	PCR positive	PCR négative	Total
Coloration de Ziehl-Neelsen positive	24	1	25
Coloration de Ziehl-Neelsen négative	11	4	15
Total	35	5	40

tableau II. La PCR sur les prélèvements osseux a eu une sensibilité de 88 p. 100 et n'a pas été significativement plus sensible que la coloration de Ziehl-Neelsen ( $p = 0,056$ ).

### Vignette clinique.

En 1994, à l'âge de 4 ans, Chimène présente un ulcère de l'épaule gauche qui cicatrise après quelques mois de traitement traditionnel. Lors d'un dépistage actif de l'ulcère de Buruli dans son village en février 1997, Chimène, alors âgée de 7 ans, présente un ulcère avec ostéomyélite du poignet gauche évoluant depuis des mois, et quasi-expulsion d'un séquestre osseux au niveau de l'extrémité inférieure du radius (Fig. 4). Elle présente également un ulcère du dos du pied droit avec un œdème de tout l'avant pied. Les bords de cet ulcère sont décollés et caractéristiques du Buruli (Fig. 5). Chimène est hospitalisée, traitée par curetage chirurgical puis excision-greffe des tissus nécrosés. Après quatre mois d'hospitalisation, elle retourne dans son village sans aucun signe clinique évolutif de la maladie. En novembre 1997, apparition d'une légère tuméfaction du dos du pied gauche; l'enfant n'est pas amenée en consultation. Cette tuméfaction non douloureuse va secondairement s'ulcérer : Chimène ne sera hospitalisée qu'en février 1998, présentant alors une ostéomyélite métatarsienne gauche. Elle retourne au village après trois mois d'hospitalisation.

L'histoire de Chimène est significative des formes disséminées. Elle débute avec un ulcère cutané qui est cicatrisé au moment du diagnostic de la maladie. Probablement à partir de cette porte d'entrée, la dissémination de la maladie se fait de façon silencieuse pendant plusieurs années et, sans que l'on puisse reconnaître de facteur déclenchant, les manifestations cliniques reprennent. On pourrait opposer à cette lecture qu'il s'agit d'une nouvelle contamination et non pas d'un même processus évolutif. Seule l'analyse des souches bactériennes par empreinte génétique permettrait de



Figure 4 - Ulcère cicatrisé de l'épaule gauche et ostéomyélite et ulcère du poignet gauche (Coll. F. Portaels).



Figure 5 - Ulcère cicatrisé du dos du pied droit (Coll. F. Portaels).

trancher cette importante question. Une reprise évolutive de la maladie est toujours, de toute façon, à craindre en l'absence de traitements antibiotiques reconnus efficaces *in vivo* sur *Mycobacterium ulcerans*.

### DISCUSSION

Comme pour les atteintes cutanées, les ostéomyélites surviennent essentiellement chez l'enfant. La fréquence des antécédents d'ulcère de Buruli cutané doit faire rechercher la cicatrice spontanée en étoile, assez caractéristique devant un tableau d'ostéomyélite atypique et faire évoquer une infection osseuse par *Mycobacterium ulcerans* (9, 10). On peut considérer qu'il s'agit là d'une reprise évolutive de la maladie avec atteinte osseuse. Les délais d'apparition de l'atteinte osseuse après la cicatrisation cutanée sont en général inférieurs à un an. Pour une même durée d'évolution, le nombre d'ostéomyélites par patient est très variable. Le nombre d'atteintes n'est donc pas lié de façon significative à la durée d'évolution de la maladie. Les manifestations cliniques sont souvent discrètes tant sur le plan local que des signes généraux et la localisation préférentielle des ostéomyélites au niveau des extrémités est utile pour le diagnostic différentiel de l'affection. L'évolution clinique est caractérisée par une ulcération secondaire de la tuméfaction dans la majorité des cas. De plus, l'indolence habituelle de ces lésions fait que lorsque le malade se plaint d'une douleur franche, il faut suspecter une coinfection de l'os, le plus souvent par des cocci Gram positif. Contrairement à une idée généralement admise, la surinfection ne semble pas nécessaire à la constitution d'une ostéite de contact à *Mycobacterium ulcerans* et seulement 16 p. 100 de ces ostéomyélites étaient associées à des germes de surinfection. La surinfection pourrait au contraire limiter la dissémination en stimulant la réaction inflammatoire locale. Cette hypothèse, émise à partir de l'expérience clinique, reçoit des arguments supplémentaires, bactériologique et anatomo-pathologique : en comparant les trente trois malades porteurs d'une atteinte osseuse à une série de soixante trois patients sans atteinte osseuse issus du même centre de santé et recrutés dans une série consécutive, on observe que les patients sans atteinte osseuse ont présenté dans 27 p. 100 des cas une culture cutanée comportant une

flore de surinfection. La coloration de Gram sur coupes histologiques a permis de montrer que sur les 19 ostéomyélites de contact, seules trois étaient associées à des germes autres que *Mycobacterium ulcerans*. De plus, il faut remarquer que les examens histologiques ne montrent pas de caractères très spécifiques à cette affection et que l'absence de BAAR n'élimine pas le diagnostic.

