

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

**PARAMÈTRES ÉPIDÉMIOLOGIQUES, IMMUNOLOGIQUES ET
ENTOMOLOGIQUES LIÉS AU MODE DE TRANSMISSION À L'HOMME DE
MYCOBACTERIUM ULCERANS, AGENT CAUSAL DE L'ULCÈRE DE BURULI, DANS
UNE RÉGION ENDÉMIQUE DU CAMEROUN**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline: Santé

Spécialité: Immunologie & Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Christelle MBONDJI WONJE

le 25 juin 2008, devant le jury ci-dessous :

Président : M. Michel MARJOLET, Professeur, Université de Nantes, France

Rapporteurs : Mme Geneviève MILON, Directeur de recherche, Institut Pasteur, Paris.
M. Julien DOANNIO, Maître de recherche, I.N.S.P., Abidjan, Côte d'Ivoire.

Examineur : M. Albert SAME-EKOBO, Professeur, Université de Douala, Cameroun.

Invités: Mme Sara EYANGO, Chargée de recherche, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé
M. Laurent MARSOLLIER, Chargé de recherche, IFR 132 INSERM, Université d'Angers.

Co-directeurs de thèse :

M. Jacques AUBRY, Professeur, INSERM U892, Université de Nantes, France

M. François-Xavier ETOA, Professeur, Université de Yaoundé I, Cameroun

TABLE DES MATIERES

Table des illustrations.....	7
Liste des abréviations	10
INTRODUCTION GENERALE.....	11
CHAPITRE I : GENERALITES	
I. Historique	16
II. Pathogénie et manifestations cliniques	18
II-1 L'agent pathogène	18
II-2 Les Manifestations cliniques	20
II-2-1 Les formes cutanées classiques	20
II-2-1-1 La phase pré-ulcéralive	20
a) La forme nodulaire	20
b) La papule	21
c) La plaque ou placard	21
d) La forme œdémateuse	21
II-2-1-2 La phase ulcéralive	22
II-2-1-3 La phase de cicatrisation	23
II-2-2 Les atteintes ostéo-articulaires	24
II-2-3 Les autres atteintes.....	24
II-2-4 Les complications	24
II-2-4-1 Les surinfections.....	24
II-2-4-2 Le cancer de la peau.....	25
II-2-4-3 Les séquelles	25
II-2-4-4 Les rechutes.....	25
II-3 La mycolactone.....	26
II-4 Histopathologie des lésions	28
III. Diagnostic	30
III-1 L'examen direct.....	30
III-2 La mise en culture de <i>M. ulcerans</i>	31
III-3 Le diagnostic moléculaire	31
III-4 L'examen histo-pathologique.....	33

IV. Traitement	33
V. Ecologie et transmission de <i>M. ulcerans</i>	34
VI. Objectifs	34
VI-1 Objectif général	36
VI-2 Objectifs spécifiques	37

CHAPITRE II : UNE ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE : ETUDES DES FACTEURS DE RISQUE A L'ULCERE DE BURULI CAMEROUN

AU

A. Avant-propos	39
I. Distribution géographique de l'ulcère de Buruli	39
II. Diffusion de l'ulcère de Buruli dans le temps	39
II-1 En Afrique Sub-saharienne	39
II-1-1 Le cas de l'Afrique de l'Ouest	41
II-1-2 Le cas de l'Afrique Centrale	42
II-2 En Asie du Sud-Est et dans l'Ouest du Pacifique	43
II-3 En Amérique du sud	44
III. Facteurs associés aux régions endémiques à l'ulcère de Buruli	44
III-1 Facteurs liés à l'environnement écologique	44
III-2 Facteurs liés à l'environnement socio-économique	45
III-3 Facteurs liés à l'accès à l'eau	46
III-4 Facteurs liés à l'activité professionnelle	47
III-5 Facteurs liés au sexe, à la race et à l'âge	47
III-6 Facteurs génétiques	47
B. Introduction : l'ulcère de Buruli au Cameroun	50
C. Méthodologie	53
I. Type d'étude	53
II. Population étudiée et critères d'inclusions	54
III. Matériel d'investigation et considérations éthiques	54
IV. Analyse des données	56
D. Résultats	56

I. Description de la population des patients enquêtés	56
II. Appariement cas-témoins extrafamiliaux	58
III. Appariement des cas-témoins intrafamiliaux.....	59
E. Discussion et perspectives	60
CHAPITRE III : INTERACTION IMMUNOLOGIQUE ENTRE L'HÔTE ET LES PUNAISES D'EAU, VECTEURS POTENTIELS DE <i>M. ULGERANS</i>	
A. Avant-propos.....	66
I. La réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par <i>M. ulcersans</i>	66
I-1 La réponse cellulaire : la dichotomie Th-1/Th-2	66
I-1-1 La réponse Th-1	66
I-1-2 La réponse Th-2	69
I-2 La réponse immunitaire humorale	71
II. Les interactions immunologiques hôte/vecteur	73
II-1 Modulation de la réponse immunitaire de l'hôte par le vecteur	73
II-1-1 L'exemple des tiques	73
II-1-2 L'exemple des phlébotomes.....	74
II-2 Les marqueurs épidémiologiques	75
II-3 L'approche vaccinale	77
B. Introduction : interaction immunologique hôte/vecteur : cas de <i>Mycobacterium</i> <i>ulcersans</i>	80
C. Méthodologie.....	82
I- Collecte des punaises d'eau et préparation de l'homogénat de glandes salivaires	82
II. Modèle expérimental 1.....	83
III. Modèle expérimental 2	84
IV. Analyse par Western blot.....	84
V. Etude de la prévalence des IgG humaines dirigées contre les protéines salivaires	84
V-1. Le type d'étude	84
V-2. Population étudiée et critères d'inclusion	85
V-3. Matériel d'investigation et considérations éthiques	85
VI. Analyse ELISA	85

D. Résultats.....	86
I. Expérience chez la souris.....	86
I-1. Modèle expérimental 1 : l'exposition aux piqûres de punaises saines protégerait de l'apparition des lésions	86
I-2. Modèle expérimental 2 : la protection induite par les constituants salivaires résulte d'une diminution de la charge de bacilles lorsqu'ils ont été co-incubés avec ces derniers	87
II. Exploration immunologique chez l'homme	88
II-1. Mise en évidence de la signature immunologique des punaises d'eau par Western blot.....	88
II-2 Evaluation du taux sérique des IgG reconnaissant les protéines salivaires de punaises d'eau par ELISA	89
E. Discussion et perspectives	90

CHAPITRE IV : ETUDE ENTOMOLOGIQUE ET IMMUNO-CHIMIQUE DES PUNAISES D'EAU

A- ETUDE ENTOMOLOGIQUE	94
I. Introduction : les punaises d'eau, vecteurs potentiels de <i>M. ulcerans</i>	94
II. Notes bibliographiques et observations personnelles sur les hémiptères aquatiques	98
II-1 Position systématique des punaises d'eau dans la classification des insectes.....	99
II-2 Morphologie générale des hétéroptères	101
II-2-1 La tête.....	101
II-2-2 Le thorax	102
II-2-2-1 Le prothorax	102
II-2-2-2 Le mésothorax	102
II-2-2-3 Le métathorax.....	102
II-2-2-4 Les pattes.....	102
II-2-2-5 Les ailes.....	103
II-2-3 L'abdomen	103
II-3 Ecologie et biologie des punaises d'eau	103
II-3-1 Distribution géographique.....	103
II-3-2 Habitat.....	104
II-3-3 Nutrition et digestion	104
II-3-4 Grégarisme	108

II-3-5 Respiration	108
II-3-6 Reproduction	110
II-3-6-1 Dimorphisme sexuel	110
II-3-6-2 Ponte et oeufs	110
II-3-6-3 Développement post-embryonnaire	112
III. Inventaire et description des punaises d'eau prédatrices du fleuve Nyong au Cameroun	113
III.1 Matériel et méthodes.....	113
III-1-1 Lieux de capture des insectes.....	113
III-1-2 Méthode de capture et échantillonnage	117
III-1-3 Identification et dénombrement	118
III-2 Résultats 1 : description des familles de punaises d'eau	120
III-2-1 Les Naucoridae.....	120
III-2-2 Les Belostomatidae	122
III-2-3 Les Nepidae.....	125
III-2-4 Les Notonectidae.....	128
III-2-5 Les Corixidae	132
III-2-6 Les Gerridae	133
III-3 Discussion et perspectives	134
III-4 Résultats 2 : Variation saisonnière des punaises d'eau	136
III-4-1 Evolution du niveau des eaux sur les sites de capture.....	136
III-4-2 Variation saisonnière de la population des punaises d'eau.....	138
III-5 Discussion et perspectives	140
B. ETUDE IMMUNO-CHIMIQUE DES PUNAISES D'EAU	141
I. Introduction.....	141
II. Matériel et méthodes.....	142
II.1 Obtention de la salive des punaises d'eau	142
II-2 Dissection des glandes salivaires.....	144
II-3 Préparation de l'homogénat de glandes salivaires.....	145
II-4 Dosage des protéines.....	145

II-5 Etude de la prévalence des IgG humaines dirigées contre les protéines salivaires .	145
II-5-1 Le type d'étude	145
II-5-2 Population étudiée et critères d'inclusions	146
II-5-3 Matériel d'investigation et considérations éthiques	146
II-5-4 Analyse ELISA.....	147
II-5-5 Analyse statistique	148
II-7. Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	148
II-8 Immuno-empreinte.....	148
II-9 Micro-séquençage	149
III. Résultats.....	149
III-1 Description de la population	149
III-2 Taux sérique des IgG totales et de leurs sous-classes dirigées contre les constituants salivaires de <i>Lethocerus sp</i>	150
III-3 Analyse des immuno-empreintes	151
III-4 Comparaison de la salive et de l'homogénat de glandes salivaires.....	152
III-5 Constituant(s) salivaire(s) immunogène(s) adhérent à <i>M. ulcerans</i>	153
IV. Discussion et perspectives	156
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	156
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159
ANNEXES	
ABSTRACT	

Table des illustrations

Fig. 1. Le génome de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	19
Fig. 2. Formes cliniques de l'ulcère de Buruli en phase pré-ulcéralive	22
Fig. 3. Ulcère de Buruli en phase ulcéralive	23
Fig. 4. Séquelles et complications liées à l'ulcère de Buruli	26
Fig. 5. Structure chimique des différentes mycolactones	28
Fig. 6. Coloration de Ziehl-Neelsen.....	31
Fig. 7. Répartition géographique des cas d'ulcère de Buruli	40
Fig. 8. Evolution du nombre de cas cumulés d'ulcère de Buruli entre 2002 et 2006	40
Fig. 9. Carte du Cameroun	50
Figure 10. Inondation pendant les crues du fleuve Nyong	51
Fig. 11. Activités dans la vallée du Nyong	51
Fig. 12. La vallée du Nyong.	55
Fig. 13. Recueil du matériel d'investigation	56
Fig. 14. Modèle expérimental 1	83
Fig. 15. Détection des IgG humaines associées aux protéines de HGS de <i>N. flavicollis</i>	88
Fig. 16. Détection des IgG humaines associées aux protéines de HGS de <i>N. flavicollis</i>	89
Fig. 17. Taux d'IgG des sérums de sujets Béninois exposés aux piqûres de punaises d'eau...90	
Fig. 18. Transmission de l'infection due à <i>M. ulcerans</i> à des souris de BALB/c	95
Fig. 19. Mode probable de transmission de <i>Mycobacterium ulcerans</i> à l'homme	97
Fig. 20. Schéma représentant la vue dorsale d'un hémiptère adulte	101
Fig. 21. Observation de la prédation des punaises d'eau en captivité	106
Fig. 22. Illustration des glandes salivaires de Belostomatidae	107
Fig. 23. Organes respiratoires des punaises d'eau	109
Fig. 24. Œufs de Belostomatidae	111
Fig. 25. Développement post-embryonnaire chez la punaise géante africaine. (Belostomatidae)	112

Fig. 26. Sites n°1 et n°2 sélectionnés à Akonolinga pour la capture de punaises d'eau	114
Fig. 27. Sites n°3 et n°4 sélectionnés à Akonolinga pour la capture de punaises d'eau.....	115
Fig. 28. Sites n°5 et n°6 sélectionnés à Akonolinga pour la capture de punaises d'eau	116
Fig. 29. Dispositif de capture et de conservation des punaises d'eau	118
Fig. 30. Spécimens de Naucoridae capturés au Cameroun	120
Fig. 31. Description de la tête d'un Naucoridae	121
Fig. 32. Pattes et ailes de Naucoridae.....	122
Fig. 33. Spécimens de Belostomatidae capturés au Cameroun	123
Fig. 34. Têtes de Belostomatidae	124
Fig. 35. Hémélytres, pattes et abdomen de Belostomatidae	125
Fig. 36. Spécimens de Nepidae capturés au Cameroun	126
Fig. 37. Tête d'un Nepidae	127
Fig. 38. Tarses de Nèpe (A1 et A2) et de Ranatre (B1 et B2)	128
Fig. 39. Spécimens de Notonectidae capturés dans les eaux du fleuve Nyong	129
Fig. 40. Têtes de Notonectidae	130
Fig. 41. Pattes antérieures, intermédiaires et postérieures de Notonectidae.....	131
Fig. 42. Morphologie d'une Corixidae	132
Fig. 43. Vues dorsale (A) et ventrale (B) d'une Gerridae	133
Fig. 44. Moyennes mensuelles de la pluviométrie et des températures de la ville de Yaoundé en 2006	136
Figure 45. Evolution du niveau des eaux sur le site n°1 entre la saison des pluies et la saison sèche.....	138
Fig. 46. Courbes de variation des punaises d'eau capturées d'octobre 2007 à janvier 2008 à Akonolinga	139
Fig. 47. Obtention de la salive des punaises d'eau	143
Fig. 48. Exemple de trois familles de punaises et de leurs glandes salivaires principales de punaises d'eau.....	144
Fig. 49. Taux des IgG totales de Camerounais exposés aux piqûres de punaises d'eau	151

Figure 50. Profil immunologique de sujets indemnes reconnaissant les constituants salivaires de <i>Lethocerus sp.</i>	151
Fig. 51. Comparaison de HGS et de la salive de <i>Lethocerus sp.</i>	152
Fig. 52. Constituants salivaires immunogènes chez l’homme se combinant à <i>M. ulcerans</i> ..	153
Tableau 1. Description de la population des patients enquêtés	57
Tableau 2. Facteurs de risque associés à l’ulcère de Buruli après l’appariement des cas-témoins extrafamiliaux.....	58
Tableau 3. Facteurs de risque associés à l’ulcère de Buruli après l’appariement cas-témoins intrafamiliaux.	59
Tableau 4. Modèle expérimental 2.....	84
Tableau 5. Classification des punaises aquatiques	100
Tableau 6. Clé de détermination des familles de punaises aquatiques.....	119
Tableau 7. Caractéristiques de la population des patients après l’analyse ELISA	151

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALES	Aide aux Lépreux Emmaüs-Suisse
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAAR	Bacille acido-alcool Résistant
BCG	Bacille de Calmette & Guérin
BSA	Bovine serum albumine
CD4, 8	Cluster of differentiation 4, 8
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HGS	Homogénat de glandes salivaires
HSR	Hypersensibilité retardée
IDR	Intra dermo-réaction
IgG, M	Immunoglobuline G, M
IL-4, 5...	Interleukine 4, 10...
INF-γ	Interféron Gamma
IS	Insertion sequence
kDa	KiloDalton
LJ	Lowenstein-Jensen
MSF	Médecins Sans Frontières
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate buffered saline
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase chain reaction
PNLUB	Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli
TH	Lymphocyte T helper
TNF	Tumor necrosis factor
UB	Ulcère de Buruli
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
ZN	Ziehl-Neelsen

Introduction générale

L'ulcère de Buruli (UB) est une infection cutanée causée par *Mycobacterium ulcerans*. Signalée dans une trentaine de pays à travers le monde, cette infection constitue aujourd'hui la troisième mycobactériose la plus courante chez l'homme après la tuberculose et la lèpre. Elle sévit principalement dans les régions tropicales et subtropicales humides notamment dans l'ouest et le centre de l'Afrique où elle touche surtout les jeunes des communautés rurales les plus démunies.

L'UB se caractérise par une destruction progressive de la peau, associée à une nécrose du tissu adipeux sous-cutané. Cette destruction des tissus est provoquée par une toxine immunosuppressive sécrétée par la mycobactérie, appelée mycolactone. En raison de cette action immunosuppressive locale, la maladie évolue sans fièvre ni douleur, ce qui explique en partie pourquoi les sujets atteints tardent le plus souvent à se faire soigner. Or en l'absence de traitement, l'infection évolue vers la formation d'un ulcère étendu, avec atteinte des tissus de soutien. Elle entraîne ainsi des incapacités fonctionnelles permanentes des membres voire des amputations.

L'incidence croissante de la maladie à la fin des années 90 et au début des années 2000 a amené l'Organisation Mondiale de la Santé à l'inscrire parmi ses priorités de santé publique. Et depuis la première conférence internationale sur l'UB à Yamoussoukro en 1998, un intérêt croissant a été porté à cette maladie longtemps considérée comme mystérieuse. Il a ainsi été observé des progrès substantiels tels que le développement d'une technique rapide de diagnostic par PCR (158), la mise en évidence de la mycolactone (52), ainsi que du plasmide de virulence portant les gènes qui codent pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la toxine (173), et l'établissement de la carte génomique du bacille (64). Il est à noter également des améliorations en ce qui concerne la prévention des incapacités fonctionnelles et le traitement (91, 149). En effet, pendant longtemps, la chirurgie par exérèse et greffe cutanée était le seul traitement proposé. Mais très récemment, la prise en charge des patients a été améliorée par l'antibiothérapie associant la streptomycine et la rifampicine (149). Lorsque le dépistage et le traitement de la maladie sont mis

en œuvre précocement, cela diminue le coût des soins, de l'hospitalisation mais aussi l'apparition de divers handicaps. Toutefois, les diverses conséquences socio-économiques de cette maladie liées le plus souvent à sa méconnaissance, à son diagnostic tardif et à l'absence d'une prévention efficace, nourrissent l'espoir qu'un vaccin puisse être proposé pour contrôler la diffusion de la mycobactérie.

Les progrès observés ces dernières années, notamment son isolement récent à partir de prélèvement de l'environnement (134) ont permis de mieux cerner la source de l'infection ; mais aussi les facteurs de risques associés à la maladie. Cependant, l'une des inconnues majeures concerne le mode de transmission à l'homme de *M. ulcerans*. Si la transmission interhumaine n'a jamais pu être démontrée, il n'est pas exclu que le bacille puisse pénétrer passivement dans le corps humain par l'intermédiaire de petites lésions cutanées à partir de l'environnement hydro-tellurique contaminées par la mycobactérie. Mais plusieurs observations soulèvent un plus grand intérêt en ce qui concerne l'hypothèse selon laquelle les insectes piqueurs, notamment les hémiptères aquatiques, pourraient intervenir dans la transmission de *M. ulcerans*. Cette hypothèse fait suite à la mise en évidence des mycobactéries chez ces insectes (132, 100, 201) et surtout à la mise au point d'un modèle expérimental de transmission de *M. ulcerans* à la souris par des punaises d'eau infectées (100). A l'aide de ce modèle, on a découvert que *M. ulcerans* était la seule mycobactérie capable de se multiplier activement dans les glandes salivaires de *Naucoris cimicoïdes* , mais aussi que les punaises d'eau (Naucoridae, Belostomatidae) pouvaient à la fois jouer le rôle de réservoir et de vecteur.

En confrontant ces différentes observations avec des données humaines et environnementales obtenues dans une région endémique à l'ulcère de Buruli au Cameroun, nous allons chercher à comprendre le mode de transmission de *M. ulcerans* à l'homme à travers une approche épidémiologique, immunologique et entomologique. Ainsi, après un bref rappel des

données relatives à l'ulcère de Buruli, notre travail sera structuré en trois principales parties, chacune d'elles décrivant la méthodologie et les résultats obtenus dans cette approche multidisciplinaire de la compréhension de la transmission à l'homme de *M. ulcerans*.

CHAPITRE I

GENERALITES

I. Historique

En 1897, Sir Albert Cook, médecin anglais travaillant à Kampala (Ouganda), décrit des ulcérations cutanées semblables à la clinique actuelle de l'ulcère de Buruli. Entre 1923 et 1935, Kleinschmidt, un médecin missionnaire dans le nord-est du Congo Démocratique observe des lésions cutanées à bords creux contenant de nombreux bacilles acido-alcool résistants. Cependant, la première description clinique de cette nouvelle maladie est publiée en 1948 par MacCallum *et al.* à propos de six patients australiens de la région de Bairnsdale; ils nomment ainsi la maladie, ulcère de Bairnsdale (105). Par la suite, ils isolent d'une biopsie, des bacilles acido-alcool résistants poussant à des températures plus basses que celles du bacille responsable de la tuberculose et démontrent le pouvoir pathogène de ces derniers en les inoculant à des animaux de laboratoire. En raison des larges ulcérations cutanées observées au cours de l'infection causée par les bacilles, ils proposent pour ces derniers le nom de *Mycobacterium ulcerans*.

Entre 1960 et 1970, près de 300 cas similaires d'ulcères à *M. ulcerans* sont notifiés dans un camp de 2.500 réfugiés, installés au bord d'un lac dans le district de Buruli (aujourd'hui district de Nakasongola) en Ouganda. L'ulcère à *M. ulcerans* sera dès lors, appelé ulcère de Buruli (188). Dans leur rapport, l'Uganda Buruli Group attire pour la première fois l'attention sur la relation entre la zone humide et la survenue de la maladie et évoque par ailleurs le rôle protecteur du vaccin BCG vis-à-vis de l'infection. Des foyers endémiques d'ulcère de Buruli seront par la suite décrits autour des cours d'eau à débit lent, des marécages, et des lacs (130, 131). Ces observations permettent d'établir l'hypothèse d'un lien étroit entre l'environnement hydro-tellurique et la mycobactérie. On suggère alors que l'environnement pourrait être le réservoir de *M. ulcerans* qui y sera activement recherché. Après les années 80, on observe une recrudescence de l'ulcère de Buruli, particulièrement en Afrique de l'Ouest. En 1997, la découverte de la séquence *IS 2404* et l'avènement de la PCR dans le diagnostic de *M. ulcerans* permettent des avancées considérables (158). En effet, grâce à cette technique, la bactérie sera détectée dans l'eau et sur la végétation

(102, 157, 158, 172), chez certains animaux à sang froid (81, 132), chez les animaux sauvages et chez certains arthropodes (49, 68, 100, 132) ; mais elle ne sera pas isolée de l'environnement. Ces différents travaux permettent toutefois d'émettre des hypothèses sur les modes de transmission et sur les vecteurs potentiels de la mycobactérie.

Suite à la conférence de Yamoussoukro en 1998, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lance « l'Initiative Mondiale de Lutte contre l'ulcère de Buruli » et la classe parmi les maladies émergentes tropicales négligées. La fin des années 90 et le début des années 2000 seront marqués par la découverte de la mycolactone, toxine sécrétée par la mycobactérie (52), à partir d'un plasmide géant portant les gènes responsables de la synthèse de celle-ci, et par l'établissement de la carte génomique de *M. ulcerans* (64, 173) et plus récemment par l'isolement de la mycobactérie de l'environnement (134). Bien que des progrès restent à faire pour une meilleure connaissance de cette maladie, ces découvertes ouvrent la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques parmi lesquelles on peut citer entre autres la recherche d'un traitement antibiotique efficace et la conception d'un vaccin. Plus d'une trentaine de pays tropicaux humides étant sévèrement touchés, l'Assemblée Mondiale de la Santé décide en 2004 d'adopter une résolution (189) visant à :

- améliorer la prise en charge des malades en proposant des structures chirurgicales périphériques et un traitement ;
- mettre en place un réseau de surveillance et favoriser les programmes d'éducation sanitaire ;
- accélérer la recherche sur la transmission, la prévention, le traitement et la mise au point de meilleurs outils de diagnostic.

II. Pathogénie et manifestations cliniques

II-1 L'agent pathogène

Mycobacterium ulcerans, agent responsable de l'ulcère de Buruli est après *M. tuberculosis* et *M. leprae*, la troisième mycobactérie responsable d'une mycobactériose chez les individus immunocompétents. Comme toutes les mycobactéries, elle appartient selon la taxonomie au phylum des *Actinobacteria*, à l'ordre des *Actinomycetales*, au sous-ordre des *Corynebacterinae* et à la famille des *Mycobacteriaceae* qui compte un genre unique: le genre *Mycobacterium*. C'est un bacille immobile, non capsulé, non sporulant, à paroi riche en lipides dont les acides mycoliques à longue chaîne carbonée. Ceux-ci ont la particularité de former une barrière hydrophobe autour de la cellule et empêchent l'action décolorante des acides et des alcools, d'où le nom de bacille acido-alcool résistant donné aux mycobactéries.

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente qui se distingue des autres mycobactéries de ce groupe par ses caractères phénotypiques et génétiques. Il forme sur le milieu de culture de Löwenstein-Jensen, des colonies rugueuses, à bords bien démarqués et jaunâtres, les souches africaines étant beaucoup plus colorées que les souches australiennes (133). Pour une croissance optimale, il nécessite une température comprise entre 29 et 33°C, un pH entre 5,4 – 7,4 et une microaérophilie (133). C'est une mycobactérie de l'environnement, associée le plus souvent à un écosystème aquatique. Elle a la capacité de s'organiser en biofilms, ce qui favorise son adaptation aux diverses niches écologiques de son réservoir hydro-tellurique (végétaux et animaux aquatiques), sa transmission et sa virulence (97, 98, 102). *M. ulcerans* est en général considéré comme un microorganisme extracellulaire. Néanmoins, des études expérimentales ont montré qu'au stade précoce de la maladie, la mycobactérie présentait de manière transitoire des passages intracellulaires (31, 119, 187). La taille de son génome est d'environ 5,6 Mb. Il est constitué de deux réplicons circulaires, d'un chromosome d'un peu plus de 5.600 Kb et d'un plasmide de virulence de 174 Kb (173-175) (Fig. 1). Le plasmide nommé pMUM001 porte les

gènes codant pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la toxine sécrétée par la mycobactérie. Le chromosome abrite deux prophages, 302 séquences d'insertion dont 209 copies d'*IS 2404* et 83 copies d'*IS 2606* (175).

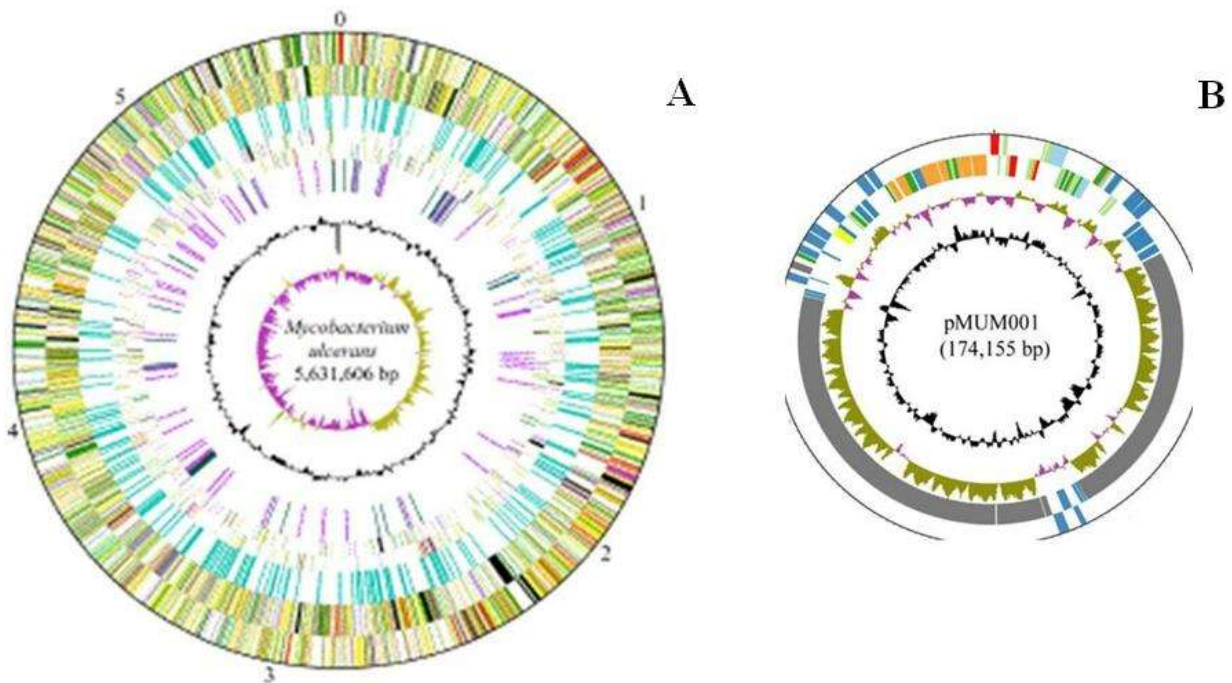


Fig. 1. Le génome de *Mycobacterium ulcerans*. (A) Le chromosome est constitué d'environ 5,6 Mb. (B) Sur le plasmide de 174 kb sont localisés les gènes qui codent pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la toxine sécrétée par la mycobactérie.

La détection par PCR de la séquence *IS 2404* dans les échantillons cliniques est spécifique à *M. ulcerans* et constitue une méthode sûre de confirmation de l'infection par la mycobactérie. Grâce à l'analyse par des VNTR de cette séquence, il a également été possible non seulement d'observer une discrimination génétique des souches de *M. ulcerans* en fonction de leur origine géographique (177), mais aussi de distinguer cette dernière des autres mycobactéries environnementales *IS 2404* positives (178).

II-2 Les Manifestations cliniques

L'ulcère de Buruli est une infection à tropisme cutané, avec parfois, des atteintes osseuses. Sa période d'incubation demeure indéterminée, variant de quelques jours à plusieurs mois voire plusieurs années (133). Le tableau clinique évolue en général sans fièvre, avec une conservation de l'état général.

II-2-1 Les formes cutanées classiques

Classiquement, la maladie évolue en trois phases : une phase pré-ulcéralive, une phase ulcéralive et une phase de cicatrisation.

II-2-1-1 La phase pré-ulcéralive

Elle est encore appelée phase de début. Longtemps méconnue des patients et de leur entourage, elle passait souvent inaperçue. Toutefois, grâce aux programmes nationaux de dépistage de la maladie mis en place depuis quelques années, elle est de moins en moins ignorée par les populations exposées à la maladie. Elle apparaît sous quatre formes cliniques différentes (Fig. 2).

a) La forme nodulaire

C'est la forme la plus fréquente en Afrique. Il s'agit d'un nodule sous-cutané de deux centimètres de diamètre environ, dur et bien délimité. Habituellement unique, indolore, adhérent à la peau et mobile au plan profond, il peut parfois s'accompagner d'un prurit et d'un halo œdémateux.

b) La papule

Plus courante en Australie, elle apparaît sous la forme d'une lésion cutanée surélevée de moins d'un centimètre de diamètre, prurigineuse, indolore et adhérente à la peau.

c) La plaque ou placard

Il s'agit d'une lésion de plus de deux centimètres de diamètre, dure, bien limitée, surélevée, à bords irréguliers et indolore. Au dessus de la lésion, la peau est souvent rouge et dépigmentée.

d) La forme œdémateuse

Elle apparaît de manière progressive ou brutale et se présente sous la forme d'une tuméfaction diffuse. Elle est ferme et ne prend pas le godet. Plus ou moins douloureuse, elle peut s'étendre sur tout un membre ou à une zone du corps. Elle peut parfois être accompagnée de fièvre.

Ces différentes lésions peuvent coexister et sont le plus souvent localisées sur les parties découvertes des membres. En effet, 75 à 90% des lésions se situent sur les membres. Cependant, elles peuvent apparaître sur n'importe quelle partie du corps y compris l'abdomen, le thorax et même le visage.

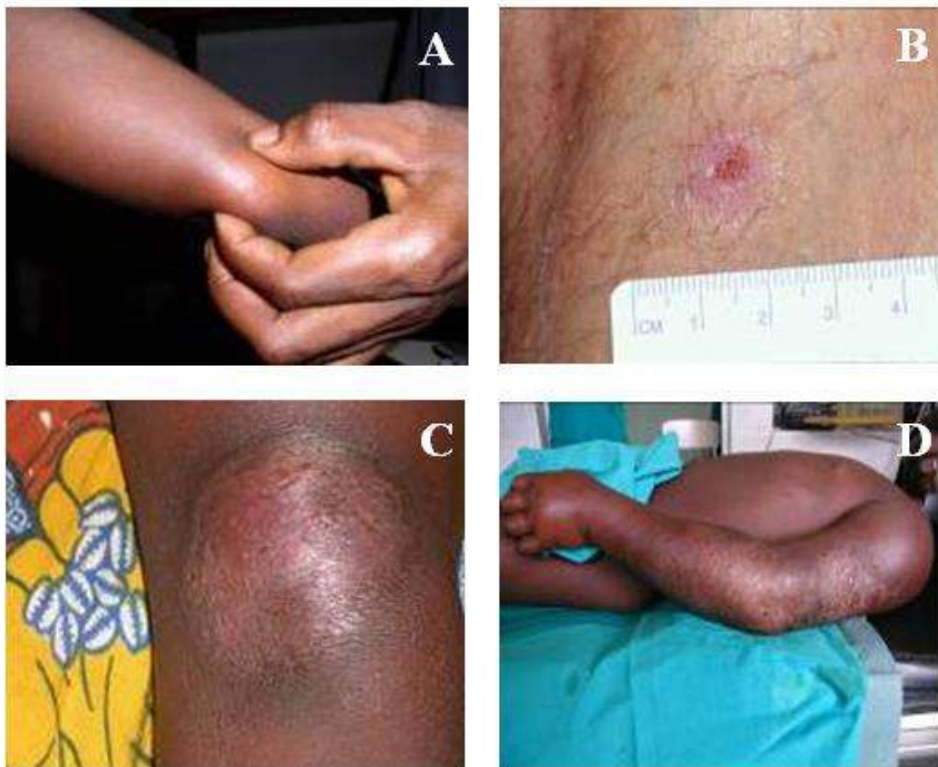


Fig. 2. Formes cliniques de l'ulcère de Buruli en phase pré-ulcéralive. (A) Nodule sous-cutané dur et bien délimité, mobile au plan profond. (B) Papule d'environ 1 cm de diamètre. (C) Plaque nette recouverte d'une peau d'aspect cartonné et décoloré. (D) Œdème diffus ferme ne prenant pas le godet.

II-2-1-2 La phase ulcéralive

Encore appelée phase d'état ou de progression, elle survient en l'absence de traitement efficace au cours de la phase pré-ulcéralive. Elle est marquée par l'élimination d'un sphacèle cutané de taille variable, laissant place à une ulcéralion cutanée profonde, indolore et chronique. Elle présente un décollement périphérique de ses bords épaissis et indurés, qui se soulèvent au passage de l'écouvillon. Elle se caractérise par la destruction et la nécrose du tissu graisseux sous-cutané. La base nécrosée est parfois blanche et cotonneuse (Fig. 3 A). Une hyperpigmentation cutanée franche est souvent retrouvée autour de l'ulcéralion. L'ulcéralion apparaît à n'importe quelle partie de la lésion initiale et s'agrandit plus ou moins rapidement. La lésion peut être unique ou multiple, et dans ce cas communiquer sous la peau intacte (Fig. 3 B). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, cet ulcère est en général indolore, ce qui explique en partie, le recours tardif du patient à une structure hospitalière. En l'absence de traitement, il évolue vers des complications ou plus rarement vers la phase de cicatrisation



Fig. 3. Ulcère de Buruli en phase ulcéral. (A) On note une hyperpigmentation autour de l'ulcère, des bords épaissis et décollés, une nécrose grasseuse d'aspect jaunâtre (document OMS). (B) Communication de deux lésions ulcérées sous la peau intacte (Hayman, 1993).

II-2-1-3 La phase de cicatrisation

La cicatrisation spontanée des lésions apparaît après plusieurs mois d'évolution. Elle fait suite à la détersion de l'ulcère et à l'accolement des bords d'où part l'épidermisation. Le tissu cicatriciel est fibreux, scléreux et forme dans le meilleur des cas, une cicatrice affaissée en étoile. Le plus souvent, le long processus de cicatrisation aboutit à des séquelles importantes, mettant en jeu le pronostic fonctionnel et esthétique du patient. En effet, suite aux adhérences et à la rétraction cicatricielle de lésions articulaires ou péri-articulaires, on observe en général une diminution de l'amplitude des mouvements, l'articulation s'ankylose et devient non fonctionnelle. La guérison spontanée de l'ulcère de Buruli se fait donc au prix de graves handicaps secondaires (Fig. 4 A).

II-2-2 Les atteintes ostéo-articulaires

Les ostéomyélites dues à *M. ulcerans* représentent une forme clinique particulière. Leur fréquence d'apparition est variable et peut aller jusqu'à 14 % (85). Elles se manifestent dans 80 % des cas par la tuméfaction localisée d'un membre, non inflammatoire et peu douloureuse. Selon Lagarrigue *et al.*, chez 6 sur 15 patients béninois, l'ostéomyélite était survenue après un antécédent d'ulcère cutané cicatrisé, ce qui suggère une réactivation de la lésion au cours de la maladie. Chez les 9 autres patients, l'atteinte osseuse serait d'origine hématogène. On a ainsi distingué des ostéomyélites de contact qui apparaissent suite à une propagation contiguë de l'infection, des ostéomyélites métastatiques, qui pourrait être liée à la présence de *M. ulcerans* dans le système lymphatique ou le sang. Outre les ostéomyélites, on a rapporté des ostéites et ostéo-arthrites dues à *M. ulcerans* (63). La présence de la bactérie dans les tissus osseux

s'expliquerait par une adaptation de celle-ci à la température corporelle (37°C), largement supérieure aux 30° C requis pour sa croissance en laboratoire.

II-2-3 Les autres atteintes

En dehors d'une atteinte des ganglions qui avait été décrite en Guyane française (136), aucune autre n'a encore été signalée.

II-2-4 Les complications

II-2-4-1 Les surinfections

Les surinfections sont rares. Cependant, il n'est pas exclu, du fait de l'étendue des lésions et de leurs expositions, que surviennent des complications graves à type de tétanos ou de septicémie par des germes Gram négatifs (*K. pneumonia*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) et Gram positifs (*S. aureus*), dont l'issue peut être fatale (72).

II-2-4-2 Le cancer de la peau

Bien qu'elles soient rares, des cancérisations secondaires aux lésions d'ulcère de Buruli ont été observées (Fig. 4 B).

II-2-4-3 Les séquelles

Elles sont le plus souvent secondaires à des cicatrisations spontanées ou à des traitements tardifs des lésions ulcérées. La phase ulcérate peut-être à l'origine de lésions irréversibles et invalidantes du fait de la destruction du tissu musculaire et osseux. Les séquelles sont à type de bride chéloïdienne, de rétractions tendineuses, d'ankylose, d'atrophie, de blocage fonctionnel et d'amputation thérapeutique (Fig. 4 C et D). Du fait des impotences fonctionnelles qu'elles entraînent, les séquelles de l'ulcère de Buruli ont un impact socio-économique important au sein des communautés touchées par la maladie.

II-2-4-4 Les rechutes

Il s'agit de lésions qui réapparaissent au même endroit ou à un autre, différent de la lésion initiale, chez un patient pour lequel les lésions antérieures ont été déclarées complètement guéries suite à un traitement antibiotique associé ou non à la chirurgie. Elles sont assez fréquentes, comme en témoigne le taux de 17 % rapporté par une étude réalisée en Côte- d'Ivoire (73).

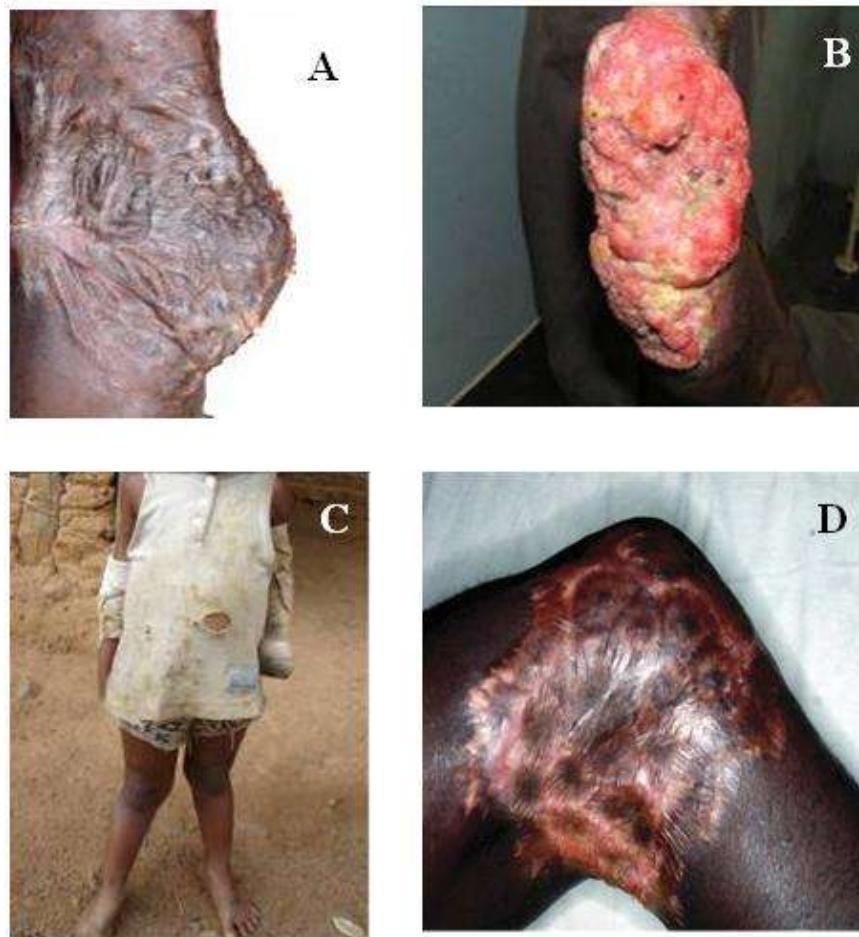


Fig. 4. Séquelles et complications liées à l'ulcère de Buruli. (A, B et C documents MSF; Akonolinga 2006, Cameroun ; D, Morand, 2005). (A) Cicatrice spontanée au niveau du genou (B) Cancérisation d'un membre supérieur secondaire à un ulcère de Buruli (C) Amputation

thérapeutique suite à une surinfection bactérienne d'une main ulcérée. (D) Cicatrice rétractile entraînant une impotence fonctionnelle du genou.

II-3 La mycolactone

La gravité des lésions cliniques cutanées causées par *M. ulcerans* notée au cours de l'examen anatomo-pathologique évoquait principalement l'action d'une toxine.

Celle-ci connue sous le nom de mycolactone fut découverte en 1998 par Georges *et al.* (51, 52). Il s'agit d'un composé lipidique appartenant à la classe des macrolides dérivés de polykétides. Des expériences *in vitro* ont démontré que cette toxine était responsable de la virulence de *M. ulcerans*. En effet, lorsque que d'une part, la mycolactone purifiée était injectée à des cobayes, on observait des lésions dont l'histopathologie était similaire à celle observée au cours de l'ulcère de Buruli (52). D'autre part, l'injection de souches de *M. ulcerans* ne produisant pas de mycolactone n'était pas virulente. Bien l'on ne connaisse pas parfaitement le mécanisme d'action de cette toxine, on a démontré qu'elle pénètre dans la cellule par diffusion, s'accumule dans le cytosol et entraîne une apoptose cellulaire suivie d'une nécrose des tissus. De plus, elle exerce localement une activité immunosuppressive (2, 41, 52, 53, 121, 167, 186). En effet l'analyse par des puces à ADN de macrophages humains traités avec la toxine a montré une altération de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire (167). Il existe différents types de mycolactone en fonction de l'origine géographique des souches de *M. ulcerans* (Fig. 5 A-D). Les souches isolées des zones endémiques africaines sont majoritairement productrices d'un mélange de mycolactone A et B. Tandis que les isolats australiens produisent surtout la mycolactone C et les isolats asiatiques la mycolactone D (112). Cette hétérogénéité de structure de la mycolactone a une implication considérable dans la virulence de la mycobactérie. Les mycolactones C et D étant beaucoup moins actives que les deux autres (A et B), les ulcérations extensives et disséminées sont beaucoup moins fréquentes en Australie et en Asie qu'en Afrique (112, 194).

Les gènes codant pour les polykétides synthétases qui sont les enzymes responsables de la synthèse de la mycolactone, ont été localisés sur le plasmide pMUM001 du génome de la mycobactérie (173) (Fig. 1B). *M. ulcerans* est la seule mycobactérie pour laquelle la virulence dépende exclusivement de la sécrétion d'une toxine. Récemment, d'autres toxines apparentées furent découvertes chez d'autres mycobactéries isolées de l'environnement telles que *M. liflandii* productrice de la mycolactone E, *M. marinum* et *M. pseudoshottsii* productrices de la mycolactone F (113, 145).

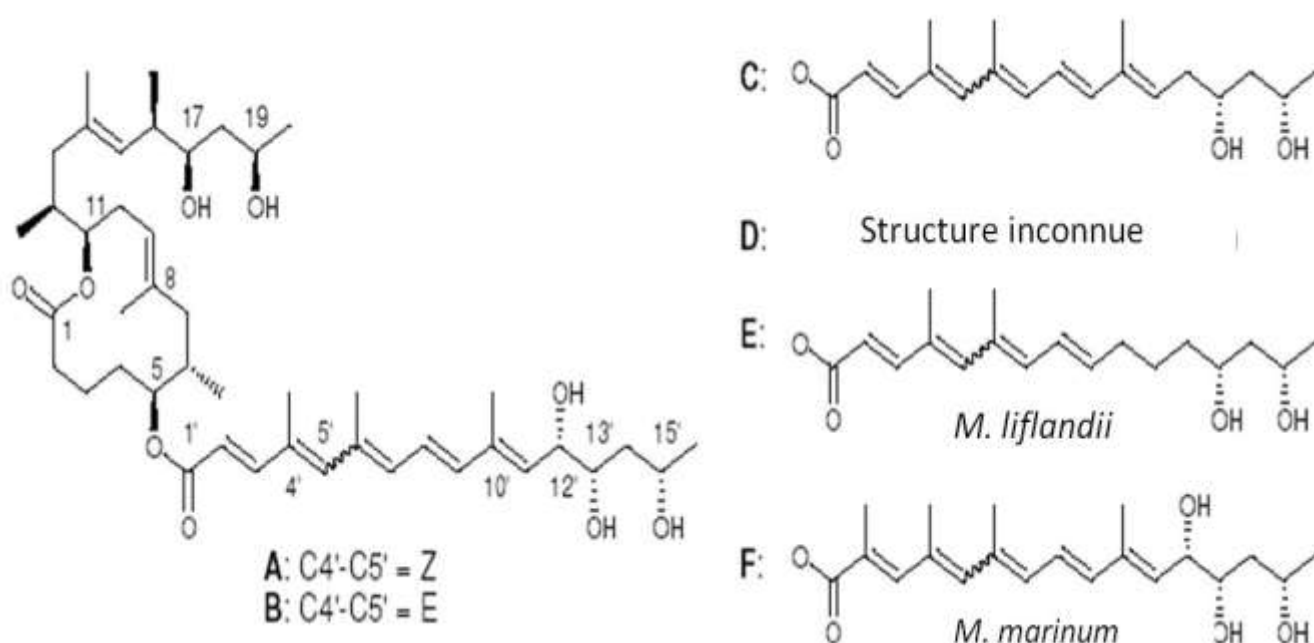


Fig. 5. Structure chimique des différentes mycolactones. Le noyau lactone reste le même, seule la chaîne latérale présente des structures et/ou conformation chimique différente en fonction de l'origine géographique de la souche *M. ulcerans* (A, B, C, D) ou de la mycobactérie sécrétrice de la toxine (E, F) .

II-4 Histopathologie des lésions

M. ulcerans affecte principalement le tissu sous-cutané et est responsable de lésions évoluant d'un stade pré-ulcératif (stade précoce de la maladie) à celui de larges ulcérations

cutanées suivies ou non de guérison spontanée. L'observation microscopique des lésions non ulcérées montre des zones circonscrites de nécrose hypodermique par coagulation dans le tissu adipeux, le derme et parfois l'aponévrose. Les adipocytes ont perdu leurs noyaux, mais ont gardé leur membrane. La coloration de Ziehl-Neelsen révèle de nombreux bacilles acido-alcoolo résistants principalement au centre des lésions. La nécrose se propage en suivant les cloisons conjonctives qui limitent les globules graisseux et s'étend bien au-delà du foyer bacillaire. Ceci est la conséquence de la diffusion de la mycolactone le long des travées conjonctivo-vasculaires (109). On retrouve quelques cellules inflammatoires notamment les polynucléaires dans les zones adjacentes à la nécrose. Dans les lésions œdémateuses et les plaques, la nécrose s'étend latéralement dans le pannicule et l'aponévrose mais épargne relativement le derme (59, 60, 62).