Les examens bactériologiques classiques, hors examen direct, sont difficiles à exploiter si l'on ne dispose pas d'un laboratoire à proximité. En effet, le semi-PANTA permet une première décontamination des prélèvements et est favorable à la conservation de *Mycobacterium ulcerans*, mais il détruit une partie des autres germes et n'autorise donc pas une étude bactériologique de la flore complète. Il n'a donc pas été possible de réaliser une mise en culture à la recherche d'autres germes que *Mycobacterium ulcerans*. La sélection de germes susceptibles d'atteindre le tissu osseux pourrait être la conséquence de formes cutanées multi-bacillaires qui, dans cette série, sont caractéristiques des patients ayant une atteinte osseuse. En effet, la recherche de BAAR sur coupe anatomo-pathologique de prélèvements cutanés est positive chez 52,4 p. 100 des patients uniquement porteurs d'une atteinte cutanée alors que les malades présentant une atteinte osseuse ont une recherche positive dans 95,8 p. 100 des cas. Ces formes multibacillaires permettraient la dissémination d'un plus grand nombre de bactéries et favoriseraient la sélection de germes capables de détruire le tissu osseux. Il est à noter que concernant la PCR, si la sensibilité de ce test est évaluée non pas uniquement sur les prélèvements osseux mais sur la totalité des 78 prélèvements, osseux et cutanés réalisés sur ces mêmes patients, la sensibilité de ce test est significativement plus élevée que la coloration de Ziehl-Neelsen ( $p = 0,03$ ).

En 1989, Small a montré la nature lipidique de la toxine de *Mycobacterium ulcerans* (13) que Connor avait suspecté (14) et dont Pimsler avait établi les propriétés immunosuppressives (15). Cette toxine est aussi responsable de la nécrose dont on sait la variabilité selon les patients. Il faut donc suspecter une différence de pouvoir pathogène selon les souches. Cette notion est étayée par la pathologie particulière des souches guyanaises pour lesquelles on ne décrit pas de lésions osseuses (16). Mais ces différences vont plus loin que la caractérisation en sous-groupes géographiques (17) car au sein d'un même continent on peut observer une augmentation de la fréquence des atteintes osseuses, comme au Bénin, voire une fréquence d'emblée élevée comme au Togo.

L'ulcère de Buruli est une affection qui sévit de façon inquiétante en Afrique occidentale. Si cette maladie est considérée comme une affection essentiellement dermatologique, les atteintes osseuses font, de plus en plus, toute la gravité de cette maladie et nécessitent une prise en charge chirurgicale. De nombreuses inconnues subsistent encore tant sur le plan épidémiologique, physiopathologique que thérapeutique. L'atteinte osseuse est en partie liée à une prise en charge trop

tardive d'où la nécessité d'une prise de conscience pour, comme le soulignait en 1997 le Docteur Hiroshi Nakajima, directeur général de l'OMS, coaliser les efforts dans la lutte contre ce fléau.

**Remerciements** • Ce travail a été aidé par le programme belge DGCI (Direction Générale de la Coopération Internationale) dans le cadre du projet « Initiative propre ulcère de Buruli au Bénin ».

## REFERENCES

- 1 - PORTAELS F. - Contribution à l'étude des mycobactéries de l'environnement au Bas Zaïre. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1989; **69** : 91-103.
- 2 - HAYMAN J. - Postulated epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Int. J. Epidemiol.* 1991; **20** : 1093-1098.
- 3 - MAC CALLUM T.S., TOLHURST J.C., BUCKLE G. et Coll. - New bacterial infection in man : clinical aspects. *J. Pathol. Bact.* 1948; **60** : 93-122.
- 4 - PERRAUDIN M.L., HERRAULT A., DESBOIS J.C. - Ulcère cutané à *Mycobacterium ulcerans*. *Annales de Pédiatrie* 1980; **27** : 687-692.
- 5 - AGUIAR J., DOMINGO M.C., GUEDENON A. et Coll. - L'ulcère de Buruli, une maladie mycobactérienne importante et en recrudescence au Bénin. *ARSOM Bulletin des Seances* 1997; **3** : 325-356.
- 6 - RADFORD A.J. - The nomenclature of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1973; **67** : 885-886.
- 7 - ROBERTS B., HIRST B. - Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Mycobacterium ulcerans*. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 2709-2711.
- 8 - ROSS B.C., MARINO L., OPPEDISANO F. et Coll. - Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 1696-1700.
- 9 - LUNN H.F. - Mycobacterial lesions in bone. *East Afr. Med. J.* 1963; **40** : 113-117.
- 10 - MARSTON B.J., DIALLO M.O., HORSBURGH R. et Coll. - Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Côte d'Ivoire. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; **52** : 219-224.
- 11 - WEED L., KARLSON A.G., IVINS J.C., HILLER R.H. - Recurring migratory chronic osteomyelitis associated with saprophytic acid-fast bacilli. *Proc. Mayo Clin.* 1956; **31** : 238-245.
- 12 - CARAYON A., HONORAT M. - Ostéites compliquant des ulcères tropicaux. *Bull. Soc. Afr. Noire Fr.* 1969; **14** : 392-415.
- 13 - GEORGE K.M., CHATTERJEE D., GUNAWARDANA G. et Coll. - Mycolactone : a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 1999; **283** : 854-857.
- 14 - CONNOR D.H., MEYERS W.M., KRIEG R.E. et Coll. - Buruli Disease. In « ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY - Pathology of tropical and extraordinary disease ». Binford-Connor ed., Washington, 1976, pp 226-235.
- 15 - PIMSLER M., SPONSLER T.A., MEYERS W.M. - immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. *J. Infect. Dis.* 1988; **157** : 577-580
- 16 - PRADINAUD R., BASSET A., GROSSHANS E. - Vingt cas de mycobactérioses cutanées en Guyane française. *Castellania* 1974; **2** : 273-274.
- 17 - PORTAELS F., FONTEYNE P.A., DE BEENHOUWER H. et Coll. - Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34** : 962-96.