Les lésions ulcérées se caractérisent par des bords creusés par la destruction du pannicule. La base de l'ulcère est constituée de débris nécrosés et de fibrine. Sur les bords de la peau qui recouvre l'ulcère, on observe une nouvelle épidermisation et une hyperplasie de l'épiderme. Les BAAR se limitent en grande partie à la base de l'ulcération (109), le muscle sous-jacent est rarement envahi. Les lésions vasculaires sont importantes et sont d'origine ischémique. La nécrose ischémique de l'hypoderme diffuse latéralement et de façon centrifuge, sous le derme et l'épiderme d'où le décollement des bords de l'ulcère. La réaction inflammatoire n'est pas notable au niveau de la zone nécrotique, toutefois on observe parfois une infiltration de quelques polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et macrophages.

Au cours de la phase de guérison, la zone nécrosée se retrouve entourée par une réaction inflammatoire de type granulomateuse. Elle est constituée d'un influx intralésionnel de lymphocytes, de monocytes, de macrophages et de cellules géantes multinuclées. Une fibrohyalinose se constitue ensuite et vient remplacer la nécrose pour mener à la guérison (59, 60, 62).

L'observation des lésions osseuses montre une moelle nécrosée et des travées osseuses érodées. Les BAAR sont en

nombre variable, des infections secondaires sont fréquentes et il arrive que l'os soit complètement détruit.

III. Diagnostic

Pour la plupart des individus vivant en zone d'endémie, le diagnostic d'ulcère de Buruli est posé sur la base de critères cliniques par un praticien expérimenté. Cependant, il est important de confirmer le diagnostic clinique par des examens de laboratoire. Ceci permet d'une part d'éviter des confusions possibles avec d'autres pathologies dont certains stades cliniques sont semblables à ceux observés au cours de l'ulcère de Buruli. D'autre part, les examens de laboratoire jouent un rôle majeur dans le suivi du traitement et de l'apparition de formes récurrentes. Selon les recommandations de l'OMS, pour confirmer le diagnostic d'ulcère de Buruli, il est nécessaire d'avoir au moins deux des quatre éléments suivants : 1) la présence de BAAR suite à l'examen direct d'un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen; 2) une culture positive de *M. ulcerans* ; 3) une étude histo-pathologique d'un échantillon de biopsie prélevée sur une lésion ; 4) une recherche positive de l'ADN de *M. ulcerans* par PCR.

III-1 L'examen direct

Après coloration du frottis suivant la technique de Ziehl-Neelsen, la positivité de l'examen direct se traduit par l'observation de BAAR au microscope (Fig. 6). Cette technique n'est pas très sensible et nécessite de ce fait, d'avoir une concentration d'environ 10 bacilles/ml de prélèvement pour avoir un résultat positif. Elle manque également de spécificité car la présence de BAAR ne permet pas de conclure à une infection par *M. ulcerans*. Cet examen est cependant rapide, peu coûteux et ne nécessite pas un équipement complexe. Il reste donc un examen de diagnostic approprié dans les régions endémiques où les moyens sont limités.

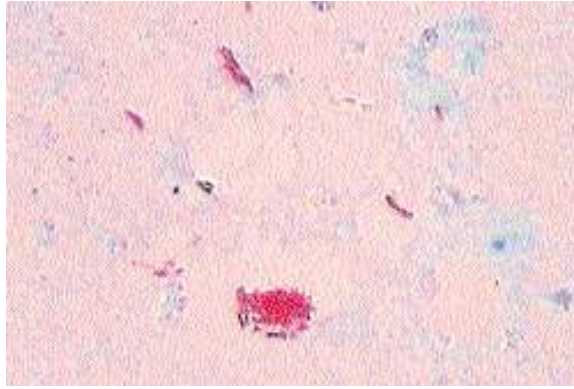


Fig. 6. Coloration de Ziehl-Neelsen sur l'écouvillon d'un patient atteint d'ulcère de Buruli.

Les amas de bacilles acido-alcool résistants apparaissent en rose fushia sur un fond clair (document OMS, 2001).

III-2 La mise en culture de *M. ulcerans*

La croissance *in vitro* de la mycobactérie dépend de plusieurs paramètres parmi lesquels on peut citer le choix du milieu de culture, de la technique de décontamination du prélèvement et des conditions d'incubation. De tous les milieux solides classiquement utilisés pour la culture des mycobactéries, le Löwenstein-Jensen convient le mieux pour la culture de *M. ulcerans*. Celle-ci croît de manière préférentielle à une température comprise entre 29°C et 33°C. Cependant, la croissance est très lente et il faut compter en général 6 à 8 semaines pour avoir des colonies en culture primaire. Elles apparaissent jaunâtres, rugueuses et à bords bien démarqués. La sensibilité de la culture dépend des formes cliniques de la maladie et se situe approximativement entre 20 et 60 %. Quant à la spécificité, elle est de 96% environ (146).

III-3 Le diagnostic moléculaire

La mise au point de l'amplification génique a été un atout majeur pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli. En effet, à cause de sa rapidité avec la confirmation du diagnostic dans les 24 heures, de sa sensibilité et de sa spécificité, elle supplante nettement les autres examens de

laboratoire. Toutefois, cette technique est relativement coûteuse et nécessite une expérience certaine, afin d'éviter des résultats faussement positifs. Elle peut donc difficilement être utilisée en routine dans certains pays africains endémiques à l'ulcère de Buruli. La cible préférentielle pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli par PCR est la séquence d'insertion *IS 2404*. On retrouve 209 copies de cette séquence dans le génome de *M. ulcerans* (175). Elle peut être détectée directement dans les échantillons cliniques ou à partir de milieux de culture. Malgré le fait que cette séquence ait également été retrouvée chez d'autres mycobactéries de l'environnement, sa détection par PCR dans les échantillons cliniques reste une méthode sûre de confirmation de l'infection par *M. ulcerans*. Ceci se justifie par le fait que les autres mycobactéries environnementales n'entraînent pas sur le plan clinique, des lésions similaires à celles observées au cours de l'ulcère de Buruli. Par contre, la détection la séquence *IS 2404* dans les échantillons de l'environnement n'est pas spécifique à *M. ulcerans*. Ainsi la confirmation de la présence de la mycobactérie dans un échantillon de l'environnement nécessite des analyses moléculaires complémentaires telles que la détection par PCR de la séquence *IS 2606* et d'une séquence de la kétoréductase, présente au niveau des gènes codant pour les polykétides synthétases (49) ; ou l'analyse par VNTR de la séquence *IS 2404* (178). La récente application de la PCR en temps réel au diagnostic moléculaire de *M. ulcerans* a permis d'améliorer de manière considérable le diagnostic moléculaire de l'ulcère de Buruli (156). Egalement basée sur la détection de la séquence *IS 2404*, elle est 10 fois plus sensible que la PCR conventionnelle et contrairement à cette dernière, elle permet de quantifier *M. ulcerans* présent dans les prélèvements. La PCR en temps réel offre également un avantage certain sur le plan épidémiologique. En effet, son adaptation en PCR multiplex permet de confirmer la présence de la mycobactérie dans les prélèvements de l'environnement (49), favorisant ainsi la découverte de nouvelles niches écologiques de la bactérie.

III-4 L'examen histo-pathologique

Pour cet examen, il est important de bien choisir le site d'excision de la biopsie destinée à l'analyse. L'échantillon sera prélevé au centre de la lésion pour les formes cliniques non ulcératives ou sur les bords de l'ulcère pour les lésions ulcérées. Il est conseillé d'inclure toutes les couches du tissu cutané jusqu'à l'aponévrose. Après fixation, les coupes de tissus seront colorées par divers colorants mettant en évidence les différents éléments recherchés à savoir : la modification des cellules cutanées, la présence de BAAR, la présence de surinfections bactériennes, etc. La nécrose du tissu sous-cutané et du collagène hypodermique, associée à la présence de quelques cellules inflammatoires et de BAAR constituent le plus souvent, le schéma histo-pathologique caractéristique de la maladie. La sensibilité de cet examen est supérieure à 90%.

IV. Traitement

Le traitement chirurgical fut pendant longtemps le seul moyen thérapeutique de l'ulcère de Buruli, en proposant des excisions plus ou moins étendues de la lésion nécrosée avec ou sans greffe de peau. Il est cependant limité entre autres par l'insuffisance des installations chirurgicales et des compétences dans la plupart des zones d'endémie, le coût élevé, la longue période d'hospitalisation nécessaire après la chirurgie, et les rechutes. Le taux de rechute après un traitement chirurgical varie entre 18 et 47 % suivant les indications opératoires et la gravité des lésions (66). Pour toutes ces raisons, l'une des priorités de l'OMS a été d'intensifier la recherche de traitements médicamenteux efficaces contre l'ulcère de Buruli. Suite aux résultats très encourageants démontrant l'activité bactéricide de la combinaison rifampicine–amikacine chez la souris (38), des essais cliniques ont commencé à être menés chez l'homme. Ainsi, on a rapporté dans un essai au Ghana, qu'un traitement d'au moins 4 semaines avec l'association rifampicine-streptomycine inhibait complètement la croissance de *M. ulcerans* notamment dans les lésions

pré-ulcéraires (46). Ces résultats ont été confirmés au Bénin, où 94,2% des patients ont été guéris après 4 à 8 semaines de traitement par cette même combinaison. L'antibiothérapie était associée (chez 53% des cas) ou non (chez 47% des cas) à la chirurgie, en fonction de la gravité des lésions (23, 24). Le taux de rechute observé un an après l'antibiothérapie était seulement de 3%. Ces différents travaux ont amené l'OMS à recommander que soit administrée dans le traitement de l'ulcère de Buruli, la combinaison rifampicine-streptomycine associée ou non à la chirurgie (149). Toutefois, l'injection intra-musculaire quotidienne de la streptomycine demeure très contraignante dans certaines zones rurales des pays endémiques et constitue un facteur de risque de l'infection par le VIH. Il est donc important que soient développés d'autres moyens thérapeutiques, traitement oral par exemple, afin de simplifier la prise en charge sur le terrain. Un intérêt particulier devrait également être mis dans la recherche de moyens de prévention efficace comme le développement d'un vaccin.

Afin de prévenir les incapacités fonctionnelles dues à la maladie, des séances de kinésithérapie ont également été recommandées dans la prise en charge des patients atteints d'ulcère de Buruli (91).

V. Ecologie et transmission de *M. ulcerans*

Le mode de transmission de *M. ulcerans* à l'homme demeure l'une des préoccupations majeures de l'infection par cette mycobactérie. L'observation des comportements au sein des communautés où la maladie est endémique laisse à penser qu'elle ne se transmettrait pas d'une personne à une autre. A ce jour, on ne dispose d'aucun élément indiquant la possibilité d'une transmission inter-humaine.

La localisation de la majorité des foyers endémiques à l'ulcère de Buruli dans des régions marécageuses ou dans lesquelles le réseau hydrographique naturel a été modifié, est à l'origine de l'association de l'infection à la présence de cours d'eau à débit lent ou stagnant (67, 114, 120, 131,

176). *M. ulcerans* serait ainsi un micro-organisme de l'environnement transmis à l'homme à partir d'une niche aquatique. Selon les hypothèses admises, cette transmission se ferait de manière passive ou active par l'intermédiaire de petites lésions cutanées négligées sinon mal traitées. La transmission passive serait consécutive à un contact direct plus ou moins prolongé avec l'environnement contaminé. L'homme s'infecterait vraisemblablement au cours de ses activités (vaisselle, lessive, collecte d'eau de boisson, maraîchage, agriculture, etc.). D'autre part, *M. ulcerans* présent à la surface de la peau pourrait être introduit dans la couche sous-cutanée à la faveur d'une injection, d'une morsure ou d'une blessure (37, 63). La transmission active quant à elle résulterait de piqûres de punaises d'eau infectées par *M. ulcerans* (100). Ce mode de transmission qui est le seul à avoir été démontré expérimentalement, fait de l'ulcère de Buruli, la seule mycobactériose humaine dont la transmission ferait intervenir un insecte vecteur. La mycobactérie a été de ce fait, retrouvée dans les glandes salivaires de punaises d'eau africaines (97, 100, 132).

Oltre le fait que *M. ulcerans* ait été mis en évidence par PCR dans l'eau, la boue, les végétaux aquatiques, les mollusques, les insectes aquatiques, les crustacées et les petits poissons (102, 157, 158, 172, 100, 132, 81, 201); la relation étroite entre la mycobactérie et la niche aquatique à partir de laquelle elle serait transmise à l'homme a été confirmée par l'isolement récent de *M. ulcerans* (134). En effet, on a isolé à partir de la culture d'une punaise aquatique de la famille des Gerridae (*Gerris sp.*) capturée dans un marécage d'une localité béninoise endémique à l'ulcère de Buruli, une souche de *M. ulcerans* nommée 00-1441 dont l'identification et la caractérisation de cette dernière ont montré qu'elle était en plusieurs points identiques aux souches isolées des lésions des patients africains. En effet, la souche 00-1441 présente quasiment les mêmes caractères phénotypiques et génotypiques que ceux des isolats africains (177, 25, 26). Elle est également productrice d'une mycolactone de type A/B responsable de chez la souris de lésions histo-pathologiques similaires à celles décrites chez l'homme atteint d'ulcère de Buruli (134).

La mise en évidence de *M. ulcerans* chez les punaises d'eau de la famille des Naucoridae et des Belostomatidae (132, 201), ainsi que les données expérimentales du modèle d'infection chez la souris (100) suggèrent fortement que ces insectes pourraient être impliqués dans la transmission à l'homme de la mycobactérie. L'isolement de celle-ci à partir des Gerris étend à d'autres familles, le rôle de ce groupe d'insectes dans la transmission de la mycobactérie. Cependant, les gerris étant des punaises d'eau prédatrices dont l'agressivité pour l'homme n'a pas encore été rapportée, leur rôle dans la transmission de *M. ulcerans* se limiterait jusqu'à preuve du contraire à celui de réservoir passif transitoire ou non. D'après une étude réalisée dans le Sud-Est de l'Australie, les moustiques trouvés positifs à *M. ulcerans*, seraient également mis en cause dans la transmission de *M. ulcerans* (49, 68). Toutefois, on n'a pas encore démontrée s'il s'agirait de vecteurs mécaniques ou biologiques.

VI. Objectifs

VI-1 Objectif général

L'objectif général de cette thèse est de chercher à comprendre le mode de transmission de *M. ulcerans* à l'homme. Nous allons pour cela confronter les observations chez l'homme et dans l'environnement afin de ressortir des paramètres épidémiologiques, immunologiques et entomologiques associés à la transmission à l'homme de la mycobactérie dans une zone endémique camerounaise.

VI-2 Objectifs spécifiques

Il s'agira spécifiquement de :

- Réaliser une enquête cas-témoins auprès des individus afin de décrire les facteurs de l'environnement qui associés à des activités humaines seraient caractéristiques de l'infection ceci dans le but de mettre en évidence d'éventuels facteurs de risques à l'apparition de la maladie ;

- Réaliser une étude séro-épidémiologique, cas/témoins comparant la prévalence de la séropositivité à la salive de punaise afin d'apporter une explication au fait que dans un même environnement, seuls certains individus présentent des lésions et notamment les plus jeunes.
- Déterminer le spectre des protéines de la salive d'une punaise aquatique en caractérisant au moins un des constituants immunogènes se fixant sur *M. ulcerans*
- D'apporter des données nouvelles à la détermination d'une clé d'identification des espèces africaines de punaises d'eau inventoriées dans cette étude.

CHAPITRE II

UNE ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE : ETUDES DES FACTEURS DE RISQUE A L'ULCERE DE BURULI AU CAMEROUN

A. Avant-propos

I. Distribution géographique de l'ulcère de Buruli

Décrite pour la première fois en 1948 en Australie, l'ulcère de Buruli a depuis été signalé dans plus d'une trentaine de pays dans le monde. Cette maladie apparaît en général sous forme de foyers endémiques circonscrits dans un écosystème caractéristique. Le continent africain est le plus touché, cependant, des cas ont également été notifiés en Amérique (Brésil, Guyane française, Mexique, Pérou, Bolivie et Surinam), en Asie (Indonésie, Sri Lanka), et dans le Pacifique occidental (Australie, Chine, Japon, Malaisie, Papouasie Nouvelle-Guinée) (Fig. 7 A).

II. Diffusion de l'ulcère de Buruli dans le temps

Depuis 1998, des réunions sur l'ulcère de Buruli sont organisées chaque année à Genève par l'OMS. Elles regroupent entre autres, les chercheurs et les représentants des ministères de la santé des pays endémiques. Elles permettent de coordonner sur le plan international, les moyens mis en œuvre pour mieux connaître la maladie afin de développer contre elle des stratégies de lutte efficaces. Elles ont ainsi favorisé la mise en place de réseaux nationaux de surveillance épidémiologique de l'ulcère de Buruli. Grâce à ces derniers, des données de plus en plus précises sur l'incidence et la prévalence de la maladie sont maintenant disponibles.

II-1 En Afrique Sub-saharienne

En Afrique, l'ulcère de Buruli a été signalé dans une vingtaine de pays. En 2004, le nombre de cas cumulés dans le continent dépassait les 40.000 (204). Ce sont principalement les pays situés autour du Golfe de Guinée entre les 10^{èmes} degrés de latitude Nord et Sud qui ont touchés par la maladie (Fig. 7 B). Ce sont particulièrement dans les pays d'Afrique de l'Ouest et du Centre qu'ont été rapportés les taux de prévalence les plus importants (Fig. 8)

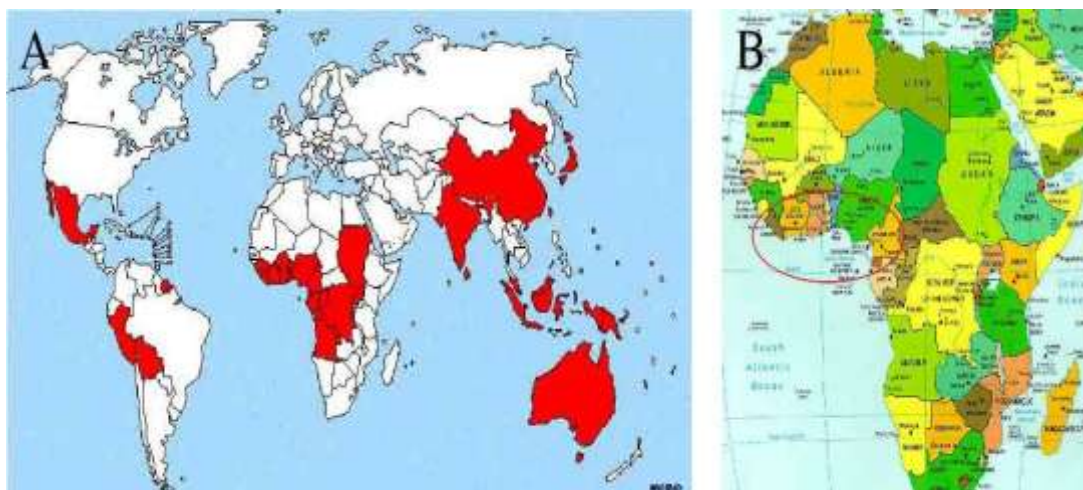


Fig. 7. Répartition géographique des cas d'ulcère de Buruli (source OMS). (A) L'ulcère de Buruli est une maladie qui sévit principalement en zone tropicale. (B) Elle est particulièrement rencontrée à l'ouest de l'Afrique, autour du golfe de Guinée.

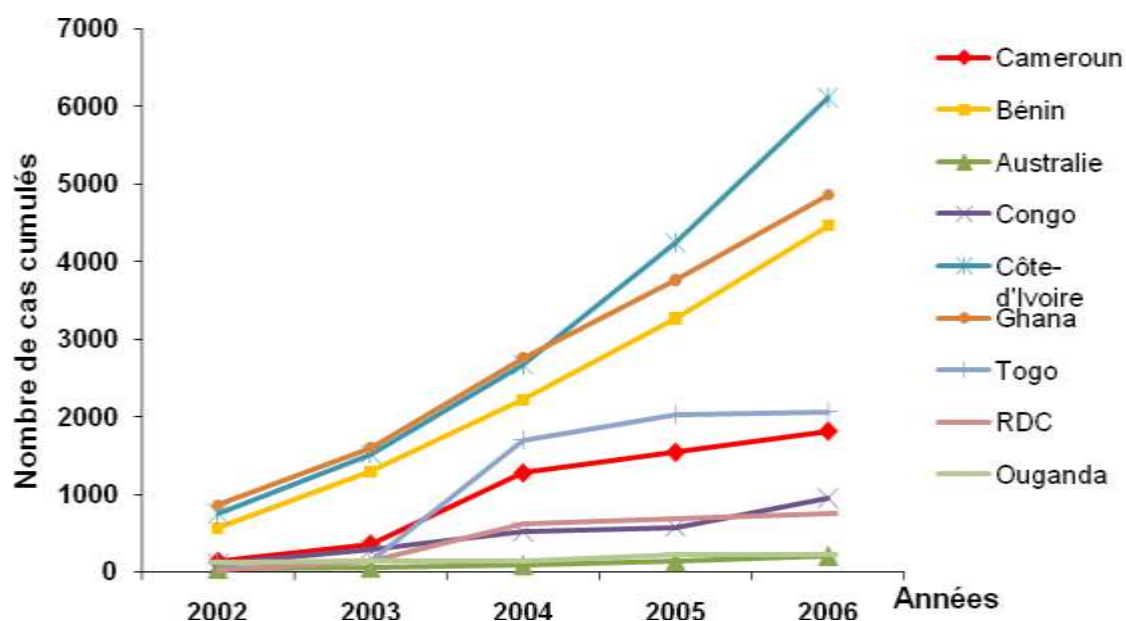


Fig. 8. Evolution du nombre de cas cumulés d'ulcère de Buruli entre 2002 et 2006 (document OMS, 2007).

II-1-1 Le cas de l'Afrique de l'Ouest

C'est vers la fin des années 70 et le début des années 80 que les cas d'ulcère de Buruli ont commencé à être notifiés dans les pays de l'Ouest de l'Afrique. Au cours des années 90 et le début des années 2000, on observe une recrudescence de la maladie avec une augmentation importante de l'incidence (Fig. 8). L'ulcère de Buruli devient ainsi un problème majeur de santé publique dans plusieurs pays de cette région de l'Afrique.

En Côte-d'Ivoire par exemple, le premier cas a été signalé en 1978. En 1995, le nombre de cas cumulés était de 5.000 répartis sur toute la moitié sud du pays (74, 103). En 2001, la prévalence de la maladie était de 32 pour 100.000 habitants, avec une incidence moyenne supérieure à 2.000 cas par an (74). Entre 2002 et 2006, environ 6.107 cas cumulés étaient notifiés dans le pays (146). Au Bénin, c'est en 1977 que les premiers cas d'ulcère de Buruli ont été rapportés dans le Sud-Ouest du pays (3). Entre 1989 et 2003, environ 5.700 cas y étaient signalés, en 2005, le nombre de cas cumulés était d'environ 7.000 (4, 35, 70, 146). Au Ghana, depuis 1993, plus de 10.000 cas ont été recensés. En 2002, une enquête nationale faisait état d'une prévalence de 20,7 pour 100.000 habitants (6), avec environ 4.848 nouveaux cas (146).

La distribution de l'ulcère de Buruli étant très circonscrite, les taux de prévalence varient de manière importante d'une localité à une autre au sein d'une même région. Ainsi, la prévalence nationale dans un pays, ne traduit pas toujours exactement, l'ampleur de la maladie. Dans certains villages de la Côte-d'Ivoire et du Ghana par exemple, on a rapporté des taux de morbidité respectifs de 16,3 et 22 % (7, 103). Ces chiffres justifient bien la troisième place attribuée à l'ulcère de Buruli dans le classement des mycobactérioses fréquemment diagnostiquées chez l'homme. Dans certains pays, elle passerait en deuxième position avant la lèpre et après la tuberculose. C'est le cas notamment du Ghana où en 1999, la prévalence de la lèpre était de 9 pour 100.000 habitants et celle de la tuberculose de 66 pour 100.000 habitants (6).

L'augmentation de l'incidence et de la prévalence vers le milieu des années 90 en Afrique occidentale s'expliquerait par le dépistage plus actif des cas. En effet, les années précédentes, bien

qu'on connaisse l'existence de la maladie, les patients n'étaient pas systématiquement recherchés. Les conséquences socio-économiques entraînées par cette maladie ont favorisé le déploiement d'efforts supplémentaires pour un dépistage précoce. Il serait donc probable que parmi les nouveaux cas signalés aujourd'hui, se trouvent aussi des anciens cas d'ulcère de Buruli, n'ayant jamais été comptabilisés car les malades n'étaient pas recherchés.

En dehors des pays à forte prévalence cités ci-dessus, des cas d'ulcère de Buruli ont également été signalés au Liberia, au Nigeria, en Sierra Leone et au Togo (182).

II-1-2 Le cas de l'Afrique Centrale

Avant les années 80, les premiers foyers d'ulcère de Buruli en Afrique centrale, ont été principalement décrits en Ouganda et au Congo. Cependant, au cours des années suivantes, l'infection reste méconnue dans cette partie de l'Afrique, et pendant longtemps, très peu de données épidémiologiques concernant la maladie y seront disponibles.

En République Démocratique du Congo, les premiers cas d'ulcère de Buruli ont été signalés au début des années 70 (77). A la fin de l'année 2006, le nombre cumulé de cas était de 940 (146). L'impact important des croyances culturelles des populations touchées par la maladie suggère fortement que ce nombre serait sous-estimé par rapport au nombre véritable de cas dans le pays. En effet, pour 61% des patients, l'ulcère de Buruli serait due à un mauvais sort (77). Dans les villages concernés par la maladie, 60 à 85% des populations ont recours directement aux tradipraticiens plutôt qu'aux hôpitaux et par conséquent ne sont pas notifiés dans les statistiques nationales (77).

En dehors de la République Démocratique du Congo et du Cameroun, l'ulcère de Buruli a également été signalé au Congo, au Nigéria, au Gabon et en Guinée équatoriale (203).

II-2 En Asie du Sud-Est et dans l'Ouest du Pacifique

Il existe peu de données sur la prévalence et l'incidence de l'ulcère de Buruli en Asie. Des patients présentant des ulcères compatibles avec l'infection à *M. ulcerans* ont été notifiés en

Indonésie et au Sri-Lanka, il n'y a cependant eu aucune confirmation officielle de la maladie dans ces deux pays. Des cas d'ulcère de Buruli ont par contre été confirmés au Japon et en Chine (19, 47).

Dans l'Ouest du pacifique, la situation épidémiologique de l'ulcère de Buruli est assez documentée et beaucoup plus précise.

Ainsi entre 1971 et 2002, 433 cas d'ulcère de Buruli ont été répertoriés en Papouasie-Nouvelle-Guinée. Entre 2002 et 2006, 62 nouveaux cas ont été ajoutés (19, 146).

En Australie, c'est dans la région de Bairnsdale dans l'Etat de Victoria que fut décrit pour la première fois l'ulcère de Buruli. Depuis ce temps, plusieurs foyers ont progressivement été répertoriés. Les foyers endémiques australiens se trouvent à majorité dans des régions tempérées et ont également été associés à la présence d'un écosystème aquatique. L'épidémiologie de l'ulcère de Buruli en Australie présente cependant, des différences notables en comparaison avec celles de la maladie en Afrique. Ces différences portent entre autres sur l'incidence relativement faible de la maladie, sur l'âge de la population touchée, mais aussi sur le fait que les localités australiennes incriminées ne soient pas des régions rurales avec des rivières ou des fleuves, mais des quartiers résidentiels avec quelques points d'eau créés par des modifications de l'environnement, construction d'un terrain de golf par exemple. Dans l'Etat de Victoria, le nombre de cas annuels d'ulcère de Buruli était dans les années 80, compris entre 0 et 4 (67). Entre 1992 et 1995, une meilleure notification dans la région a permis d'identifier dans un quartier de Phillips Island au Sud-Est de Melbourne, 29 nouveaux cas (195). Il s'agissait principalement d'adultes retraités vivant à proximité d'un terrain de golf irrigué par les eaux usées. Dans cet Etat, *M. ulcerans* a également été retrouvé chez des animaux sauvages et domestiques. En dehors de l'Etat de Victoria, quelques cas d'ulcère de Buruli ont été décrits dans l'Extrême-Nord de l'Etat du Queensland et dans le New South Wales (65, 87). Entre 2002 et 2006, l'Australie comptait environ 200 cas d'ulcère de Buruli (146) (Fig. 6).

II-3 En Amérique du sud

Le premier cas d'ulcère de Buruli notifié dans le continent américain a été décrit au Mexique en 1953 (19, 131). Depuis, des malades ont été signalés au Pérou, au Suriname, et plus récemment au Brésil (44). Le taux d'incidence annuel le plus élevé du continent est de 1 cas pour 1.000 habitants dans une zone côtière de la Guyane française (19).

III. Facteurs associés aux régions endémiques à l'ulcère de Buruli

III-1 Facteurs liés à l'environnement écologique

Dans la majorité des régions endémiques, l'infection a été associée à la présence de marécages, de marais, de rivières à débit lent, et de lacs. Ainsi, en Ouganda, les cas décrits viennent pour la plupart de la vallée du Nil et des zones marécageuses intégrées (11). Les cas d'ulcère de Buruli diagnostiqués au Cameroun, proviennent des villages situés dans les plaines traversées par le fleuve Nyong et entourés de marécages (114, 148). Au Bénin, la zone d'endémie se situe dans le sud du pays, les villages proches des rivières des régions du Couffo, Mono, Ouémé et Zou sont les plus touchés (35, 71). Stoffel *et al* rapportent une prévalence 7,5 fois plus élevée dans la localité de Bonou traversée par le fleuve Ouémé, comparée à celle de la localité de Kétou dépourvue de réseau hydrographique (176). Au Ghana, des études ont montré que les villages endémiques étaient à majorité situés dans des zones marécageuses (36, 143). L'association de l'infection avec les eaux a aussi été établie entre autres en République Démocratique du Congo (107), en Côte-d'Ivoire (103) et en Guyane Française (106). Par ailleurs, des foyers épidémiques seraient également apparus suite aux modifications importantes de l'environnement écologique. Il peut s'agir de modifications d'origine naturelle, comme ce fut le cas des inondations en Ouganda (131). En Papouasie Nouvelle-Guinée, les premiers cas d'ulcère de Buruli sont apparus après l'éruption du Mont Leamington (131). D'autre part, elles peuvent être dues à l'action de l'homme. Ainsi, au Nigeria, des cas d'ulcère de Buruli ont été diagnostiqués quelque temps après la création

d'un lac artificiel sur le campus universitaire d'Ibadan (120). En Côte-d'Ivoire, la recrudescence de la maladie serait consécutive au déboisement et à la construction de barrages (131). En Australie, elle serait secondaire à la création d'un terrain de golf irrigué par les eaux usées (67). Au Bénin, de nouveaux foyers endémiques sont apparus après l'aménagement d'espaces agricoles (4).

III-2 Facteurs liés à l'environnement socio-économique

Les personnes les plus touchées par l'ulcère de Buruli appartiennent majoritairement à des communautés agricoles rurales pauvres, vivant dans des localités difficiles d'accès et dépourvues de structures sanitaires modernes. Dans cet environnement de pauvreté, la malnutrition est couramment observée et pourrait être considérée comme un facteur favorisant l'infection par des germes (45). En effet, l'impact considérable que peut avoir la malnutrition sur les fonctions immunitaires d'un individu et sa susceptibilité aux infections a été clairement démontrée (20). Il n'est donc pas exclu que celle-ci favorise l'immunosuppression aggravée localement par la toxine de *M. ulcerans*, contribuant ainsi à l'apparition des lésions (69, 128). Les cas d'ulcère de Buruli rapportés chez les personnes atteintes d'hypoprotéinémie et d'anémie illustrent clairement cette hypothèse (9, 140).

Dans de nombreuses localités, les patients atteints d'ulcère de Buruli n'ont recours aux soins hospitaliers qu'à un stade avancé d'ulcération. Parmi les raisons expliquant ce recours tardif aux soins, on peut citer entre autres le manque de moyens financiers, mais aussi la difficulté d'accès au centre de soins du fait de l'isolement de certains villages et/ou la dégradation du réseau routier.

III-3 Facteurs liés à l'accès à l'eau

Dans plusieurs communautés touchées par la maladie, on a observé que les diverses tâches domestiques (lessive, vaisselle, bain des enfants, etc.) étaient effectuées dans les marais, des rivières ou des fleuves situés à proximité, et qui de ce fait constituaient la source d'eau principale

des foyers. L'accès à l'eau a ainsi été considéré comme étant un facteur favorisant. Ceci d'autant plus qu'une étude réalisée en Ouganda a rapporté que l'ulcère de Buruli était présent dans 6% des familles utilisant des puits comme source d'eau et dans 53% des familles utilisant l'eau des marais de façon permanente (10). La même situation a été observée dans la région de Lalo au Bénin où le risque de contracter un ulcère de Buruli était d'autant plus important que l'accès à l'eau des puits était rare sinon éloigné. En effet, la prévalence de l'ulcère de Buruli était de 0,58 pour 1.000 habitants, chez des villageois utilisant l'eau des puits ou des citernes. Elle passait à 32,6 pour 1.000 habitants chez ceux qui s'approvisionnaient directement dans la rivière (71).

III-4 Facteurs liés à l'activité professionnelle

Dans certaines localités, les familles d'agriculteurs étaient les plus touchées par la maladie, du fait de leur activité à proximité des rivières et des marécages. C'est le cas notamment en Côte-d'Ivoire où il a été démontré que les activités agricoles près de la rivière étaient favorables à l'apparition des lésions dues à *M. ulcerans* (103).

III-5 Facteurs liés au sexe, à la race et à l'âge

Il n'existe pas de liaison entre l'ulcère de Buruli et le sexe ou la race. En effet, la maladie semble toucher autant de filles que de garçons. Néanmoins, bien que les jeunes garçons soient touchés plus tôt, certains auteurs ont noté une fréquence de la maladie légèrement plus élevée chez les jeunes filles (7, 61). Ceci pourrait s'expliquer par le contact plus régulier qu'ont ces dernières avec le réservoir de la bactérie, lorsqu'elles commencent à accompagner leur mère dans les activités quotidiennes (lessive, vaisselle, activités champêtres, etc.). Pour ce qui est de la race, elle n'a aucune influence sur la susceptibilité à la maladie, toute personne vivant en zone endémique peut être infectée. Par ailleurs, l'ulcère de Buruli a été diagnostiqué chez des touristes et des expatriés ayant séjourné en zone d'endémie. D'après les premières études épidémiologiques en zones endémiques africaines, plus de 70 % des individus touchés par l'ulcère de Buruli sont des jeunes de moins de 15 ans. Cette prédominance de la maladie chez ces derniers pourrait

s'expliquer par les divers traumatismes liés à leur activité souvent à même le sol ou dans l'eau (jeux, baignade). En zones endémiques australiennes par contre, plus de 50% de cas diagnostiqués sont des adultes (141).

III-6 Facteurs génétiques

Il a été clairement démontré avec la tuberculose et la lèpre, que la virulence intrinsèque d'une mycobactérie n'est pas le seul facteur déterminant la sévérité de la maladie (22). En effet, les facteurs génétiques jouent un rôle important dans la susceptibilité ou la résistance de l'hôte à ces infections. Ainsi, la protéine codée par le gène NRAMP1, exprimée spécifiquement dans les cellules phagocytaires humaines, semble être impliquée dans la défense de l'hôte contre *M. tuberculosis*. En effet, des études réalisées en Afrique (Gambie et Guinée-Conakry) et en Corée ont montré une association partielle entre la susceptibilité à la tuberculose pulmonaire et un polymorphisme du gène NRAMP1 (153). Une telle association a également été démontrée dans le cas de l'infection par *M. leprae* (1). Bien qu'elle soit encore sujette à quelques controverses du fait de l'hétérogénéité des résultats en fonction des populations étudiées (155, 164), cette association a également été recherchée dans le cas de l'infection par *M. ulcerans*. En effet, une étude réalisée chez des sujets ghanéens exposés à la mycobactérie a mis en évidence un polymorphisme du gène Nrampl associé à la susceptibilité à l'infection par *M. ulcerans* (170). Le polymorphisme décrit dans cette étude ne semble pas être spécifique *M. ulcerans*, il s'agit néanmoins d'une première étude montrant qu'il pourrait exister chez l'hôte un facteur de prédisposition génétique à l'ulcère de Buruli.

B. Introduction : l'ulcère de Buruli au Cameroun

Au Cameroun, le premier rapport sur l'ulcère de Buruli ou ATOM (plaie mystérieuse) en dialecte local, faisait état de 47 cas, tous provenant de foyers bien localisés, dans la vallée du Nyong entre les villes d'Akonolinga et d'Ayos (147). Akonolinga et Ayos sont deux arrondissements de la province du Centre du Cameroun (Fig. 12). Ils sont respectivement situés à environ 130 km et 180 km à l'est de Yaoundé, la capitale politique du pays. Chacun de ces arrondissements fonctionne comme un district de santé dont dépendent plusieurs unités administratives et leurs centres de santé; sous la coordination du Ministère de la santé. Le district de santé d'Akonolinga couvre plus d'une dizaine de centres de santé sur une superficie 4.300 km², avec une population d'environ 79.000 habitants. Quant au district de santé d'Ayos beaucoup plus petit, il couvre sept centres de santé avec une population d'environ 43.000 habitants. La population de ces deux districts est à majorité rurale ; seules quelques agglomérations concentrent les fonctionnaires des entreprises du secteur public et privé. Ces deux régions sont essentiellement agricoles et forestières. La forêt est marécageuse et inondable par le fleuve Nyong qui traverse les deux districts (Fig. 10 A). Le lit du fleuve est situé à l'intérieur d'une vallée. Pendant les saisons de pluie, la crue peut atteindre 3 m et durer plusieurs semaines du fait de l'écoulement lent des eaux (Fig. 10 B). L'élevage et la pêche s'y pratiquent de manière artisanale (Fig. 11), leur production entrant uniquement dans la consommation locale. Malgré leur accessibilité depuis Yaoundé par une route bitumée, le réseau routier à l'intérieur des deux districts est très dégradé. Certains centres de santé sont inaccessibles pendant la saison des pluies, et ne peuvent être reliés aux hôpitaux de district.



Fig. 9. Carte du Cameroun. Le district d'Akonolinga est situé à environ 130 km à l'Est de Yaoundé, la capitale, dans la Province du Centre.



Figure 10. Inondation pendant les crues du fleuve Nyong. (A) Racines des arbres immergés dans la forêt marécageuse de la vallée du Nyong. (B) Champ de manioc inondé par le fleuve Nyong.



Fig. 11. Activités dans la vallée du Nyong. (A et B) Pêche artisanale, (C) Lessive dans une rivière. (D) Espace aménagé pour l'élevage des poissons.

Après la première notification de l'ulcère de Buruli en 1978 dans ces deux districts, on a cru jusqu'en 2000 que la maladie avait disparu. En effet, cette dernière mal connue du personnel de santé, restait totalement ignorée des statistiques sanitaires camerounaises. Ce n'est qu'en 2001 que l'association Aide aux Lépreux Emmaüs-Suisse s'engage dans la lutte contre l'ulcère de Buruli auprès des populations du district de santé d'Ayos. Elle réalise une enquête préliminaire de prévalence dans les villages du bassin du Nyong et rapporte 438 cas d'ulcère de Buruli, dont 97 recensés dans le district d'Ayos et 331 dans le district d'Akonolinga (114). Les résultats de cette enquête remettent en exergue l'importance de cette maladie au Cameroun et elle fera dès lors partie des problèmes de santé publique du pays. Ceci va contribuer à la mise en place par le Ministère de la santé publique, d'un programme national de lutte contre l'ulcère de Buruli (PNLUB) en 2003. Une meilleure notification des cas sera alors assurée en liaison étroite avec des partenaires non gouvernementaux tels que MSF, ALES, et l'OMS. De nouveaux foyers endémiques ont ainsi récemment été découverts dans les provinces du Sud-Ouest (localité de Mbonguè) et de l'Adamaoua (région de Bankim). A la fin de l'année 2006, MSF rapporte une prévalence de 0,4% à Akonolinga, taux non négligeable par rapport à la population du district. Entre 2003 et 2006, le nombre cumulé de nouveaux cas recensés dans les deux districts de santé a été estimé à 1.805 (Fig. 8). Toutefois, ce nombre reste inférieur au nombre véritable de personnes atteintes par la maladie dans la région. En effet, la détection des cas en phase précoce de la maladie s'y déroule encore de manière passive par l'intermédiaire des centres de santé de chacun des districts ou lorsque les conditions de transport le permet, par accès direct des patients aux services de l'hôpital. Par ailleurs, la sous-estimation de la prévalence de la maladie serait également liée, comme c'est le cas entre autre de la République Démocratique du Congo, à l'impact des croyances socio-culturelles. Selon une étude portant sur les « connaissances, attitudes et pratiques » réalisée dans ces deux districts, l'ulcère de Buruli apparaît pour 92 % des répondants comme une malédiction consécutive à une sanction aux violations des normes sociales

(190). Cette imputation de l'ulcère de Buruli à la sorcellerie au sein des populations rurales fait que de nombreux malades restent confiner chez les tradipraticiens avec plusieurs interdits dont celui du contact avec l'hôpital. Il est donc fort probable qu'il existe encore de nombreux patients non pris en charge, non notifiés et de ce fait non inclus dans les statistiques des études épidémiologiques nationales.

La notification de la maladie au Cameroun dans la vallée du Nyong, confirme l'association de la maladie à un environnement marécageux. Toutefois, on ignore encore les facteurs de l'environnement qui associés aux activités des populations résidant dans cet environnement hydro-tellurique pourrait favoriser le développement de la maladie. En effet, sur les rares études cas-témoins des facteurs de risque à l'ulcère de Buruli publiées, aucune ne concernait le Cameroun. Ainsi dans le but d'identifier les facteurs de risque à l'ulcère de Buruli au Cameroun, nous avons entrepris une étude cas-témoin dans les districts d'Ayos et d'Akonolinga.

La méthodologie et les résultats présentés ci-dessous ont l'objet de la publication insérée en annexe de cette thèse.

C. Méthodologie

I. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude épidémiologique cas-témoins conçue selon un double appariement.

- Un appariement cas-témoin intrafamilial : le témoin était représenté par le frère ou la sœur du cas dont l'âge était le plus proche de ce dernier.
- Un appariement cas-témoin extrafamilial : le témoin était représenté par un individu pris dans la communauté dont l'âge était le plus proche du cas.

Il s'agissait donc d'un appariement selon l'âge et selon le lieu de résidence des individus à l'intérieur des deux districts de santé d'Ayos et Akonolinga.

II. Population étudiée et critères d'inclusions

Elle était représentée par l'ensemble des habitants des villages situés dans la vallée du fleuve Nyong entre Akonolinga et Ayos (Fig. 12) et qui recevaient des soins médicaux dans les hôpitaux de ces deux districts. Etaient inclus dans l'étude :

- des cas définis comme étant des sujets exposés à l'infection par *M. ulcerans* présentant des lésions caractéristiques de l'UB, diagnostiquées par des cliniciens expérimentés (cas probables) et/ou pour lesquels l'infection a été confirmée par la mise en évidence de la mycobactérie suite à une coloration de Ziehl-Neelsen, ou par PCR (cas confirmé).
- des témoins définis comme étant des sujets exposés à l'infection ne présentant aucune lésion active ou inactive d'ulcère de Buruli, ni de cicatrice douteuse.

Pour appairer les enfants selon le lieu de résidence, les témoins étaient choisis au hasard dans des écoles primaires des communautés voisines elles-mêmes sélectionnées au hasard. Pour appairer les adultes, les témoins étaient sélectionnés au hasard directement dans les villages.

III. Matériel d'investigation et considérations éthiques

Entre Février et mi-mars 2006, un peu moins d'une centaine de questions réparties en trois questionnaires administrés sous forme d'interview en face-à-face d'environ 30 minutes, en français ou en dialecte local, après consentement éclairé des sujets enquêtés

- Un questionnaire individuel rapportant les données relatives sur les facteurs comportementaux de l'enquêté ;
- Une fiche des cas rapportant l'histoire de la maladie, la description des lésions et le comportement de l'individu avant et après le diagnostic
- Un questionnaire familial renseignant sur les données socio-démographiques et l'environnement de l'enquêté ;

Dans la cinquantaine de villages et deux cent familles visitées, nous avons recueilli, les données sur 163 cas, 163 témoins intra-familiaux et sur 118 témoins extra-familiaux.

Le protocole de cette étude a été approuvé par le comité scientifique d'éthique et le Ministère de la santé publique du Cameroun.



Fig. 12. La vallée du Nyong. Tous les centres de santé des villages visités dont ceux représentés (points jaunes) sur cette carte sont rattachés aux hôpitaux des districts d'Akonolinga et d'Ayos.



Fig. 13. Recueil du matériel d'investigation. (A) Accueil à Efulan. (B) Administration du questionnaire.

IV. Analyse des données

Elle a été réalisée avec le Dr Pouillot selon un modèle de régression logistique conditionnelle. Les données recueillies suite à chacun des deux appariements ont été analysées indépendamment. Nous avons utilisé des analyses univariées puis multivariées pour évaluer le lien entre les différentes variables et l'ulcère de Buruli grâce au logiciel I R (R Core Team). Suite à l'analyse univariée, les variables avec un $p < 0,10$ ont été retenues pour l'analyse multivariée.

D. Résultats

I. Description de la population des patients enquêtés

Les 163 patients interviewés dans notre enquête étaient répartis en 46 cas probables et 117 cas confirmés (Tableau 1). Ces deux groupes ont été associés en une seule population car ils n'ont montré aucune différence significative. Dans cette cohorte, on comptait autant de filles que de garçons. Leur âge était compris entre 1 et 78 ans, les sujets ayant moins de 15 ans étaient légèrement plus nombreux que les sujets plus âgés. Cependant, l'âge médian situé à 14 ans

témoignait du fait que l'ulcère de Buruli au Cameroun tout comme dans les autres pays africains touche particulièrement les jeunes enfants. D'après les données recueillies, pour 37 % des patients, la première lésion est apparue sous la forme d'un nodule, tandis que seulement chez 3% d'entre eux sous la forme d'une ulcération. La lésion était localisée de manière prédominante sur la jambe, et qu'il s'agisse de l'atteinte du membre inférieur ou supérieur, elle était le plus souvent située sur le côté gauche. Un peu plus des trois quarts des patients n'ont associé l'apparition de la première lésion à aucun événement particulier (Tableau 1).

Patients	Totaux (n, %)	Cas probables (n, %)	Cas confirmés (n, %)	P*
N	163 (100)	46 (28)	117 (72)	
Sexe				
Féminin (n, %)	79 (48)	18 (39)	61 (52)	0,16
Masculin (n, %)	84 (52)	28 (61)	56 (48)	
Age	14 (1-78)	15,5 (1-74)	13 (1-78)	0,30
< 10	45 (28)	14 (3)	31 (27)	0,27
[10 – 15]	41 (25)	7 (15)	34 (29)	
]15 – 24]	38 (23)	11 (24)	27 (23)	
≥ 25	39 (24)	14 (30)	25 (21)	
Première lésion				0,10
Papule	31 (19)	10 (22)	21 (18)	
Nodule	60 (37)	11 (24)	49 (42)	
Plaques	20 (12)	5 (11)	15 (13)	
Œdème	46 (28)	17 (37)	29 (25)	
Ulceres	5 (3)	3 (7)	2 (2)	
Localisation				
Jambe	92 (58)	28 (62)	64 (56)	0,85
Bras	57 (36)	14 (31)	43 (38)	
Tronc / Tête	10 (6)	3 (6)	7 (6)	
Côté droit	57 (38)	14 (31)	43 (38)	0,46
Côté gauche	92 (61)	28 (62)	64 (56)	
Evènement				
Aucun	127 (76)			
Blessure	16 (10)			
Piqûre d'insecte	15 (9)			

Tableau 1. Description de la population des patients enquêtés.

* p obtenu avec le test exact de Fisher était significatif lorsqu'il était < 0,1

II. Appariement cas-témoins extrafamiliaux

L'analyse univariée des données obtenues après appariement des cas à leurs témoins extrafamiliaux, a permis de retenir les variables contenues dans un peu plus d'une dizaines de rubriques. Après l'analyse multivariée, seules les variables de 6 des 11 rubriques retenues ont montré une différence significative importante entre les cas et les témoins pris dans la communauté (Tableau 2). L'absence de vêtements recouvrant les membres lors des activités dans les champs, le traitement non adéquat des plaies ainsi que le comportement des individus vis-à-vis des piqûres d'insecte ont montré une association très significative comme facteurs de risque à l'ulcère de Buruli.

Facteurs de risque	P
Démographie	
Niveau d'étude primaire ou secondaire	0,014
Activités	
Ne pas faire la lessive	0,008
Se baigner dans les eaux du fleuve	0,007
Habillement au cours des activités dans les champs	
Vêtements découvrant les membres	< 0,001
Traitement des blessures	
Faire de pansement avec du sparadrap	0,001
Ne pas utiliser d'antiseptique	0,04
Ne pas faire de pansement avec des feuilles	0,009
Comportements vis-à-vis des piqûres d'insectes	
Ne pas dormir sous une moustiquaire	0,022
Utiliser des serpentins anti-moustiques	0,001
Environnement immédiat de la concession	
Plantation de cacao	0,004
Bois	0,039

Tableau 2. Facteurs de risque associés à l'ulcère de Buruli après l'appariement des cas-témoins extrafamiliaux. p était significatif lorsqu'il était < 0,05

III. Appariement des cas-témoins intrafamiliaux

Au cours de l'analyse des données suite à l'appariement des cas-témoins intrafamiliaux, nous avons également retrouvé les trois facteurs de risques mis en évidence précédemment au cours de l'appariement des cas avec les témoins extrafamiliaux (Tableau 3).

Facteurs de risque	P
Démographie	
Niveau d'étude primaire ou secondaire	0,002
Activités	
Se baigner / patauger dans les eaux du fleuve	0,005
Traitement des blessures	
Ne pas faire de pansement avec des feuilles	0,011
Comportements vis-à-vis des piqûres d'insectes	
Ne pas dormir sous une moustiquaire	< 0,001
Pêche	
Ne pas pêcher dans le fleuve	0,024

Tableau 3. Facteurs de risque associés à l'ulcère de Buruli après l'appariement cas-témoins intrafamiliaux. p était significatif lorsqu'il était < 0,05

Ainsi, le fait de ne pas dormir sous moustiquaire notamment constituait un facteur de risque à l'ulcère de Buruli aussi important que vaquer aux activités dans les champs avec des membres découverts, ou traiter des plaies cutanées de manière inadéquate.

E. Discussion et perspectives

L'augmentation de l'incidence de l'ulcère de Buruli dans les pays africains depuis une vingtaine d'années, a soulevé de nombreuses interrogations entre autres sur l'environnement et les comportements qui entraînent chez certains individus exposés, une probabilité plus élevée de présenter des lésions suite à l'infection par *M. ulcerans* comparée à leurs voisins. En dehors du fait de résider dans un environnement marécageux qui semble être le principal facteur de risque commun aux différentes régions africaines endémiques à la maladie, de nombreux autres facteurs ont été identifiés. Certaines professions semblent par exemple être plus exposées que d'autres. En effet, selon une étude réalisée dans la région de Daloa en Côte-d'Ivoire, les producteurs de riz auraient plus de risque de contracter la maladie que les autres individus de la région (103). De même, au Cameroun, les personnes ayant des activités agricoles près des marécages auraient 8 fois plus de risque de déclarer un ulcère de Buruli (135). Contrairement à la tuberculose, l'infection par le VIH ne semble pas prédisposer à l'ulcère de Buruli; elle serait cependant favorable au développement de formes sévères telles que les ostéomyélites (143). D'autres facteurs de risque pour ces formes graves seraient la virulence des souches de *M. ulcerans*, la coexistence avec d'autres maladies tropicales (schistosomias, anémie falciforme), le statut immunitaire, la présence de facteurs de prédisposition génétique, l'absence de vaccination BCG et la présence de cicatrice typique d'ancienne lésion n'ayant pas été traitée par chirurgie (170, 171).

La majorité des travaux qui ont abouti à l'identification des facteurs de risque cités ci-dessus, n'ont pas été réalisés sur le modèle d'un appariement cas-témoins. De ce fait, ils n'ont pas toujours permis d'évaluer avec précision, la force d'association d'un ou plusieurs de ces facteurs à l'apparition de la maladie. On compte très peu d'études des facteurs de risque de l'ulcère de Buruli conçus sur un modèle d'appariement des cas et des témoins. Des études de ce type ont à ce jour, uniquement été réalisées au Ghana, au Bénin, en Australie et au Cameroun.

L'enquête sur la recherche des facteurs de risque à l'ulcère de Buruli au Cameroun est à l'heure actuelle, la plus grande des études cas-témoin réalisées sur la base d'un questionnaire en tête-à-tête. Elle a permis de confirmer l'association de l'ulcère de Buruli à des facteurs de risque tels que la baignade dans les cours d'eau (mares, rivières, fleuve), le port de vêtements découvrant les membres durant les activités agricoles dans les marécages. Ces facteurs de risque avaient déjà été identifiés au cours d'études réalisées au Ghana et au Bénin (36, 143). En effet, au sein des communautés camerounaises interrogées, nous avons noté que les individus travaillant dans les champs avec des vêtements découvrant les membres avaient 2,5 fois plus de lésions dues à l'infection par *M. ulcerans*. Bien que cela n'ait pas été associé à un facteur de risque, en Australie, il a également été rapporté que porter des vêtements recouvrant les membres lorsqu'on est à l'extérieur des habitats réduisait de 0,51 fois l'apparition de la maladie (141). L'absence de protection des membres par des vêtements au cours des activités en zones marécageuses en Afrique expliquerait pourquoi chez 90% de patients atteints d'ulcère de Buruli, les lésions se situent principalement sur les membres. L'atteinte des membres inférieurs représente environ 60% de ces cas.

Au Ghana, les enfants de moins de 15 ans ayant l'habitude de se baigner dans les rivières des districts endémiques à l'ulcère de Buruli avaient 18 fois plus de risque de contracter la maladie (5). Il en était de même au Cameroun où le risque de faire la maladie était associé de manière significative au fait de se baigner dans les eaux du fleuve Nyong ou dans ses affluents. Contrairement au Bénin où les individus s'approvisionnant en eau dans les rivières et marais avaient 47 fois plus de risque de faire la maladie comparés à ceux qui utilisaient l'eau des pompes, et donc protégée de l'environnement, la source d'eau ne constituait ni au Cameroun, ni au Ghana, un facteur de risque associé à l'ulcère de Buruli. Cette différence s'expliquerait par le fait que les individus s'approvisionnant dans des sources d'eau non protégées (rivières, mares) auraient un contact plus constant et prolongé avec l'environnement. Ainsi, la source d'eau ne serait qu'un

facteur indirect de l'exposition de la peau à *M. ulcerans* à travers son réservoir hydro-tellurique. Des études camerounaise et australienne ont montré que le traitement immédiat des plaies constitue un facteur protecteur de l'ulcère de Buruli. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle l'homme s'infecterait par l'intermédiaire de petits traumatismes cutanés exposés à un environnement hydro-tellurique contaminé par la mycobactérie (141). Dans un modèle d'analyse multivariée, les Australiens ont rapporté que la piqûre de moustiques, constituait un facteur de risque à l'ulcère de Buruli (141). En effet, les individus qui avaient été piqués par des moustiques avaient 2,60 fois plus de risque de développer des lésions. Au Cameroun, bien qu'à travers l'analyse univariée les patients aient rapporté avoir été piqués par des insectes avec une fréquence significativement plus élevée que les témoins, la piqûre par des insectes n'a pas été confirmée comme étant un facteur de risque suite à l'analyse multivariée. Toutefois, dormir sous une moustiquaire contribuerait à protéger de la maladie au même titre que le soin immédiat des plaies et se couvrir les membres lors des activités dans les marécages (135).

En dépit de quelques différences rapportées dans les études cas-témoins africaines et australiennes, on note toutefois de nombreuses concordances. L'étude de facteurs de risque réalisée au Cameroun présente cependant quelques limites. Les résultats obtenus sur la base de questionnaires faisant référence aux comportements du patient avant et après l'apparition des lésions, ne peuvent mesurer avec exactitude leur comportement vis-à-vis de leur environnement et de leur santé. En effet, ils pourraient être biaisés par la mémoire et la confusion, ceci d'autant plus qu'on ignore encore la période d'incubation de l'ulcère de Buruli. Il a donc souvent été difficile pour les patients de rapporter avec fidélité les comportements qu'ils ont eus avant l'apparition des lésions. Par ailleurs, un grand nombre d'entre eux ignore le stade précoce de l'infection, et donc le début de leur maladie. De ce fait, il semble important que l'étude des facteurs de risque puisse également être envisagée de manière prospective.

L'identification de la piqûre de moustique comme étant un facteur de risque et l'utilisation de moustiquaire un facteur protecteur de la maladie, suggère fortement que les moustiques pourraient jouer un rôle dans la transmission de *M. ulcerans*. Toutefois, il est important de remarquer que, la capacité des moustiques à transmettre la mycobactérie n'a jamais été démontrée en laboratoire. En outre, la moustiquaire protégerait non seulement de la piqûre des moustiques mais également d'autres insectes vecteurs de maladie comme les trypanosomes, les taons, voire des punaises d'eau. En effet, ces insectes qui peuplent les cours d'eau des zones africaines endémiques à l'ulcère de Buruli, sont attirés par la lumière et ont une aptitude à voler jusque dans les habitations. Bien qu'aucune étude africaine n'ait encore associé de manière significative ces insectes à un facteur de risque à l'ulcère de Buruli, ce sont pour le moment les seuls insectes pour lesquels on a démontré qu'ils pouvaient être à la fois réservoirs et vecteurs de *M. ulcerans* (96, 134).

En définitive, pour mieux cerner la situation épidémiologique de l'ulcère de Buruli au Cameroun, des efforts supplémentaires doivent être réalisés. Pour atteindre cet objectif, il est important que soit instaurée une détection active des cas (contrôle systématique de la population à risque) ainsi qu'une sensibilisation de la population (information sur la maladie, sur les possibilités de prévention et de traitement). Des activités dans ce sens commencent par ailleurs à être entreprises comme en témoigne la journée de sensibilisation qui s'est tenue à Ayos le 21 septembre 2007. Elle fut organisée par le Centre Pasteur du Cameroun avec la contribution du Ministère de la santé et des organismes internationaux, dans le cadre du cours international sur la Microbiologie de *M. ulcerans*. Elle avait notamment pour but d'informer les populations sur les facteurs de risques identifiés suite à cette enquête cas-témoins à savoir :

- L'absence de traitement adéquat des plaies cutanées (antiseptiques, pansements)
- Se vêtir d'habits découvrant les membres lors des travaux dans les champs

- Ne pas dormir sous moustiquaire

Il serait important d'envisager une extension des interventions de santé publique dans les nouveaux foyers endémiques identifiés dans le pays, à l'exemple des régions de Mbalmayo dans le Centre, Bankim dans l'Adamaoua et de Mbongué dans le Sud-Ouest.

Chapitre III

L'INTERACTION IMMUNOLOGIQUE ENTRE L'HOTE ET LES PUNAISES D'EAU, VECTEURS POTENTIELS DE *M.ULCERANS*

A. Avant-propos

I. La réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par *M. ulcerans*

La réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection par des mycobactéries a été largement étudiée dans le cas de la tuberculose et de la lèpre. Par contre elle est encore mal connue en ce qui concerne l'ulcère de Buruli.

I-1 La réponse cellulaire : la dichotomie Th-1/Th-2

I-1-1 La réponse Th-1

Chez l'homme, l'une des preuves les plus évidentes de l'importance des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*, est la recrudescence de celle-ci chez les individus déficitaires en cellules CD4+. C'est le cas notamment des sujets séropositifs pour le VIH, chez qui on a montré que le risque de contracter une tuberculose était de 8 à 10 % par an, lorsque leur épreuve à la tuberculine était positive. Par contre, chez un sujet VIH négatif, ces mêmes chiffres représentent non pas le risque annuel, mais le risque tout le long d'une vie (165). Les lymphocytes Th-1 sont médiateurs des réactions d'hypersensibilité et de l'activation des lymphocytes cytotoxiques. Au cours de l'infection par *M. tuberculosis*, l'activation des cellules Th-1 induit une réaction d'hypersensibilité retardée. Celle-ci est détectée chez l'hôte par l'intradermo-réaction à la tuberculine, constituant ainsi un diagnostic sérologique de la tuberculose. L'afflux et l'activation des macrophages suite à une réaction de type HSR, constituent en général un moyen de défense efficace contre les agents pathogènes intracellulaires (54). En effet, les cellules infectées par les agents pathogènes intracellulaires sont rapidement détruites par les enzymes provenant des macrophages activés. Au cours de l'infection à *M. tuberculosis*, l'activation continue des macrophages entraîne la formation d'une lésion granulomateuse. Les bacilles séquestrés au sein de ce granulome sont éliminés ou inhibés (32, 54). Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle déterminant des cytokines telles que l'IL-12, l'INF- γ et le TNF- α dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* (54, 80). La sécrétion d'IL-12 secondaire à la phagocytose de la mycobactérie par les macrophages et les cellules dendritiques,

entraîne chez l'hôte le développement d'une réponse immunitaire de type Th-1 avec une production importante d'INF- γ (84, 159). L'invalidation des gènes codant pour ces cytokines entraîne chez la souris une plus grande susceptibilité à développer des lésions au cours d'une infection (49). D'une manière générale, la réponse immunitaire de type Th-1, développée par les sujets infectés par *M. tuberculosis* leur permet de contrôler l'infection et les protégerait d'une ré-infection. Il peut arriver cependant que la réaction d'hypersensibilité retardée médiée par cette réponse soit très intense. Les enzymes libérées par les macrophages activées détruisent alors le tissu sain environnant. Cette action des enzymes, associée entre autre à la toxicité des bacilles va entraîner des lésions chez environ 10% des sujets infectés par *M. tuberculosis* (25, 48, 76).

Pour ce qui est de l'infection par *M. ulcerans* la réponse cellulaire de type HSR a été explorée, en vue notamment de développer un test sérodiagnostic. Ainsi, en réactivité à l'injection intradermique de buruline qui est un lysat d'extrait brut de culture de *M. ulcerans*, on a observé une réponse d'hypersensibilité retardée chez environ 71,8 % de patients, permettant de confirmer le diagnostic de l'ulcère de Buruli chez ces derniers. Toutefois, le test cutané était positif uniquement dans les phases tardives de la maladie. En effet, la réactivité à la buruline restait négative chez la majorité des patients présentant des lésions non ulcérées (42, 169). Cette négativité du test révèle que la réponse cellulaire au cours des phases précoces de l'ulcère de Buruli serait soit absente, soit insuffisante pour pouvoir induire une réponse immunitaire efficace. Ceci contribuerait à la progression de l'infection chez l'hôte. L'inefficacité de la réponse cellulaire dans les stades précoces de la maladie, pourrait s'expliquer par l'inhibition de la sécrétion de certaines cytokines clés de la réponse innée. En effet, on a démontré *in vitro*, que la mycolactone inhibait la sécrétion de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-2 (30, 120). Les deux premières sont connues pour leur rôle crucial dans l'activation des cellules inflammatoires, favorisant leur activité phagocytaire. La troisième quant à elle est nécessaire à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes T (54).

Bien que l'exploration des cytokines Th-1 ait été sujette à quelques controverses, elle semble néanmoins confirmer l'hypothèse d'une réponse immunitaire Th-1 prédominante dans les phases tardives de l'ulcère de Buruli. En effet d'après leurs travaux sur des PBMC de patients ghanéens, Phillips *et al.* ont rapporté des taux importants d'INF- γ sans différence significative entre les malades et les témoins. Cette cytokine qui était sécrétée à différents stades de la maladie, montrait un pic important durant la phase de guérison (126). C'était également le cas de la cytokine IL-12 dont les taux étaient plus importants chez les sujets présentant des lésions tardives que chez ceux qui avaient des lésions précoces (126, 127, 199). Ainsi, le développement d'une réponse immunitaire de type Th-1 chez l'hôte infecté par *M. ulcerans* ne semble pas le protéger de l'apparition de lésions causées par la mycobactérie. Ceci remet en question l'association du profil Th-1 à un statut protecteur de l'hôte vis-à-vis de l'infection par *M. ulcerans* comme l'avaient suggéré des études précédentes sur des patients ghanéens (55, 56). Néanmoins, les pics d'INF- γ observés en phase de guérison, suggèrent fortement qu'il serait possible de distinguer grâce à cette cytokine les différentes phases de la maladie. L'hypothèse d'une réponse de type Th-1 efficace dans les phases tardives de l'infection par MU semble être liée à l'anatomo-pathologie des lésions observées à ce stade de la maladie (160). Au cours des phases précoces de l'ulcère de Buruli, on observe peu de cellules inflammatoires. Tandis que dans les lésions tardives, il y aurait un influx important de cellules immunes dont les lymphocytes (60). Ces cellules seraient responsables de l'augmentation du taux d'INF- γ et par conséquent de la restauration de la réponse cellulaire de type Th-1. Cette restauration de l'immunité cellulaire expliquerait la positivité du test à la buruline au cours de la phase tardive de l'infection. Par ailleurs, d'après Hayman, l'étape ultime de l'ulcération précédant la phase clinique de guérison spontanée se traduit par la formation d'une structure de type granulomateuse (60). Cette structure serait typique des infections mycobactériennes lorsqu'il s'établit une réponse immunitaire à médiation cellulaire (74, 203). La présence d'un granulome indiquerait une réponse cellulaire efficace, notamment lorsqu'il est

associé à une production importante de cytokines Th-1 (INF- γ , IL-12) et à une faible densité bacillaire (62, 79).

I-1-2 La réponse Th-2

Par leur production en cytokines IL-4, IL-5 IL-6, IL-10 et IL-13, les lymphocytes Th-2 jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes B et donc dans la réponse immunitaire humorale. Au cours de l'infection à *M. leprae*, on a démontré que le développement d'une réponse immunitaire de type Th-2 était néfaste pour l'hôte. Ainsi, les sujets atteints de la lèpre lépromateuse présentent un profil de type Th-2 contrairement aux sujets atteints de la lèpre dans sa forme tuberculoïde dont le profil immunitaire est de type Th-1 (78, 206). En ce qui concerne l'infection par *M. tuberculosis*, la variabilité des taux d'IL-4 observée d'un sujet à un autre ne permet pas de conclure à une prépondérance de la réponse Th-2 à certains stades de l'infection (48). Par ailleurs, des études réalisées sur des PBMC de sujets atteints de tuberculose montrent une dépression de la réponse Th-1 non associée à un accroissement de la réponse Th-2 (14, 93, 208). Ainsi, aucune association du profil Th-2 à la susceptibilité à l'infection par *M. tuberculosis* n'a jamais été mise en évidence contrairement à ce qu'on a observé au cours de certaines infections causées par des parasites intracellulaires comme les leishmanies.

L'une des premières explorations de la réponse Th-2 chez les sujets exposés à *M. ulcerans* associait ce profil à la susceptibilité à l'infection causée par la mycobactérie. En effet, suite à la stimulation des PBMC de sujets australiens exposés à la mycobactérie, on a détecté chez les patients une expression des cytokines IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 ainsi que de leurs ARN messagers, à des taux beaucoup plus élevés que chez leurs voisins sains (55, 56). D'après ces travaux, le développement des lésions dues à *M. ulcerans*, serait favorisé par l'anergie des cellules T, induite par la réponse Th-2 dominante chez certains individus exposés. Cette hypothèse a été confortée par l'observation chez un des patients, du changement de profil de cytokines Th-1 vers un profil Th-2 lorsque ce dernier est passé d'un état sain à un état lésionnel (57). Toutefois, des études

similaires réalisées par la suite n'ont pas permis de confirmer ces résultats. Aucune d'entre elles n'a rapporté une prédominance du profil Th-2 chez les patients ghanéens ou guyanais en phase active d'ulcération (126, 127, 137). L'absence de concordance des résultats de ces travaux s'expliquerait par les différences observées au niveau du protocole expérimental choisi dans chacun de ces travaux. Ainsi, des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de mieux cerner l'influence de la réponse Th-2 au cours de l'infection par *M. ulcerans*. Il est à noter cependant que les patients présentant des lésions tardives ne développeraient plus de réponse immunitaire de type Th-2 (199). La sécrétion de l'IL-10 était aussi importante chez les sujets qui développaient une réponse immunitaire de type Th-2 que chez ceux qui montraient une réponse de type Th-1. Ceci s'expliquerait par le fait que l'IL-10 qui est autant produite par les cellules Th-2 que par les cellules B activées et par certaines cellules Th-1, ne soit pas spécifiquement associée à la prédominance de la réponse Th-2. En effet, l'IL-10 est une cytokine pléiotropique avec des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives (29, 197). On a ainsi démontré que chez les patients atteints de tuberculose active, la faible réponse immunitaire Th-1 observée serait due à l'immunosuppression induite par IL-10 (16).

Ainsi, la dichotomie Th-1/Th-2 observée dans la réponse immunitaire de l'hôte au cours de l'infection à *M. ulcerans* n'est pas encore totalement clarifiée. On ne saurait affirmer s'il existe un profil de susceptibilité ou de résistance à l'infection, et par conséquent de quel type il serait. Malgré le fait que *M. ulcerans* présente des similitudes génétiques avec d'autres mycobactéries dont *M. tuberculosis*, elle entraînerait chez l'hôte une réponse immunitaire potentiellement différente de ces dernières. Les mécanismes initiateurs de cette réponse demeurent inconnus. Néanmoins, il semblerait que la phagocytose de *M. ulcerans* soit inhibée au début de la maladie entre autre sous l'action de la mycolactone. En effet, la bactérie a été mise en évidence de manière transitoire dans les macrophages de la souris. Ces derniers seraient détruits avant d'avoir pu stimuler une réponse immunitaire efficace (31). En définitive, quoiqu'elle ne puisse être

considérée comme étant un profil immunitaire de protection de l'hôte au cours de l'infection par *M. ulcerans*, la réponse Th-1 serait néanmoins un marqueur de la guérison. Particulièrement lorsqu'elle est associée à une lésion de type granulomateuse, à une faible densité bacillaire et à une quasi-absence de cytokines Th-2.

I-2 La réponse immunitaire humorale

La réponse par anticorps de l'hôte à l'infection par *M. ulcerans* a été très peu explorée. Contrairement à la réaction cellulaire d'hypersensibilité à la buruline, la réponse anticorps contre *M. ulcerans* détectée dans les sérums humains au cours de cette étude n'a été corrélée à aucun stade de la maladie. En effet, tous les patients sans distinction, étaient séropositifs aux protéines de 70, 38 et 31 kDa de *M. ulcerans* (42). Par la suite, une étude cas-témoins réalisée au Ghana, a mis en évidence une réponse humorale de type IgM dirigée contre les molécules de *M. ulcerans* (118). En effet, chez 84,8% des patients contre 4,5 % de sujets exposés, on a détecté des IgM reconnaissant des molécules bactériennes de 30, 40, et 70 kDa. Bien qu'aucune de ces molécules immunogènes n'ait encore été caractérisée, cette réponse IgM qui permet une discrimination entre les patients et les individus sains, revêt un grand intérêt dans la mesure où elle pourrait constituer un espoir évident pour la mise au point d'un test sérodiagnostique de l'infection à *M. ulcerans*. Cependant, les IgM sont au cours des infections mycobactériennes, sécrétées à des concentrations moins importantes et moins sensibles que les IgG. Or, la réponse IgG dirigée contre *M. ulcerans* semble être non discriminante et non spécifique (118). En effet, elle est quasiment identique chez tous les sujets exposés à l'infection qu'ils soient malades ou non, et est également détectée chez les patients atteints de tuberculose vivant en zone non endémique à l'ulcère de Buruli. Ceci témoigne de l'existence chez les mycobactéries de nombreux antigènes à réactivité croisée. C'est le cas notamment de la protéine de 31 kDa *M. ulcerans* reconnue par les anticorps humains et dont la séquence est homologue à une transférase d'autres mycobactéries parmi lesquelles *M. tuberculosis* (42).

Bien qu'il y ait encore très peu de données sur la réponse humorale de l'homme à l'infection par *M. ulcerans*, les études réalisées sur ce sujet témoignent de son intérêt. En effet, comme le montrent les premiers résultats obtenus, la réponse humorale pourrait contribuer de manière importante au développement d'outils de diagnostic précoce de la maladie basée sur la détection d'anticorps spécifiques, mais aussi à la caractérisation de molécules bactériennes immunogènes. Afin de contourner les difficultés liées aux réactions croisées, une alternative intéressante serait d'étudier la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis des mycobactéries en tenant compte des particularités de chacune d'entre elles. En ce qui concerne *M. ulcerans*, il s'agit d'une mycobactérie généralement considérée comme extracellulaire (40) qui sécrète une toxine responsable de sa virulence et dont il a été démontré expérimentalement qu'elle pouvait être transmise par des arthropodes. L'ulcère de Buruli pourrait donc être une maladie à transmission vectorielle. Or on a déjà démontré dans certaines maladies de ce type que l'hôte en réagissant contre les molécules salivaires du vecteur, serait capable de développer une réponse immunitaire efficace contre les microorganismes transmis par ces derniers. L'exploration de la réponse immune de l'hôte en prenant en compte l'action des molécules du vecteur serait une approche nouvelle dans le cas d'une mycobactériose et pour ce qui est de l'infection par *M. ulcerans*, elle serait tout à fait rationnelle.

II. Les interactions immunologiques hôte/vecteur

II-1 Modulation de la réponse immunitaire de l'hôte par le vecteur

II-1-1 L'exemple des tiques

Les tiques sont des arthropodes hématophages, vecteurs de spirochètes du genre *Borrelia*. Il s'agit de bactéries responsables chez l'homme de maladies telles que la maladie de Lyme et les fièvres récurrentes. La maladie de Lyme causée par *Borrelia burgdorferi* est transmise à l'homme par des tiques appartenant au genre *Ixodes*. Quant aux fièvres récurrentes à tiques, elles sont causées par des *Borrelia* transmises à l'homme par des tiques du genre *Ornithodoros*.

Lorsqu'une tique infectée mord la peau pour se nourrir, le spirochète pénètre dans le sang. L'hôte réagit contre l'infection en activant plusieurs mécanismes de défense médiés principalement par le système du complément. Il a été démontré que l'activation de ce dernier consécutive à l'infection par *B. burgdorferi* et *B. garinii* constituait un des moyens de défense majeur de l'hôte (82, 193). En effet celui-ci serait capable à travers la cascade de réactions de la voie alterne, d'inactiver les spirochètes introduits dans le sérum humain (193). Le système du complément serait par ailleurs activé par la réaction inflammatoire aiguë consécutive à la morsure de tiques. Toutefois, afin de garantir le succès de son repas sanguin, la tique inocule avec sa salive des molécules inhibitrices de l'activation du complément (116). En effet, il été rapporté que l'extrait de glandes salivaires (HGS) des *Ixodes* inhibait fortement dans le sérum humain, la formation, la stabilité et l'activité des complexes fonctionnels de la voie alterne du complément, activée *in vitro* par des érythrocytes de lapin (88, 89). Les différents travaux sur l'activité anti-complément de la salive de tique ont permis d'isoler entre autre, une protéine de 18 kDa qui interfère avec la liaison du facteur B à la protéine C3b du complément (192). Outre leur activité anti-complément les tiques sont également capables au cours de leur repas de diminuer la réponse anticorps de l'hôte dirigée contre elles. Ceci a été démontré par la détection dans leur salive et leur hémolymphe de protéines fixant des immunoglobulines (198). Ces molécules permettraient à l'insecte de ré-excréter les IgG dirigés contre lui sans que ces dernières n'aient eu d'action néfaste pour son organisme. Cette ré-excrétion d'IgG serait à l'origine d'une saturation locale des récepteurs des fragments Fc, avec pour conséquence une diminution de la capacité des anticorps primaires à induire une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. L'action modulatrice de la réponse immunitaire de l'hôte par les molécules issues des glandes salivaires de tiques, s'exprime également par une polarisation de la réponse cellulaire de l'hôte vers une réponse immune de type Th-2. Les molécules contenues dans l'HGS de tiques entraîneraient chez

l'hôte une dépression de la réponse Th-1 caractérisée par une faible production d'INF- γ et IL-2, associée forte production de cytokines IL-4 et IL-10 (50, 200, 206).

Ces mécanismes par lesquels les constituants salivaires des tiques modulent la réponse immune de l'hôte sont déterminants pour le succès du processus de nutrition de l'insecte. Cependant, ils créent également un environnement favorable à la transmission des *Borrelia*, jouant ainsi un rôle important dans l'infectivité de ces pathogènes. Ceci a été soutenu par le fait que la restauration passive du TNF- α , de l'INF- γ et de l'IL-2, aboutit à une reconstitution à 95%, de la protection contre la transmission des spirochètes par les tiques infectées (144).

II-1-2 L'exemple des phlébotomes

Il s'agit d'insectes appartenant à la sous-famille des Phlebotominae. Celle-ci compte les espèces telles que *Phlebotomus papatasi* et *Lutzomyia longipalpis* vecteurs de parasites tels que *L. braziliensis*, *L. donovani* et *L. major* qui sont responsables des leishmanioses humaines.

Plusieurs molécules capables de moduler la production des cytokines de type Th1/Th2 ont été mises en évidence dans l'homogénat de glandes salivaires des phlébotomes. D'une manière générale, on a rapporté que ces molécules salivaires entraîneraient une inhibition de la réponse Th-1 caractérisée par une inactivation des lymphocytes T et une diminution de la production de cytokines INF- γ et IL-12 (104, 184). A l'inverse, elles amplifient la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-1, de la prostaglandine E₂, du TGF- β et donc la réponse Th-2 (13, 104, 115, 168). Cette immunomodulation de la production des cytokines Th-1/Th-2 joue un rôle fondamental vis-à-vis de la résistance ou la susceptibilité de l'hôte à l'infection par les leishmanies. Par exemple, l'augmentation de la sécrétion de l'IL-4 suite à une stimulation des cellules immunitaires par la salive *L. longipalpis*, inhibe la destruction des leishmanies par les macrophages (180, 185). D'autre part, suite à la co-injection de la salive et des parasites, on a noté une inhibition de la capacité des macrophages murins à présenter l'antigène et à produire du NO et du H₂O₂, molécules néfastes à la survie des parasites intra-cellulaires (18). Les différents travaux sur

l'activité immuno-modulatrice de la salive des phlébotomes ont abouti à l'identification du vasodilatateur Maxadilan (MAX) (92, 142). Il s'agit d'un petit peptide de 6.5 kDa isolé de la salive de *L. longipalpis* capable à lui seul d'induire les mêmes effets qu'un extrait de glandes salivaires d'insectes vecteurs de leishmanies (18, 111) et donc d'exacerber la transmission de ces derniers à l'homme.

II-2 Les marqueurs épidémiologiques

Plusieurs travaux portant sur l'analyse de la réponse immune de l'hôte aux protéines salivaires ont également démontré que ces dernières pourraient servir à définir des marqueurs épidémiologiques de l'infection au sein des populations exposées. Ainsi, dans le cas de la maladie de Lyme, on a noté que les taux d'anticorps IgG anti-salive d'*Ixodes damini* retrouvés chez les individus exposés à la piqure de ces derniers suivaient la même progression que ceux des anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* (162, 163). Cette corrélation était 3,2 fois plus importante chez les individus séropositifs pour la maladie de Lyme, associant ainsi la présence d'anticorps anti-tiques à un facteur de risque de la maladie (86, 162). Une telle relation a également été observée dans le cas des leishmanioses (12). En effet, dans les sérums d'enfants brésiliens présentant une réaction d'hypersensibilité retardée aux antigènes de leishmanies, on a détecté un titre d'IgG anti-HGS de *L. longipalpis* significativement élevé. Ceci suggérerait fortement que ces anticorps puissent être des marqueurs d'exposition à la leishmaniose viscérale. Les marqueurs épidémiologiques des infections à transmission vectorielle ont particulièrement été explorés dans le cas de maladies transmises par les moustiques du genre *Aedes*, *Anopheles* et *Culex*. L'apparition d'une réponse IgG4 anti-salive serait un indicateur d'exposition intense aux piqûres d'*Aedes* (122, 151, 154), tandis que les anticorps IgG et IgE dirigés contre les constituants salivaires de *Culex quinquefasciatus* ont été détectés chez des individus vivant dans des régions tropicales endémiques à *Wuchereria bancrofti* (34). Dans le cas du paludisme, d'après des études récentes, la réponse en anticorps IgG anti-salive d'*Anopheles gambiae* chez des enfants vivants en zone

d'endémie, est directement associée au degré d'exposition aux piqûres du vecteur (152). Ce taux d'anticorps anti-salive d'*An. gambiae* variait en fonction des différentes périodes de la saison d'apparition du paludisme et serait prédictive de la morbidité palustre (28).

Les protéines salivaires du vecteur ainsi associées aux marqueurs immunologiques d'exposition à l'infection présentent un intérêt majeur notamment dans les études épidémiologiques. En effet, outre le fait qu'elles permettent d'évaluer le degré d'exposition aux piqûres des vecteurs, la caractérisation de telles protéines pourrait conduire au développement de tests immunologiques. Ces derniers permettraient d'identifier les populations à risque de maladies à transmission vectorielle afin d'une part d'optimiser les stratégies de surveillance épidémiologique de ces dernières et d'autre part d'évaluer la lutte anti-vectorielle.

II-3 L'approche vaccinale

Les infections transmises par des arthropodes vecteurs comptent parmi les maladies humaines et animales les plus dévastatrices à travers le monde. Leur contrôle affectant nettement les ressources des populations les plus touchées, l'immunisation semble être dans une politique de santé publique l'intervention la plus appropriée. Ainsi des efforts et des fonds considérables ont été mobilisés dans le but de développer des vaccins ciblant les micro-organismes à transmission vectorielle, responsables de maladies humaines. Cependant, les résultats restent assez ambigus et pour plusieurs d'entre-elles, il n'existe encore aucun vaccin ciblant les agents étiologiques de ces maladies. C'est le cas particulièrement du paludisme, de la leishmaniose, de la maladie de Lyme, etc. C'est ainsi que, afin de réduire la transmission des pathogènes responsables de ces infections, leurs vecteurs sont devenus des cibles potentielles pour l'élaboration de vaccin. Cette nouvelle orientation de la recherche met en exergue une nouvelle stratégie vaccinale dont le principe fait intervenir un antigène immunogène du vecteur associé ou non à un élément du microorganisme transmis. L'hypothèse de l'immunité contre le vecteur, protectrice de l'infection, s'appuie sur les

résultats obtenus suite aux travaux sur les arthropodes-vecteurs tels que les phlébotomes, les tiques et les moustiques.

a) pour les leishmanioses, on a démontré que, outre le fait que la protéine MAX potentialise la transmission et l'infectivité *L. major*, elle serait également protectrice de l'infection causée par le parasite (183). En effet, une immunisation préalable de l'hôte par la protéine induit chez ce dernier une production d'anticorps IgG anti-MAX. Ces anticorps compromettent le succès du repas sanguin du vecteur et par conséquent protégeraient l'hôte de la transmission du microorganisme (108). Des résultats similaires ont été obtenus avec une protéine de 15 kDa (SP 15) isolée de la salive de *P. papatasi*. En plus de la production d'anticorps, la SP15 induirait également chez l'hôte une réponse immune à type d'hypersensibilité retardée qui serait protectrice du développement des lésions (183, 191). Ces travaux suggèrent fortement que ces deux protéines salivaires pourraient être des candidats intéressants dans une approche vaccinale contre la transmission des leishmanies.

b) La salive de tique s'est également avérée être une source d'antigènes immunogènes. Parmi ces derniers, certaines enzymes protéolytiques, inhibitrices de protéases de la salive de tiques seraient des candidats vaccins potentiels. En effet, elles entraîneraient chez l'hôte une réaction immune anti-tique et une neutralisation de l'activité enzymatique essentielle au processus de nutrition de l'arthropode et à sa survie (75, 138). Une serpine nommée Iris caractérisée à partir de la salive *I. ricinus*, a ainsi été explorée chez l'animal (90, 139). D'après cet essai, la vaccination préalable par iris serait à l'origine chez le lapin, d'une immunité protectrice par production d'IgG anti-iris associée à une mortalité des tiques pendant leur repas (139). D'après ces résultats, la protéine iris pourrait être un candidat vaccin intéressant contre l'infection par *B. burgdorferi*.

c) L'une des difficultés majeures dans le développement d'un vaccin anti-paludique est la nécessité de combiner plusieurs antigènes afin de cibler les différents stades de développement du *Plasmodium*. Une étude expérimentale récente vient de démontrer qu'une exposition préalable des piqûres répétitives d'anophèles femelles non infectées influe sur la réponse immune locale et systémique que développe l'hôte à la suite de l'infection par *P. yoelii*. Celle-ci limiterait le développement du parasite avec une réduction de sa charge dans le foie et dans la circulation (43). Ces résultats suggèrent que l'addition de composants salivaires de moustiques aux vaccins anti-malariques serait une approche stratégique rationnelle. En effet, cela contribuerait à créer un micro-environnement immunitaire défavorable à la survenue de l'infection.

De ces différents travaux il apparaît clairement que l'exploitation des molécules salivaires d'arthropodes immunogènes chez l'hôte dans approche vaccinale est un concept tout à fait prometteur. De tels vaccins existent déjà dans le cadre de la médecine vétérinaire, c'est le cas notamment des vaccins anti-tique, tels que TickGuard plus (Hoechst Roussel, Melbourne, Australie) et Gavac (Herber Biotel, Havana, Cuba) qui assurent la protection du bétail contre la borréliose bovine transmise par *Boophilus microplus*.

B. Introduction : interaction immunologique hôte/vecteur dans le cas de *Mycobacterium ulcerans*

L'ulcère de Buruli causé par *M. ulcerans* se manifeste par des lésions qui évoluent vers des larges ulcérations cutanées en générale indolores du fait des propriétés immunosuppressives de la mycolactone. Cette absence de douleur constitue l'une des raisons du recours tardif aux soins, dans les communautés pauvres dans lesquelles sévit la maladie. Ainsi, malgré les recommandations récentes de l'OMS d'un traitement antibiotique associant la rifampicine et la streptomycine, efficace notamment sur les formes pré-ulcératives de la maladie, les interventions chirurgicales demeurent nécessaires dans ces communautés où les patients ne consultent qu'en phase d'ulcération évoluée. Le traitement chirurgical qui consiste en une exérèse large de la lésion est responsable d'une perte cutanée importante et nécessite le plus souvent une greffe de peau. Il est donc long et coûteux et s'accompagne des séquelles importantes et invalidantes.

Actuellement, il n'existe pas de vaccin disponible contre l'ulcère de Buruli. La mise en place d'outils de prévention efficace contre cette maladie nécessite la connaissance du cycle de vie de *M. ulcerans* dans son écosystème aquatique naturel et notamment de son mode de transmission à l'homme non encore élucidé à ce jour. Plusieurs hypothèses ont été émises à propos du mode de transmission à l'homme de la mycobactérie à l'homme. Toutefois seule celle dans laquelle ont été impliquées des punaises d'eau a été étayée d'une preuve expérimentale chez la souris. En effet, outre le fait qu'on ait démontré que *M. ulcerans* était capable de coloniser les glandes salivaires de punaises d'eau de Naucoridae et des Belostomatidae, Marsollier et *al.* dans un modèle expérimental, démontrent également que ces insectes prédateurs étaient capables de transmettre par leur piqure la mycobactérie à des souris de laboratoire (96, 97, 100). Cette expérience suggère fortement que l'infection à *M. ulcerans* pourrait être classée parmi les infections causées par des micro-organismes à transmission vectorielle au même titre que les infections telles que la

leishmaniose, la maladie de lyme, la trypanosomiase et le paludisme. Cependant, contrairement à ces infections dont les agents pathogènes responsables sont transmis par des insectes hématophages, on note dans le cas de l'infection à *M. ulcerans* que les vecteurs incriminés sont des insectes prédateurs. Ces deux groupes d'insectes ont toutefois la particularité d'injecter leur salive à l'hôte, en même temps que les micro-organismes qu'ils véhiculent. Sur la base de modèles expérimentaux utilisant soit un homogénat de glandes salivaires ou plus rarement de la salive du vecteur, plusieurs travaux ont ainsi décrit les différentes interactions qu'il y aurait entre le système immunitaire de l'hôte et les molécules salivaires des phlébotomes (18, 104, 184, 191), des tiques (116, 124, 207), des moustiques (15, 151, 152) et des glossines (21, 129). Avec sa salive, le vecteur inocule un ensemble de molécules actives à l'hôte qui lui permettent entre autre de moduler la réponse immunitaire de l'hôte de manière à échapper aux réactions de défense qu'il développe, tout en lui facilitant son processus de nutrition. Cette activité immuno-modulatrice des molécules salivaires du vecteur favorise également l'augmentation de la pathogénicité des microorganismes transmis. Par ailleurs, les travaux montrant que la salive des arthropodes favorisait la transmission des agents pathogènes dont ils sont vecteurs, ont également rapporté que l'exposition à la piqûre itérative de vecteurs non-infectés ou l'administration de leur extrait salivaire protégerait l'hôte d'une infection ultérieure. Dans le cas de la maladie de Lyme et du paludisme notamment, on a également montré que la réponse immunitaire de l'homme aux molécules salivaires du vecteur contribuerait à l'apparition de marqueurs épidémiologiques de l'infection et à l'acquisition d'une immunité contre celle-ci (162, 152).

L'infection à *M. ulcerans* causée par un micro-organisme qui peut être transmis par des arthropodes vecteurs, nous nous proposons dans une approche similaire que celle présentée dans les autres infections de ce type de décrire les interactions immunologiques entre l'hôte et le vecteur. Pour cela, nous allons d'une part rechercher à travers un modèle murin, si l'exposition à la piqûre itérative de punaises saine confère une résistance à l'infection par *M. ulcerans*. D'autre

part, on a observé en zone d'endémie, que chez les pêcheurs adultes notamment, très peu de lésions sont diagnostiquées contrairement aux jeunes enfants. Outre le fait que les jeunes enfants soient probablement plus sensibles aux infections, ces observations suggèrent que chez les individus régulièrement exposés aux piqûres de punaises aquatiques, se développe un processus immunologique qui pourrait se traduire par l'absence de lésions. Nous nous proposons ainsi de rechercher la preuve de l'exposition à la piqûre de punaise d'eau par la mise en évidence d'une signature immunologique de celle-ci chez les sujets vivant en zones d'endémie béninoise à l'ulcère de Buruli.

La méthodologie et les résultats présentés ci-dessous font l'objet de la publication insérée dans l'annexe 2 de cette thèse.

C. Méthodologie

I. Collecte des punaises d'eau et préparation de l'homogénat de glandes salivaires

Pour cette étude, des *Naucoris cimicoides* ont été capturés dans les marécages de l'Ouest de la France ; *Belostoma cordofana* et *Naucoris flavicollis* (Macrocoris) dans le long du fleuve Ouémé dans la République du Bénin, Afrique de l'Ouest. Les insectes gardées en aquarium ont été expérimentalement infectées avec des asticots contaminés par *M. ulcerans* (souche 01G897) (100).

Les glandes salivaires accessoires disséquées ont été conservées dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, additionné d'inhibiteurs de protéases (Complete, EDTA free; Roche Diagnostics). Les tissus sont ensuite broyés mécaniquement avec des billes de verres de 106 µm de diamètre, pendant 5 minutes à vitesse maximale à 4°C, à l'aide d'un vibrobroyeur (MM 200, RETSCH). Le broyat a été centrifugé à 8.000 x g pendant 10 minutes afin d'en éliminer les débris. Puis on recueille le surnageant constituant l'homogénat de glandes salivaires (HGS). La concentration en

protéine a été ajustée à 7 mg/ml suivant la méthode de Bradford (Bio-Rad) avant d'être stocké à - 80 ° C, ou à 100 % de sulfate d'ammonium pour les échantillons recueillis au Bénin.

II. Modèle expérimental 1 : exposition des souris à la piqûre de punaises saines suivie d'une exposition à la piqûre de punaises infectées par *M. ulcerans*

Deux groupes de dix souris femelles BALB/c (Charles River France, <http://www.criver.com/ico>) de six semaines ont été anesthésiées par une injection intramusculaire de kétamine (88 mg / kg). Les queues des souris du groupe 1 sont ensuite immergées 4 fois 10 secondes, une fois par semaine pendant 4 semaines, dans un aquarium contenant des *Naucoris cimicoides*. A la cinquième semaine, le sang des deux groupes de souris a été prélevé afin d'évaluer le taux des IgG sériques reconnaissant les molécules contenues dans un HGS. A la sixième semaine, les queues de toutes les souris sont exposées aux piqûres de punaises infectées par *M. ulcerans*. Quelques semaines après, les souris ont été sacrifiées et la mycobactérie a été recherchée dans les lésions qui sont apparues (Fig. 14).

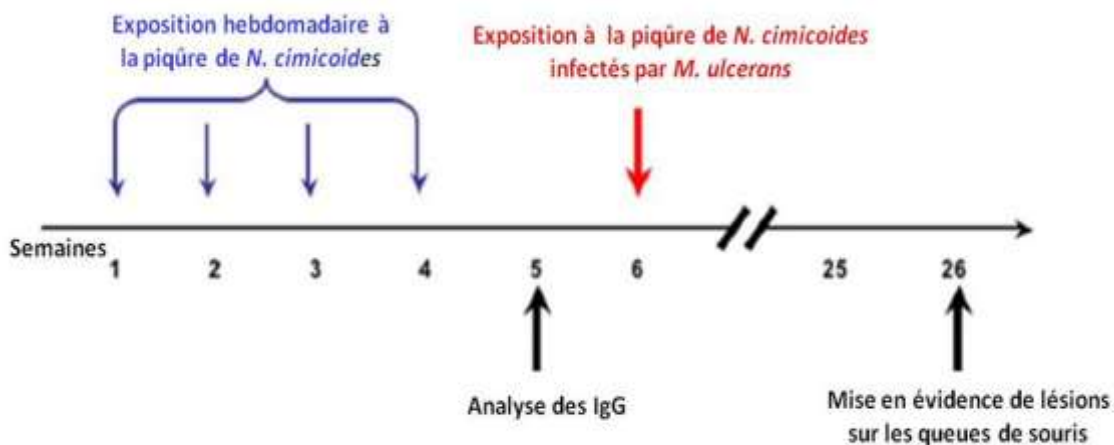


Fig. 14. Modèle expérimental 1

III. Modèle expérimental 2

Contrairement au modèle précédent, les quatre groupes de cinq souris de ce modèle ont été directement inoculées ou non (groupe controle) avec de l'HGS puis avec une suspension de *M. ulcerans* pré-incubée ou non avec de l'HGS (Tableau 4).

IV. Analyse par Western blot

Un échantillon de HGS contenant 60 µg de protéines ou de *M. ulcerans* co-incubés avec 1 mg de protéines salivaires a été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 4 % -12 %. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose qui sera ensuite incubée avec du sérum murin ou humain dilué au 1/100. La détection des IgG murins ou humains fixées aux protéines salivaires a été effectuée avec des anticorps secondaires anti-IgG de souris ou anti-IgG humaines conjugués à la peroxydase et avec du diamino benzyldine (DAB).

V. Etude de la prévalence des IgG humaines dirigées contre les protéines salivaires

V-1 Le type d'étude

Il s'agit d'une étude séro-épidémiologique, cas / témoins comparant la prévalence de la séropositivité au suc salivaire de punaise en recherchant les immunoglobulines G et M par les méthodes ELISA et Western-Blot chez des cas (enfants ou adultes ayant un ulcère de Buruli) à la prévalence de séropositivité chez des témoins (enfants ou adultes appariés pour l'âge, l'intensité d'exposition). L'intensité de l'exposition a été définie par un indice relatif à la fréquentation du milieu aquatique.

V-2 Population étudiée et critères d'inclusion

Elle était représentée par la population de Pobé et des villages béninois voisins. Les participants ayant signé un consentement éclairé étaient répartis en deux cohortes :

- La cohorte des « patients » : elle était composée de 30 individus dont 11 femmes et 19 hommes, âgés de 3-74 ans qui avaient été recrutés au centre Centre de Diagnostic et de Traitement de l'Ulcère de Buruli Follereau de Pobè au Bénin. Le diagnostic de l'ulcère de Buruli a été établi par coloration Ziehl-Neelsen et confirmé par PCR par la mise en évidence de la séquence IS2404 spécifique de *M. ulcerans*.

- La cohorte des « sujets exposés » : elle était composée de 55 dont 21 femmes et 34 hommes, âgés de 5-72 ans. En règle générale, leurs activités professionnelles étaient la pêche et l'agriculture.

V-3 Matériel d'investigation et considérations éthiques

Le protocole de cette étude a été approuvé par le le Ministère de la santé de la République du Bénin. L'échantillon nécessaire pour cette étude était un prélèvement unique de sang veineux de 20 ml recueilli chez chacun des participants. Le sérum récupéré a été conservé en azide de sodium à 0,05% puis divisé en cinq aliquots dont quatre de 1 ml et un autre avec le reste. Les aliquots ont été étiquetés avec les initiales du patient, la date et le numéro de l'étude puis conservées à 4°C, avant leur acheminement jusqu'à l'Institut Pasteur de Paris.

VI. Analyse ELISA

Un échantillon de HGS contenant 50 µg de protéines dilué dans 100 µl de PBS additionné de 0,05% de Tween 80 a été déposé dans chacun des puits d'une plaque Nunc Maxisorb de 96 puits. Après incubation à 4° C de la plaque pendant toute une nuit, la plaque a été lavée puis

saturée avec du lait à 5% dans du PBS. Après 2 h et trois lavages, les sérums humains dilués au 1/100 ont été rajoutés et incubés 1 h30 à 37° C. Les IgG sériques associées aux molécules salivaires ont été détectées en utilisant des anticorps de chèvre anti-IgG humaines (chaîne γ) (Sigma) ou de rat anti-IgM humaines (chaîne μ) (Interchim), conjugués à la peroxydase et de l'OPD (Dako, <http://www.dako.com>).

VII. Analyse statistique

Le test χ^2 a été utilisé pour comparer la taille de l'échantillon des distributions (proportions). L'analyse de la variance a été utilisée pour comparer les valeurs moyennes entre les groupes, suivie par le test de Newman-Keuls de comparaison des moyennes par paires afin de détecter les différences des moyennes entre les groupes. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

D. Résultats

I. Expérience chez la souris

I-1. Modèle expérimental 1 : l'exposition préalable aux piqûres de punaises saines protégerait de l'apparition des lésions.

Au bout de 4 à 6 mois après l'exposition des deux groupes de souris aux piqûres de punaises infectées, on a observé que dans le groupe 1 de souris pré-exposées, seule une souris sur dix présentait des lésions tandis que dans le groupe 2, les lésions étaient retrouvées chez 8 souris sur 10. La pré-exposition répétée des souris aux piqûres de punaises saines semble protéger de l'apparition des lésions due à *M. ulcerans*.

I-2. Modèle expérimental 2 : la protection induite par les constituants salivaires résulte d'une diminution de la charge de bacilles lorsqu'ils ont été co-incubés avec ces derniers

Deux variables ont été prises en compte dans cette expérience à savoir la pré-incubation ou non des bacilles dans un homogénat de glandes salivaires avant leur inoculation à des souris ayant ou non été immunisées par une injection sous-cutanée d'HGS. Trois mois après l'inoculation de la mycobactérie, on a observé aucune lésion sinon chez une seule des souris appartenant au groupe de souris pré-immunisées avec de l'HGS et ayant été inoculées avec *M. ulcerans* co-incubés avec ces mêmes constituants salivaires. D'autre part, malgré l'absence de lésions, on a noté une multiplication de la mycobactérie toutefois de deux log inférieurs que dans les autres groupes (Tableau 4). D'après ces résultats, les constituants salivaires de *N. cimidoides* empêcheraient le développement de lésions cutanées due à *M. ulcerans* sans que paradoxalement les bacilles ne soient éliminés.

Traitement	Mesures	A	B	C	D
Pré-immunisation HGS	-	Non	Non	Oui	Oui
Inoculation avec <i>M. ulcerans</i> ± incubés HGS	-	-HGS	+HGS	-HGS	+HGS
Nombre de bacilles inoculés : 10	Lésions	5/5	5/5	5/5	1/5
	Log CFU	7,3	7,6	7,6	5,6
Nombre de bacilles inoculés : 100	Lésions	5/5	5/5	5/5	0/5
	Log CFU	8,5	8,4	8,2	6,1

Tableau 4. Modèle expérimental 2

II. Exploration immunologique chez l'homme

II-1. Mise en évidence de la signature immunologique des punaises d'eau par Western blot

Suite à l'analyse par Western blot, quatre profils immunologiques ont été observés (Fig. 15). Seuls les sérums de sujets indemnes (témoins) ont reconnu les constituants salivaires de *N. flavicollis*

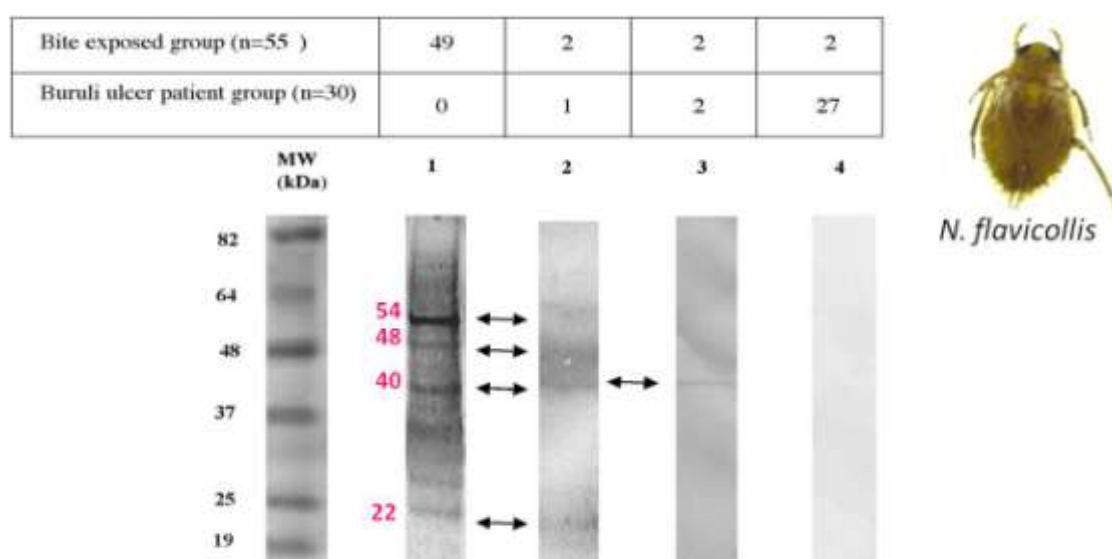


Fig. 15. Détection des IgG humaines associées aux protéines de HGS de *N. flavicollis*.

L'analyse par Western blot sur un éluat de la mycobactérie co-incubées avec de l'HGS, permet de constater que certaines molécules de la salive de Naucoridae notamment celles de 22, 40 et 48 kDa immunogènes chez les Béninois exposés étaient capables de se fixer sur la membrane de *M. ulcerans* (Fig. 16).

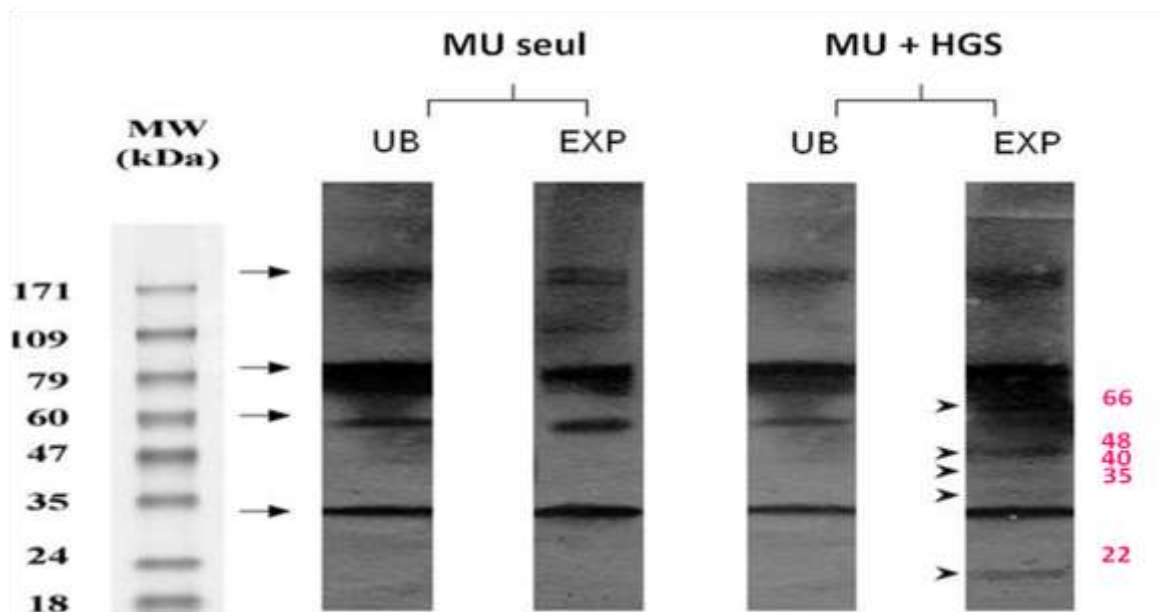


Fig. 16. Détection des IgG humaines associées aux protéines de HGS de *N. flavicollis* reconnaissant des éléments membranaires de *M. ulcerans*

II-2 Evaluation du taux sérique des IgG reconnaissant les protéines salivaires de punaises d'eau par ELISA

Les résultats quantitatifs de l'analyse ELISA ont permis de constater que comparativement aux patients, les taux d'IgG étaient plus élevés chez les sujets sains et ceci quelle que soit la famille à laquelle appartenait la punaise ($p = 0,05$ pour *N. flavicollis* et $p = 0,001$ pour *B. cordofana*) (Fig. 17).

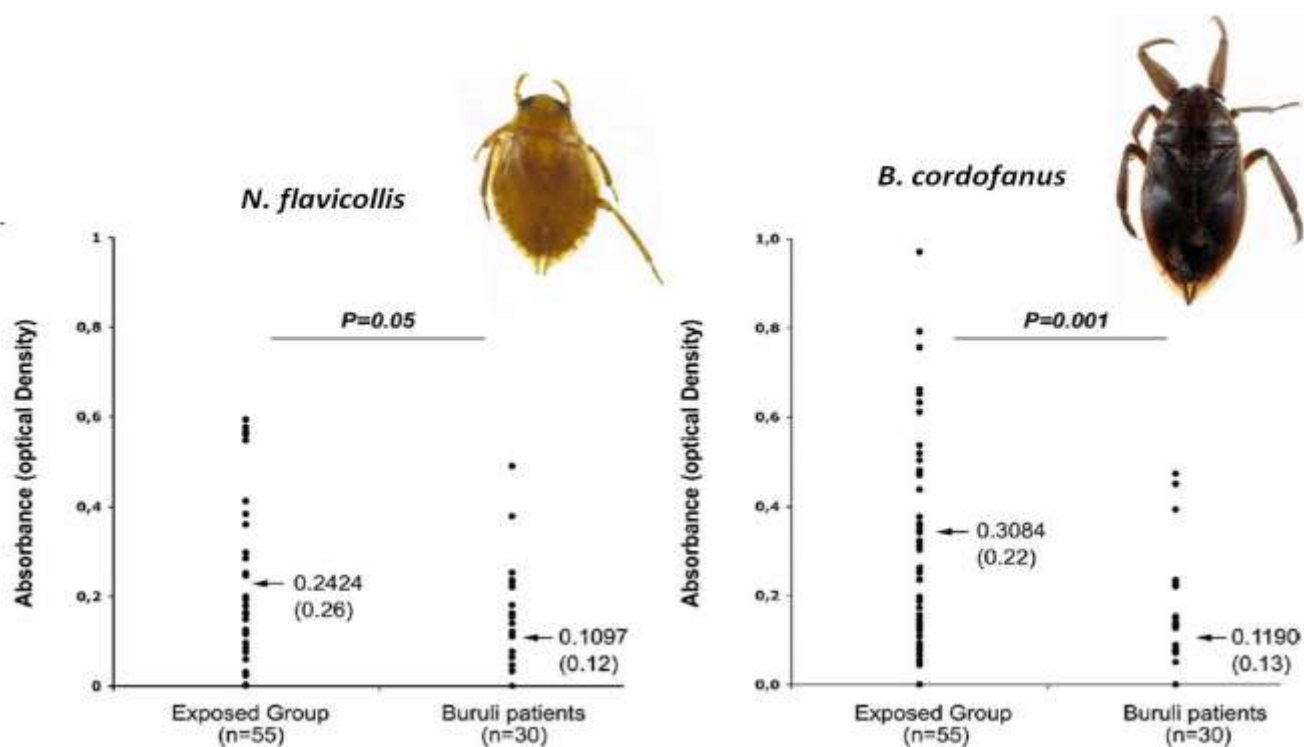


Fig. 17. Taux d'IgG des sérums de Béninois exposés aux piqûres de punaises d'eau.

En effet, dans 87,2% des sérums des sujets exposés (48/55) et dans 60% des sérums de patients (19/30), il a été retrouvé des IgG dirigées contre les constituants salivaires de punaises d'eau. Cette différence étant statistiquement significative suggère une corrélation entre le titre d'anticorps IgG et l'absence ou la présence d'ulcère de Buruli.

E. Discussion et perspectives

Considérant la niche aquatique de *M. ulcerans* et sa mise en évidence chez certains arthropodes aquatiques (132), Marsollier *et al.* ont démontré que *M. ulcerans* pouvait être transmise par la piqûre de punaises d'eau (100). Cette nouvelle hypothèse remettait en avant la relation entre les arthropodes vecteurs et les maladies humaines. Une telle relation a déjà démontrée dans le cas des leishmanioses et de la maladie de Lyme. Elle a conduit à l'identification

de protéines salivaires de phlébotomes et de tiques capable de conférer une immunité protectrice à l'hôte contre les infections causées par les micro-organismes qu'ils transmettent.

En ce qui concerne l'infection par *M. ulcerans*, une première étude au Bénin a montré des résultats comparables à ceux obtenus dans les études relatives aux maladies causées par des micro-organismes à transmission vectorielle citées précédemment. Les résultats obtenus ci-dessus suggèrent notamment que dans le sérum des personnes vivant en zones endémiques à l'ulcère de Buruli, la présence et la valeur du titre d'anticorps se combinant aux molécules salivaires des punaises d'eau pourraient potentiellement être considérés comme des bio-marqueurs d'un statut de protection en l'absence de toute lésion pré-ulcéralive ou de lésions ulcéreuses positives à *M. ulcerans*. Ces molécules salivaires présenteraient un intérêt majeur notamment dans les études épidémiologiques. En effet, outre le fait qu'elles permettent d'évaluer le degré d'exposition aux piqûres des vecteurs, la caractérisation de telles protéines pourrait conduire au développement de tests immunologiques. Ces derniers permettraient d'identifier les populations à risque de ces maladies afin d'une part d'optimiser les stratégies de surveillance épidémiologique de ces dernières et d'autre part d'évaluer la lutte anti-vectorielle. Les molécules salivaires qui induisent chez l'hôte une réponse immunitaire protectrice seraient par ailleurs des cibles potentielles à l'élaboration de vaccin. Cette approche vaccinale constituerait l'espoir d'un traitement prophylactique applicable aux maladies causées par des micro-organismes à transmission vectorielle qui posent encore aujourd'hui, des problèmes de santé publique notamment dans les pays en voie de développement.

Ces résultats tout à fait exceptionnels obtenus au Bénin, nous permettaient de faire le lien entre *M. ulcerans*, les punaises d'eau, potentielles vectrices de la mycobactérie et les individus des zones d'endémie. Toutefois, il s'agit là d'une première étude, il nous a paru important non seulement de vérifier les résultats obtenus dans une autre région endémique à l'ulcère de Buruli,

mais également d'identifier les différentes molécules immunogènes des punaises d'eau dont celles se liant à *M. ulcerans*. Ainsi, dans la continuité de ce travail, nous avons réalisé la même étude au Cameroun, avec des cohortes plus larges. Les résultats de cette dernière seront présentés et discutés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

**ETUDE ENTOMOLOGIQUE
ET IMMUNO-CHIMIQUE
DES PUNAISES D'EAU**

A- Etude entomologique

I. Introduction : les punaises d'eau, vecteurs potentiels de *M. ulcerans*

La suspicion du rôle des punaises d'eau dans la transmission de *M. ulcerans* a été émise pour la première fois en 1999 (132). En effet, dans des prélèvements de l'environnement collectés dans des localités béninoises et ghanéennes endémiques à l'ulcère de Buruli, Portaels *et al.* détectent la mycobactérie chez des punaises d'eau appartenant aux familles des Naucoridae (genre *Naucoris*) et des Belostomatidae (genre *Diplonychus*). Ces insectes prédateurs, étant très agressifs lorsqu'ils sont dérangés, et capables de piquer l'homme, on émet alors l'hypothèse d'une transmission active de l'ulcère de Buruli par la piqûre de punaises d'eau. La preuve expérimentale de cette hypothèse a été apportée quelques années plus tard par Marsollier *et al.*, en infectant artificiellement des spécimens de *Naucoris cimicoides* (Naucoridae) capturés dans l'Ouest de la France, qui sont nourris de larves d'insectes infectées par *M. ulcerans* (100). Quelques semaines après l'infection des punaises, l'extrémité des queues de souris préalablement anesthésiées ont été immergées dans l'aquarium contenant des punaises infectées et affamées, les exposant ainsi à la piqûre de ces insectes. Entre le deuxième et le troisième mois après cette épreuve, des lésions comparables à celles qui surviennent au cours de l'ulcère de Buruli ont été observées sur les queues de souris, au point de morsure des insectes (Fig. 18 A et B). Marsollier *et al.* démontraient ainsi que les punaises d'eau infectées pouvaient par leur piqûre transmettre *M. ulcerans*. Le rôle vecteur des punaises aquatiques a été soutenu par la mise en évidence de bacilles, après l'étude immuno-histochimique de leurs glandes salivaires (Fig. 18 C).

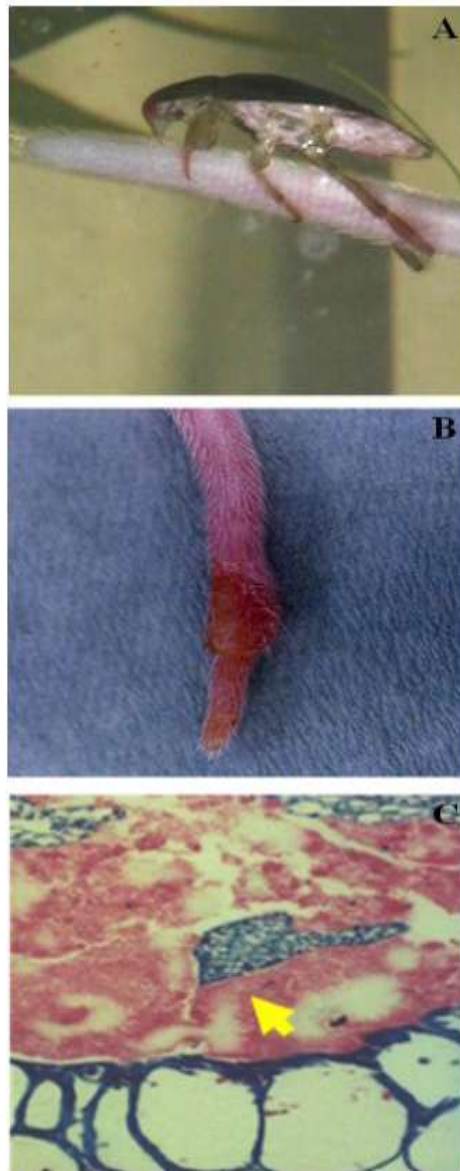


Fig. 18. Transmission de l'infection due à *M. ulcerans* à des souris de BALB/c suite à la piqûre d'insectes de la famille des Naucoridae. (A) Punaise d'eau (*N. cimicoides*) enfonçant son rostre dans la queue de souris. Les pattes antérieures dites ravisseuses, sont adaptées pour saisir la proie. (B) Après 57 jours, des lésions inflammatoires actives se développent sur le site de la piqûre. (C) Distribution de *M. ulcerans* sur des coupes histologiques de glandes salivaires de punaises d'eau (*N. cimicoides*) infectées expérimentalement. La coloration au Ziehl-Neelsen montre des colonies de bacilles acido-alcool résistants (flèche) (Marsollier, 2002).

Cette relation entre un arthropode-vecteur et une mycobactérie pathogène pour l'homme semblait être spécifique à *M. ulcerans*. Par ailleurs, le fait d'observer au cours de l'expérimentation que *M. ulcerans* pouvait persister et se multiplier dans les glandes salivaires des punaises d'eau, les a amenés à conclure que ces punaises d'eau seraient non seulement des vecteurs mais également des hôtes de la mycobactérie. Ceci vient d'être confirmé par Portaels et al. qui ont isolé à partir d'un broyat de punaise d'eau mis en culture une souche de *M. ulcerans* de génotype identique à celle retrouvée chez des africains atteints d'ulcère de Buruli (134).

En essayant de comprendre comment les punaises d'eau pouvaient se contaminer dans l'environnement, Marsollier et al. ont découvert que *M. ulcerans* est capable de former des biofilms à la surface des plantes aquatiques (97, 101). Les Naucoridae étant exclusivement des carnivores, il existerait donc un hôte intermédiaire obligatoire, qui serait représenté par des mollusques tropicaux aquatiques ; ces derniers s'infecteraient en se nourrissant de végétaux aquatiques recouverts du biofilm de bacilles. L'ingestion des mollusques (*Ampullariidae*, *Planorbidae*) par les punaises au cours de leur période d'infection transitoire pourrait ainsi être à l'origine de la contamination des insectes. A partir de ces hypothèses, des données expérimentales et de la détection par PCR de la mycobactérie sur les végétaux et les mollusques (101), un schéma de contamination a été proposé (Fig. 19).

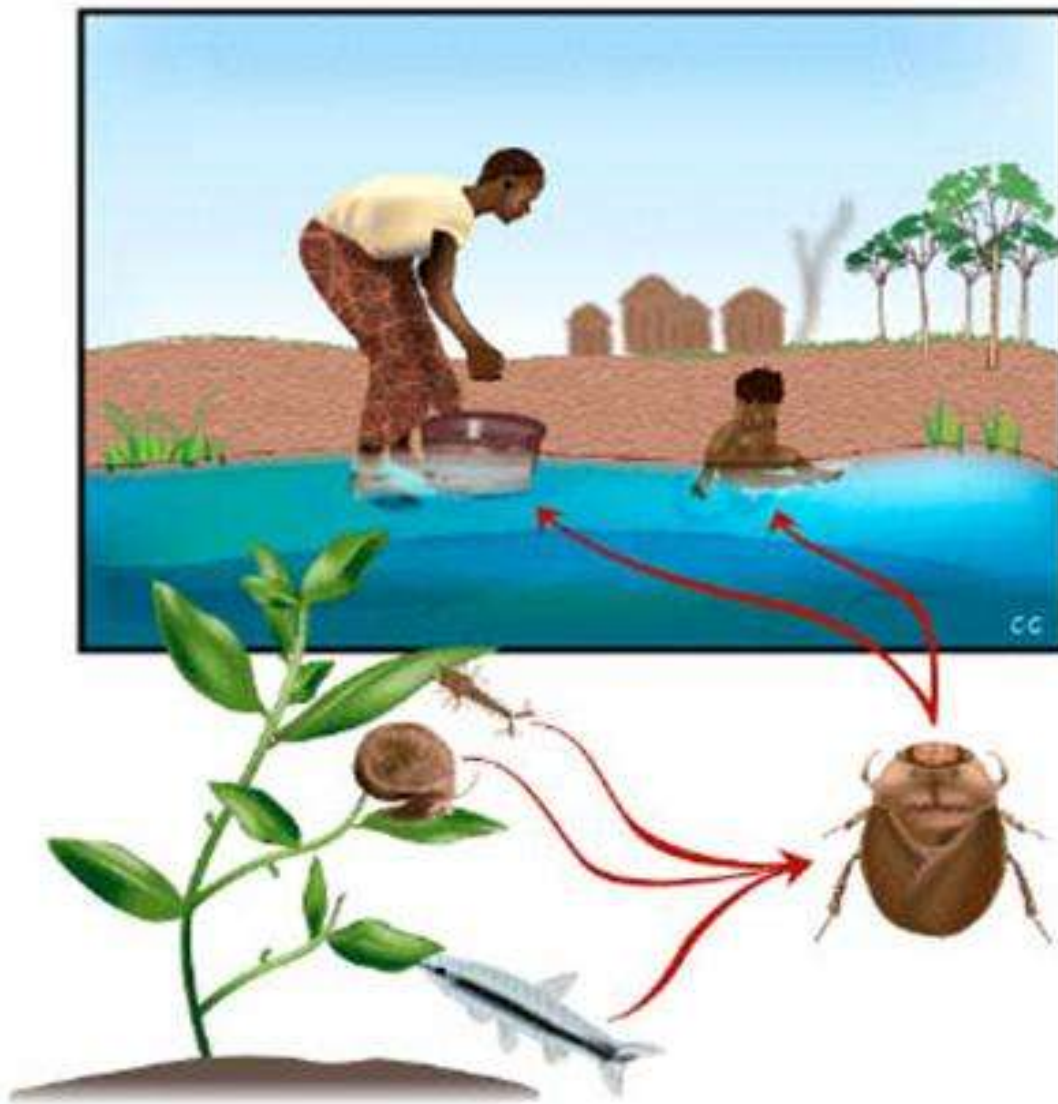


Fig. 19. Mode probable de transmission de *Mycobacterium ulcerans* à l'homme. Des mollusques aquatiques ou d'autres animaux phytophages sont des sources transitoires de *M. ulcerans* puisqu'ils se nourrissent de plantes servant de support aux biofilms formés par le bacille. Ces proies sont dévorées par les punaises aquatiques. Les bacilles s'établissent au niveau des glandes salivaires des insectes et s'y multiplient. Ils peuvent être transmis à l'homme lors de piqûres accidentelles (Marsollier, 2003).

Ils décrivent par la suite, le mécanisme par lequel les glandes salivaires des punaises d'eau seraient contaminées (94, 95). En effet, au cours de leur repas, les stylets en se déployant du rostre et en pénétrant dans les tissus de la proie, permettent d'injecter un suc salivaire riche en enzymes protéolytiques (179), et d'aspirer les tissus prédigérés en même temps que les bacilles. Ces derniers fixés sur les stylets qui se rétractent dans la capsule céphalique de l'insecte, y sont libérés sous l'action d'enzymes, et transloqués de sa cavité céphalique vers sa cavité générale par un mécanisme encore inconnu. Ils sont ensuite captés par les plasmatocytes contenus dans l'hémolymph où ils peuvent se multiplier. Au niveau des glandes salivaires, les plasmatocytes détruits sous l'action de la mycolactone, libèrent diverses enzymes et de nombreux bacilles (95).

Les punaises d'eau sont des insectes cosmopolites, retrouvées autant dans les régions tempérées que tropicales. Toutefois, c'est uniquement en Afrique que ces insectes ont été impliqués dans la transmission de l'ulcère de Buruli. Les punaises d'eau peuvent être attirées par la lumière et se retrouver dans des habitations. Leur aptitude à voler pourrait contribuer à la diffusion et à l'apparition de nouveaux foyers de la maladie.

II. Notes bibliographiques et observations personnelles sur les hémiptères aquatiques

Parmi les 40.000 hétéroptères connus jusqu'à présent, il existe très peu d'études sur les punaises aquatiques. Les caractères morphologiques de ces dernières, très variables d'une espèce à une autre, ont permis de décrire différents spécimens. Grâce à ces descriptions, il a été possible de définir des critères taxonomiques permettant de les identifier jusqu'au niveau de la famille (Tableau 5).

II-1 Position systématique des punaises d'eau dans la classification des insectes

D'après Randall Schuh, la position systématique des punaises d'eau est la suivante :

Embranchement : *Arthropoda*,

Sous-embranchement : *Hexapoda*

Classe : *Insecta*

Ordre : *Hemiptera*

Sous-ordre : *Heteroptera*

Infra-Ordre : *Gerromorpha* qui inclut certaines familles de punaises semi-aquatiques à l'exemple des Gerridae;

Nepomorpha dans lequel sont retrouvées toutes les familles des punaises entièrement aquatiques à savoir : les Naucoridae, les Belostomatidae, les Notonectidae, les Nepidae, et les Corixidae .

Ordre	Sous-ordre		Infra-ordre	Super-famille	Famille
Hemiptera	Heteroptera	NEOHETEROPTERA	Gerromorpha	Mesoveloidea	Mesoveliidae
				Hebroidea	Hebridae
					Macroveliidae
				Hydrometroidea	Hydrometridae
				Gerroidea	Veliidae
					Gerridae
		PANHETEROPTERA	Nepomorpha	Nepoidea	Belostomatidae
					Nepidae
				Ochterioidea	Ochterioidea
					Gelastocoridae
				Corixoidea	Corixidae
				Naucoroidea	Potamocoridae
					Naucoridae
					Aphelocheiridae
				Notonectoidea	Notonectidae
					Pleidae
					Helotrephidae

Tableau 5. Classification des punaises aquatiques (161).

II-2 Morphologie générale des hétéroptères

Comme chez tous les insectes, on distingue chez les hétéroptères trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen. Chacune d'entre elles porte des caractères distinctifs des insectes constitutifs de ce groupe. Nous évoquerons dans la description suivante les caractères les plus remarquables (Fig. 20).

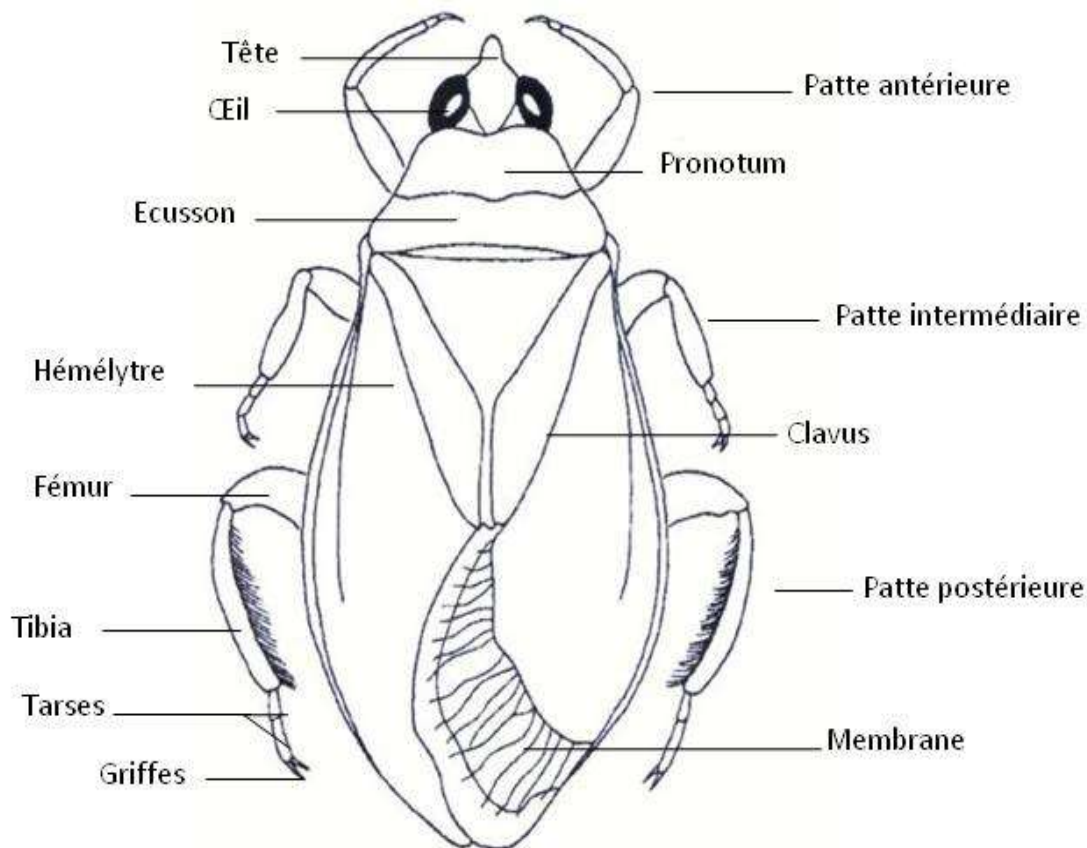


Fig. 20. Schéma représentant la vue dorsale d'un hémiptère adulte (Villiers, 1952).

II-2-1 La tête

Elle est distincte, très peu mobile et porte les pièces buccales modifiées en un rostre à l'intérieur duquel coulissent des stylets. Le rostre de type piqueur-suceur est constitué de un à quatre articles. Les antennes disposées symétriquement sont constituées de un à cinq articles. Elles sont de forme et de longueur très variables selon les espèces. Elles peuvent être bien développées et visibles en vue dorsale chez certaines espèces ripicoles ou très courtes et invisibles en vue

dorsale chez les hétéroptères aquatiques. Les ocelles sont présents ou absents en fonction de l'insecte.

II-2-2 Le thorax

Il est constitué d'avant en arrière du prothorax, du mésothorax et du métathorax. Chacun des trois segments est muni d'une paire de pattes.

II-2-2-1 Le prothorax

Sa partie dorsale ou pronotum est relativement large et rigide. Sa partie ventrale ou prosternum est percée de deux cavités dans lesquelles viennent s'ajuster les hanches des pattes antérieures.

II-2-2-2 Le mésothorax

Il n'est visible sur la face dorsale que par une région appelée écusson ou scutellum. En général de forme triangulaire, ce dernier est inséré entre la base des hémélytres ou les recouvre sur une étendue plus ou moins grande. Il porte les pattes intermédiaires de l'insecte.

II-2-2-3 Le métathorax

Sa face dorsale est complètement cachée par les ailes quand l'insecte est au repos. Sur sa face ventrale, se trouvent les ouvertures des glandes odorifères. Celles-ci émettent une odeur caractéristique de l'insecte qu'il utilise souvent pour éloigner les prédateurs. Il porte les pattes postérieures.

II-2-2-4 Les pattes

Elles sont portées par chacun des trois segments thoraciques. De la base vers l'apex, elles comprennent : la hanche ou coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse. Les fémurs et les tibias sont de formes variables. Les tarses sont formés d'un ou plusieurs articles et terminés par une ou deux griffes. En fonction de la biologie et de l'environnement écologique de l'insecte, les pattes ont quelquefois subi des adaptations. Ainsi chez les Naucoridae, les Belostomatidae et les Nepidae par exemple, les pattes antérieures sont dites ravisseuses avec des fémurs élargis, aplatis,

et adaptés à la préhension. Leurs pattes intermédiaires et postérieures sont adaptées à la natation par un aplatissement des tibias et des tarses, qui sont frangés de longs poils transformés en des sortes de rames permettant à l'insecte de se déplacer dans l'eau.

II-2-2-5 Les ailes

Chez les hétéroptères, les ailes antérieures ou hémélytres sont formées d'une partie basale coriace (le corium), d'une région basale interne formant l'angle anal de l'hémélytre (le clavus) et d'une partie apicale membraneuse. Lorsque l'insecte est au repos, les hémélytres recouvrent les ailes postérieures qui sont entièrement membraneuses. Les ailes sont parcourues par des nervures longitudinales et transversales se réunissant de façon variable pour former des cellules dont la disposition et le nombre diffèrent selon les espèces. La nervation des ailes constitue pour les systématiciens un élément important dans l'identification de l'espèce.

II-2-3 L'abdomen

Il est constitué de segments dont le nombre varie entre cinq et onze en fonction des insectes. Chez quelques familles d'Hétéroptères, certains segments ont régressé et ne sont presque plus visibles, certains ont été transformés afin d'abriter une partie des organes de l'insecte et d'autres enfin ont simplement disparu.

II-3 Ecologie et biologie des punaises d'eau

II-3-1 Distribution géographique

Les punaises d'eau sont répandues dans les régions tempérées, mais sont surtout nombreuses dans les contrées tropicales. Les bouleversements environnementaux (déforestation, création de lacs artificiels pour l'irrigation et la pêche, riziculture) sont favorables à leur développement. Par ailleurs, l'attraction qu'exerce la lumière chez certaines, leur aptitude à voler, ainsi que la décrue importante des eaux de leur habitat peuvent être à l'origine des migrations vers de nouveaux environnements aquatiques qu'elles colonisent.

II-3-2 Habitat

Les punaises d'eau sont habituellement retrouvées dans des points d'eau calme, des lacs, des étangs, des rivières et des fleuves à débit lent. Elles s'accrochent le plus souvent aux racines, aux feuilles ou aux branches des plantes aquatiques. Certaines espèces préfèrent les rives comme les Notonectes, en général retrouvées sous une faible couche d'eau et les Népidés dans la vase d'où surgit leur siphon respiratoire. D'autres comme les Bélostomes géants sont plus abondants en pleines eaux car les proies y sont plus abondantes. Les punaises semi-aquatiques telles que les Gerris, les Hébrides et les Mesoveliides, patinent, marchent, courent, à la surface des eaux à la recherche de proies vivantes ou mortes.

II-3-3 Nutrition et digestion

A l'exception de certaines Corixidae qui se nourrissent d'algues ou de minuscules organismes et qui ne piquent pas, toutes les autres punaises aquatiques sont des insectes prédateurs. Grâce à leurs mouvements lents et leur camouflage, elles passent souvent inaperçues pour les proies potentielles qu'elles attrapent fermement avec leurs pattes ravisseuses. Une fois la proie saisie, la punaise l'explore et la transperce à l'aide de son rostre. Elle y enfonce ses stylets, y libèrent de la salive contenant des enzymes qui permettent à l'insecte de digérer les tissus puis de les aspirer. Les punaises d'eaux se nourrissent principalement de petits invertébrés terrestres et aquatiques (larves d'insectes, crustacés, têtards, vers de terre, petits poissons, etc.). Le choix des proies inclut non seulement la diversité de leur morphologie mais aussi la source de nourriture et surtout la diversité des enzymes digestives produites par leurs glandes salivaires. En effet, une étude comparative des punaises d'eau de la famille des Belostomatidae a montré des différences significatives entre la sécrétion enzymatique des glandes salivaires d'insectes appartenant au genre *Lethocerus* (punaise géante) et celle du genre *Belostoma* (punaises plus petites). *L. uhleri* par exemple, secrète dans sa salive onze enzymes digestives dont trois ont des activités protéolytiques différentes (179). *L. cordofanus*, la punaise géante africaine injecte avec sa salive cinq enzymes

protéolytiques (150). Tandis que dans la salive de *B. lutarium* beaucoup plus petit, seulement deux des neuf enzymes digestives secrétées par la punaise sont protéolytiques (179). L'activité protéolytique additionnelle retrouvée chez les *Lethocerus* leur permet de digérer plus rapidement des repas riches en protéines et explique entre autre leur capacité à s'attaquer à des proies plus grandes (des amphibiens, des petits poissons, des serpents) par rapport aux autres spécimens de la même famille (110, 117) (Fig. 21 A). Les punaises d'eau cohabitent en général dans le même environnement et sont sujettes à une forte tendance au cannibalisme et à la prédation intra et inter-spécifique (Fig. 21 B).

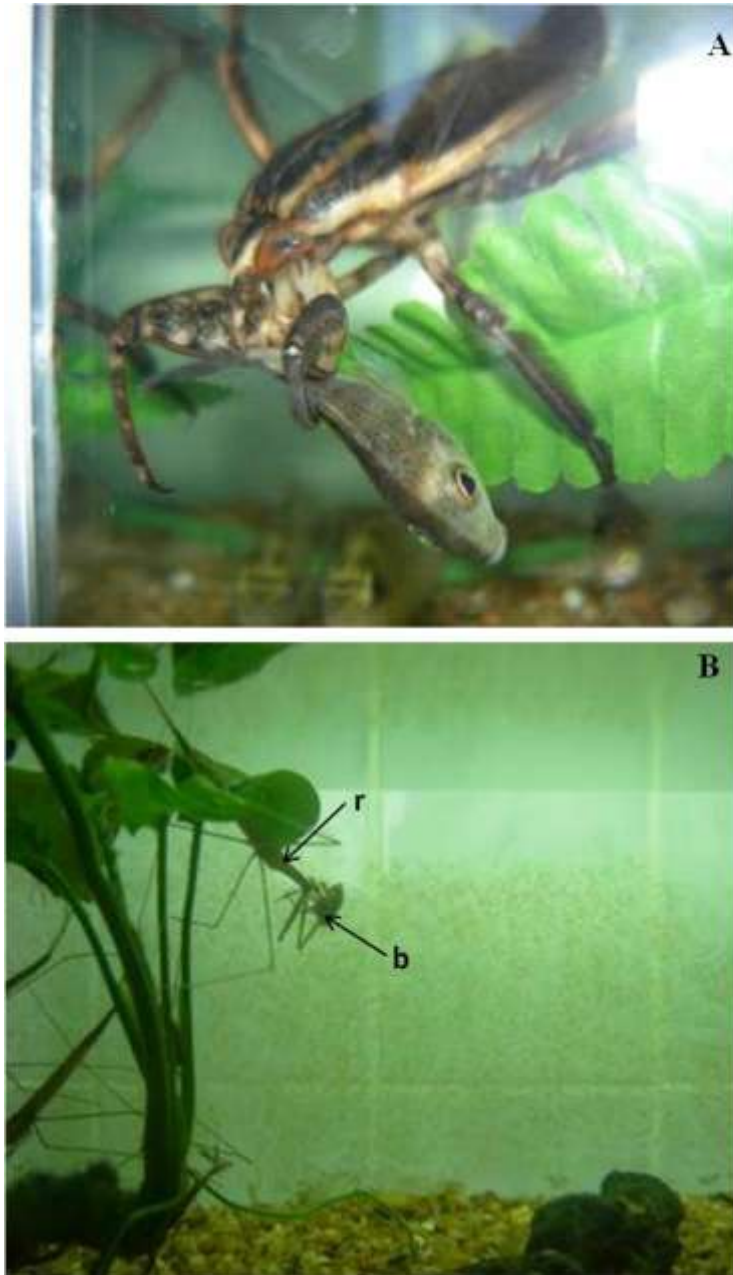


Fig. 21. Observation de la prédation des punaises d'eau en captivité. (A) Les *Lethocerus* sont capables grâce à leurs enzymes protéolytiques, de digérer les tissus de poissons de petite taille. (B) Une Ranatre (r) se nourrissant d'un petit Bélostome (b).

L'étude de la morphologie des glandes salivaires des Belostomatidae révèle qu'elles sont constituées de plusieurs lobes dont trois sont productives d'enzymes digestives : les glandes principales, les glandes secondaires et les glandes accessoires (180, 205) (Fig. 22).

Les glandes principales tout comme les glandes secondaires sont constituées de cellules alvéolaires formant une structure en grappe. Chacune des cellules est attachée à la lumière centrale qui se vide sur la face antérieure dans un sac de stockage. La glande principale est plus grande que la glande secondaire lorsqu'on se base sur le nombre et la taille des cellules alvéolaires. Les cellules glandulaires contiennent de nombreuses mitochondries actives et un réticulum endoplasmique lisse. Les glandes principales, secondaires et les sacs de stockages sont enveloppés d'un tissu musculaire strié. Les glandes accessoires quant à elles sont constituées d'une couche unique de cellules allongées formant une structure semblable à des doigts de gant.

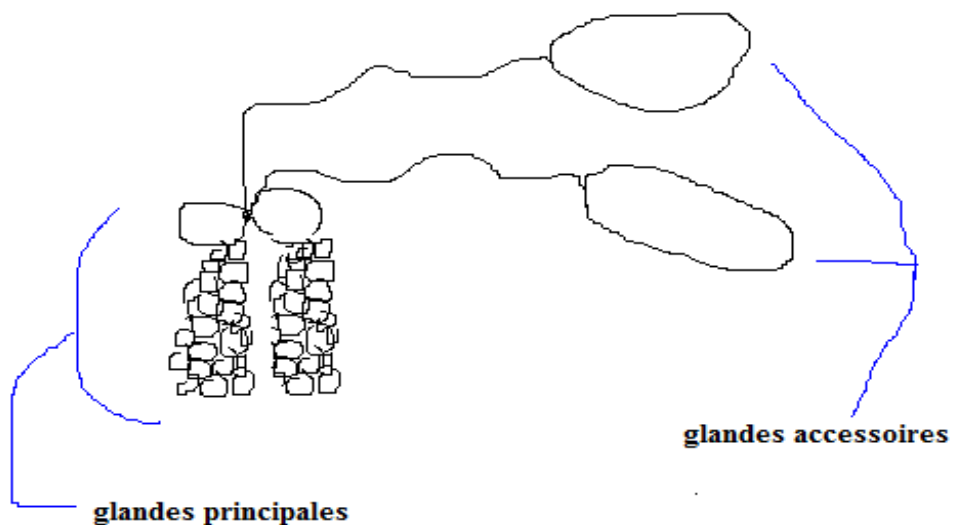


Fig. 22. Illustration des glandes salivaires de Belostomatidae. Les glandes principales sont constituées de cellules formant une structure en grappe. Les glandes accessoires sont allongées semblables à des doigts de gant.

II-3-4 Grégarisme

Plusieurs espèces de punaises d'eau dont celles appartenant aux familles des Belostomatidae, des Nepidae et des Naucoridae sont grégaires et peuvent se rassembler en grands groupes en des points tranquilles des cours d'eau. Quand ils sont dérangés, ils se dispersent, nageant sur une distance plus ou moins grande et se rassemblent à nouveau.

II-3-5 Respiration

Habituellement, les punaises d'eau ont la tête et tout ou une partie de l'abdomen complètement immergée. Périodiquement, elles émergent à la surface afin de se réapprovisionner en air. C'est le cas notamment des Naucoridae et Notonectidae qui au moyen de poils extrêmement fins et hydrofuges recouvrant la surface de leurs ailes antérieures et de leur abdomen, piègent les bulles d'air qui leur servira de réserve. Les Nepidae ou scorpions d'eau utilisent de manière plus ou moins continue, l'air présent à la surface grâce à leurs longs siphons respiratoires non rétractiles qu'elles laissent apparaître hors de l'eau. Ces punaises sont ainsi dépendantes de l'air de la surface des eaux et de ce fait ne peuvent survivre dans les eaux profondes. Pour s'enquérir de la profondeur de l'eau, ils possèdent en dessous de leur abdomen trois paires de capteurs de pression appelés orifices d'aération ou spiracles (Fig. 23 A). En dessous de ces orifices se trouvent des poches d'air du système interne de respiration de l'insecte. Les terminaisons nerveuses reliées à ces poches ainsi que les déplacements de l'air dans ces dernières informent le Népidae de la profondeur de l'eau et de sa position par rapport à celle-ci. Chez les Belostomatidae les échanges respiratoires se font également par l'intermédiaire de siphons caudaux, mais contrairement à ceux des Nepidae, les siphons des Belostomatidae sont courts et rétractiles (Fig. 23 B) (123).

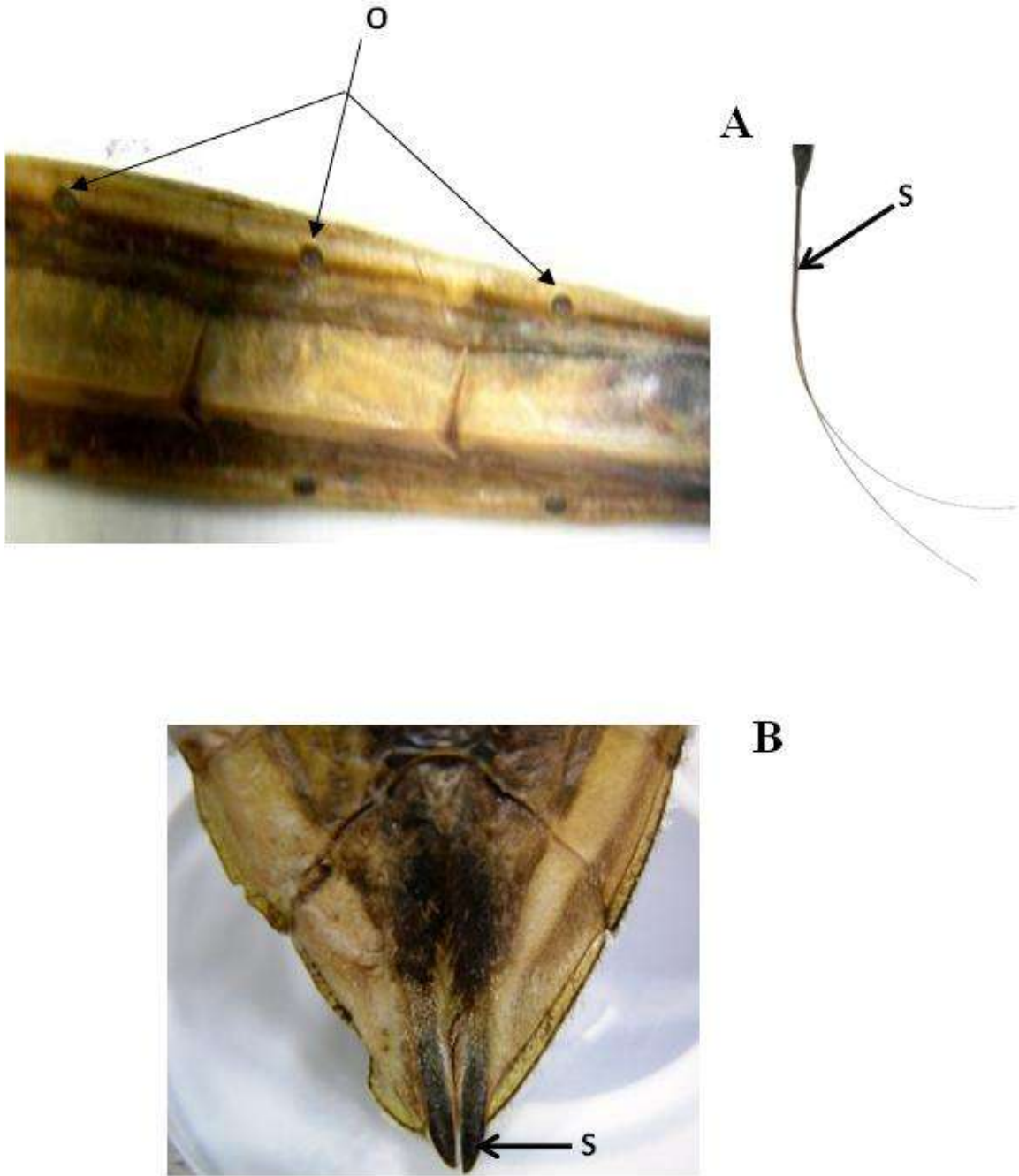


Fig. 23. Organes respiratoires des punaises d'eau. (A) Sur la face ventrale de l'abdomen d'une Ranatre (Nepidae), les orifices d'aération ou spiracles (o) sont disposés symétriquement de part et d'autre des parties latérales des segments abdominaux. (A) Chez les Nepidae, le dernier segment abdominal est prolongé d'un long siphon respiratoire (s). (B) Chez les Belostomatidae, les siphons respiratoires (s) sont courts et rétractiles.

II-3-6 Reproduction

II-3-6-1 Dimorphisme sexuel.

Les punaises d'eau présentent en général un dimorphisme sexuel. Cependant, leurs caractères morphologiques ne permettent que dans quelques rares cas, de différencier le mâle de la femelle. Chez *Anisops murati* (Notonectidae) par exemple, le mâle possède un peigne stridulant sur chaque tibia antérieur et un article unique au tarse correspondant, au lieu de deux chez la femelle (58).

II-3-6-2 Ponte et oeufs

Chez les Belostomatidae, environ 15 à 21 jours après l'accouplement, la femelle pond dans l'eau, sur la face dorsale du corps du mâle. Les œufs sont fixés sur ce dernier grâce à une glue imperméable (196). Au laboratoire, la ponte dure plusieurs heures ; elle est fréquemment interrompue par la femelle qui retourne s'accoupler avec le mâle. Elles pondent en moyenne 100 œufs par cycle de reproduction (Fig. 24 A, B et C). Le mâle expose de manière périodique, les œufs à l'air afin d'assurer leur viabilité. Les œufs éclosent environ 2 semaines après la ponte (Fig. 24 D). Le pourcentage d'éclosion est important et peut dépasser 90%. A l'éclosion, les larves sont de couleur jaune verdâtre ; elles brunissent par la suite. Elles ont tendance à se grouper en grand nombre à la surface de l'eau. On observe alors un cannibalisme important au sein de l'espèce, les larves les plus jeunes sont dévorées par les larves plus matures et par les adultes. Chez les Nepidae, les femelles pondent plusieurs œufs qui se collent ou s'attachent à la végétation aquatique. Les œufs déposés sur les tiges de plantes sont pourvus de filaments dont le nombre varie en fonction de l'espèce ; ceux-ci flottent librement dans l'eau et ont le même rôle que le siphon caudal de l'adulte. Pendant la ponte, la femelle introduit son organe ovipositeur dans les tissus végétaux puis le retire à chacun des œufs pondus qui, dès lors, demeurent solidement fixés sur le support à l'aide de deux filaments pneumatiques. L'œuf, de couleur blanchâtre, prend une

teinte orangée de plus en plus vive au fur et à mesure de sa maturation. Le pourcentage d'éclosion est d'environ 95% et la durée du développement embryonnaire de sept à douze jours (33).

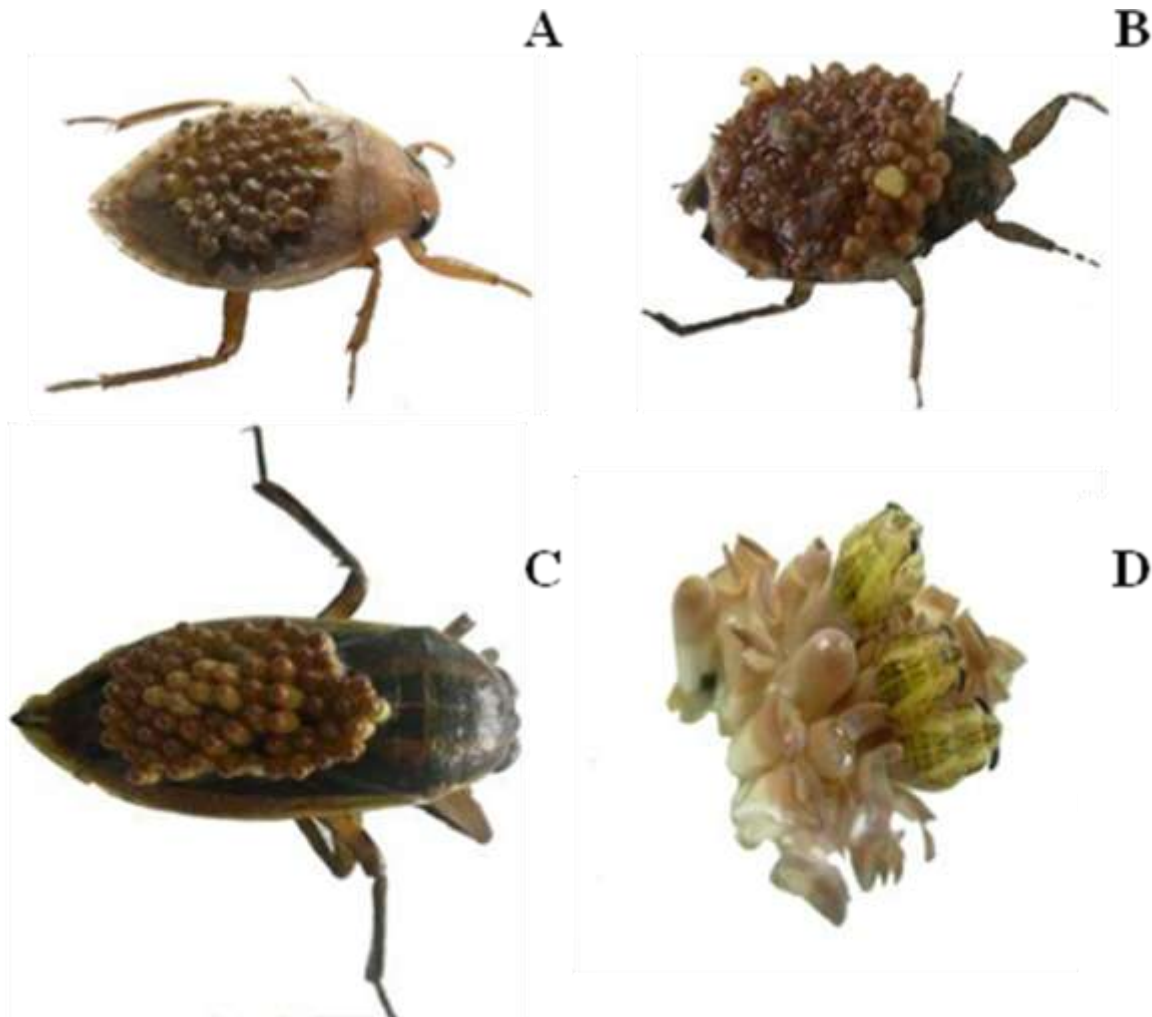


Fig. 24. Œufs de Belostomatidae. Environ 21 jours après l'accouplement, les femelles pondent les œufs sur quasiment toute la face dorsale des mâles (A, B, et C). Les œufs éclosent dans les 15 jours, ils peuvent se détacher du dos du mâle au cours de l'éclosion (D), ou y rester fixés (B).

II-3-6-3 Développement post-embryonnaire

Le développement post-embryonnaire est de type hémimétabole; on compte cinq stades successifs. Les larves, de couleur jaune-verdâtre (Fig. 25 A), subissent des mues successives (Fig.

25 B). A chaque mue, leur poids double à la suite d'une importante absorption d'eau et leur taille augmente. Elles se développent suivant une métamorphose graduelle montrant une accentuation progressive des caractères de l'insecte adulte (Fig. 25 C et D). La croissance de la larve est influencée par la température, la nature et la qualité de la nourriture; elle dépend aussi du sexe des individus, les mâles évoluant généralement un peu plus rapidement que les femelles.

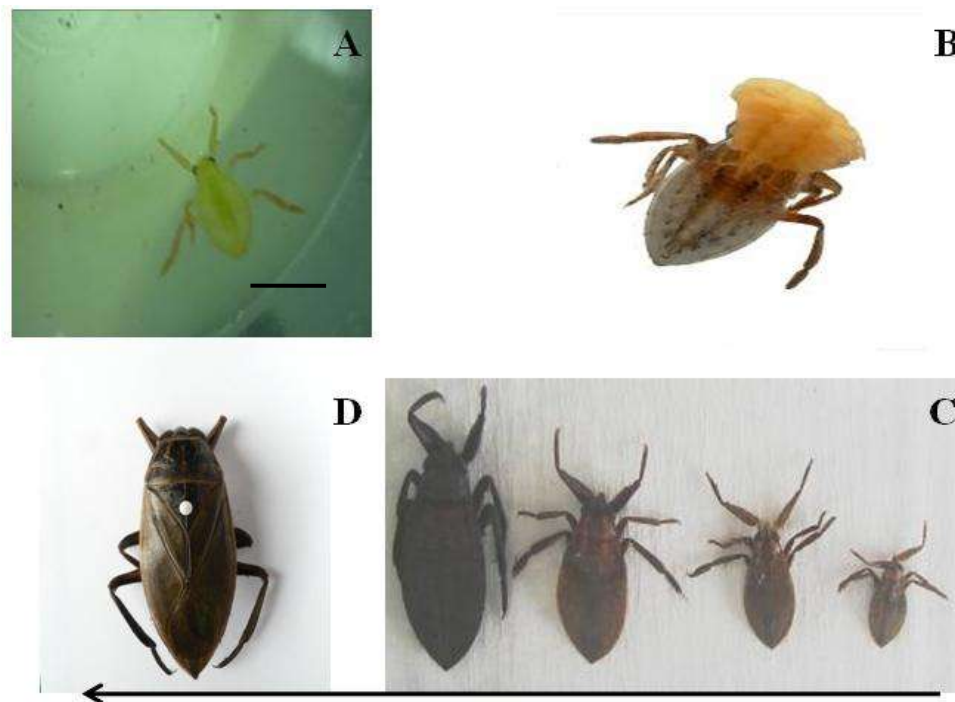


Fig. 25. Développement post-embryonnaire chez la punaise géante africaine. (Belostomatidae). (A) Après éclosion, une métamorphose graduelle avec une accentuation progressive des caractères de l'insecte, les premières larves sont jaune-verdâtres. (B) Elles subissent ensuite des mues successives, augmentent de taille pour donner l'insecte adulte tes (C-D). Barres : 0,5 cm (A, B, C) ; 1,5 cm (D)

III. Inventaire et description des punaises d'eau prédatrices du fleuve Nyong au Cameroun

III.1 Matériel et méthodes

III-1-1 Lieux de capture des insectes

Les punaises d'eau ont été capturées dans six sites arrosés par le fleuve Nyong (Fig 26 - 28) à Akonolinga (Fig. 12). Les lieux de captures ont été sélectionnés sur les critères suivants : la présence d'une activité humaine, la présence de végétation aquatique et l'accessibilité des berges. Il s'agit de sites naturellement exposés en plein soleil, à des températures journalières comprises entre 24 et 32°C selon la saison, le moment de la journée et l'ensoleillement. Deux des sites ont été choisis à proximité du fleuve Nyong, près d'un champ de manioc partiellement inondé pendant les saisons des pluies (Fig. 26 A et B). Les deux premiers sites sont séparés l'un de l'autre d'une distance d'environ 20 m. La profondeur du site n°1 ne dépasse pas 20 cm tandis que celle du site n°2 est d'environ 1 m.

Dans ces deux sites, outre l'activité agricole dans le champ de manioc, les pêcheurs posent des filets entre le bord et les premières végétations, et placent des hameçons dans les débris végétaux. Le site n°2 constitue également un lieu de départ et d'arrivée pour certains piroguiers transportant populations et vivres vers les villages voisins.

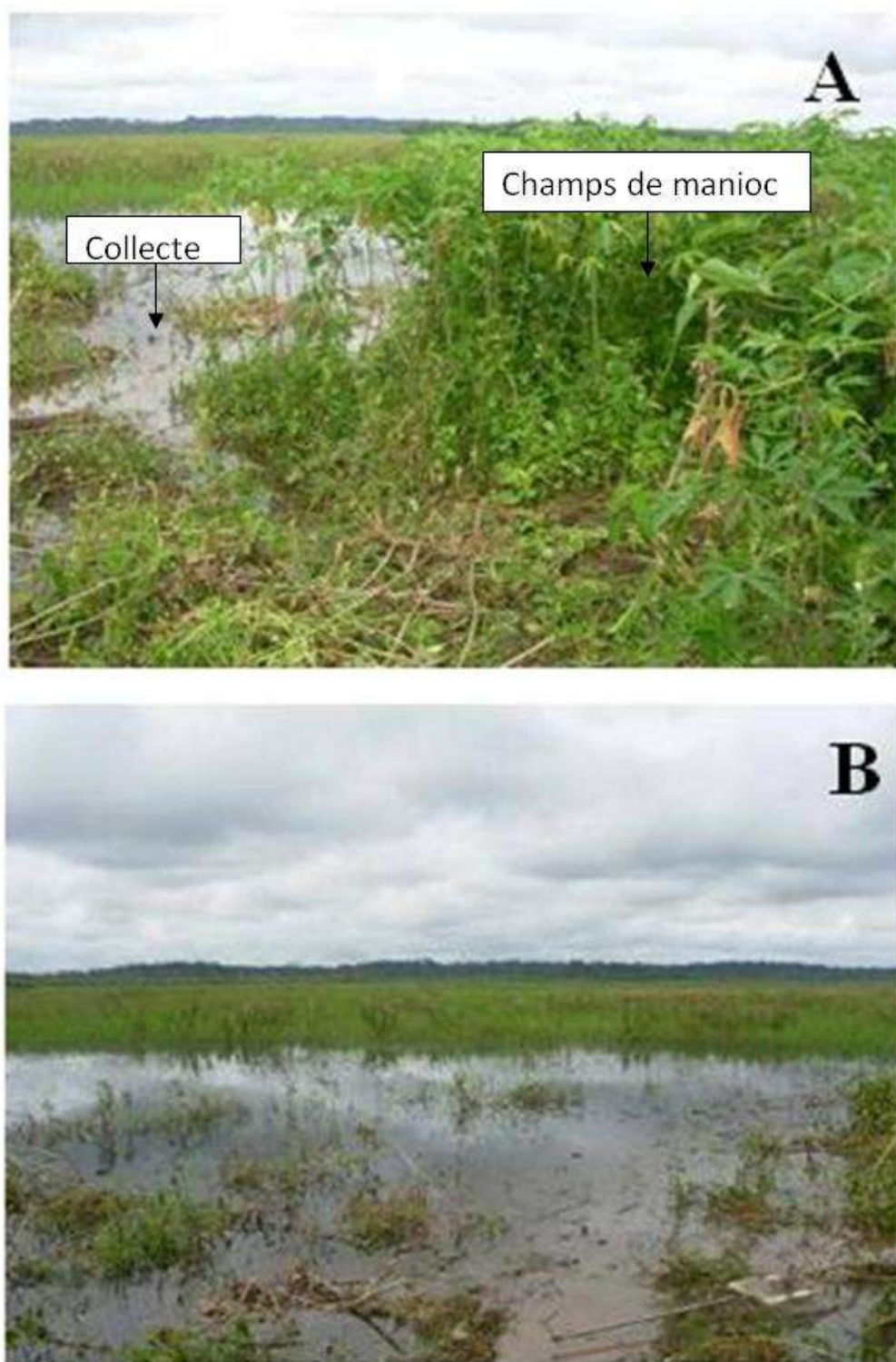


Fig. 26. Sites n°1 et n°2 sélectionnés à Akonolinga pour la capture de punaises d'eau. (A) Le site n°1 situé au bord d'un champ de manioc inondable pendant les saisons de pluie. (B) Le second situé à 20 m du premier, montre les premières végétations aquatiques.

Les sites n°3 et n°4 situés de part et d'autre du lit du fleuve, ont été choisis en pleine eau, en raison de leur richesse en végétation et de leur accessibilité en pirogue (Fig. 27 A et B). Dans ces deux sites, on retrouve des fougères, des roseaux, des nénuphars, et des débris de végétations y sont abondants. Les activités humaines qui y sont rencontrées sont la pêche traditionnelle, le transport de vivres et de bois, et le transport de la population d'un village à un autre.



Fig. 27. Sites n°3 et n°4 sélectionnés à Akonolinga pour la capture de punaises d'eau. (A et B)

Les deux sites ont été sélectionnés en plein fleuve dans les zones envahies par une végétation dense et accessibles en pirogue.

Le cinquième site a été choisi dans un lac aménagé pour l'élevage des poissons (Fig. 28 A) et le sixième site sur les berges d'une rivière (Fig. 28 B).



Fig. 28. Sites n°5 et n°6 sélectionnés à Akonolinga pour la capture de punaises d'eau. (A) le site n°5 est situé dans un lac aménagé pour l'élevage des poissons. (B) le sixième lieu de capture est situé sur les berges d'une rivière.

Ces deux derniers sites étaient les plus fréquentés, car situés pas loin des habitations. Le site n°6 aménagé à proximité d'un lac par un citadin, était un lieu privé.

III-1-2 Méthode de capture et échantillonnage

Les punaises ont été capturées en poussant une époussette en dessous de la surface de l'eau notamment au niveau de la vase et des racines des plantes aquatiques. Cette époussette confectionnée au Cameroun par des artisans locaux, ferronnier et cordonnier, avait les dimension suivantes:

- cadre : 30X30 cm
- profondeur du filet : 48cm
- longueur du manche : 108cm
- maille du filet carrée : 0,2cm

Certains spécimens capturés ont été maintenus vivants dans l'eau grâce aux pompes à oxygène (Fig. 29) jusqu'à leur installation en aquarium. Afin de mettre en évidence les variations journalières des punaises aquatiques, plusieurs échantillons ont été constitués. Un échantillon était représenté par l'ensemble des punaises mis dans un tube contenant 70% d'éthanol, collectées à la suite de 10 coups consécutifs d'époussette (Fig. 29). A chacun des tubes, il a été attribué un numéro reporté sur une fiche de prélèvement comportant toutes les données physico-chimiques mesurées et les observations (Annexe 4). La collecte était réalisée durant 3 jours consécutifs, du lever au coucher du soleil sur les sites 1 à 4.



Fig. 29. Dispositif de capture et de conservation des punaises d'eau.

III-1-3 Identification et dénombrement

La description des punaises d'eau a été réalisée au laboratoire après dissection de l'insecte sous une loupe binoculaire et à l'aide de critères définis par la clé de détermination des familles (Tableau 6). Différentes familles de punaises ont ainsi été repertoriées, il s'agissait notamment de Naucoridae, Belostomatidae, Nepidae, Notonectidae, Corixidae et Gerridae. Après description, les spécimens représentant chacune des familles ont été dénombrés afin de déterminer la variation de leur population au cours des saisons.

	Description		Familles
1	Antennes très courtes et invisibles en vue dorsale ; insectes aquatiques	2	
1'	Antennes développées et bien visibles en vue dorsale ; insectes terrestres ou vivant à la surface de l'eau	8	
2(1)	Ocelles présents ; insectes ripicoles ; taille inférieure à 10 mm	3	
2'	Ocelles absents ; insectes aquatiques	4	
3(2)	Antennes cachées ; patte antérieure ravisseuse ; yeux saillants ; rostre court, masqué par le fémur antérieur		Gelastocoridae
3'	Antennes visibles ; patte antérieure normale ; yeux non saillants : rostre long atteignant la hanche postérieure		Ochteridae
4	Tarse antérieur formé d'un seul article modifié en spatule et frangé de longs cils ; rostre très court et apparemment non segmenté		Corixidae
4'	Tarse antérieur différent et plurisegmenté		Hydrometridae
5(4')	Patte antérieure ravisseuse, le fémur épaissi, tarse postérieur muni de griffes ; corps comprimé dorso-ventralement punaise nageant sur le ventre	6	Hebridae
5'	Patte antérieure différente, non ravisseuse ; tarse postérieur dépourvu de griffes ; corps fortement convexe dorsalement ; punaises nageant sur le dos.		Notonectidae
6	Membrane dépourvue de nervures		Naucoridae
6'	Nervures présentes sur la membrane ; taille supérieure à 20 mm	7	
7(6')	Tarses formés d'un seul article ; présence d'un long siphon respiratoire.		Nepidae
7'	Tarses formés de deux articles ; présence siphon respiratoire très court, rétractile ; pattes postérieures modifiées en palettes natatoires.		Belostomatidae
8	Œil composé présent	9	
9 (8)	Corps présentant ventralement une pubescence dense et soyeuse ; insectes vivant à la surface de l'eau.	10	
9'	Surface ventrale du corps non pubescente	14	
10(9)	Griffes insérées avant l'apex du tarse	11	
10'	Griffes insérées à l'apex du tarse	12	
11	Hanches médianes plus proches des postérieures que des antérieures ; tarses formés de 2 articles ; taille supérieure à 5mm		Gerridae
	Hanches médianes à égale distance des hanches antérieures et postérieures ; tarses formés de 1 à 3 articles ; 1,6- 5mm		Veliidae
12(10')	Tête très allongée ; œil éloigné de la marge antérieure du pronotum; corps et pattes allongés, fin	12	Hydrometridae
12'	Tête normale, bien moins allongée ; œil rapproché de la marge antérieure du pronotum ; membrane sans nervure distincte	13	
13(12')	Antenne formée de 5 articles, les 2 premiers renflés ; taille inférieure à 3 mm		Hebridae
13'	Antenne formée de 4 articles		Mesoveliidae

Tableau 6. Clé de détermination des familles de punaises aquatiques (39, 196).

III-2 Résultats 1 : description des familles de punaises d'eau

III-2-1 Les Naucoridae

Les Naucoridae capturés dans le fleuve Nyong mesurent entre 8 et 10 mm de longueur sur 3 à 5 mm de largeur ; ils ont une forme ovale, convexe sur la face dorsale, atténuée en arrière (Fig. 30). Ils sont de couleur brun foncé à noire avec une nuance beaucoup plus claire allant vers le jaune de la partie antérieure du pronotum vers la tête. La portion postérieure du pronotum, l'écusson ainsi que les hémélytres sont d'un noir terne assez uniforme. L'écusson relativement large et triangulaire (Fig. 30 A et B). Les segments abdominaux présentent une symétrie bien matérialisée sur le dernier segment par une sorte de suture (Fig. 30 B1).

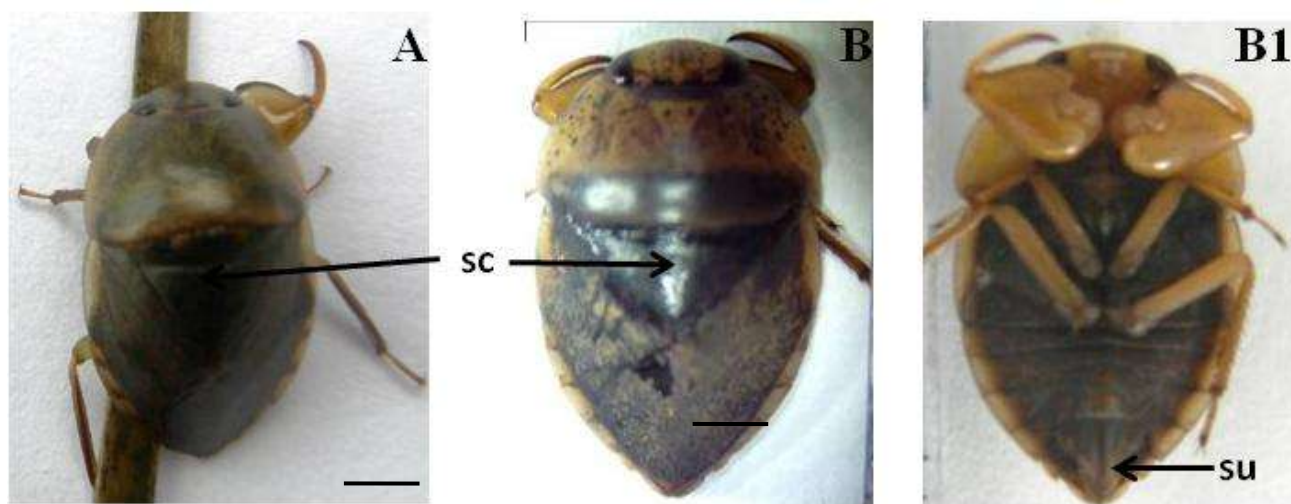


Fig. 30. Spécimens de Naucoridae capturés au Cameroun. Vues dorsales (A et B) et ventrale (B1). Leur taille varie entre 8 et 10 mm. Le scutellum ou écusson (sc) est large et triangulaire. On note sur la face ventrale, une suture (su) marquant la symétrie des segments abdominaux . Barre: 1 mm.

Les yeux sont disposés dans la continuité des marges du pronotum. Ce dernier est relativement grand, avec environ 3 mm de longueur sur 6 mm de largeur. La surface de sa portion

antérieure est recouverte de nombreux points noirs tout comme le vertex (Fig. 31 A). Le rostre constitué de trois articles est court et protégé par le labre (Fig. 31 B). Les antennes cachées sous les yeux sont constituées de 3 articles (Fig. 31 C).

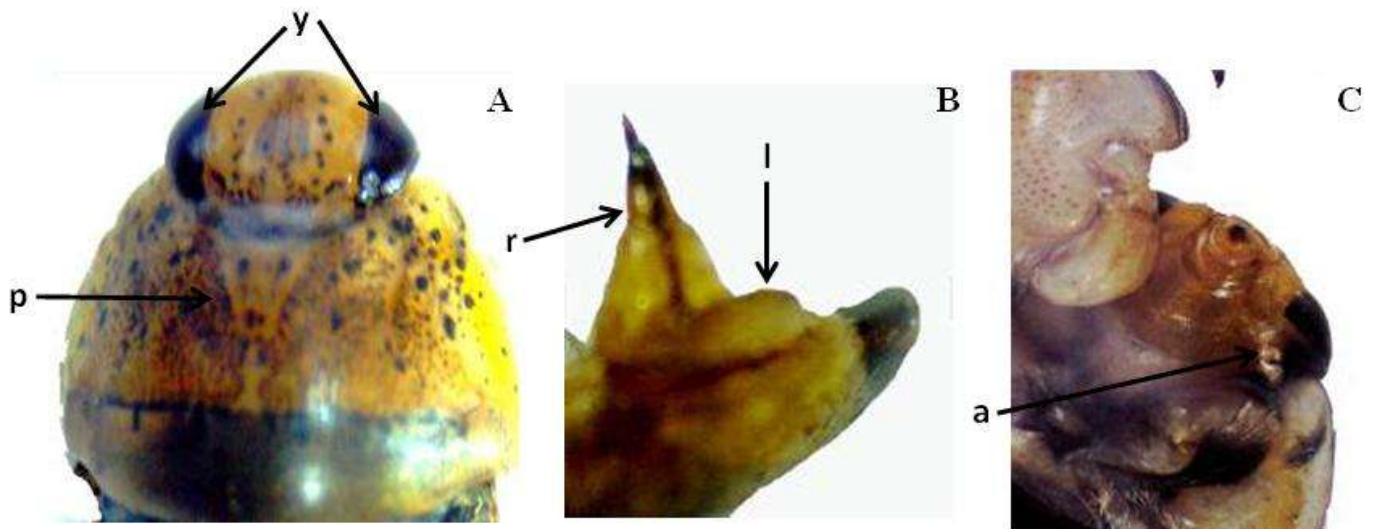


Fig. 31. Description de la tête d'un Naucoridae. (A) La tête et la partie antérieure du pronotum (p) de couleur jaunâtre sont mouchetées de points sombres, les yeux (y) sont situés dans la continuité des marges du pronotum. (B) Le labre (l) protège le rostre (r) qui est constitué de trois articles. (C) Les antennes cachées sous les yeux, constituées de trois articles, ne sont visibles qu'en vue ventrale.

Les fémurs antérieurs sont dilatés, piquetés de petits points sombres, frangés de petites soies sur le bord ventral et avec une nette protubérance sur la portion postérieure (Fig. 32 A). Ces soies sont également présentes sur les tibias antérieurs, elles sont robustes et disposées de façon régulière sur toute leur longueur. Les tarses antérieures sont uniarticulés et se terminent par une griffe (Fig. 32 A). Au niveau des pattes intermédiaires et postérieures, les fémurs sont plus fins, les tibias portent des poils rigides jouant le rôle de rame, ce qui permet à l'insecte de se déplacer facilement. Les tarses sont biarticulés et bionguiculés (Fig. 32 B). La limite du clavus (la commissure clavale) des hémélytres n'est pas toujours nette. Les membranes des hémélytres sont

dépourvues de nervures contrairement à l'aile postérieure dont les nervures sont bien marquées (Fig. 32 C).

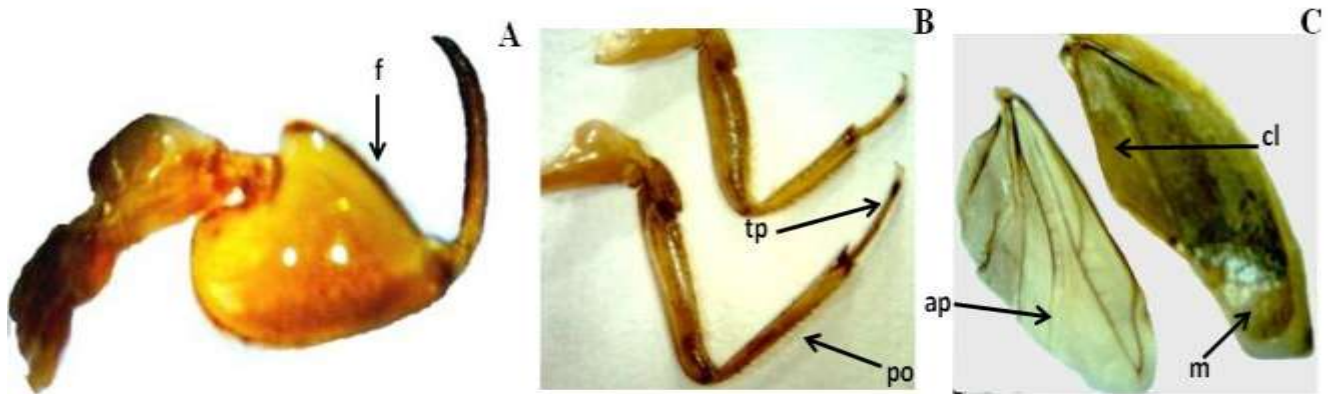


Fig. 32. Pattes et ailes de Naucoridae. (A) Les fémurs antérieurs sont dilatés avec une protubérance sur la portion postérieure; le bord ventral est frangé de petites soies (f). (B) Les tibias des pattes intermédiaires et postérieures portent des poils rigides (po), les tarses sont biarticulés et biongulés (tp). (C) La membrane de l'hémélytre (m) est dépourvue de nervures contrairement à l'aile postérieure dont les nervures sont bien marquées (ap).

III-2-2 Les Belostomatidae

Les punaises appartenant à la famille des Belostomatidae sont caractérisées par la présence sur le prolongement du huitième segment abdominal, de deux courts appendices rétractiles qui, réunis, forment un court siphon respiratoire (Fig. 23 B). Des spécimens différents ont été collectés dans les eaux du Nyong (Fig. 33). En dehors des particularités liées à la taille qui détermine entre autres les genres *Belostoma*, *Diplonychus* et *Lethocerus* auxquels appartiennent les différents spécimens capturés, les caractères morphologiques sont quasiment identiques. Les Belostomatidae sont des punaises d'eau dont la taille varie entre 11 et 70 mm. Leur corps brun clair à brun foncé tendant vers le noir chez certaines espèces, a une forme allongée elliptique ou ovoïde. Il est aplati sur la face dorsale avec un léger renflement ventral, bien visible chez la punaise géante. La tête en

général conique porte de grands yeux dont la forme évoque des triangles équilatéraux, tout comme l'écusson. Le prothorax est trapézoïdal, légèrement échancré en avant à l'endroit où s'insère la tête. Il est sillonné en travers, sur le tiers basal. Sur l'un des spécimens collectés, le prothorax forme un angle d'environ 40° avec le reste du corps lorsque l'insecte est mis complètement à plat (Fig. 33).



Fig. 33. Spécimens de Belostomatidae capturés au Cameroun. Leur taille varie entre 11 et 70 mm. L'un des spécimens est caractéristique par un angle d'environ 40° formé par son prothorax avec le reste de son corps (flèche).

Le rostre robuste notamment chez la punaise géante, est constitué de trois articles, le deuxième étant beaucoup plus long que les deux autres (Fig. 34 A-C). Les antennes courtes et cachées sous les yeux sont en général quadriarticulées. Lorsqu'elles sont déployées, on observe des projections latérales sur les deux derniers segments (Fig. 34 D).

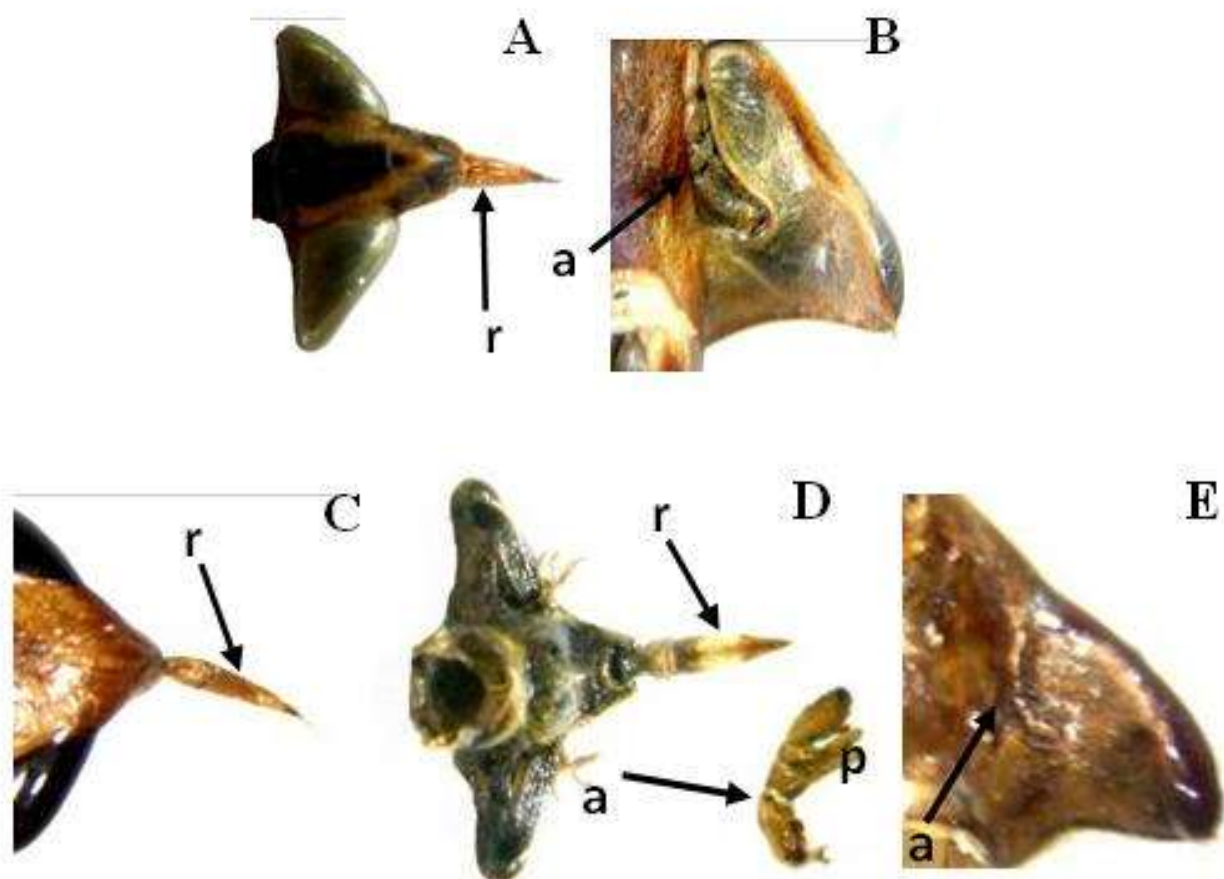


Fig. 34. Têtes de Belostomatidae : Vues dorsale (A et C) et ventrale (B, D et E). Le rostre (r) est constitué de trois articles, le deuxième est plus long que les deux autres, que ce soit chez le *Lethocerus* (A) ou les Bélostones de taille plus petite (C et D). Les antennes (a) cachées sous les yeux, sont constituées de quatre articles (B, D et E) avec des projections latérales sur les deuxième et troisième articles (p).

Le clavus des hémélytres est en général bien visible chez toutes les espèces; leur membrane est réticulée (Fig. 35 A). les fémurs antérieurs sont plus dilatés que ceux des pattes intermédiaires et postérieures. Recouverts de petites soies tranchantes, ils forment avec les tibias antérieurs plus fins, des organes de préhension redoutable pour les proies passant à proximité. Les tarsi sont biarticulés et terminés par une ou deux griffes sur les pattes antérieures (Fig. 35 B) et de deux griffes au niveau des pattes intermédiaires et postérieures. Ces dernières sont frangées de

longs poils. Sur leur face ventrale les segments abdominaux sont divisés de manière symétrique par une suture bien visible (Fig. 35 C).

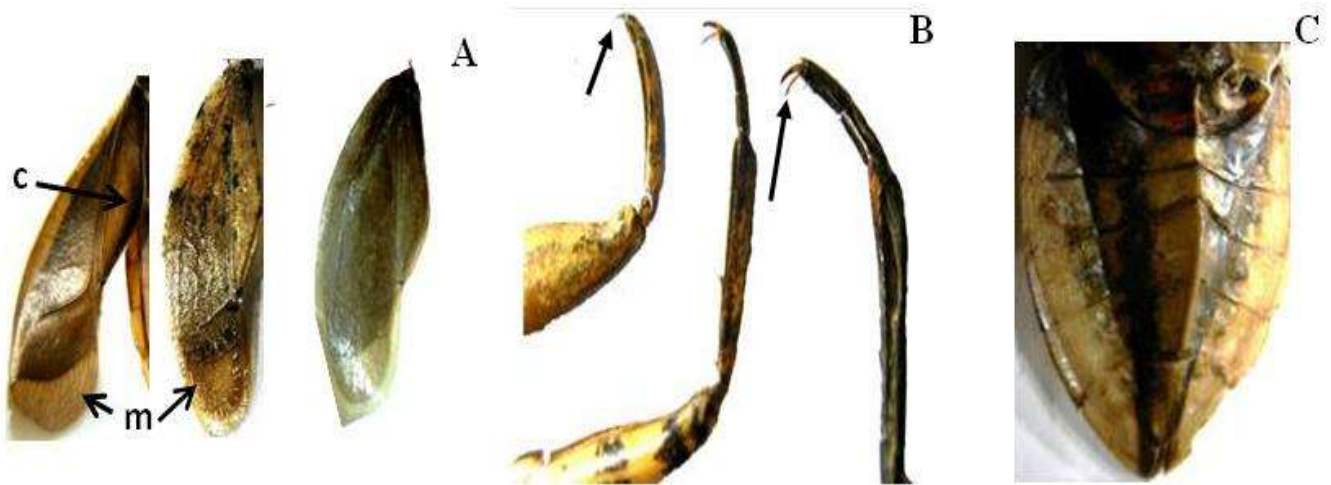


Fig. 35. Hémélytres, pattes et abdomen de Belostomatidae. (A) Le clavus (c) est bien délimité et la membrane (m) est réticulée, la réticulation est différente selon les espèces. (B) Les tarse sont biarticulés, uniongulés au niveau des pattes antérieures (flèche) et biongulés au niveau des pattes postérieures (flèche). (C) Les segments abdominaux sont symétriquement divisés par une sorte de suture bien marquée.

III-2-3 Les Nepidae

Encore appelés scorpions d'eau, les Nepidae sont caractérisés par la présence d'un long siphon respiratoire constitué de deux filaments soudés à la base l'un à l'autre et situé à l'extrémité postérieure de l'abdomen (Fig. 36). Malgré leur appartenance à la même famille, ils présentent en fonction des genres des morphologies complètement différentes. Ainsi, le corps des nèpes (*Nepa*), d'un brun uniforme à noir, se présente sous une forme ovoïde, plus ou moins allongée et aplatie, ce qui leur donne un aspect de feuille morte (Fig. 36 A). Le corps des ranatres (*Ranatra*) quant à lui est tubulaire, très effilé semblable à des brindilles (Fig. 36 B), d'où le fait qu'elles soient

difficiles à distinguer dans la végétation. Les Nepidae adultes peuvent mesurer jusqu'à 50 mm sans leur siphon respiratoire.



Fig. 36. Spécimens de Nepidae capturés au Cameroun. (A et B) Les Nèpes et les Ranatres.

Leur taille peut aller jusqu'à 50 mm sans le siphon respiratoire. Barre: 1,5 cm

La tête des Nèpes porte un rostre court et de grands yeux saillants (Fig. 37 A); elle est plus petite chez les Ranatres. Les antennes dissimulées sous les yeux sont triarticulées, le troisième article présentant une projection latérale (Fig. 37 B). Le prothorax est allongé notamment chez la

Ranatre, l'écusson est triangulaire et de petite taille. Le déploiement de leurs ailes révèle un abdomen rouge orangé.

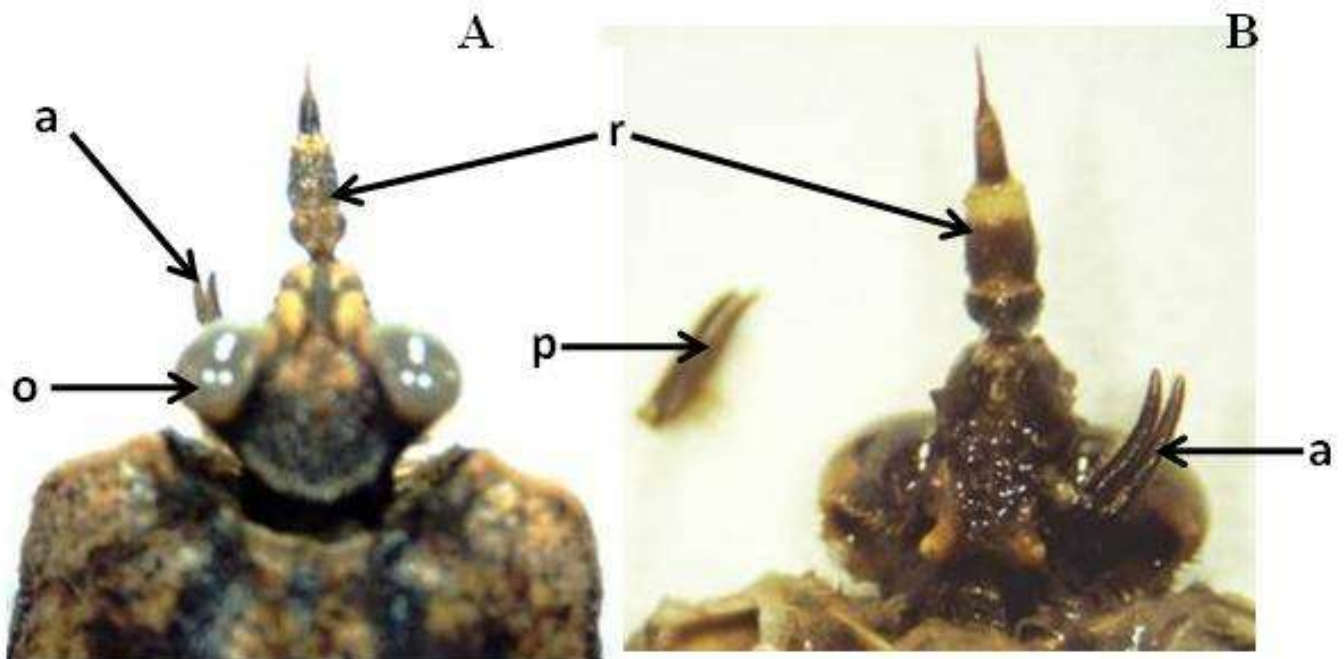


Fig. 37. Tête d'un Nepidae : Vues dorsale (A) et ventrale (B). Le rostre (r) est constitué de trois articles. Les antennes (a) cachées sous les yeux, sont constituées de trois articles avec une projection latérale sur le troisième (p).

Sur la face ventrale de l'abdomen des ranatres notamment, on peut observer au niveau des bords latéraux des segments abdominaux des orifices respiratoires (Fig. 23 A). Les membranes sont réticulées. Les Nepidae ont de très grandes pattes quasiment dépourvues de poils natatoires. Les tarsi des ranatres sont plus longs que ceux des nèpes. Les tarsi de Nepidae sont constitués d'un seul article et se terminent par une griffe au niveau des pattes antérieures et par deux griffes au niveau de pattes intermédiaires et postérieures (Fig. 38).

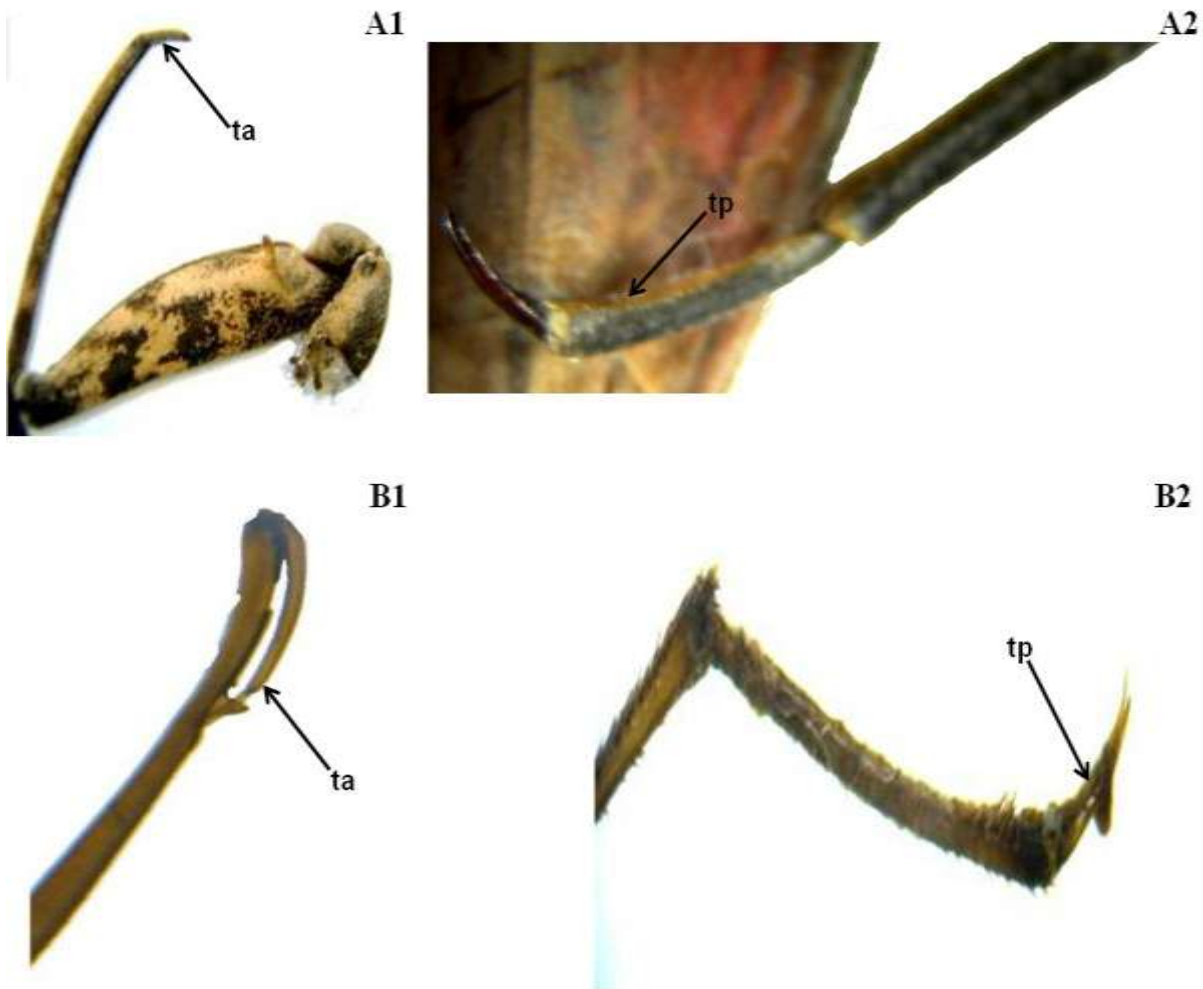


Fig. 38. Tarses de Nèpe (A1 et A2) et de Ranatre (B1 et B2). Les tarses antérieurs (ta) sont uniongulés, tandis que les tarses postérieurs (tp) se terminent par deux griffes.

III-2-4 Les Notonectidae

De toutes les punaises collectées dans les eaux du Nyong, celles appartenant à la famille des Notonectidae présentaient des caractères distinctifs des différents spécimens les plus remarquables (Fig. 39). Les Notonectes sont des petites punaises de 5 à 12 mm de long. Elles se déplacent très rapidement dans l'eau, mais sont incapables de se déplacer en dehors.

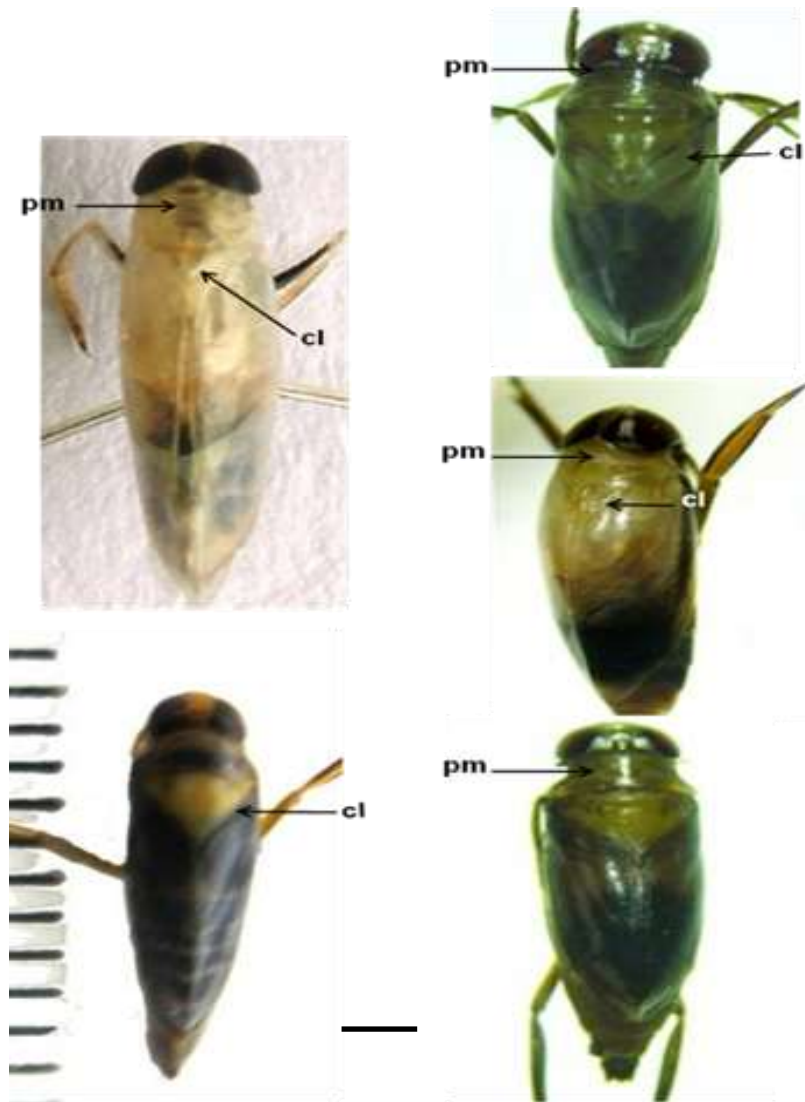


Fig. 39. Spécimens de Notonectidae capturés dans les eaux du fleuve Nyong. Elles sont de petite taille, fusiformes et concaves sur la face dorsale. L'aspect des commissures clavales (cl) et du pronotum (pm) diffère en fonction des espèces. Barre : 1 mm.

Elles ont la particularité de nager sur le dos et sont en général fusiformes, avec une face dorsale convexe, claire et une face ventrale concave sombre. La forme de la partie dorsale du prothorax (pronotum) diffère en fonction des espèces (Fig. 39). Les hémélytres sont translucides et ne recouvrent pas la totalité de l'abdomen. Leur membrane est dépourvue de nervures. Les commissures clavales sont plus ou moins larges et délimitées en fonction des espèces (Fig. 39). Il

s'agit d'un des caractères distinctifs des deux sous-familles constitutives de la famille des Notonectidae : *Notonectinae* et les *Anisopinae* (161).

Leur petite tête porte de grands yeux composés (Fig. 40 A-C) et un rostre piqueur-suceur constitué de quatre articles (Fig. 40 C). La douleur provoquée par la piqûre des Notonectes est légère et de courte durée. Les antennes sont partiellement dissimulées sous la dépression des yeux, en face ventrale et sont constituées de deux ou trois articles selon les spécimens (Fig. 40 A et B).

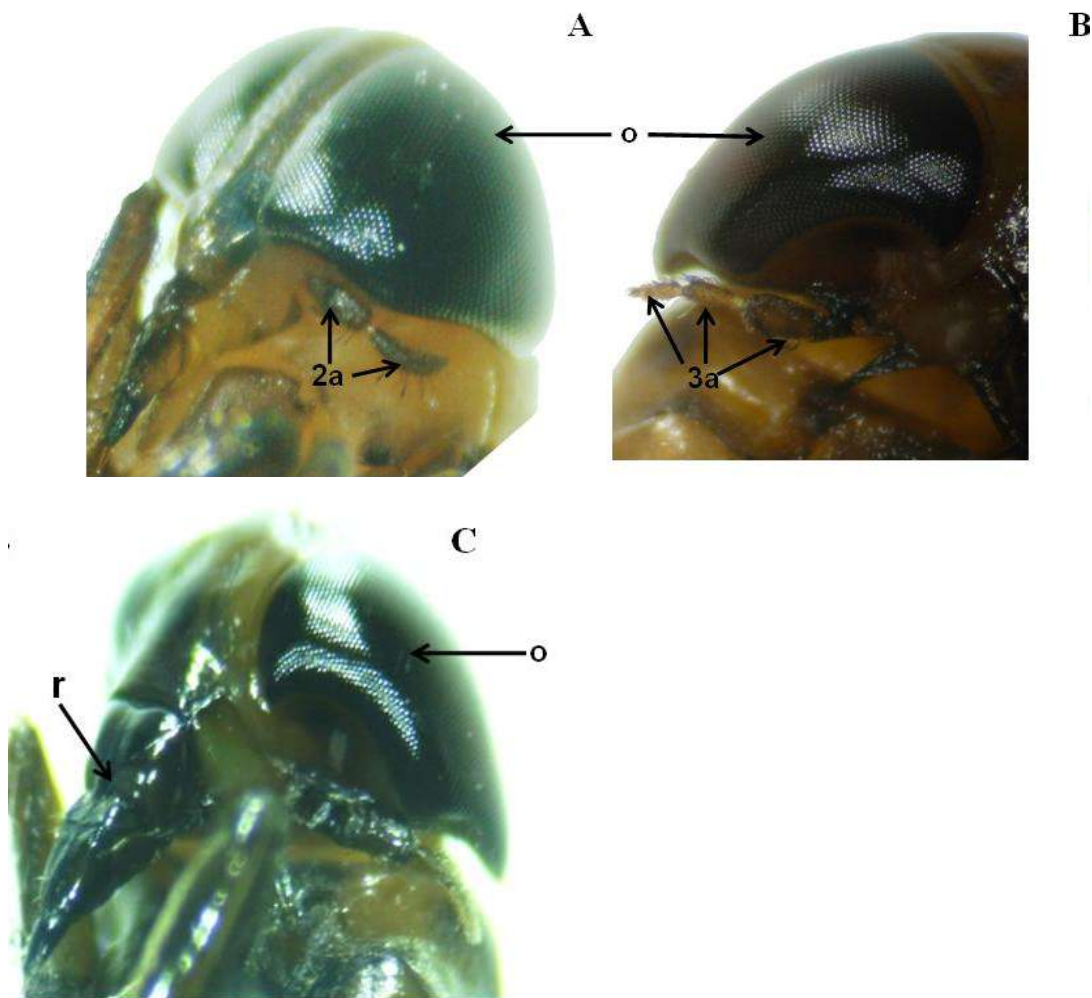


Fig. 40. Têtes de Notonectidae : Vues ventrale (A) et de profil (B et C). On note de grands yeux composés (o). Les antennes partiellement cachées sous les yeux sont constituées de deux (2a) ou trois (3a) articles selon les espèces. Le rostre (r) est constitué de quatre articles.

Leurs pattes antérieures et intermédiaires adaptées à la préhension présentent des tarses avec un ou deux articles terminés par une ou deux griffes en fonction des spécimens (Fig. 41). Les pattes postérieures présentent sur leur tibia et leurs tarses des poils plus ou moins longs suivant des spécimens collectés (Fig. 41).

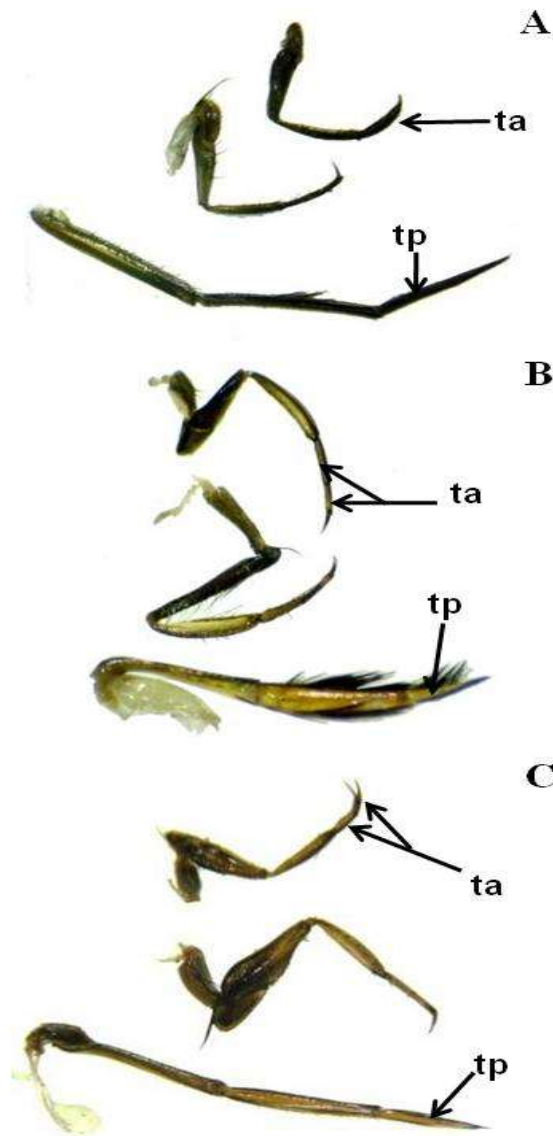


Fig. 41. Pattes antérieures, intermédiaires et postérieures de trois espèces de Notonectidae.

Les tarses antérieurs (ta) constitués de un (A) ou deux articles (B et C), sont terminés par une (A et B) ou deux griffes (C). (A-C) Les tibias et les tarses postérieurs (tp) portent des poils plus ou moins longs suivant les espèces.

III-2-5 Les Corixidae

Il s'agit de punaises dont la taille est inférieure à 10 mm. Elles se caractérisent par une coloration noirâtre de leur face dorsale concave (Fig. 42 A). La tête porte des antennes courtes, invisibles en vue dorsale, de larges yeux, un rostre triangulaire (Fig. 42 B), non segmenté et non mobile. Le pronotum et les hémélytres sont caractérisés par la présence de striations transverses. Les tarses antérieurs unisegmentés et frangés de longs poils hydrofuges (Fig. 42 C), sont transformés en palette natatoire. Les pattes intermédiaires et postérieures sont allongées.

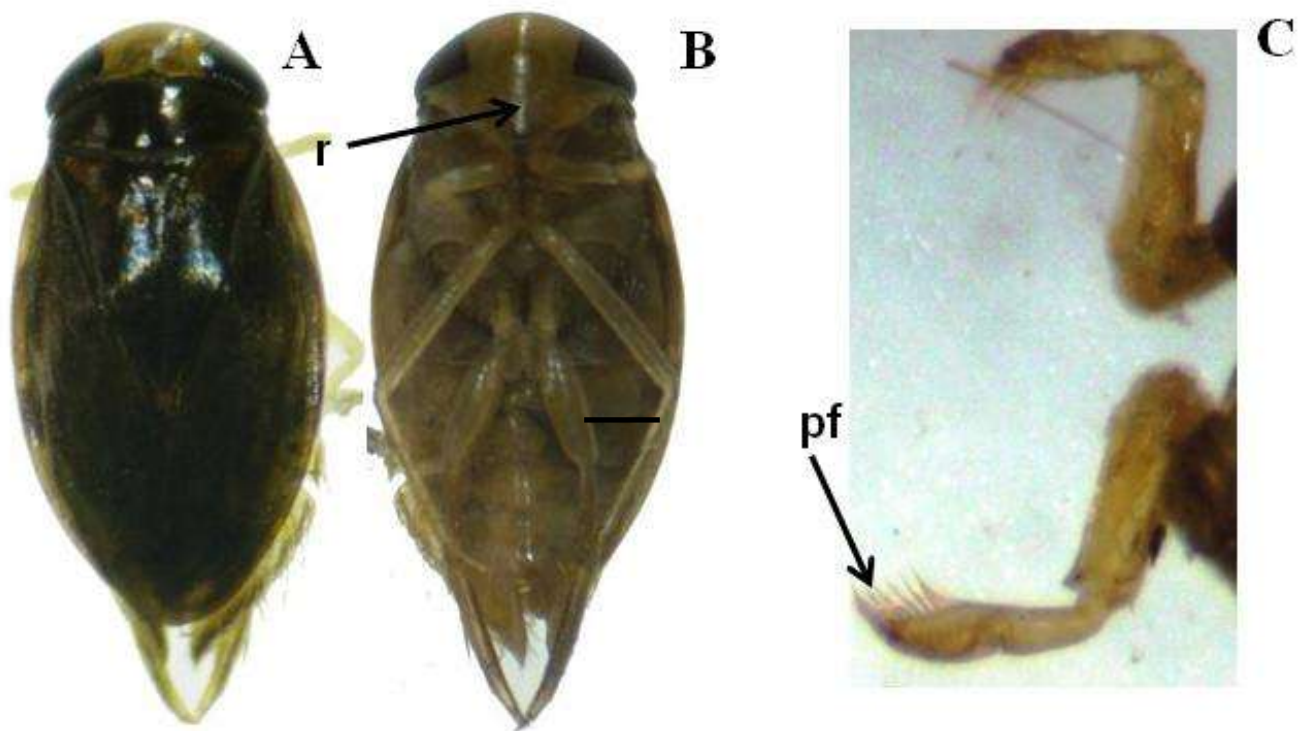


Fig. 42. Morphologie d'une Corixidae : Vues dorsale (A) et ventrale (B). Le rostre (r) est triangulaire. (C) Sur les pattes antérieures, les tarses transformés en palettes natatoires portent une rangée de poils hydrofuges (pf). Barre : 1 mm

III-2-6 Les Gerridae

Elles patinent sur l'eau ou sautent lorsqu'elles sont sur un support dur, se déplaçant ainsi avec une grande vitesse. Elles se caractérisent par la présence de longues pattes avec des fémurs intermédiaires et postérieurs dépassant nettement l'abdomen. Un seul spécimen a été collecté dans les eaux du fleuve Nyong (Fig. 43). La tête de ce dernier porte de grands yeux ronds, des antennes quadriarticulées bien visibles et un long rostre également constitué de quatre articles. Le pronotum d'un noir luisant recouvre un peu plus du tiers du corps de l'insecte. Les ailes sont peu développées, ce qui laisse apparaître un abdomen recouvert de courts poils notamment sur la face ventrale.

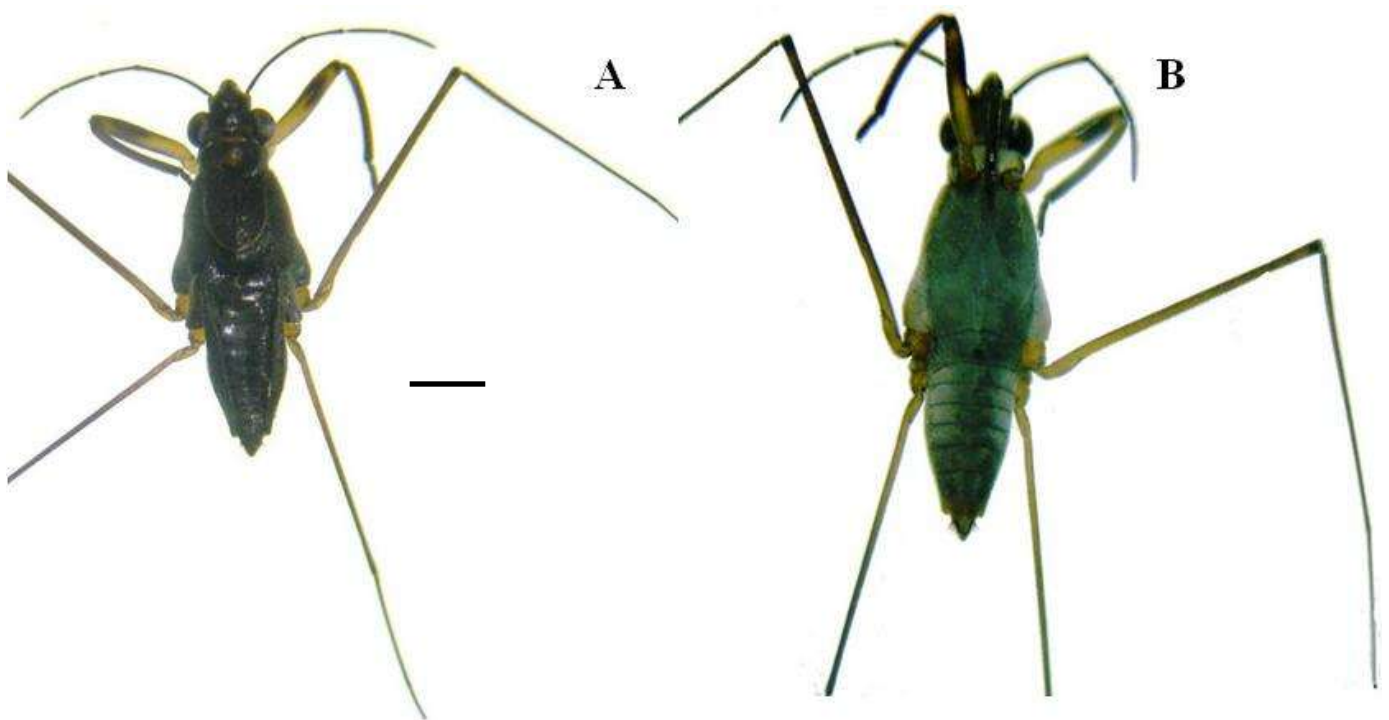


Fig. 43. Vues dorsale (A) et ventrale (B) d'une Gerridae capturée dans les eaux du fleuve Nyong. Barre : 1,5 mm

III-3 Discussion et perspectives

La description ci-dessus des différents spécimens de punaises d'eau capturées à Akonolinga au Cameroun, nous a permis de les classer jusqu'au niveau de la famille. En effet, dans la systématique des hétéroptères publiée par Randall Schuh, dont nous nous sommes inspirés, les punaises d'eau sont réparties en un plus d'une dizaine de familles (161). Les genres n'étant pas tous connus avec précision, encore moins les différentes espèces qu'ils comprennent, les clés actuelles d'identification des punaises d'eau se limitent en général à la description de la famille (Tableau 6). Ce manque d'information sur l'inventaire et la systématique des punaises aquatiques est particulièrement crucial pour ce qui est des espèces des régions africaines. Aux Etats-Unis, au Canada, en Australie et au Brésil notamment, des clés taxonomiques partielles ont été établies et permettent d'identifier jusqu'au niveau de l'espèce, des punaises d'eau des régions d'Amérique et du Pacifique (8, 17, 125, 166). Bien que la connaissance de la famille d'un insecte soit un atout très important de son identification, elle reste basée sur des critères généraux tels que la morphologie générale et/ou la présence de caractères saillants chez certains spécimens au sein d'un groupe. De ce fait, elle est moins informative que l'identification de l'espèce sur le cycle de vie, la biologie et l'écologie d'un insecte. L'identification des insectes jusqu'au niveau de l'espèce est primordiale notamment pour ceux qui sont des vecteurs de maladie. C'est le cas par exemple pour les moustiques. En effet, bien qu'appartenant tous à la famille des *Culicidae*, seules les anophèles femelles sont hôtes et vectrices du paludisme. Et d'autre part, toutes les espèces de culex ne sont pas impliquées dans la transmission de la filariose lymphatique. Chez les hétéroptères, on a noté dans le cas de la famille des *Reduviidae* que ce sont principalement certaines espèces appartenant aux genres *Triatoma* et *Rhodnius*, qui transmettent *Trypanosoma cruzi*, microorganisme responsable de la maladie de Chagas. De même, des espèces appartenant au même genre peuvent avoir des cycles de vie et des exigences environnementales différentes, avec un impact sur l'homme. Il est donc essentiel de pouvoir identifier l'espèce à laquelle appartient un

insecte vecteur, de connaître sa biologie ainsi que son écologie. Cette exigence contribuerait de manière importante à la mise en place de mesures efficaces de surveillance et de contrôle d'une maladie à transmission vectorielle. Les résultats obtenus ci-dessus, ne nous ont pas permis d'identifier les espèces des différents spécimens capturés. Toutefois il s'agit là de premiers résultats qui donnent un aperçu des caractères morphologiques des différentes punaises d'eau rencontrées dans une zone endémique à l'ulcère de Buruli. Par ailleurs, cette description s'inscrit dans la perspective plus large de la détermination en collaboration avec un entomologiste de l'Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire d'une clé d'identification des espèces des punaises d'eau africaine.

III-4 Résultats 2 : Variation saisonnière des punaises d'eau

III-4-1 Evolution du niveau des eaux sur les sites de capture

La vallée du Nyong est située à 650 m d'altitude. Son climat subéquatorial appartient au même groupe que celui de Yaoundé avec 4 saisons : 2 saisons de pluies et 2 saisons sèches. La petite (mars à mai) et la grande saison des pluies (septembre à novembre) sont séparées par une courte saison plus sèche (juin à aout), la grande saison sèche s'étendant de décembre à février (Fig. 44).

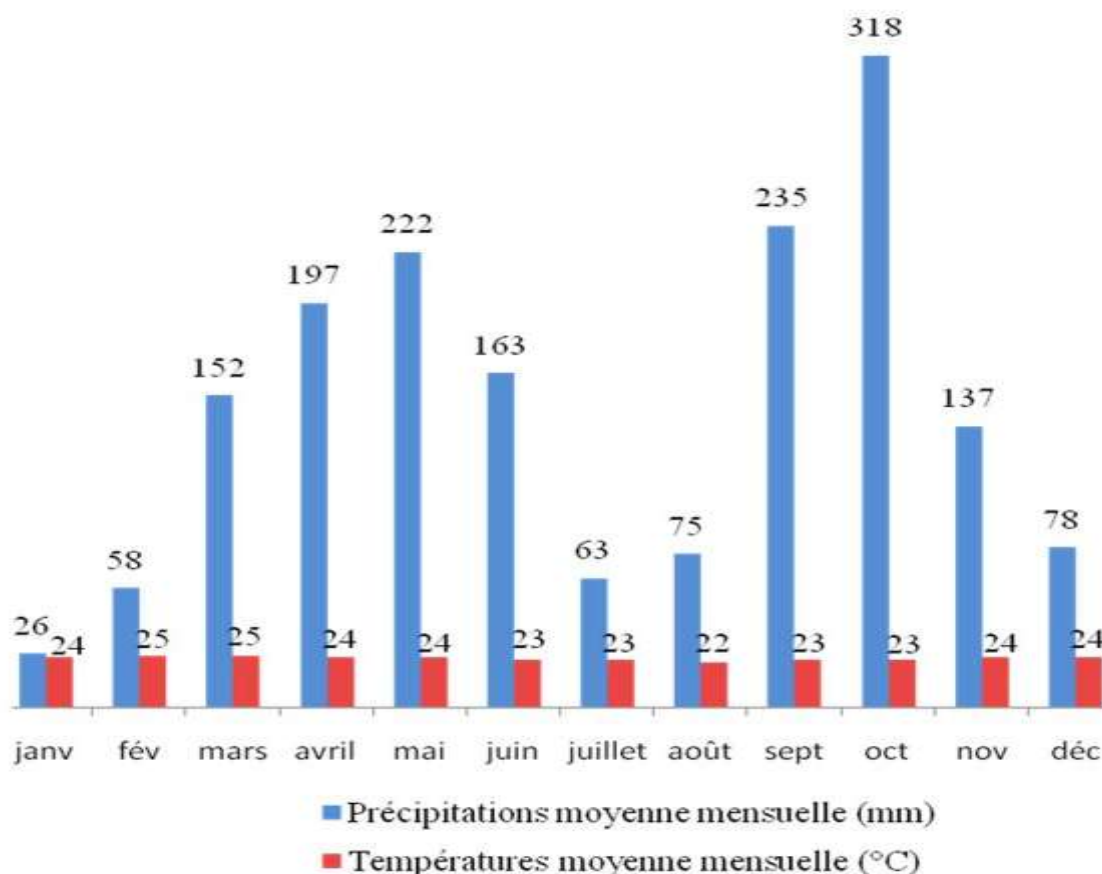


Fig. 44. Moyennes mensuelles de la pluviométrie et des températures de la ville de Yaoundé en 2006. (Source Ministère des transports /Direction de la Météorologie/Cameroun).

Les pluviométries annuelles sont comprises entre 1.500 et 2.000 mm, la température moyenne annuelle est de l'ordre de 24°C et une humidité relative de 83%. Pendant la grande saison des pluies, il tombe environ 40 % des précipitations annuelles. Il pleut en moyenne 12 jours par mois avec un pic de 16 jours durant le mois d'octobre. Les températures les plus basses durant cette saison sont comprises entre 15 et 16°C, tandis que les plus élevées avoisinent les 32°C. Toutefois, par mois, on ne compte en moyenne que 4 jours durant lesquelles sont enregistrées des températures proches de 32°C. Au cours de la petite saison des pluies, on compte en moyenne 8 jours de précipitation par mois et des températures qui oscillent entre 15 et 32°C avec une moyenne mensuelle de 9 jours au cours desquels sont enregistrées des températures proches de 32°C. Durant la grande saison sèche, il tombe moins de 10% des précipitations annuelles, avec une moyenne de 3 jours de pluies par mois ; les températures sont comprises entre 12 et 33°C. Pendant la petite saison sèche, les températures sont relativement les mêmes que durant la grande saison sèche, mais il pleut deux fois plus.

A l'intérieur de cette vallée inondable, le lit du fleuve est très sinueux et varie de 3 à 6 km. Les écoulements sont très lents, la hauteur et la durée de la submersion varie avec la distance entre le fleuve et les rivières. La crue peut atteindre 3 mètres et durer plusieurs semaines. Le niveau des eaux des sites de capture en octobre et novembre était important. Il est descendu d'environ 3 mètres à partir du mois de décembre (Fig. 45). Les lieux de capture situés en plein fleuve étaient rendus difficiles d'accès par la pirogue au cours du mois de janvier à cause de l'abondance de la végétation.



Figure 45. Evolution du niveau des eaux sur le site n°1 entre la saison des pluies et la saison sèche. (A) Le champ de manioc inondé durant le mois de décembre. (B) Le même champ totalement asséché au mois de janvier.

III-4-2 Variation saisonnière de la population des punaises d'eau

Pour cette étude, les sites de capture n° 5 et n°6 ont été exclus du fait des désagréments liés au caractère privé du site n°5 (Fig. 28 A) et à la grande fréquentation du site n°6 (Fig. 28 B). Le site n°5 était cependant le seul lieu dans lequel ont été capturés les nêpes et quelques Naucoridae décrits ci-dessus. La capture et le dénombrement des punaises d'eau ont été constants sur les quatre autres sites et les résultats présentés ci-dessous ne prennent en compte que les punaises d'eau capturées sur ces derniers. Les sites en pleines eaux ont été rendus difficiles d'accès durant le mois de janvier (milieu de la saison sèche) du fait de l'abondance de la végétation. L'absence d'une famille au cours de la capture réalisée à un mois donné ne signifie pas qu'elle n'était pas présente sur le site. En effet, la faible densité de sa population au moment de la capture pourrait justifier le fait qu'elle ne se soit pas retrouvée dans l'échantillonnage. La variation mensuelle des punaises semble être différente d'une famille à une autre (Fig. 46). En effet, à l'exception des

Notonectidae dont la population augmente de manière importante durant le mois de janvier, le nombre de punaises des autres familles varie peu durant ces quatre premiers mois de l'étude (Fig. 46). C'est également durant ce mois que les familles des punaises d'eau semblent être les plus diversifiées.

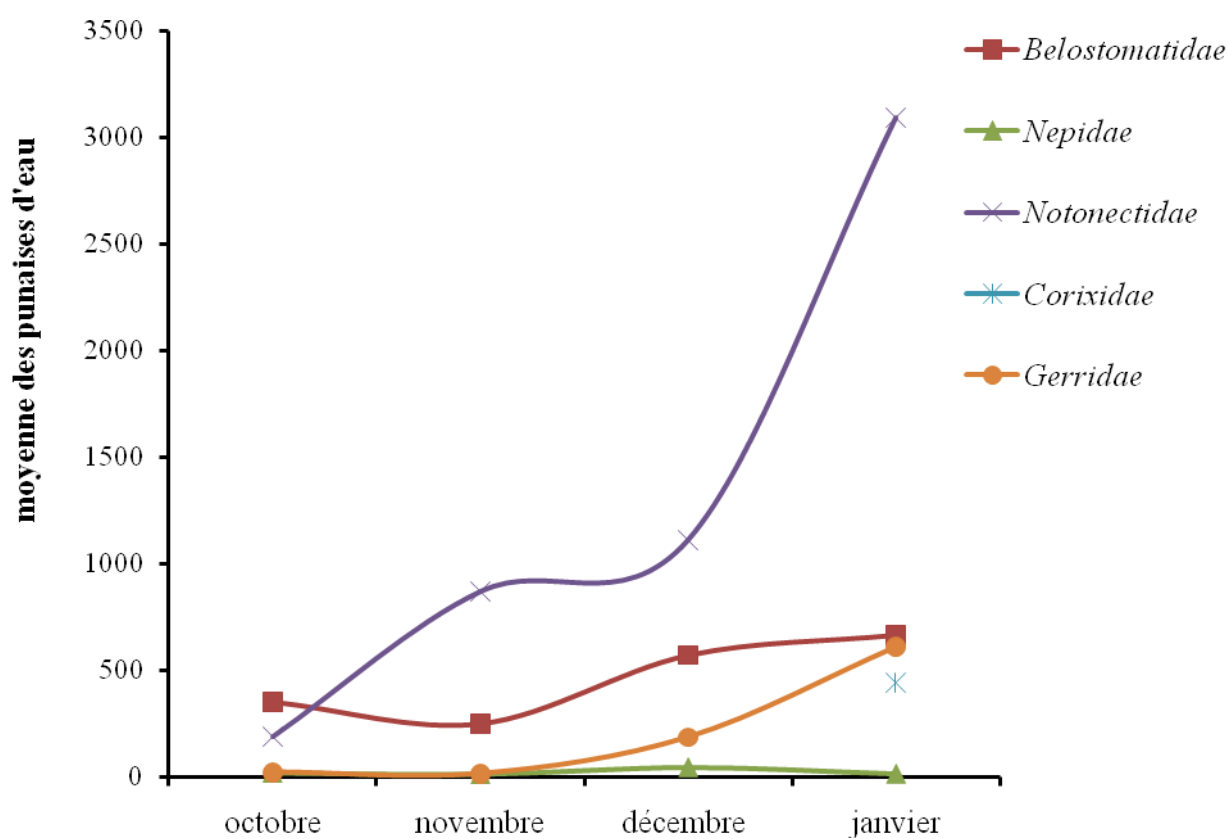


Fig. 46. Dynamique des punaises d'eau capturées d'octobre 2007 à janvier 2008 à Akonolinga.

III-5 Discussion et perspectives

Ces premiers résultats montrent la tendance d'une variation saisonnière des différentes familles des punaises d'eau dans une zone endémique à l'ulcère de Buruli. Durant le mois de janvier correspondant dans la région au milieu de la grande saison sèche, toutes les familles semblent être représentées en une densité élevée. Ceci suggère entre autres que les faibles précipitations et la baisse des eaux sont favorables à une concentration de ces insectes aquatiques, elles seraient alors plus visibles du fait de la baisse des eaux. Mais aussi que le mois de janvier pourrait être consécutif à la période de reproduction des punaises. Cette étude réalisée en collaboration avec Estelle Marion, va être poursuivie par cette dernière. Elle rapportera d'une part les variations saisonnières, mensuelles et journalières pour chaque famille de punaises en corrélation avec les facteurs physico-chimiques des lieux de capture. D'autre part, elle aura pour but de mettre en évidence la colonisation par *M. ulcerans* des punaises d'eau dans cette zone d'endémie, à l'aide d'une technique sensible telle que la PCR en temps réel. Ceci aura pour but d'apporter des arguments supplémentaires en faveur du rôle des punaises d'eau dans la transmission de la bactérie. Une étude semblable est également en cours en Côte-d'Ivoire. Les résultats de ces deux études mis en commun permettront de mieux cerner les facteurs de risques environnementaux à la transmission de *M. ulcerans*; Ils contribueront ainsi à mieux sensibiliser les populations vis-à-vis de l'infection à *M. ulcerans* et ainsi à améliorer sa prévention.

B. Etude immuno-chimique des punaises d'eau

I. Introduction

L'une des questions clés sur l'infection à *M. ulcerans* à l'heure actuelle concerne le mode de transmission à l'homme, de la mycobactérie. D'après le modèle expérimental de l'infection chez la souris, on a montré que les punaises d'eau prédatrices pourraient être à la fois hôtes et vecteurs de *M. ulcerans* (100). L'ulcère de Buruli serait donc la seule mycobactériose humaine à transmission vectorielle. Dans plusieurs études sur les maladies dues à des micro-organismes transmis par des arthropodes-vecteurs telles que la leishmaniose, la borréliose et la maladie de Lyme, on a mis en évidence des interactions impliquant le système immunitaire de l'hôte et les constituants salivaires du vecteur. En effet, outre le fait que la salive du vecteur potentialise l'infectivité des microorganismes qu'elle véhicule, elle serait également capable d'induire ou de renforcer chez l'hôte une réponse immunitaire. Celle-ci pourrait le protéger des lésions dues à l'infection par les germes transmis. Ainsi, dans le cas de l'ulcère de Buruli, nous avons dans le chapitre trois démontré au cours d'une expérimentation chez la souris que l'exposition répétée de l'animal aux constituants salivaires de punaises d'eau de la famille des Naucoridae et des Belostomatidae induisaient chez ce dernier une réponse immunitaire qui le protégerait de l'apparition des lésions cutanées causées par *M. ulcerans* (99). D'autre part, nous avons observé que les sérums de Béninois indemnes de lésions dues à l'infection par la mycobactérie, contenaient des anticorps dirigés contre les constituants salivaires de punaises d'eau dont ceux se lient à la membrane de *M. ulcerans*. La présence de tels anticorps chez les sujets indemnes suggèraient fortement qu'ils seraient impliqués dans un processus immunologique qui protégerait l'homme du développement des lésions dues à la mycobactérie. D'après ces résultats, il existerait dans la salive de punaises d'eau des molécules qui, associées à un ou plusieurs constituants membranaires de la mycobactérie seraient pharmacologiquement et immunologiquement actives chez l'hôte. Leur caractérisation, du moins de l'une d'entre elles serait une avancée considérable

en ce qui concerne l'ulcère de Buruli. En effet, elles pourraient conduire au développement de biomarqueurs pertinents, mais également à la mise en évidence d'une cible vaccinale potentielle contre *M. ulcerans*.

Nous nous proposons ainsi, dans la continuité de l'étude réalisée au Bénin, de caractériser de manière plus spécifique la signature immunologiques des punaises d'eau chez les sujets exposés à leurs piqûres en zone endémique camerounaise, mais aussi d'identifier les constituants salivaire immunogènes dont ceux se liant à la membrane de la mycobactérie.

La méthodologie et les résultats présentés ci-dessous sont l'objet du manuscrit inséré à l'annexe 3 de cette thèse.

II. Matériel et méthodes

II.1 Obtention de la salive des punaises d'eau

Les punaises d'eau capturées à Akonolinga et conservées en aquarium au laboratoire des mycobactéries du Centre Pasteur du Cameroun ont été soumises à la salivation avec des techniques différentes suivant les espèces.

Chez les Belostomatidae de petite taille, la salivation a été obtenue en exerçant une légère pression au niveau du métathorax et/ou de l'abdomen de l'insecte immobilisé dans une pince (Fig. 47 A). Chez les Nepidae et les *Lethocerus*, la salivation a été obtenue par une injection au niveau du prothorax, de 3 à 5 µl de pilocarpine à 1%, à l'aide d'une aiguille fine de 0,33 mm de diamètre (Fig. 47 B). Ce geste entraîne dans les 2 minutes, une contraction des glandes salivaires de l'insecte. La salive recueillie dans un cône contenant au moins 20 µl d'eau additionnée d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA, Roche Diagnostics), est rapidement transférée dans un microtude de 0,5 ml maintenu dans de la glace. La salive ainsi obtenue, a été aliquotée et conservée à -80°C dans les délais les plus brefs afin de limiter l'activité des protéases qu'elle contient. Grâce à ces techniques de salivation, nous avons recueilli environ 1 µl de salive

par b  lostome de petite taille, 5   l de salive par n  pe et 150   l par *Lethocerus* soumis    la salivation.

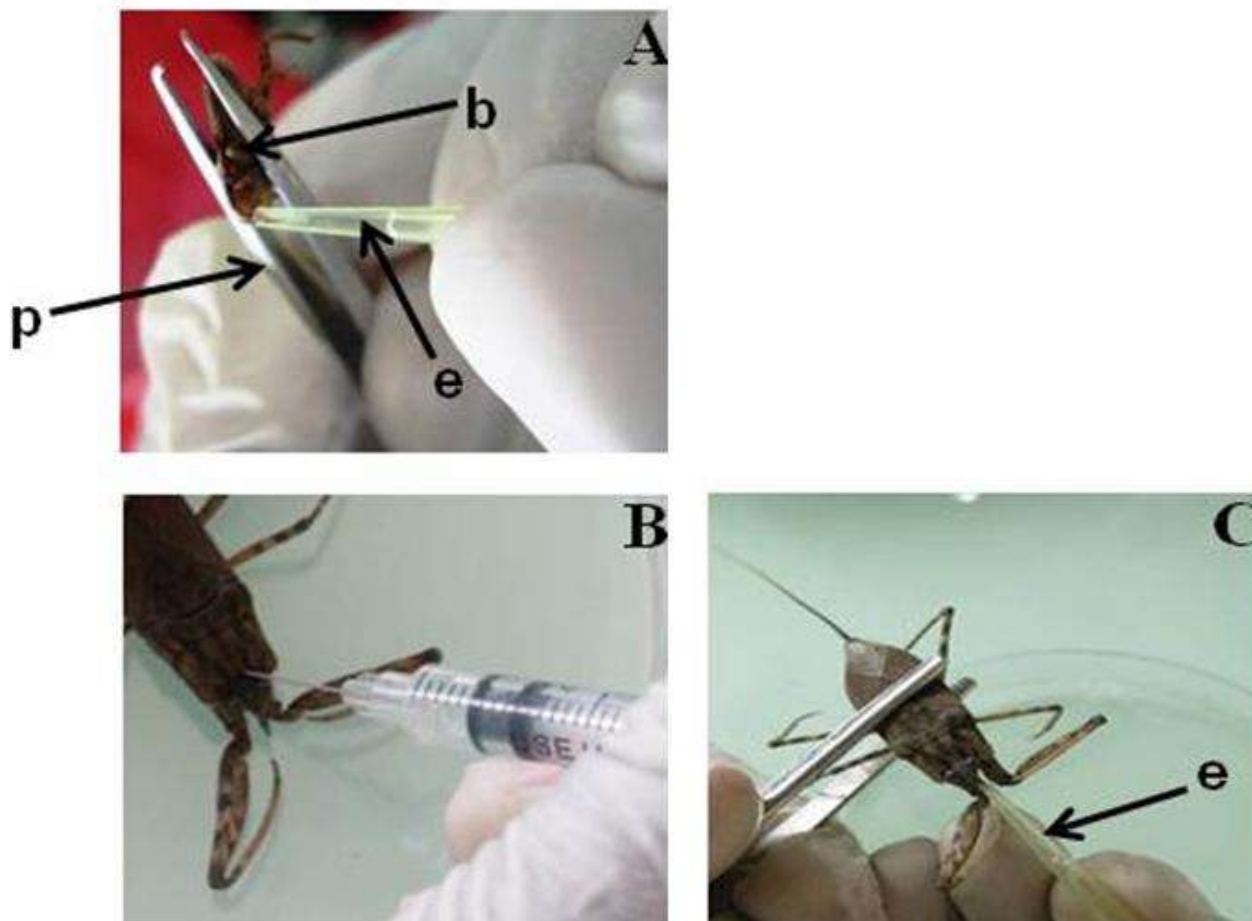


Fig. 47. Obtention de la salive des punaises d'eau. (A) La salivation d'un petit b  lostome est consécutive    la pression du metathorax de l'insecte (b) immobilisé dans une pince. (B) La salivation d'une n  pe est consécutive    l'injection au niveau du prothorax de 3    5   l de pilocarpine 1%. (A et C) la salive est recueillie dans un cône (e) contenant de l'eau addition  e d'inhibiteurs de protéases.

II-2 Dissection des glandes salivaires

Les glandes salivaires de chacun des spécimens capturés ont été récupérées par dissection de la punaise sous une loupe binoculaire (Fig. 48), pour être conservées à -20° C par pool dans des microtubes contenant environ 400 µl de sulfate d'ammonium à 100 %.

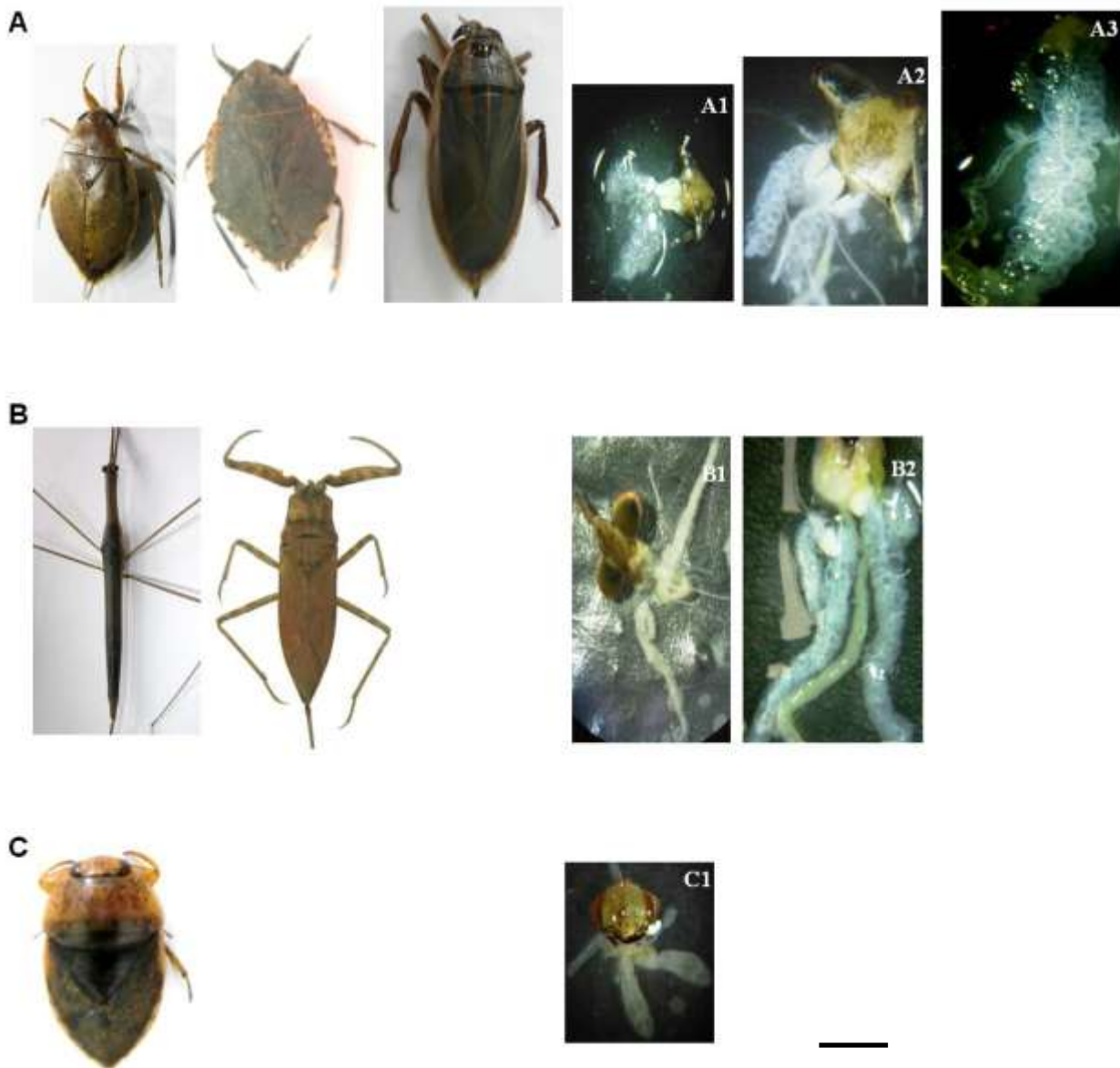


Fig. 48. Exemple de trois familles de punaises et de leurs glandes salivaires principales de punaises d'eau. (A) Les Belostomatidae : glandes salivaires de *Belostoma Appasus* (A1), de *Diplonychus sp* (A2) et de *Lethocerus sp* (A3). (B) Les Nepidae: glandes salivaires de *Ranatra* (B1) et de *Nèpe* (B2). (C) Naucoridae : glandes salivaires de Naucoridae (C1) . Barre : 0,05 mm (A1, A2, B1, C) ; 0,5 mm (A3, B2).

L'étude réalisée au Benin n'ayant montré aucune différence significative vis-à-vis de la famille des punaises d'eau utilisée, nous travaillerons ici principalement avec la punaise géante africaine (*Lethocerus sp*, Belostomatidae) dont les glandes salivaires plus volumineuse permettent d'avoir une quantité de salive beaucoup plus importante.

II-3 Préparation de l'homogénat de glandes salivaires

Les glandes salivaires conservées dans du sulfate d'ammonium à 100 %, ont été réparties dans plusieurs tubes d'Eppendorf de 1.5 ml auxquels on a rajouté des billes de verre de 106 µm de diamètre et une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete, EDTA free; Roche Diagnostics). Elles ont ensuite été broyées à vitesse maximale dans un vibro-broyeur (MM 200, RETSCH), deux fois 5 minutes avec 10 minutes d'incubation à -20° C. La centrifugation du broyat à 8.000 x g pendant 10 minutes à 4°C a permis de récupérer le surnageant constituant l'homogénat de glandes salivaires.

II-4 Dosage des protéines

La concentration en protéines de la salive et de l'homogénat de glandes salivaires a été déterminée à l'aide de la trousse Bio-Rad's protein assay (Bio-Rad, France) suivant les indications du fabricant. La concentration de la salive a été ajustée à 2,5 mg/ml et celle de l'homogénat de glandes salivaires à 4 mg/ml.

II-5 Etude de la prévalence des IgG humaines dirigées contre les protéines salivaires

II-5-1 Le type d'étude

Il s'agit d'une étude séro-épidémiologique, cas/témoins comparant la prévalence de séropositivité au suc salivaire de punaise en recherchant les immunoglobulines M, G, G1, G2, G3 et G4 par la méthode ELISA) chez des "cas", enfants ou adultes ayant un ulcère de Buruli, à la prévalence de séropositivité chez des témoins intrafamiliaux (enfants ou adultes).

II-5-2 Population étudiée et critères d'inclusions

Elle était représentée par l'ensemble des habitants des villages situés dans la vallée du fleuve Nyong entre Akonolinga et Ayos (Fig. 12) et qui recevaient des soins médicaux dans les hôpitaux de ces deux districts. Etaient inclus dans l'étude :

- des cas définis comme étant des sujets exposés à l'infection par *M. ulcerans* présentant des lésions caractéristiques de l'UB, diagnostiquées par des cliniciens expérimentés (cas probables) et/ou pour lesquels l'infection a été confirmée par la mise en évidence de la mycobactérie suite à une coloration de Ziehl-Neelsen, ou par PCR (cas confirmés).

- des témoins définis comme étant des sujets exposés à l'infection ne présentant aucune lésion active ou inactive d'ulcère de Buruli, ni de cicatrice douteuse.

-

II-5-3 Matériel d'investigation et considérations éthiques

Le protocole de cette étude a été approuvé par le comité scientifique d'éthique et le ministère de la santé publique du Cameroun. L'échantillon nécessaire pour cette étude était un prélèvement unique de sang veineux de 5 ml recueillis chez chacun des participants. Le sérum récupéré a été conservé en azide de sodium à 0,05% puis aliquoté par tube de 1 ml. Les aliquotes ont été étiquetés avec un numéro d'ordre constitué d'au moins 5 chiffres (numéro de l'enquêteur, de la famille enquêtée et de l'individu d'après l'arbre généalogique de la famille) attribué à chaque patient puis conservés à 4°C, avant leur acheminement jusqu'au laboratoire du GEIHP à Angers.

II-5-4 Analyse ELISA

La détection des immunoglobulines se liant aux constituants salivaires de *Lethocerus* a été réalisée par la technique ELISA. 100 µl d'une solution de HGS diluée au 1/500 (environ 0,8 µg de

protéines) dans une solution tampon carbonate-bicarbonate de sodium 50 mM, pH 9.6 ont été déposés dans chacun des puits d'une plaque Nunc Maxisorp de 96 puits. Les plaques ont ensuite été incubées toute la nuit à 4°C. Après trois lavages successifs avec du PBS, elles sont saturées à 37° C par une solution de BSA à 3% dans du PBS. Deux heures après, elles sont à nouveau lavées trois fois de suite, avec du PBS additionné de Tween 20 à 0,05 %. Ensuite, 100 µl de sérum humain dilué au 1/100 dans une solution de PBS-Tween 20 à 0,05 %, additionnée de BSA à 0,3 %. Après une heure d'incubation à 37°C, puis trois lavages successifs au PBS-Tween 20-BSA. Les immunoglobulines humaines liées aux espèces moléculaires contenues dans l'HGS ont été révélées par des anticorps anti-immunoglobulines humaines. En fonction de l'anticorps à rechercher, la révélation a été effectuée en utilisant soit des anticorps secondaires de chèvres anti-IgG humaines (λ spécifique, Sigma), soit des anticorps secondaires monoclonaux de souris anti-IgG1 humaines (InVitrogen), ou anti-IgG2 humaines (Autogenbioclear) ou anti-IgG3 humaines (InVitrogen), ou encore des anti-IgG4 humaines (InVitrogen). Les anticorps secondaires étaient tous conjugués à la peroxydase. L'activité de l'enzyme a été révélée par de l'OPD (Sigma) dissout dans une solution tampon citrate-phosphate 0,15 M, Ph 5. Chacun des sérums, y compris les contrôles positif et négatif a été analysé trois fois.

La détection des IgM humaines se combinant aux espèces moléculaires contenues dans l'HGSB a été réalisée suivant une procédure similaire à celle utilisée pour les IgG totales, décrite ci-dessus. La révélation a été faite par des anticorps de chèvre anti-IgM humaines (μ spécifiques, ADB serotec, Royaume-Uni) conjugués à la peroxydase. Chacun des sérums a également été analysé trois fois.

II-5-5 Analyse statistique

Le test t de Student a été utilisé pour évaluer la différence des moyennes de la réponse immunitaire par anticorps aux antigènes salivaires entre les deux cohortes indépendantes. La

différence était significative pour $p < 0,05$. Les taux des immunoglobulines ont été exprimés par la valeur ajustée des densités optiques (aDO). Ce paramètre calculé pour chaque sérum correspondait à la moyenne de la mesure des trois DO obtenues à chacune des trois analyses du sérum moins la moyenne des trois DO du même sérum testé en l'absence de l'antigène. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS version 16.0.

II-7 Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Deux échantillons correspondant à la salive et à l'homogénat de glandes salivaires (HGS) contenant respectivement 24 µg et 36 µg de protéines ont été soumis à une migration électrophorétique en conditions non dénaturantes sur un gel de polyacrylamide 4% -12% (Biorad). Les bandes de protéines séparées ont été soit visualisées après coloration avec Coomassie Brilliant Blue Instant Stain (Interchim, France), soit transférées sur une membrane PVDF en vue de leur séquençage.

II-8 Immuno-empreinte

Un échantillon de HGS contenant 50 µg de protéines *M. ulcerans* co-incubés avec 1 mg de protéines salivaires a été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % -15 %. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane Hybond PVDF (Amersham) qui a été saturée par de la BSA à 3 % durant toute la nuit à 4°C. La membrane a ensuite été incubée avec du sérum humain dilué au 1/100. La détection des IgG de ses sous-classes fixées aux protéines salivaires a été effectuée avec des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG humaine (Sigma) dilués au 1/10.000 ou des anticorps monoclonaux de souris spécifiques de chacune des sous-classes d'IgG humaines (Zymed) diluée à 1 / 1000 ; conjugués à la peroxydase et avec du DAB.

II-9 Micro-séquençage

Les protéines d'intérêt de la salive et de HGS ont été éluées de la membrane de PVDF colorée à l'amidoschwartz puis introduites dans un séquenceur automatique (ABI 494 Applied Biosystems, Foster City, CA) suivant les instructions du fournisseur. Les séquences de protéines générées ont été comparées à celles des protéines connues en utilisant les programmes BLAST ou FASTA.

III. Résultats

III-1 Description de la population

Chez les 119 participants présentant des lésions d'ulcère de Buruli, 46% était de sexe féminin et 54% de sexe masculin. On n'a noté aucune différence significative entre les sexes. Bien que leur âge fût compris entre 1 et 78 ans, 63% d'entre eux avaient moins de 15 ans avec une moyenne de 16,2 ans. Les "cas" étaient en majorité constitués d'écoliers. Chez 60,5% (72/119) d'entre eux, 47 d'entre eux étaient des cas probables et 72 des cas confirmés. Comme nous l'avons montré dans l'étude épidémiologique présentée dans le chapitre II, ces deux groupes n'ont également montré aucune différence significative suite à l'analyse ELISA (Tableau 7), nous autorisant à les regrouper en une seule cohorte.

Nombre total de patients (n = 119)			
	Valeur moyenne des DO ajustée des cas probables n = 47 ($\pm\sigma$)	Valeur moyenne des DO ajustée des cas confirmés n = 72 ($\pm\sigma$)	P*
IgG totales	0.190(0.014)	0.176(0.003)	0.362 [¥]
IgG 1	0.112(0.012)	0.109(0.012)	0,840 [¥]
IgG 2	0.071 (0.003)	0.074(0.002)	0,434 [¥]
IgG 3	0.160(0.03)	0.144(0.013)	0,577 [¥]
IgG 4	0.076(0.004)	0.069(0.004)	0,248 [¥]

Tableau 7. Caractéristiques de la population des patients après l'analyse ELISA.

* p obtenu avec le test exact de Fisher était significatif lorsqu'il était $< 0,1$

Chez les 172 témoins, il n'y avait également aucune différence significative entre les deux sexes. L'âge des sujets était compris entre 4 et 75 ans; plus de 70% de la population de ce groupe était constitué d'adultes. Au cours de leur activité principale, agriculture et pêche, 60,3% d'entre eux étaient en contact permanent avec les eaux du Nyong.

III-2 Taux sérique des IgG totales et de leurs sous-classes dirigées contre les constituants salivaires de *Lethocerus sp*

L'analyse par ELISA des sérums a montré que les témoins présentaient des taux d'IgG totales à des taux significativement plus élevés que les patients ($p = 0,013$) (Fig 49). Aucun signal IgG spécifique des constituants salivaires n'a été observé chez les témoins non exposés et n'ayant jamais été en zone d'endémie. De toutes les sous-classes, seules les IgG1 ont montré une différence significative entre les patients et les témoins ($p = 0,012$).

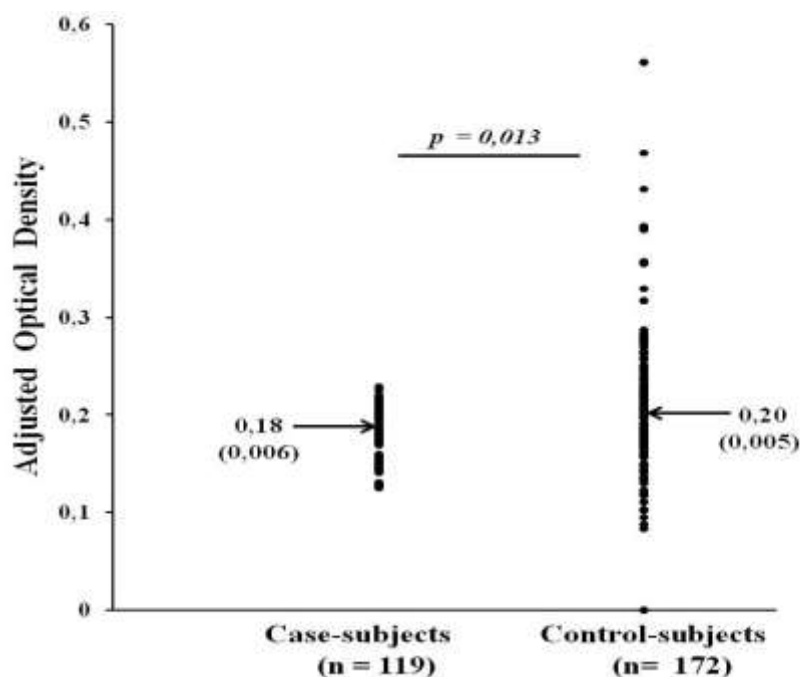


Fig. 49. Taux des IgG totales des sérums de Camerounais exposés aux piqûres de punaises d'eau.

III-3 Analyse des immuno-empreintes

Suite à l'analyse par Western blot, on constate que seules les IgG1 et IgG3 de sérum de sujets sains reconnaissent les constituants salivaires de *Lethocerus sp* (Fig. 50).

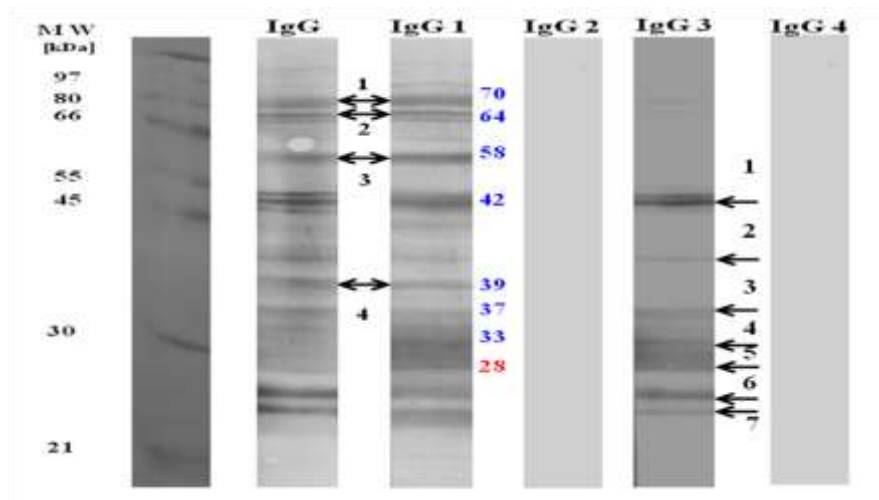


Figure 50. Profil immunologique de sujets indemnes reconnaissant les constituants salivaires de *Lethocerus sp*.

III-4 Comparaison de la salive et de l'homogénat de glandes salivaires

D'après l'analyse des profils électrophorétiques de la salive et de l'HGS, tous les constituants de la salive sont retrouvés dans l'HGS. Seuls quatre d'entre eux sont immunogènes chez l'homme (Fig. 51). Deux des constituants de la salive présentent la même séquence partielle qu'une trypsine contenue dans la salive de *Culex quinquefasciatus*. Les deux autres, de poids moléculaires plus élevés (Fig. 51) n'ont pu être identifiés, ce qui suggère qu'elles pourraient être spécifiques aux punaises d'eau dont on ignore encore la carte génomique ou le transcriptome de leurs glandes salivaires.

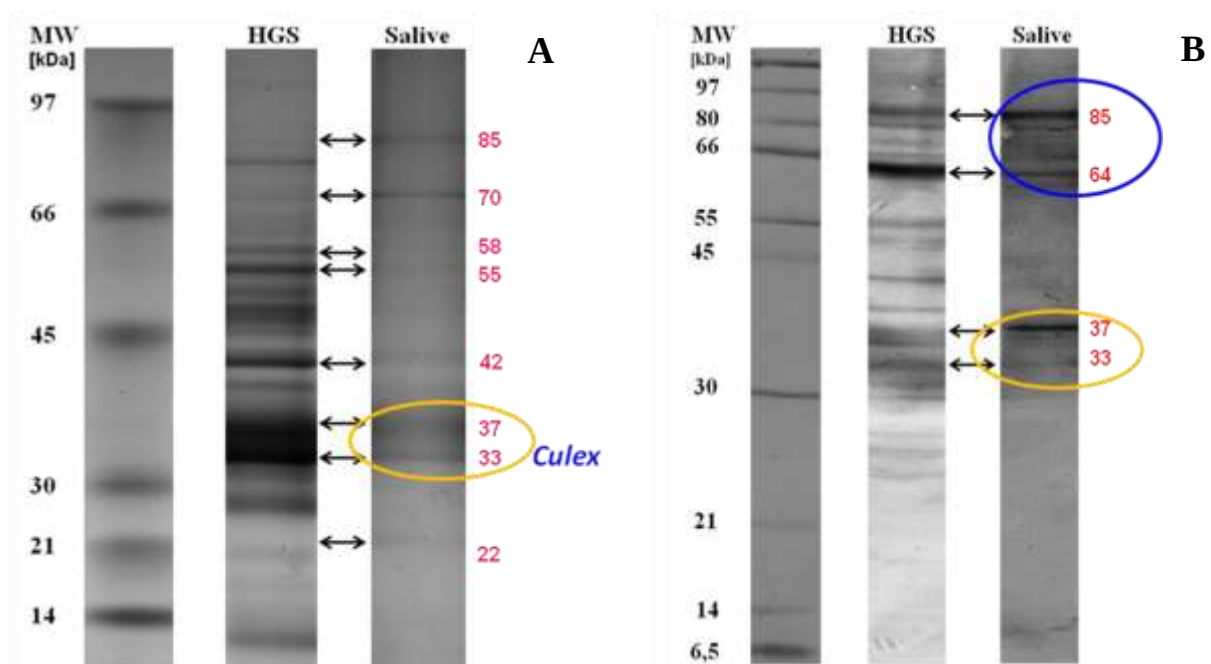


Fig. 51. Comparaison de HGS et de la salive de *Lethocerus sp.* (A) Profils électrophorétiques. (B) Western blots.

III-5 Constituant(s) salivaire(s) immunogène(s) adhérent à *M. ulcerans*

Un constituant de 28 kDa contenu dans l'HGS adhère à des éléments de la membrane de *M. ulcerans* (Fig. 52).

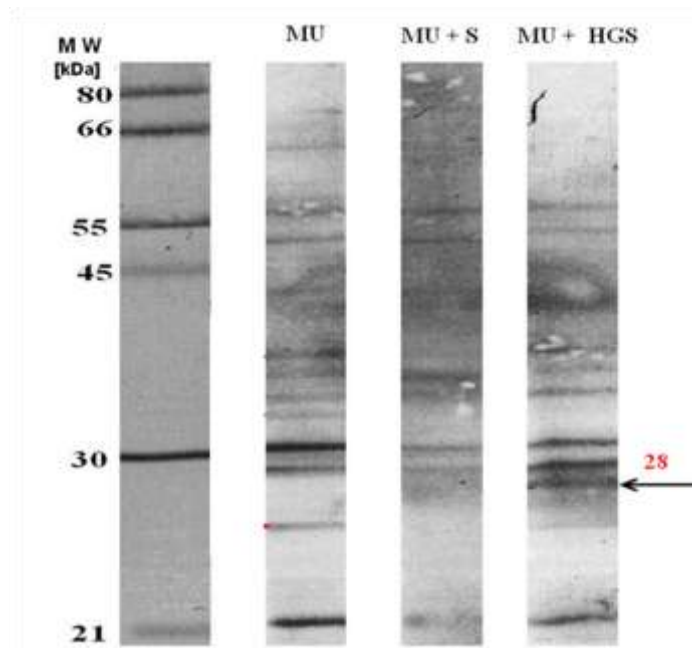


Fig. 52. Constituants salivaires immunogènes chez l'homme se combinant à *M. ulcerans*.

IV. Discussion et perspectives

L'enquête séro-épidémiologique menée dans la région endémique camerounaise) révèle l'existence d'un taux d'anticorps d'IgG spécifiques d'antigènes salivaires de *Lethocerus sp*, significativement plus élevé chez les « individus sains » que chez les « patients » ($p = 0,013$). Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté de notre étude au Bénin. Ils confirment ainsi que les individus régulièrement exposés aux piqûres itératives de punaises d'eau développeraient des anticorps de type IgG qui les protégeraient de l'apparition des lésions dues à l'infection par *M. ulcerans*. Ils apportent également un argument supplémentaire à l'hypothèse selon laquelle la salive de punaises d'eau incriminées dans la transmission à l'homme de *M. ulcerans* induirait chez l'hôte une réponse immunitaire par anticorps IgG. Elle constitue donc une signature immunologique du vecteur qui pourrait être corrélée à l'apparition des lésions consécutive à l'infection. Ce sont principalement les adultes qui seraient par leurs activités agricoles dans les marécages de la vallée du fleuve Nyong qui les plus exposées aux piqûres de punaises aquatiques

contrairement à leurs enfants vivant dans le même environnement. Cette situation pourrait expliquer entre autre pourquoi dans cette zone endémique camerounaise, 60% des patients ont moins de 15 ans.

Nous avons également démontré que la différence des taux d'IgG sécrétés par les sujets exposés à la piqure des punaises n'est observée que pour la sous-classe IgG1. Toutefois l'analyse par Western blot a montré qu'en plus de la sous-classe d'IgG1, les constituants salivaires de *Lethocerus sp* étaient également reconnus par les anticorps IgG3. Ainsi, , ce sont principalement les anticorps IgG1 et IgG3 qui participeraient à une résistance de l'hôte aux lésions causées par l'infection par *M. ulcerans*. Une telle résistance de l'hôte à l'apparition des lésions causées par un microorganisme transmis par un arthropode vecteur a déjà été observée dans le cas de la maladie de Lyme et des leishmanioses. Dans le cas des leishmanioses, la protection conférée par HGS a notamment été associée à la production d'anticorps neutralisant la sécrétion d'IL-4, à une augmentation de la sécrétion d'IL-12 et d'INF- γ par activation des cellules CD4 et à une hypersensibilité retardée (183, 185). Pour ce qui est de l'infection à *M. ulcerans*, les mécanismes de la réponse immunitaire induite par les constituants salivaires des punaises d'eau restent à être élucidés. Toutefois, la mise en évidence de l'intervention des IgG1 principalement mais aussi de la reconnaissance de molécules antigéniques par l'isotype IgG3 constitue une orientation intéressante dans l'exploration de cette réponse. En effet, ces deux isotypes représentent les composants majeurs à l'activation de la voie classique du complément via la fixation de leur récepteur Fc.

L'analyse par SDS-PAGE d'un homogénat de glande salivaire et de la salive de *Lethocerus sp* révèle dans l'homogénat un mélange complexe de plusieurs protéines, avec au moins huit protéines dont quatre prédominantes de 94, 78, 37 et 35 kDa, sont sécrétées dans la salive de l'insecte.

Les IgG sériques des sujets exposés dont le taux déterminé par ELISA était le plus élevé reconnaissent principalement les quatre protéines majoritaires de 94, 68, 37 et 35 kDa. Le séquençage N-terminal de ces quatre protéines a permis d'identifier seulement la protéine de 35 kDa comme étant une trypsine similaire à celle retrouvée dans la salive de *Culex quinquefasciatus*. Les fonctions des trois autres protéines antigéniques demeurent inconnues. Par ailleurs une protéine de 28 kDa issue de l'homogénat de glande salivaire, immunogène chez l'homme et adhérant à la membrane de *M. ulcerans* a également été séquencée, mais n'a pu être identifiée. Ces protéines non identifiées semblent être spécifiques de *Lethocerus sp.* dont le génome n'est pas disponible ce qui pourrait être utile pour explorer leurs fonctions.

En conclusion, cette étude met en évidence des constituants salivaires spécifiques de punaises d'eau immunogènes chez l'hôte dont certains pourraient être adhérents à la membrane de *M. ulcerans*. Elle pourrait de ce fait révéler des marqueurs biologiques pertinents pour identifier les populations à risque, mais aussi proposer des cibles vaccinales potentielles. Toutefois, pour mieux cerner l'interaction immunologique entre l'hôte et les vecteurs potentiels de *M. ulcerans* que sont les punaises d'eau, des investigations supplémentaires sur la réactivité et le rôle de chacun de ses antigènes salivaires, ainsi que leurs interactions avec la mycobactérie sont nécessaires.

Conclusion générale et Perspectives

L'étude que nous avons entreprise dans le cadre de cette thèse, avait pour dessein de chercher à comprendre le (s) mécanisme (s) de la transmission à l'homme de *Mycobacterium ulcerans*. Nous nous sommes principalement appuyé sur l'hypothèse de la transmission à l'homme de la mycobactérie par des hétéroptères aquatiques du groupe des punaises d'eau. Cette recherche a constitué une des premières études intégrant les paramètres liés à cette transmission dans une approche multidisciplinaire. Les observations notées en zones endémiques camerounaises, nous ont incités à chercher une réponse à l'une des questions principales que soulève cette infection en Afrique, à savoir pourquoi dans un même environnement, certains groupes d'individus et plus particulièrement les jeunes de moins de 20 ans sont atteints de la maladie contrairement à leurs voisins. Au cours d'une étude épidémiologique des facteurs de risque que nous avons menée, nous avons démontré que le port des vêtements recouvrant les membres lors des activités dans les marécages d'une part, le soin immédiat des plaies et le fait de dormir sous moustiquaire d'autre part, assuraient une protection contre l'ulcère de Buruli. Cette étude qui s'est focalisée pour le moment au sein des populations des districts de santé d'Akonolinga et d'Ayos, mériterait cependant d'être étendue aux autres territoires nationaux touchés par l'infection à l'exemple de la région de Bankim dans l'Adamaoua et de Mbongué dans le Sud-Ouest. Les retombées d'une telle recherche sont en effet considérables dans la mesure où elle permettrait la mise en place d'outils de sensibilisation des populations afin de prévenir la maladie. Ces données mettent également en exergue l'implication directe d'un insecte dans la transmission de *M. ulcerans*. Des investigations complémentaires sont en cours notamment en ce qui concerne le rôle des punaises d'eau dans cette transmission.

Au cours des différentes enquêtes ayant conduit aux résultats ci-dessus, nous avons été frappés par la diversité des punaises d'eau dans le site étudié ; il est apparu aussi que peu d'investigations ont été consacrées jusqu'à présent à leur sujet. Nous avons donc entrepris une étude entomologique de ces insectes en décrivant les spécimens capturés dans le but de proposer

une clé d'identification des espèces africaines de punaises aquatiques. Nous avons bénéficié au cours de ce travail de la grande expérience du Pr Julien Doannio, entomologiste à l'Université de Côte-d'Ivoire que nous remercions infiniment ici de son aide et qui poursuit cette recherche. L'étude de la bio-écologie des punaises d'eau à également été entreprise, cette fois en collaboration avec Estelle Marion. Elle permettra de déterminer la dynamique des populations de ces insectes et de définir le mode de leur contamination par *M. ulcerans*.

Cette étude apporte une contribution majeure au développement d'outils de prévention efficace contre l'ulcère de Buruli. Elle a permis de faire des observations complémentaires en faveur du rôle des punaises d'eau dans la transmission de *M. ulcerans* à l'homme.

Références bibliographiques

1. **Abel, L., Sánchez, F., Oberti, J., Thuc, N., Hoa, L., Lap, V., Skamene, E., Lagrange, P., and Schurr, E.** (1998). Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis* **177**:133-145.
2. **Adusumilli, S., Mve-Obiang, A., Sparer, T., Meyers, W., Hayman, J., and Small, P. L.** (2005). *Mycobacterium ulcerans* toxic macrolide, mycolactone modulates the host immune response and cellular location of *M. ulcerans* *in vitro* and *in vivo*. *Cell Microbiol* **7**:1295-1304.
3. **Aguiar, J., Domingo, M. C., Guedenon, A., Meyers, W., Steunou, C., and Portaels, F.** (1997). L'ulcère de Buruli, une maladie mycobactérienne importante et en recrudescence au Bénin. *ARSOM Bulletin des Séances* **3**:325-356.
4. **Aguiar, J., and Stenou, C.** (1997). Buruli ulcers in rural areas of Benin: management of 635 cases. *Med Trop (Mars)* **57**:83-90.
5. **Aiga, H., Amano, T., Cairncross, S., Adomako, J., Nanas, O. K., and Coleman, S.** (2004). Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. *Am J Trop Med Hyg* **71**:387-392.
6. **Amofah, G., Bonsu, F., Tetteh, C., Okrah, J., Asamoah, K., Asiedu, K., and Addy, J.** (2002). Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. *Emerg Infect Dis* **8**:167-170.
7. **Amofah, G. K., Sagoe-Moses, C., Adjei-Acquah, C., and Frimpong, E. H.** (1993). Epidemiology of Buruli ulcer in Amansie West district, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**:644-645.
8. **Andersen, N. M., and Weir, T. A.** (2004) Australian Water Bugs (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha and Nepomorpha): Their Biology and Identification vol. 14. CSIRO Publishing.
9. **Bar, W., Rusch-Gerdes, S., Richter, E., Marquez de Bar, G., Dittmer, C., Papsdorf, H., Stosiek, P., de Rijck, P. B., Meyers, W. M., and Portaels, F.** (1998). *Mycobacterium ulcerans* infection in a child from Angola: diagnosis by direct detection and culture. *Trop Med Int Health* **3**:189-196.
10. **Barker, D. J., and Carswell, J. W.** (1973). *Mycobacterium ulcerans* infection among tse-tse control workers in Uganda. *Int J Epidemiol* **2**:161-165.
11. **Barker, D. J., and Ninkibigaya, V.** (1972). Buruli disease and patients's activities. *East Afr Med J* **49**:260-268.
12. **Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E. D., Valenzuela, J. G., Charlab, R., Barral-Netto, M., and Ribeiro, J. M.** (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker ? *Am J Trop Med Hyg* **62**:740-745.

13. **Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., and Sacks, D. L.** (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* **188**:1941-1953.
14. **Bhattacharyya, S., Singla, R., Dey, A. B., and Prasad, H. K.** (1999). Dichotomy of cytokine profiles in patients and high-risk healthy subjects exposed to tuberculosis. *Infect Immun* **67**:5597-5603.
15. **Billingsley, P. F., Baird, J., Mitchell, J. A., and Drakeley, C.** (2006). Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol* **28**:143-153.
16. **Boussiotis, V. A., Tsai, E. Y., Yunis, E. J., Thim, S., Delgado, J. C., Dascher, C. C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J. M., and Goldfeld, A. E.** (2000). IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* **105**:1317-1325.
17. Bright, E. *Aquatic Insects of Michigan*. January 2, 2007. Disponible sur <http://insects.ummz.lsa.umich.edu/~ethanbr/aim/Keys/Heteroptera/>.
18. **Brodie, T. M., Smith, M. C., Morris, R. V., and Titus, R. G.** (2007). Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun* **75**:2359-2365.
19. Buruli ulcer disease. (2004). *Wkly Epidemiol Rec* **79**:194-9.
20. **Calder, P. C., and Jackson, A. A.** (2000). Undernutrition, infection and immune function. *Nut Res Rev* **13**:3-29.
21. **Caljon, G., Van Den Abbeele, J., Sternberg, J. M., Coosemans, M., De Baetselier, P., and Magez, S.** (2006). Tse-tse fly saliva biases the immune response to Th2 and induces anti-vector antibodies that are a useful tool for exposure assessment. *Int J Parasitol* **36**:1025-1035.
22. **Casanova, J. L., and Abel, L.** (2002). Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* **20**:581-620.
23. **Chauty, A., Ardant, M. F., Adeye, A., Euverte, H., Guedenon, A., Johnson, C., Aubry, J., Nuermberger, E., and Grosset, J.** (2007). Promising Clinical Efficacy of Streptomycin-Rifampin Combination for Treatment of Buruli Ulcer (*Mycobacterium ulcerans* Disease). *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4029-35.
24. **Chauty, A., Euverte, H., Guedenon, A., Adeye, A., Johnson, C., Boulinguez, S., and Aubry, J.** (2005). P247- Évaluation à un an du traitement de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* au Bénin par l'association rifampicine-streptomycine. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* **132**:222.

25. **Chemlal, K., G. Huys, P. A. Fonteyne, V. Vincent, A. G. Lopez, L. Rigouts, J. Swings, W. M. Meyers, and F. Portaels. (2001).** Evaluation of PCR-restriction profile analysis and IS 2404 restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification and typing of *Mycobacterium ulcerans* and *M. marinum*. J Clin Microbiol 39:3272-3278.
26. **Chemlal, K., K. De Ridder, P. A. Fonteyne, W. M. Meyers, J. Swings, and F. Portaels. (2001).** The use of IS 2404 restriction fragment length polymorphisms suggests the diversity of *Mycobacterium ulcerans* from different geographical areas. Am J Trop Med Hyg 64:270-273.
27. **Cooper, A. M., Roberts, A. D., Rhoades, E. R., Callahan, J. E., Getzy, D. M., and Orme, I. M. (1995).** The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Immunology 84:423-432.
28. **Cornelie, S., Remoue, F., Doucoure, S., Ndiaye, T., Sauvage, F. X., Boulanger, D., and Simondon, F. (2007).** An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. Malar J 6:75.
29. **Cottrez, F., and Groux, H. (2001).** Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. J Immunol 167:773-778.
30. **Coutanceau, E., Legras, P., Marsollier, L., Reyset, G., Cole, S. T., and Demangel, C. (2006).** Immunogenicity of *Mycobacterium ulcerans* Hsp65 and protective efficacy of a *Mycobacterium leprae* Hsp65-based DNA vaccine against Buruli ulcer. Microbes Infect 8:2075-2081.
31. **Coutanceau, E., Marsollier, L., Brosch, R., Perret, E., Goossens, P., Tanguy, M., Cole, S. T., Small, P. L., and Demangel, C. (2005).** Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of *Mycobacterium ulcerans*: the contribution of endogenous mycolactone toxin. Cell Microbiol 7:1187-1196.
32. **Dannenberg, A. M., Jr. (1994).** Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Immunobiology 191:461-473.
33. **Darriet, F., and Hougard, J-M. (1993).** Étude en laboratoire de la biologie et des capacités prédatrices de l'Hétéroptère aquatique *Ranatra parvipes vicina* (Signoret, 1880) à l'encontre des larves de moustiques. Reo. Hydrobiol. trop. 26:305-311.
34. **Das, M. K., Mishra, A., Beuria, M. K., and Dash, A. P. (1991).** Human natural antibodies to *Culex quinquefasciatus*: age-dependent occurrence. J Am Mosq Control Assoc 7:319-321.

35. **Debacker, M., Aguiar, J., Steunou, C., Zinsou, C., Meyers, W. M., Guedenon, A., Scott, J. T., Dramaix, M., and Portaels, F.** (2004). *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in rural hospital, Southern Benin, 1997-2001. *Emerg Infect Dis* **10**:1391-1398.
36. **Debacker, M., Portaels, F., Aguiar, J., Steunou, C., Zinsou, C., Meyers, W., and Dramaix, M.** (2006). Risk factors for Buruli ulcer, Benin. *Emerg Infect Dis* **12**:1325-1331.
37. **Debacker, M., Zinsou, C., Aguiar, J., Meyers, W., and Portaels, F.** (2002). *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) following human bite. *Lancet* **360**:1830.
38. **Dega, H., Bentoucha, A., Robert, J., Jarlier, V., and Grosset, J.** (2002). Bactericidal activity of rifampin-amikacin against *Mycobacterium ulcerans* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3193-3196.
39. **Delvare, G., and Aberlenc, H. P.** (1989) Les insectes d'Afrique et d'Amérique Tropicale: Clés pour la reconnaissance des familles PRIFAS CIRAD, Montpellier
40. **Dobos, K. M., Quinn, F. D., Ashford, D. A., Horsburgh, C. R., and King, C. H.** (1999). Emergence of a unique group of necrotizing mycobacterial diseases. *Emerg Infect Dis* **5**:367-378.
41. **Dobos, K. M., Small, P. L., Deslauriers, M., Quinn, F. D., and King, C. H.** (2001). *Mycobacterium ulcerans* cytotoxicity in an adipose cell model. *Infect Immun* **69**:7182-7186.
42. **Dobos, K. M., Spotts, E. A., Marston, B. J., Horsburgh, C. R., Jr., and King, C. H.** (2000). Serologic response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium ulcerans* during Buruli ulcer disease. *Emerg Infect Dis* **6**:158-164.
43. **Donovan, M. J., Messmore, A. S., Scrafford, D. A., Sacks, D. L., Kamhawi, S., and McDowell, M. A.** (2007). Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infect Immun* **75**:2523-2530.
44. **DosSantos, V. M., Noronha, F. L., Vicentina, É. C., and Lima, C. C.** (2007). *Mycobacterium ulcerans* infection in Brazil. *The Medical Journal of Australia* **187**:63-64.
45. **Duker, A. A., Portaels, F., and Hale, M.** (2006). Pathways of *Mycobacterium ulcerans* infection: a review. *Environ Int* **32**:567-573.
46. **Etuaful, S., Carbonnelle, B., Grosset, J., Lucas, S., Horsfield, C., Phillips, R., Evans, M., Ofori-Adjei, D., Klustse, E., Owusu-Boateng, J., Amedofu, G. K., Awuah, P., Ampadu, E., Amofah, G., Asiedu, K., and Wansbrough-Jones, M.** (2005). Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3182-3186.

47. **Faber, W. R., Arias-Bouda, L. M., Zeegelaar, J. E., Kolk, A. H., Fonteyne, P. A., Toonstra, J., and Portaels, F.** (2000). First reported case of *Mycobacterium ulcerans* infection in a patient from China. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**:277-279.
48. **Flynn, J. L., and Chan, J.** (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**:93-129.
49. **Fyfe, J. A., Lavender, C. J., Johnson, P. D., Globan, M., Sievers, A., Azuolas, J., and Stinear, T. P.** (2007). Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **73**:4733-4740.
50. **Ganapamo, F., Rutti, B., and Brossard, M.** (1996). Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the *in vitro* responsiveness of lymphocytes to mitogens. *Immunology* **87**:259-263.
51. **George, K. M., Barker, L. P., Welty, D. M., and Small, P. L.** (1998). Partial purification and characterization of biological effects of a lipid toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* **66**:587-593.
52. **George, K. M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman, J., Lee, R., and Small, P. L.** (1999). Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* **283**:854-857.
53. **George, K. M., Pascopella, L., Welty, D. M., and Small, P. L.** (2000). A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* **68**:877-883.
54. **Goldsby, R. A., Osborne, B. A., Kindt, T. J., and Kuby, J.** (2003) *Immunologie: Le cours de Janis Kuby*, 4 ed. Dunod, Paris.
55. **Gooding, T. M., Johnson, P. D., Campbell, D. E., Hayman, J. A., Hartland, E. L., Kemp, A. S., and Robins-Browne, R. M.** (2001). Immune response to infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* **69**:1704-1707.
56. **Gooding, T. M., Johnson, P. D., Smith, M., Kemp, A. S., and Robins-Browne, R. M.** (2002). Cytokine profiles of patients infected with *Mycobacterium ulcerans* and unaffected household contacts. *Infect Immun* **70**:5562-5567.
57. **Gooding, T. M., Kemp, A. S., Robins-Browne, R. M., Smith, M., and Johnson, P. D.** (2003). Acquired T-helper 1 lymphocyte anergy following infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Clin Infect Dis* **36**:1076-1077.
58. **Grasse, P. P.** (1951). *Insectes supérieurs et Hémiptéroïdes Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie*, vol. X. Masson et Cie, Paris

59. **Guarner, J., Bartlett, J., Whitney, E. A., Raghunathan, P. L., Stienstra, Y., Asamo, K., Etuaful, S., Klutse, E., Quarshie, E., van der Werf, T. S., van der Graaf, W. T., King, C. H., and Ashford, D. A.** (2003). Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Emerg Infect Dis* **9**:651-656.
60. **Hayman, J.** (1993). Out of Africa: observations on the histopathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Clin Pathol* **46**:5-9.
61. **Hayman, J.** (1991). Postulated epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Int J Epidemiol* **20**:1093-1098.
62. **Hayman, J., and McQueen, A.** (1985). The pathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Pathology* **17**:594-600.
63. **Hofer, M., Hirschel, B., Kirschner, P., Beghetti, M., Kaelin, A., Siegrist, C. A., Suter, S., Teske, A., and Bottger, E. C.** (1993). Brief report: disseminated osteomyelitis from *Mycobacterium ulcerans* after a snakebite. *N Engl J Med* **328**:1007-1009.
64. Institut Pasteur. *Mycobacterium ulcerans* Disponible sur <http://genolist.pasteur.fr/BuruList/>. 2006 April 26th
65. **Jenkin, G. A., Smith, M., Fairley, M., and Johnson, P. D.** (2002). Acute, oedematous *Mycobacterium ulcerans* infection in a farmer from far north Queensland. *Med J Aust* **176**:180-181.
66. **Johnson, P. D., Stinear, T., Small, P. L., Pluschke, G., Merritt, R. W., Portaels, F., Huygen, K., Hayman, J. A., and Asiedu, K.** (2005). Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med* **2**:282-286.
67. **Johnson, P. D., Veitch, M. G., Leslie, D. E., Flood, P. E., and Hayman, J. A.** (1996). The emergence of *Mycobacterium ulcerans* infection near Melbourne. *Med J Aust* **164**:76-78.
68. **Johnson, P. D. R., Aзуolas, J., Wishart, E., Lavender, C. J., Stinear, T. P., Hayman, J. A., Brown, L., Jenkin, G. A., and Fyfe, J. A. M.** (2007). *Mycobacterium ulcerans* in Mosquitoes Captured during Outbreak of Buruli Ulcer, Southeastern Australia *Emerg Infect Dis* **13**:1653 - 1660.
69. **Johnson, R. C., Ifebe, D., Hans-Moevi, A., Kestens, L., Houessou, R., Guedenon, A., Meyers, W. M., and Portaels, F.** (2002). Disseminated *Mycobacterium ulcerans* disease in an HIV-positive patient: a case study. *Aids* **16**:1704-1705.
70. **Johnson, R. C., Makoutode, M., Sopoh, G. E., Elsen, P., Gbovi, J., Pouteau, L. H., Meyers, W. M., Boko, M., and Portaels, F.** (2005). Buruli ulcer distribution in Benin. *Emerg Infect Dis* **11**:500-501.

71. **Johnson, R. C., Sopoh, G. E., Boko, M., Zinsou, C., Gbovi, J., Makoutode, M., and Portaels, F.** (2005). Distribution of *Mycobacterium ulcerans* (Buruli ulcer) in the district of Lalo in Benin. *Trop Med Int Health* **10**:863-871.
72. **Josse, R., Guedenon, A., Darie, H., Anagonou, S., Portaels, F., and Meyers, W. M.** (1995). *Mycobacterium ulcerans* cutaneous infections: Buruli ulcers. *Med Trop* **55**:363-373.
73. **Kanga, J. M., Kacou, D. E., Sangare, A., Dabila, Y., Asse, N. H., and Djakeaux, S.** (2003). Recurrence after surgical treatment of Buruli ulcer in Cote d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* **96**:406-409.
74. **Kanga, J. M., and Kacou, E. D.** (2001). Epidemiological aspects of Buruli ulcer in Cote d'Ivoire: results of a national survey. *Bull Soc Pathol Exot* **94**:46-51.
75. **Kanost, M. R.** (1999). Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol* **23**:291-301.
76. **Kaufmann, S. H.** (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**:ii54-8.
77. **Kibadi Kapay, A.** (2004). Enquête connaissances-attitudes-pratiques (CAP) de la population de Songololo (R.D. Congo) sur l'ulcère de Buruli. *Bull Soc Pathol Exot* **97**:302-305.
78. **Kiszewski, A., Becerril, E., Baquera, J., Ruiz-Maldonado, R., and Hernández Pando, R.** (2003). Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br J Dermatol* **148**:795-798.
79. **Kiszewski, A. E., Becerril, E., Aguilar, L. D., Kader, I. T., Myers, W., Portaels, F., and Hernandez Pando, R.** (2006). The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin Exp Immunol* **143**:445-451.
80. **Kobayashia, K., and Yoshida, T.** (1996). The Immunopathogenesis of Granulomatous Inflammation Induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods* **9**:204-214.
81. **Kotlowski, R., Martin, A., Ablordey, A., Chemlal, K., Fonteyne, P. A., and Portaels, F.** (2004). One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish. *J Med Microbiol* **53**:927-933.
82. **Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schafer, S. M., Sewell, H. S., Brade, V., and Kraiczy, P.** (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. *Trends Microbiol* **10**:74-79.
83. **Kyei-Faried, S., Appiah-Denkyira, E., Brenya, D., Akuamoa-Boateng, A., and Visser, L.** (2006). The role of community-based surveillance in health outcomes measurement. *Ghana Med J* **40**:26-30.

84. **Ladel, C. H., Szalay, G., Riedel, D., and Kaufmann, S. H.** (1997). Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun* **65**:1936-1938.
85. **Lagarigue, V., Portaels, F., Meyers, W. M., and Aguiar, J.** (2000). Buruli ulcer: risk of bone involvement! A propos of 33 cases observed in Benin. *Med Trop* **60**:262-266.
86. **Lane, R. S., Moss, R. B., Hsu, Y. P., Wei, T., Mesirov, M. L., and Kuo, M. M.** (1999). Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. *Am J Trop Med Hyg* **61**:850-859.
87. **Lavender, C. J., Senanayake, S. N., Fyfe, J. A., Buntine, J. A., Globan, M., Stinear, T. P., Hayman, J. A., and Johnson, P. D.** (2007). First case of *Mycobacterium ulcerans* disease (Bairnsdale or Buruli ulcer) acquired in New South Wales. *Med J Aust* **186**:62-63.
88. **Lawrie, C. H., Randolph, S. E., and Nuttall, P. A.** (1999). *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Exp Parasitol* **93**:207-214.
89. **Lawrie, C. H., Sim, R. B., and Nuttall, P. A.** (2005). Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Mol Immunol* **42**:31-38.
90. **Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., and Godfroid, E.** (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J Biol Chem* **277**:10083-10089.
91. **Lehman, L., Simonet, V., Saunderson, P., and Agbenorku, P.** (2006) *Ulcère de Buruli: Prévention des incapacités (POD)*, Organisation Mondiale de la Santé ed.
92. **Lerner, E. A., and Shoemaker, C. B.** (1992). Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem* **267**:1062-1066.
93. **Lin, Y., Zhang, M., Hofman, F., Gong, J., and Barnes, P.** (1996). Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* **64**:1351-1356.
94. **Marsollier, L., Andre, J. P., Frigui, W., Reyset, G., Milon, G., Carbonnelle, B., Aubry, J., and Cole, S. T.** (2007). Early trafficking events of *Mycobacterium ulcerans* within *Naucoris cimicoides*. *Cell Microbiol* **9**:347-355.
95. **Marsollier, L., Aubry, J., Coutanceau, E., Andre, J. P., Small, P. L., Milon, G., Legras, P., Guadagnini, S., Carbonnelle, B., and Cole, S. T.** (2005). Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. *Cell Microbiol* **7**:935-943.
96. **Marsollier, L., Aubry, J., Milon, G., and Brodin, P.** (2007). Aquatic insects and transmission of *Mycobacterium ulcerans*. *Med Sci* **23**:572-575.

97. **Marsollier, L., Aubry, J., Saint-Andre, J. P., Robert, R., Legras, P., Manceau, A. L., Bourdon, S., Audrain, C., and Carbonnelle, B.** (2003). Ecology and transmission of *Mycobacterium ulcerans*. *Pathol Biol* **51**:490-5.
98. **Marsollier, L., Brodin, P., Jackson, M., Kordulakova, J., Tafelmeyer, P., Carbonnelle, E., Aubry, J., Milon, G., Legras, P., Andre, J. P., Leroy, C., Cottin, J., Guillou, M. L., Reyset, G., and Cole, S. T.** (2007). Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog* **3**:e62.
99. **Marsollier, L., Deniaux, E., Brodin, P., Marot, A., Wondje, C. M., Saint-Andre, J. P., Chauty, A., Johnson, C., Tekiaia, F., Yeramian, E., Legras, P., Carbonnelle, B., Reyset, G., Eyangoh, S., Milon, G., Cole, S. T., and Aubry, J.** (2007). Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. *PLoS Med* **4**:288-296.
100. **Marsollier, L., Robert, R., Aubry, J., Saint Andre, J. P., Kouakou, H., Legras, P., Manceau, A. L., Mahaza, C., and Carbonnelle, B.** (2002). Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* **68**:4623-4628.
101. **Marsollier, L., Severin, T., Aubry, J., Merritt, R. W., Saint Andre, J. P., Legras, P., Manceau, A. L., Chauty, A., Carbonnelle, B., and Cole, S. T.** (2004). Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* **70**:6296-6298.
102. **Marsollier, L., Stinear, T., Aubry, J., Saint Andre, J. P., Robert, R., Legras, P., Manceau, A. L., Audrain, C., Bourdon, S., Kouakou, H., and Carbonnelle, B.** (2004). Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *Appl Environ Microbiol* **70**:1097-1103.
103. **Marston, B. J., Diallo, M. O., Horsburgh, C. R., Jr., Diomande, I., Saki, M. Z., Kanga, J. M., Patrice, G., Lipman, H. B., Ostroff, S. M., and Good, R. C.** (1995). Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* **52**:219-224.
104. **Mbow, M. L., Bleyenbergh, J. A., Hall, L. R., and Titus, R. G.** (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* **161**:5571-5577.
105. **McCallum, P.** (1948). A new mycobacterial infection in man : clinical aspects. *J Path Bact* **60**:60-102.
106. **Menard, A., Couppie, P., Sainte-Marie, D., and Pradinaud, R.** (2003). Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection by PCR: report of 3 cases observed in French Guiana. *Bull Soc Pathol Exot* **96**:403-405.

107. **Meyers, W. M., Connor, D. H., McCullough, B., Bourland, J., Moris, R., and Proos, L.** (1974). Distribution of *Mycobacterium ulcerans* infections in Zaire, including the report of new foci. *Ann Soc Belg Med Trop* **54**:147-157.
108. **Milleron, R. S., Ribeiro, J. M., Elnaime, D., Soong, L., and Lanzaro, G. C.** (2004). Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **70**:278-285.
109. **Morand, J.-J., Maslin, J., and Darie, H.** (2005). Manifestations cutanéomuqueuses des mycobactéries environnementales (dont *Mycobacterium ulcerans*). *EMC - Dermatologie-Cosmétologie* **2**:65-91.
110. **Mori, A., and Ohba, S.** (2004). Field observations of predation on snakes by the giant water bug. *Bull.-Herpetol. Soc. Jpn.* **2004**:78-81.
111. **Morris, R. V., Shoemaker, C. B., David, J. R., Lanzaro, G. C., and Titus, R. G.** (2001). Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* **167**:5226-5230.
112. **Mve-Obiang, A., Lee, R. E., Portaels, F., and Small, P. L.** (2003). Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infect Immun* **71**:774-783.
113. **Mve-Obiang, A., Lee, R. E., Umstot, E. S., Trott, K. A., Grammer, T. C., Parker, J. M., Ranger, B. S., Grainger, R., Mahrous, E. A., and Small, P. L.** (2005). A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of *Xenopus* species with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the *Mycobacterium ulcerans* macrolide toxin. *Infect Immun* **73**:3307-3312.
114. **Noeske, J., Kuaban, C., Rondini, S., Sorlin, P., Ciaffi, L., Mbuagbaw, J., Portaels, F., and Pluschke, G.** (2004). Buruli ulcer disease in Cameroon rediscovered. *Am J Trop Med Hyg* **70**:520-526.
115. **Norsworthy, N. B., Sun, J., Elnaiem, D., Lanzaro, G., and Soong, L.** (2004). Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect Immun* **72**:1240-1247.
116. **Nuttall, P. A., Paesen, G. C., Lawrie, C. H., and Wang, H.** (2000). Vector-host interactions in disease transmission. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**:381-6.
117. **Ohba, S.-y., and Nakasuji, F.** (2006). Dietary items of predacious aquatic bugs (Nepoidea: Heteroptera) in Japanese wetlands. *Limnology* **7**:41-43.
118. **Okenu, D. M., Ofielu, L. O., Easley, K. A., Guarner, J., Spotts Whitney, E. A., Raghunathan, P. L., Stienstra, Y., Asamoah, K., van der Werf, T. S., van der Graaf, W. T., Tappero, J. W., Ashford, D. A., and King, C. H.** (2004). Immunoglobulin M antibody

responses to *Mycobacterium ulcerans* allow discrimination between cases of active Buruli ulcer disease and matched family controls in areas where the disease is endemic. Clin Diagn Lab Immunol **11**:387-391.

119. **Oliveira, M. S., Fraga, A. G., Torrado, E., Castro, A. G., Pereira, J. P., Filho, A. L., Milanezi, F., Schmitt, F. C., Meyers, W. M., Portaels, F., Silva, M. T., and Pedrosa, J.** (2005). Infection with *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice. Infect Immun **73**:6299-6310.
120. **Oluwasanmi, J. O., Solankee, T. F., Olurin, E. O., Itayemi, S. O., Alabi, G. O., and Lucas, A. O.** (1976). *Mycobacterium ulcerans* (Buruli) skin ulceration in Nigeria. Am J Trop Med Hyg **25**:122-128.
121. **Pahlevan, A. A., Wright, D. J., Andrews, C., George, K. M., Small, P. L., and Foxwell, B. M.** (1999). The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. J Immunol **163**:3928-3935.
122. **Palosuo, K., Brummer-Korvenkontio, H., Mikkola, J., Sahi, T., and Reunala, T.** (1997). Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. Int Arch Allergy Immunol **114**:367-72.
123. **Parsons, M. C.** (1972). Respiratory significance of the thoracic and abdominal morphology of *Belostoma* and *Ranatra* (insecta, heteroptera). Zoomorphology **73**:163-194.
124. **Pechova, J., Stepanova, G., Kovar, L., and Kopecky, J.** (2002). Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. Folia Parasitol (Praha) **49**:153-159.
125. **Pereira, D. L. V., MeloII, d. A. L., and HamadaI, N.** (2007). Keys to families and genera of gerromorpha and nepomorpha (Insecta: Heteroptera) in the central Amazonia, Brazil. Neotropical Entomology **36**:210-228.
126. **Phillips, R., Horsfield, C., Kuijper, S., Sarfo, S. F., Obeng-Baah, J., Etuaful, S., Nyamekye, B., Awuah, P., Nyarko, K. M., Osei-Sarpong, F., Lucas, S., Kolk, A. H., and Wansbrough-Jones, M.** (2006). Cytokine response to antigen stimulation of whole blood from patients with *Mycobacterium ulcerans* disease compared to that from patients with tuberculosis. Clin Vaccine Immunol **13**:253-257.
127. **Phillips, R., Horsfield, C., Mangan, J., Laing, K., Etuaful, S., Awuah, P., Nyarko, K., Osei-Sarpong, F., Butcher, P., Lucas, S., and Wansbrough-Jones, M.** (2006). Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and correlation with local inflammatory response. Infect Immun **74**:2917-2924.
128. **Pimsler, M., Sponsler, T. A., and Meyers, W. M.** (1988). Immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. J Infect Dis **157**:577-580.

129. **Poinsignon, A., Cornelie, S., Remoue, F., Grebaut, P., Courtin, D., Garcia, A., and Simondon, F.** (2007). Human/vector relationships during human African trypanosomiasis: initial screening of immunogenic salivary proteins of *Glossina* species. *Am J Trop Med Hyg* **76**:327-333.
130. **Portaels, F.** (1995). Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clinics Dermatol* **13**:207-222.
131. **Portaels, F.** (1989). Epidemiology of ulcers due to *Mycobacterium ulcerans*. *Ann Soc Belg Med Trop* **69**:91-103.
132. **Portaels, F., Elsen, P., Guimaraes-Peres, A., Fonteyne, P. A., and Meyers, W. M.** (1999). Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* **353**:986.
133. **Portaels, F., Johnson, P., and Meyers, W.** (2001). Ulcère de Buruli: Diagnostic de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.4. Organisation Mondiale de la Santé.
134. **Portaels, F., Meyers, W. M., Ablordey, A., Castro, A. G., Chemlal, K., de Rijk, P., Elsen, P., Fissette, K., Fraga, A. G., Lee, R., Mahrous, E., Small, P. L., Stragier, P., Torrado, E., Van Aerde, A., Silva, M. T., and Pedrosa, J.** (2008). First Cultivation and Characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the Environment. *PLoS Negl Trop Dis* **2**:e178.
135. **Pouillot, R., Matias, G., Mbondji-Wonje, C., Françoise, P., and Valin, n.** (2007). Risk Factors for Buruli Ulcer Disease: a case-control study in Cameroon *Plos Neg Trop Dis* **1**:e101.
136. **Pradinaud, R.** (1980). Mycobactérioses cutanées atypiques, p. B10-12, *Encycl Med Chir Dermatologie*.
137. **Prevot, G., Bourreau, E., Pascalis, H., Pradinaud, R., Tanghe, A., Huygen, K., and Launois, P.** (2004). Differential production of systemic and intralesional gamma interferon and interleukin-10 in nodular and ulcerative forms of Buruli disease. *Infect Immun* **72**:958-965.
138. **Prevot, P. P., Adam, B., Boudjeltia, K. Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., Brasseur, R., Vanhaeverbeek, M., Vanhamme, L., and Godfroid, E.** (2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J Biol Chem* **281**:26361-26369.
139. **Prevot, P. P., Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L., and Godfroid, E.** (2007). Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine* **25**:3284-3292.
140. **Pszolla, N., Sarkar, M. R., Strecker, W., Kern, P., Kinzl, L., Meyers, W. M., and Portaels, F.** (2003). Buruli ulcer: a systemic disease. *Clin Infect Dis* **37**:78-82.

141. **Quek T Y.J. , Athan E , Henry M J. , JA., P., Jane Redden-Hoare, Andrew Hughes, and Johnson., P. D. R.** (2007). Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection, southeastern Australia. . *Emerg Infect Dis* **13**:1661-1666
142. **Qureshi, A. A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R. D., and Lerner, E. A.** (1996). Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg* **54**:665-671.
143. **Raghunathan, P. L., Whitney, E. A., Asamoah, K., Stienstra, Y., Taylor, T. H., Jr., Amofah, G. K., Ofori-Adjei, D., Dobos, K., Guarner, J., Martin, S., Pathak, S., Klutse, E., Etuaful, S., van der Graaf, W. T., van der Werf, T. S., King, C. H., Tappero, J. W., and Ashford, D. A.** (2005). Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* Infection): results from a case-control study in Ghana. *Clin Infect Dis* **40**:1445-1453.
144. **Ramachandra, R. N., and Wikel, S. K.** (1992). Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: *Ixodidae*): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J Med Entomol* **29**:818-826.
145. **Ranger, B. S., Mahrous, E. A., Mosi, L., Adusumilli, S., Lee, R. E., Colorni, A., Rhodes, M., and Small, P. L.** (2006). Globally distributed mycobacterial fish pathogens produce a novel plasmid-encoded toxic macrolide, mycolactone F. *Infect Immun* **74**:6037-6045.
146. Rapport récapitulatif de la Réunion annuelle sur l'ulcère de Buruli (avril 2007). Organisation Mondiale de la Santé
147. **Ravisse, P.** (1977). [Skin ulcer caused by *Mycobacterium ulcerans* in Cameroon. I. Clinical, epidemiological and histological study]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **70**:109-124.
148. **Ravisse P., Roques M.C., Le Bourthe F., and Tchuembou J.** (1975). Une affection méconnue au Cameroun : l'ulcère à mycobactérie. *Médecine tropicale* **35**:471-474.
149. Recommandations provisoires pour certains antibiotiques dans la prise en charge de linfection à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli).(2004). Organisation Mondiale de la Santé WHO/CDS/CPE/GBUI/2004.10.
150. **Rees, A. R., and Offord, R. E.** (1969). Studies on the protease and other enzymes from the venom of *Lethocerus cordofanus*. *Nature* **221**:675-677.
151. **Remoue, F., Alix, E., Cornelie, S., Sokhna, C., Cisse, B., Doucoure, S., Mouchet, F., Boulanger, D., and Simondon, F.** (2007). IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop* **104**:108-115.
152. **Remoue, F., Cisse, B., Ba, F., Sokhna, C., Herve, J. P., Boulanger, D., and Simondon, F.** (2006). Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100**:363-370.

153. **Remus, N., El Baghdadi, J., Casanova, J.-L., and Abel, L.** (2004). Génétique humaine de la tuberculose. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* **7**:121-126.
154. **Reunala, T., Brummer-Korvenkontio, H., Palosuo, K., Miyanij, M., Ruiz-Maldonado, R., Love, A., Francois, G., and Palosuo, T.** (1994). Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol* **104**:366-371.
155. **Roger, M., Levee, G., Chanteau, S., Gicquel, B., and Schurr, E.** (1997). No evidence for linkage between leprosy susceptibility and the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene in French Polynesia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* **65**:197-202.
156. **Rondini, S., Mensah-Quainoo, E., Troll, H., Bodmer, T., and Pluschke, G.** (2003). Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *J Clin Microbiol* **41**:4231-7.
157. **Ross, B. C., Johnson, P. D., Oppedisano, F., Marino, L., Sievers, A., Stinear, T., Hayman, J. A., Veitch, M. G., and Robins-Browne, R. M.** (1997). Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. *Appl Environ Microbiol* **63**:4135-4138.
158. **Ross, B. C., Marino, L., Oppedisano, F., Edwards, R., Robins-Browne, R. M., and Johnson, P. D.** (1997). Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Clin Microbiol* **35**:1696-1700.
159. **Sano, C., Sato, K., Shimizu, T., Kajitani, H., Kawauchi, H., and Tomioka, H.** (1999). The modulating effects of proinflammatory cytokines interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), and immunoregulating cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta), on anti-microbial activity of murine peritoneal macrophages against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Clin Exp Immunol* **115**:435-442.
160. **Schipper, H. S., Rutgers, B., Huitema, M. G., Etuaful, S. N., Westenbrink, B. D., Limburg, P. C., Timens, W., and van der Werf, T. S.** (2007). Systemic and local interferon-gamma production following *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clin Exp Immunol* **150**:451-459.
161. **Schuh, R. T., and Slater, J. A.** (1995) True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history, Cornell University Press ed.
162. **Schwartz, B. S., Ford, D. P., Childs, J. E., Rothman, N., and Thomas, R. J.** (1991). Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *Am J Epidemiol* **134**:86-95.

163. **Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M., and Goldstein, M. D.** (1990). Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* **132**:58-66.
164. **Selvaraj, P., Chandra, G., Kurian, S. M., Reetha, A. M., Charles, N., and Narayanan, P. R.** (2002). NRAMP1 gene polymorphism in pulmonary and spinal tuberculosis. *Current Science* **82**:451-454.
165. **Selwyn, P., Hartel, D., Lewis, V., Schoenbaum, E., Vermund, S., Klein, R., Walker, A., and Friedland, G.** (1989). A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **320**:545-550.
166. **Sites, R. W., and Polhemus, J. T.** (1994). Nepidae (Hemiptera) of United States and Canada. *Ann Entomol Soc Am* **87**:027-042.
167. **Snyder, D. S., and Small, P. L.** (2003). Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Mycobacterium ulcerans*. *Microb Pathog* **34**:91-101.
168. **Soares, M. B., David, J. R., and Titus, R. G.** (1997). An *in vitro* model for infection with *Leishmania major* that mimics the immune response in mice. *Infect Immun* **65**:2837-2845.
169. **Stanford, J. L., Revill, W. D., Gunthorpe, W. J., and Grange, J. M.** (1975). The production and preliminary investigation of Burulin, a new skin test reagent for *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Hyg (Lond)* **74**:7-16.
170. **Stienstra, Y., Van der Graaf, W. T., Te Meerman, G. J., The, T. H., D Leij, L. F., and Van der Werf, T. S.** (2001). Susceptibility to development of *Mycobacterium ulcerans* disease: review of possible risk factors. *Trop Med Int Health* **6**:554-562.
171. **Stienstra, Y., van der Werf, T. S., van der Graaf, W. T., Secor, W. E., Kihlstrom, S. L., Dobos, K. M., Asamo, K., Quarshi, E., Etuafu, S. N., Klutse, E. Y., and King, C. H.** (2004). Buruli ulcer and schistosomiasis: no association found. *Am J Trop Med Hyg* **71**:318-321.
172. **Stinear, T., Davies, J. K., Jenkin, G. A., Hayman, J. A., Oppedisano, F., and Johnson, P. D.** (2000). Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**:3206-3213.
173. **Stinear, T. P., Mve-Obiang, A., Small, P. L., Frigui, W., Pryor, M. J., Brosch, R., Jenkin, G. A., Johnson, P. D., Davies, J. K., Lee, R. E., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S. F., Leadlay, P. F., and Cole, S. T.** (2004). Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci* **101**:1345-1349.

174. **Stinear, T. P., Pryor, M. J., Porter, J. L., and Cole, S. T.** (2005). Functional analysis and annotation of the virulence plasmid pMUM001 from *Mycobacterium ulcerans*. *Microbiology* **151**:683-692.
175. **Stinear, T. P., Seemann, T., Pidot, S., Frigui, W., Reyset, G., Garnier, T., Meurice, G., Simon, D., Bouchier, C., Ma, L., Tichit, M., Porter, J. L., Ryan, J., Johnson, P. D., Davies, J. K., Jenkin, G. A., Small, P. L., Jones, L. M., Tekaiia, F., Laval, F., Daffe, M., Parkhill, J., and Cole, S. T.** (2007). Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res* **17**:192-200.
176. **Stoffel, V., Barthelme, B., and Chague, F.** (2005). Tropical ecopathology: up hill and down dale Buruli ulcer. *Sante Publique* **17**:191-7.
177. **Stragier, P., Ablordey, A., Bayonne, L. M., Lugor, Y. L., Sindani, I. S., Suykerbuyk, P., Wabinga, H., Meyers, W. M., and Portaels, F.** (2006). Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* isolates from Africa. *Emerg Infect Dis* **12**:844-847.
178. **Stragier, P., Ablordey, A., Durnez, L., and Portaels, F.** (2007). VNTR analysis differentiates *Mycobacterium ulcerans* and *IS 2404* positive mycobacteria. *Syst Appl Microbiol* **30**:525-530.
179. **Swart, C. C., Deaton, L. E., and Felgenhauer, B. E.** (2006). The salivary gland and salivary enzymes of the giant waterbugs (Heteroptera; Belostomatidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **145**:114-122.
180. **Swart, C. C., and Felgenhauer, B. E.** (2003). Structure and function of the mouthparts and salivary gland complex of the giant waterbug, *Belostoma lutarium* (Stål) (Hemiptera: Belostomatidae). *Ann Entomol Soc Am* **96**:870-882.
181. **Theodos, C. M., and Titus, R. G.** (1993). Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. *Parasite Immunol* **15**:481-487.
182. **Thomssen, H.** (2002). Buruli ulcer. A mycobacterial skin disease. *Hautarzt* **53**:334-337.
183. **Titus, R. G., Bishop, J. V., and Mejia, J. S.** (2006). The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* **28**:131-41.
184. **Titus, R. G., and Ribeiro, J. M.** (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* **239**:1306-1308.
185. **Titus, R. G., Theodos, C. M., Shankar, A. H., and Hall, L. R.** (1994). Interactions between *Leishmania major* and macrophages. *Immunol Ser* **60**:437-459.

186. **Torrado, E., Adusumilli, S., Fraga, A. G., Small, P. L., Castro, A. G., and Pedrosa, J.** (2007). Mycolactone-mediated inhibition of tumor necrosis factor production by macrophages infected with *Mycobacterium ulcerans* has implications for the control of infection. *Infect Immun* **75**:3979-3988.
187. **Torrado, E., Fraga, A. G., Castro, A. G., Stragier, P., Meyers, W. M., Portaels, F., Silva, M. T., and Pedrosa, J.** (2007). Evidence for an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* **75**:977-987.
188. **Uganda, Buruli, and Group.** (1971). Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **65**:763-775.
189. **Ulcère de Buruli (infection à *Mycobacterium ulcerans*) Surveillance et lutte.**(mai 2004). Cinquante-septième Assemblée mondiale de la Santé, Organisation Mondiale de la Santé. Genève (WHA57/2004/REC/1):1-2.
190. **UmBoock, A., and Staeheli, R.** (2004). L'ulcère de Buruli au Cameroun: le résultat d'une violation des normes sociales ? *Bulletin de Medicus Mundi Suisse* **92**:9-11.
191. **Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E. D., Sacks, D. L., and Ribeiro, J. M.** (2001). Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* **194**:331-342.
192. **Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., and Ribeiro, J. M.** (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* **275**:18717-18723.
193. **van Dam, A. P., Oei, A., Jaspars, R., Fijen, C., Wilske, B., Spanjaard, L., and Dankert, J.** (1997). Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease. *Infect Immun* **65**:1228-1236.
194. **Van der Werf, T. S., Stinear, T., Stienstra, Y., van der Graaf, W. T., and Small, P. L.** (2003). Mycolactones and *Mycobacterium ulcerans* disease. *Lancet* **362**:1062-1064.
195. **Veitch, M. G., Johnson, P. D., Flood, P. E., Leslie, D. E., Street, A. C., and Hayman, J. A.** (1997). A large localized outbreak of *Mycobacterium ulcerans* infection on a temperate southern Australian island. *Epidemiol Infect* **119**:313-318.
196. **Villiers, A.** (1952) Hémiptères de l'Afrique noire (punaises et cigales). IFAN, Dakar
197. **Wakkach, A., Cottrez, F., and Groux, H.** (2000). Can interleukin-10 be used as a true immunoregulatory cytokine ? *Eur Cytokine Netw* **11**:153-160.

198. **Wang, H., and Nuttall, P. A.** (1994). Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* **109**:525-30.
199. **Westenbrink, B. D., Stienstra, Y., Huitema, M. G., Thompson, W. A., Klutse, E. O., Ampadu, E. O., Boezen, H. M., Limburg, P. C., and van der Werf, T. S.** (2005). Cytokine responses to stimulation of whole blood from patients with Buruli ulcer disease in Ghana. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:125-129.
200. **Wikel, S. K.** (1996). Tick modulation of host cytokines. *Exp Parasitol* **84**:304-309.
201. **Williamson, H. R., M. E. Benbow, K. D. Nguyen, D. C. Beachboard, R. K. Kimbirauskas, M. D. McIntosh, C. Quaye, E. O. Ampadu, D. Boakye, R. W. Merritt, and P. L. Small.** (2008). Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli Ulcer Endemic and Non-Endemic Aquatic Sites in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* **2**:e205
202. World health Organization. Buruli ulcer. Disponible sur : <http://www.who.int/buruli/photos/nonulcerative/en/index.html>.
203. World health Organization. Buruli ulcer endemic countries. Disponible sur : <http://www.who.int/buruli/country/en/>.
204. World Health Organization. Buruli ulcer: Epidemiology Risk Factors and Mode of Transmission. Disponible sur : <http://www.afro.who.int/buruli/epidemiology.html>.
205. **Yadav, P. R.** (1992). Histological evidence on the secretory activity of the accessory salivary gland of *Lethocerus indicus* Lep. and Serv. (Heteroptera-Belostomatidae). *Proc. Natl. Acad. Sci., India* **62**:284-287.
206. **Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R., Weinberg, K., Rea, T., Bloom, B., and Modlin, R.** (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions *Science* **254**:277-279.
207. **Zeidner, N., Dreitz, M., Belasco, D., and Fish, D.** (1996). Suppression of acute *Ixodes scapularis*-induced *Borrelia burgdorferi* infection using tumor necrosis factor-alpha, interleukin-2, and interferon-gamma. *J Infect Dis* **173**:187-195.
208. **Zhang, M., Lin, Y., Iyer, D. V., Gong, J., Abrams, J. S., and Barnes, P. F.** (1995). T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**:3231-3234.

Annexes

ANNEXE 1

Risk Factors for Buruli Ulcer: A Case Control Study in Cameroon

Régis Pouillot^{1*}, Gonçalo Matias^{1,2}, Christelle Mbondji Wondje³, Françoise Portaels⁴, Nadia Valin², François Ngos⁵, Adelaïde Njikap⁶, Laurent Marsollier^{7,8}, Arnaud Fontanet², Sara Eyangoh^{3*}

1 Laboratoire d'Epidémiologie et de Santé Publique, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon, **2** Unité d'Epidémiologie des Maladies Emergentes, Institut Pasteur, Paris, France, **3** Laboratoire des Mycobactéries, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon, **4** Mycobacterium Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, **5** Hôpital de District d'Akonolinga, Ministère de la Santé Publique, Yaoundé, Cameroon, **6** Médecins Sans Frontières-Suisse, Yaoundé, Cameroon, **7** Groupe d'Etude des Interactions Hôtes Parasites, Université d'Angers, Angers, France, **8** Equipe Avenir Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Pasteur Korea, Seongbuk-gu, Seoul, Korea

Abstract

Background: Buruli ulcer is an infectious disease involving the skin, caused by *Mycobacterium ulcerans*. This disease is associated with areas where the water is slow-flowing or stagnant. However, the exact mechanism of transmission of the bacillus and the development of the disease through human activities is unknown.

Methodology/Principal Findings: A case-control study to identify Buruli ulcer risk factors in Cameroon compared case-patients with community-matched controls on one hand and family-matched controls on the other hand. Risk factors identified by the community-matched study (including 163 pairs) were: having a low level of education, swamp wading, wearing short, lower-body clothing while farming, living near a cocoa plantation or woods, using adhesive bandages when hurt, and using mosquito coils. Protective factors were: using bed nets, washing clothes, and using leaves as traditional treatment or rubbing alcohol when hurt. The family-matched study (including 118 pairs) corroborated the significance of education level, use of bed nets, and treatment with leaves.

Conclusions/Significance: Covering limbs during farming activities is confirmed as a protective factor guarding against Buruli ulcer disease, but newly identified factors including wound treatment and use of bed nets may provide new insight into the unknown mode of transmission of *M. ulcerans* or the development of the disease.

Citation: Pouillot R, Matias G, Wondje CM, Portaels F, Valin N, et al. (2007) Risk Factors for Buruli Ulcer: A Case Control Study in Cameroon. PLoS Negl Trop Dis 1(3): e101. doi:10.1371/journal.pntd.0000101

Editor: Pamela Small, University of Tennessee, United States of America

Received: March 9, 2007; **Accepted:** September 6, 2007; **Published:** December 19, 2007

Copyright: © 2007 Pouillot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was financially supported by Direction des affaires internationales-Institut Pasteur (Paris), Programme Transversaux de Recherche-Institut Pasteur (Paris), Association Française Raoul Follereau, the World Health Organization/Global Buruli Ulcer Initiative and the French Cooperation in Cameroon. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

*E-mail: pouillot@pasteur-yaounde.org (RP); eyangoh@pasteur-yaounde.org (SE)

Introduction

Buruli ulcer (BU) is an infectious disease involving the skin, caused by *Mycobacterium ulcerans*, characterized by a painless nodule, papule, plaque or edema, evolving into a painless ulcer with undermined edges, often leading to disabling sequelae [1]. BU has been reported from 30 countries in Africa, the Americas, Asia and the Western Pacific, mainly in tropical and subtropical regions [2,3]. The epidemiologic pattern is defined by the presence of confined foci where BU is endemic [1,3], with prevalence ranging from a few cases to up to 22% in given communities [4]. The preventive and therapeutic tools for reducing the impact of this disease are still very limited [5,6].

In Cameroon, BU was first described in 1969 in 47 patients in a well confined area located in the neighborhood of the villages of Ayos and Akonolinga ("Province du Centre"), in the valley of the Nyong river [7]. The Nyong river basin in this area is characteristically known for its swampy banks (Figure 1). Cocoa and coffee farming was the main resource activity until the in-

ternational pricing crisis of the 1990s. Known in this area as "Atom", this disease did not arouse particular interest among public health professionals until the beginning of this century, when BU was "rediscovered" [8]. A cross-sectional study in the Nyong river basin in 2001 identified 436 patients with active or inactive BU, giving an estimated prevalence of 0.44% [8]. It is unclear whether BU has re-emerged or if cases had been undiagnosed due to the fear of stigmatization [9–11].

Buruli ulcers are associated with areas where the water is slow flowing or stagnant [1,12–15]. Ecologic transformations have been frequently associated with occurrence or increase in BU incidence [16]. Nevertheless, the exact mechanism of transmission of the mycobacterium and the development of the disease through water-related human activities is unknown. Previous trauma at the lesion site has been recognized as a route of infection [17]. More recently, insects have been suggested to be involved in transmission of *M. ulcerans*, either through bites or by contamination of a previous trauma site [18]. This hypothesis is supported by experimental evidence showing that *M. ulcerans* can be transmitted

Author Summary

Buruli ulcer (BU) is a neglected tropical infectious disease caused by *Mycobacterium ulcerans*. While BU is associated with areas where the water is slow-flowing or stagnant, the exact mechanism of transmission of the bacillus is unknown, impairing efficient control programs. Two hypotheses are proposed in the literature: previous trauma at the lesion site, and transmission through aquatic insect bites. Using results from a face-to-face questionnaire, our study compared characteristics from Cameroonian patients with Buruli ulcer to people without Buruli ulcer. This latter group of people was chosen within the community or within the family of case patients. The statistical analysis confirmed some well-known factors associated with the presence of BU, such as wearing short lower-body clothing while farming, but it showed that the use of bed nets and the treatment of wounds with leaves is less frequent in case patients. These newly identified factors may provide new insight into the mode of transmission of *M. ulcerans*. The implication of domestic or peridomestic insects, suggested by the influence of the use of bed nets, should be confirmed in specific studies.

to laboratory mice by the bite of aquatic bugs (*Naucoridae*) infected with this organism [19].

Few case-control studies have been published [4,12,20–24] and none of these concern Cameroon. We conducted a case-control investigation in Cameroon seeking for environmental and behavioral risk factors for BU, with two categories of controls: *i*) an age- and community-matched control and *ii*) a family-matched control.

Methods

Study design and case definitions

A double-matched case-control study was designed in the two health districts of Cameroon where BU is endemic, i.e. Akonolinga and Ayos.

A probable case of BU was defined as a patient presenting with active or inactive BU [1] in one of the two BU treatment centers in the area. The clinical diagnosis of BU was made by trained and specialized health practitioners in charge of the BU treatment

centers. A confirmed case was defined as a probable case with evidence of *M. ulcerans* infection, indicated by a Ziehl-Neelsen test for acid-fast bacilli in smears of lesion exudates [25], a positive polymerase chain reaction (PCR) [26] or both. Laboratory analyses were done at the mycobacteria reference laboratory in Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon.

An eligible control was defined as a person who had no signs or symptoms of active or inactive BU. One age- and village-matched control was selected. A control child for child case-patients attending primary school was randomly sampled within the same classroom. Controls for other children and adult case-patients were randomly sampled within the village. An unaffected member of the family of each patient was enrolled as a family-matched control (formally: the nearest brother/sister in age). No family-matched control was enrolled when the patient was a single child or when his/her siblings lived out of the study area.

Study enrollment was voluntary. Written informed consent was obtained from case-patients and control subjects or from their parents or guardians. All BU case-patients had received or were currently receiving free treatment for BU in one of the two BU treatment centers. The study protocol was approved by the National Ethics Committee and the Cameroon Ministry of Public Health.

Sample size

The sample size for matched case-control studies [27] was evaluated 168 pairs of one case patient/one control (control case ratio 1, odds ratio ≥ 2 , power $(1-\beta)$ 0.8, significance level (α) 0.05, correlation of exposure between pairs in the case-control set (ϕ) 0.2, calculated using the SAMPSI_MCC Stata (Stata Corporation) module [28]).

Data Collection

In February and March 2006, study personnel administered two standard questionnaires to participants concerning demographic, environmental and behavioral risk factors (see supporting information file). The first questionnaire concerned familial items (e.g. house characteristics and environment) and was given to each case-patient and his/her matched community control. The second questionnaire concerned individual items (e.g. activity and personal exposure to water) and were responded to by all case-patients and controls. All questions were close-ended. Questionnaires were verbally administered in French and/or in Ewondo (the local language). Both languages are regularly spoken irrespective to educational level of inhabitants. Case-patients were interviewed about their habits the year before onset of symptoms; controls were interviewed about their habits the year before the interview.

Statistical methods

Community-matched and family-matched case-control studies were analyzed independently. Univariate and multivariate conditional logistic regressions were used to assess the link between variables and BU within the matched group of one case-patient/one control, using the R software (The R Core Team [29], “clogit” function, “survival” library).

Following the univariate analysis, variables that attained a p -value < 0.10 were retained for multivariable analysis. A procedure using backward and forward selection based on the Likelihood Ratio Test (LRT) was used to obtain the final model.

The same initial multivariate model, excluding familial items, was used for the intra-familial case-control study, followed by the same algorithm, based on the LRT, for selection of variables.



Figure 1. People having a bath for leisure in the Nyong River near Akonolinga (Cameroon).
doi:10.1371/journal.pntd.0000101.g001

Results

We enrolled 163 probable cases, 163 community-matched controls and 118 familial controls.

Characteristics of Case patients

Among the 163 probable cases, 111 (68%) were confirmed by a positive PCR. Six additional probable cases (4%) were confirmed by a single positive Ziehl-Neelsen test. The remaining probable case-patients had not been sampled for BU confirmation when symptoms were present and no sampling could be done at the time of the study as the lesions had healed. No significant difference was observed between probable cases and confirmed cases in terms of demographic data, type of first lesion, and localization of lesion (Table 1). Probable cases and confirmed cases were combined for the main analyses of the study and supplementary analyses using confirmed case-control pairs was done to corroborate results obtained from the whole dataset.

The median age of all recruited patients was 14 years (range: 1 to 78 years). However, male case-patients were generally younger than female case-patients (median age: 12 and 19, respectively; $p < 0.01$, nonparametric K-sample test for equality of medians).

Table 1. Characteristics of total cases, probable cases and confirmed cases.

Characteristics	Total cases (n, %)	Probable cases (n, %)	Confirmed cases (n, %)	p*
n	163 (100)	46 (28)	117 (72)	
Sex				
Female (n, %)	79 (48)	18 (39)	61 (52)	0.16 [†]
Male (n, %)	84 (52)	28 (61)	56 (48)	
Age (median, range)	14 (1–78)	15.5 (1–74)	13 (1–78)	0.30 ^{†‡}
<10	45 (28)	14 (3)	31 (27)	0.27 [†]
[10–15]	41 (25)	7 (15)	34 (29)	
[15–24]	38 (23)	11 (24)	27 (23)	
≥24	39 (24)	14 (30)	25 (21)	
First lesion [§]				0.10 [†]
papule	31 (19)	10 (22)	21 (18)	
nodule	60 (37)	11 (24)	49 (42)	
plaque	20 (12)	5 (11)	15 (13)	
edema	46 (28)	17 (37)	29 (25)	
active ulcers	5 (3)	3 (7)	2 (2)	
Localization*				
Leg	92 (58)	28 (62)	64 (56)	0.85 [†]
Arm	57 (36)	14 (31)	43 (38)	
Trunk	7 (4)	2 (4)	5 (4)	
Head	3 (2)	1 (2)	2 (2)	
Distal	103 (65)	31 (69)	72 (63)	0.58 [†]
Proximal/Trunk/Head	56 (35)	14 (31)	42 (37)	
Right side	57 (38)	14 (31)	43 (38)	0.46 [†]
Left side	92 (61)	28 (62)	64 (56)	

*Probable vs. confirmed cases, Fisher's exact test;

[†]Nonsignificant;

[‡]two sample t-test;

[§]one missing piece of data;

*four missing pieces of data

doi:10.1371/journal.pntd.0000101.t001

When interviewed, 25 patients had contracture deformities or scars and three had had an amputation. The first BU lesions in most cases occurred on the leg (92/159, 58%, data missing for 4 cases) or arm (57/159, 36%). Initial lesions occurred less frequently on the trunk (7/159, 4%) and head (3/159, 2%). More patients had lesions on a distal extremity (from the elbow to the hand and from the knee to the foot, 103/159, 65%) than on a proximal extremity, trunk or head (56/159, 35%, Fisher exact test: $p < 0.01$). When first BU lesions appeared on a limb, it was more frequently on the lower limbs than upper limbs (92 and 57, respectively; Fisher exact test: $p = 0.01$) and more frequently on the left side than on the right side (92 and 57, respectively; Fisher exact test: $p = 0.01$). There was no significant difference in this distribution of lesions associated with the sex or the age (<10 compared to >10 years) of case-patients.

Most case-patients (127/163, 76%) did not declare an association between the occurrence of their first lesion and a particular event. Nevertheless, 16/163 (10%) associated it with an injury, 15/163 (9%) with an insect bite and 8/163 (5%) with another event. While all case-patients had been treated in a hospital, as recruitment was hospital-based, 80/162 had been treated in parallel or consecutively by a traditional practitioner.

Case-/Community-matched control

Univariate Analysis (Table 2). We could only assess bacillus Calmette Guérin (BCG) vaccination by the presence of a scar, as vaccination records were generally missing. A scar was more frequently observed in the control population (Conditional logistic regression as in all the following text: $p = 0.04$). Few subjects reported a personal history or family history of tuberculosis. This was not significantly associated with BU. We assessed history of schistosomiasis based on the self-declaration of history of blood in the urine. Few subjects reported having a history of blood in urine, and this was not significantly associated with BU.

Based on the questionnaire about household environment, case-patients more frequently lived closer to the Nyong river than the median distance calculated for the studied population ($p = 0.04$). They also lived in the immediate neighborhood of a cocoa plantation ($p = 0.01$), a swamp ($p < 0.01$) and/or woods ($p = 0.01$). Whereas significantly more case-patients than controls reported sharing living space with goats ($p = 0.02$) and/or pigs ($p = 0.02$), there was no difference between these subjects regarding reports of sharing living space with domestic carnivores or poultry.

There was no significant difference between case-patients and controls with respect to the source of drinking water, i.e. water network, river or stream or borehole water. Cases declared that they washed clothes less frequently than controls ($p = 0.01$), and fetching water was not significantly associated with BU.

Case-patients reported that they had been bitten by insects more frequently than controls while they were in water or wading in mud ($p = 0.01$). They reported use of bed nets less frequently than controls ($p < 0.01$) and that they used mosquito coils instead ($p < 0.01$). Note that these two variables were negatively associated ($p < 0.01$), indicating that people use preferably one of these two methods to prevent insect bites.

Whereas case-patients more frequently used soap, water ($p = 0.01$) and adhesive bandages when hurt ($p < 0.01$), controls more frequently used rubbing alcohol ($p < 0.01$) and leaves ($p = 0.01$). The use of adhesive bandages was negatively associated with the use of leaves ($p = 0.01$) and the use of soap and water was negatively associated with the use of rubbing alcohol ($p = 0.03$).

Wading in the Nyong river swamp and wading in a river or a stream, though less frequent, was significantly associated with case-patients ($p < 0.01$ in both situations).

Table 2. Univariate analysis of selected variables for Buruli ulcer disease in Cameroon, Community-matched case-control study.

Characteristic	No. (%) of control subjects (n = 163)	No. (%) of case-subjects (n = 163)	Univariate OR (95% CI) *	p †
<i>Demographic</i>				
Ethnic group of the father: Maka/others	13 (8)	22 (14)	2.0 (0.90–4.5)	0.08
Ethnic group of the mother: Maka/others	14 (9)	16 (10)	1.2 (0.53–2.6)	0.68
Education level: Primary or any/Secondary or more	94 (58)	121 (74)	4.0 (1.9–8.3)	<0.01
<i>Economic level</i>				
Household spends <than 1 €/day/≥1 €/day‡	52 (32)	62 (38)	1.6 (0.86–2.8)	0.14
<i>Health</i>				
BCG scar: Yes/No	114 (70)	96 (59)	0.61 (0.38–0.97)	0.04
History of Tuberculosis: Yes/No	6 (4)	11 (7)	1.8 (0.67–5.0)	0.22
Family history of tuberculosis: Yes/No	17 (10)	14 (9)	1.2 (0.59–2.6)	0.57
Ever had blood in urine: Yes/No	5 (3)	5 (3)	1.0 (0.25–4.0)	1.0
<i>Household Environment</i>				
Mud wall: Yes/No	59 (36)	65 (40)	1.2 (0.74–1.8)	0.49
Mud floor: Yes/No	74 (45)	82 (50)	1.3 (0.78–2.0)	0.33
Within 15 min vs >15 min of the Nyong river	13 (8)	24 (15)	2.2 (1.0–4.9)	0.04
No. of people in household: >8 vs ≤ 8	71 (44)	78 (48)	1.2 (0.8–1.9)	0.42
Cocoa plantation in the immediate neighborhood: Yes/No	50 (31)	72 (44)	1.8 (1.1–2.8)	0.01
Coffee plantation in the immediate neighborhood: Yes/No	66 (40)	83 (51)	1.6 (1.0–2.5)	0.05
Bush in the immediate neighborhood: Yes/No	112 (69)	119 (73)	1.2 (0.76–2.0)	0.38
Woods in the immediate neighborhood: Yes/No	7 (4)	18 (11)	3.2 (1.2–8.7)	0.01
Swamp in the immediate neighborhood: Yes/No	21 (13)	45 (28)	2.7 (1.5–5.0)	<0.01
River in the immediate neighborhood: Yes/No	20 (12)	30 (18)	1.6 (0.87–3.0)	0.12
Share living space with goats: Yes/No	49 (30)	69 (42)	1.7 (1.1–2.8)	0.02
Share living space with poultry: Yes/No	116 (71)	127 (78)	1.6 (0.89–2.8)	0.11
Share living space with pigs: Yes/No	50 (31)	70 (43)	1.8 (1.1–3.0)	0.02
Share living space with cats: Yes/No	77 (47)	94 (58)	1.6 (1.0–2.5)	0.05
Share living space with dogs: Yes/No	62 (38)	77 (47)	1.4 (0.93–2.2)	0.10
<i>Primary source of drinking water</i>				
Network	39 (24)	37 (23)	1 (reference)	
River or stream	81 (50)	69 (42)	0.88 (0.46–1.7)	0.70
Borehole	43 (26)	57 (35)	1.4 (0.72–2.7)	0.32
<i>Insect bites/behavior</i>				
Received insect bite in water/mud: Yes/No	48 (29)	70 (43)	1.8 (1.1–2.8)	0.01
Use bed nets: No/Yes	51 (31)	74 (45)	2.0 (1.2–3.4)	<0.01
Use mosquito coils: Yes/No	84 (51)	110 (67)	2.1 (1.3–3.4)	<0.01
<i>Treatment when hurt</i>				
Soap and water: Yes/No	36 (22)	57 (35)	1.9 (1.1–3.1)	0.01
Rubbing alcohol: No/Yes	85 (52)	120 (74)	2.8 (1.6–4.6)	<0.01
Leaves: No/Yes	138 (84)	153 (94)	2.7 (1.2–5.7)	0.01
Adhesive bandage: Yes/No	21 (13)	50 (31)	3.4 (1.8–6.5)	<0.01
<i>Activities</i>				
Waded in the Nyong swamp: Yes/No	10 (6)	35 (21)	5.1 (2.2–12)	<0.01
Waded in a river or stream: Yes/No	5 (3)	21 (13)	5.0 (1.7–15)	<0.01
<i>Activities</i>				
Wash clothes: No/Yes	16 (10)	34 (21)	2.6 (1.3–5.3)	0.01
Fetch water: Yes/No	136 (83)	132 (81)	0.82 (0.45–1.5)	0.53
Farm: Yes	132 (81)	136 (83)	1.2 (0.66–2.3)	0.40
Do not farm	31 (19)	27 (17)	1 (reference)	

Table 2. Cont.

Characteristic	No. (%) of control subjects (n = 163)	No. (%) of case-subjects (n = 163)	Univariate OR (95% CI) *	p †
Farm and wear long upper body clothing/shirt	89 (55)	85 (52)	1.1 (0.59–2.2)	0.38
Farm and wear short upper body clothing/shirt	43 (26)	51 (31)	1.4 (0.70–2.9)	0.98
Do not farm	31 (19)	27 (17)	1 (reference)	
Farm and wear long pants/dress	117 (72)	104 (64)	1.0 (0.50–2.0)	0.91
Farm and wear short pants/dress	15 (9)	32 (20)	2.5 (1.1–5.8)	0.03
Fish: Yes/No	54 (33)	76 (47)	2.0 (1.2–3.3)	0.01
Do not fish	109 (67)	87 (53)	1 (reference)	
Fish, but not in the Nyong river	40 (25)	40 (25)	1.3 (0.73–2.4)	0.36
Fish in the Nyong river	14 (9)	36 (22)	4.5 (1.9–10)	<0.01
Do not fish	109 (67)	87 (53)	1 (reference)	
Fish with long upper body clothing	38 (23)	44 (27)	1.7 (0.92–2.9)	0.09
Fish with short/no upper body clothing	16 (10)	32 (20)	2.8 (1.4–5.9)	0.01
Do not fish	109 (67)	87 (53)	1 (reference)	
Fish with long lower body clothing	42 (26)	59 (36)	2.1 (1.2–3.6)	0.01
Fish with short/no lower body clothing	12 (7)	17 (10)	1.9 (0.83–4.2)	0.12
<i>Bath (hygiene)</i>				
Have bath for hygiene: Yes/No	57 (53)	116 (71)	2.3 (1.4–3.8)	<0.01
Do not have bath for hygiene	76 (47)	47 (29)	1 (reference)	
Have bath for hygiene, but not in the Nyong river	67 (41)	76 (47)	1.8 (1.0–3.1)	0.04
Have bath for hygiene in the Nyong river: Yes	20 (12)	40 (25)	4.7 (2.0–11)	<0.01
Do not have bath for hygiene	76 (47)	47 (29)	1 (reference)	
Have bath for hygiene, but not in open borehole	71 (44)	80 (49)	2.0 (1.2–3.4)	0.01
Have bath for hygiene in open borehole	16 (10)	36 (22)	3.7 (1.8–7.6)	<0.01
<i>Swim/dive/play in water</i>				
Swim: Yes/No	80 (49)	98 (60)	1.75 (1.1–2.9)	0.02
Do not swim	83 (51)	65 (40)	1 (reference)	
Swim, but not in the Nyong river	57 (35)	51 (31)	1.2 (0.69–2.1)	0.50
Swim in the Nyong river	23 (14)	47 (29)	4.8 (2.0–11)	<0.01
<i>Beliefs on the origin of BU</i>				
wound: Yes/No	2 (1)	6 (4)	3.0 (0.61–15)	0.15
insect bites: Yes/No	15 (9)	6 (4)	0.4 (0.16–1.0)	0.05
witchcraft: Yes/No	45 (28)	55 (34)	1.3 (0.83–2.1)	0.23
do not know: Yes/No	69 (42)	81 (50)	1.5 (0.89–2.4)	0.13

*conditional logistic regression;

†Wald test, conditional logistic regression;

‡data missing for 84 subjects

doi:10.1371/journal.pntd.0000101.t002

Almost all subjects reported farming activity (this variable being understood as: “follow his parents during farming activities” for children). This activity was not significantly associated with BU ($p = 0.40$). Nevertheless, wearing short pants or a short dress when farming was significantly associated with BU (univariate odds ratio (OR): 2.5; $p = 0.03$ compared to the reference group “do not farm”). There was no such difference associated with a particular type of upper body clothing.

Univariate analysis based on the responses to the questionnaire about water-associated activities indicated that fishing was a risk factor for BU ($p = 0.01$). More precisely, fishing in the Nyong river with short upper body clothing and/or with long lower body clothing ($p = 0.01$ compared to nonfishers) was significantly associated with BU. Case-patients were significantly more likely

than controls to have a bath for hygiene purposes or for leisure (swimming/diving/playing) in the Nyong river and to have a bath for hygiene purposes in open boreholes ($p < 0.01$).

At the end of the questionnaire, it was asked to participants their beliefs about the origin of BU. Most of them were ignorant of the origin of this disease (69/163, 43% for controls and 81/163, 50% for case patients) while a large part of the others think it could be due to witchcraft (45/163, 28% for controls and 55/163, 34% for case patients). No significant difference was observed in answers regarding this question between case and controls.

Multivariate analysis. Washing clothes, using bed nets, and treating wounds with rubbing alcohol or leaves were behavioral protective factors for BU in the final multivariate model (Table 3), whereas wading in the Nyong swamp, farming with short lower

Table 3. Multivariable model for risk factors for Buruli ulcer disease in Cameroon, Community-matched case-control study

Risk factor	Multivariate OR * (95% CI)	p †
<i>Demographic and activities</i>		
Education level: Primary or any/Secondary or more	3.6 (1.3–9.8)	0.014
Wash clothes: No/Yes	5.1 (1.5–17)	0.008
Wade in the Nyong swamp: Yes/No	5.7 (1.6–20)	0.007
<i>Farming activities and clothing</i>		
Do not farm or farm with long pants/dress	1 (reference)	
Farm with short pants/dress	15 (4.2–58)	<0.001
<i>Insect bites/behavior</i>		
Use bednets: No/Yes	2.6 (1.2–6.0)	0.022
Use mosquito coils: Yes/No	4.5 (1.8–11)	0.001
<i>Household environment</i>		
Cocoa plantation in the immediate neighborhood: Yes/No	3.2 (1.5–7.0)	0.004
Woods in the immediate neighborhood: Yes/No	6.3 (1.1–36)	0.039
<i>Treatment when hurt</i>		
Use adhesive bandage: Yes/No	6.4 (2.2–19)	0.001
Use rubbing alcohol: No/Yes	2.2 (1.0–4.6)	0.040
Use leaves: No/Yes	4.4 (1.4–13)	0.009

*multivariate conditional logistic regression;

†Wald test, multivariate conditional logistic regression

doi:10.1371/journal.pntd.0000101.t003

body clothing, using mosquito coils to prevent insect bites and using adhesive bandages to treat wounds were behavioral risk factors. The Odds Ratio (OR) associated with the factor “Farm with short pants/dress” was very high (15; 95% CI 4.2–58) with reference to the item “Do not farm or farm with long pants/dress”; it was estimated 25 (95% CI 4.5–140; $p < 0.01$) with reference to “Do not farm”, using the same other variables. Living in the immediate neighborhood of cocoa plantations and/or woods were indicated to be risk factors. Lastly, less than a secondary school level of education was more frequently associated with case-patients.

The analysis on confirmed case-control pairs only (117 pairs) corroborates that washing clothes, using bed nets, treating wounds with rubbing alcohol were protective factors for BU whereas wading in the Nyong swamp, farming with short lower body clothing and using adhesive bandages to treat wounds were confirmed as risk factors. Swimming in the Nyong river is a significant risk factor for BU in this analysis.

Case-/Familial-matched control

Univariate Analysis. Median age and sex were not different between case-patients and family-matched controls. Substantially fewer factors were significant in the univariate analysis of this family-matched case-control study than in the community-matched case-control study (Table 4). A low education level was significantly associated with BU cases ($p = 0.04$). Those who never used bed nets were significantly more affected than those who sometimes or frequently used bed nets ($p < 0.01$).

Multivariate analysis. The final multivariate model (Table 5) indicates that using bed nets and using leaves to treat

wounds were strong protective factors. Case-patients were more frequently associated with lower than a secondary-school level of education. Fishing in the Nyong river was determined to be a protective factor (0.28; 95% CI 0.094–0.84) using “Do not fish or fish, but not in the Nyong river” as the reference; the OR was estimated 0.30 (95% CI 0.10–.92; $p = 0.04$) with reference to “Do not fish” using the same other variables. Swimming, but not in the Nyong river appeared to be protective.

The analysis on confirmed case-control pairs only (89 pairs) corroborates that a low education level was a risk factor and that using bed nets, using leaves to treat wounds and swimming were protective factors. Wearing long pants while fishing was a significant protective factor and using soap to treat wounds was a significant risk factor in this latter analysis.

Discussion

This case-control study identifying BU risk factors in Cameroon is the first published.

Limitations of the study

Case-control study limitations are undoubtedly applicable to this study. The study could not be done on incident cases due to the low incidence of BU in the area. Cases that were at early stages of infection could not be included which could possibly induce a bias. Memory bias may have occurred as onset of BU symptoms could have happened a long time before the study. Beliefs about BU may have modified participants' responses; nevertheless, this study confirms that most people do not have any knowledge of the origin of the disease or think it is due to witchcraft, like in other BU endemic countries [9,10]. Also, interviewers were not blinded to the disease status of participants.

The proportion of confirmed BU cases in Cameroon is increasing, especially since the PCR technique was implemented in the Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé. Nevertheless, the statistical power of the analysis is lower if we restrict the study to confirmed cases. The similar characteristics of confirmed and unconfirmed cases give us confidence to combine these two sub-populations, as well as the high sensitivity of the clinical diagnostic found elsewhere [21]. The presence of misclassification (false positive cases) is not excluded. Possible misclassification of BU-free patients as case-patients reduces the statistical power of the study and may introduce bias [30]. Nevertheless, we confirmed the major factors identified on the whole dataset when analyses were done on the sub-sample of confirmed case-control pairs.

We matched case-patients with controls from their villages of residence, but did not use the nearest-neighbor method in order to avoid overmatching. Overmatching is evident in the family case-control study. Results from both analyses are not independent as the case-samples were the same. Nevertheless, the identification of a risk factor in both family and community case-control studies provides additional support for that risk factor.

Cases

Our study design could not investigate the influence of age on BU. The majority of case-patients are children under 15 years of age, as described in other publications [1]. We confirm the prevalence of BU lesions on the extremities, especially on the legs [8,12,15,31]. A study carried out in Ghana in 1989 reported that the left leg was more frequently affected than the right leg in adults [31], but this asymmetrical distribution was not confirmed in a more recent study [32] or in Cameroon [8]. We found an unequal right-left distribution in favor of the left side. We found no association between this asymmetrical distribution

Table 4. Univariate analysis of selected variables for Buruli ulcer disease in Cameroon, Familial-matched case-control study.

Characteristic	No. (%) of control subjects (n=118)	No. (%) of case subjects (n=118)	Univariate OR (95% CI) [*]	p [†]
<i>Economic level</i>				
Education level: Primary or any/Secondary or more	80 (68)	91 (77)	2.4 (1.0–5.4)	0.04
<i>Health</i>				
BCG scar: Yes/No	84 (71)	71 (60)	0.62 (0.36–1.1)	0.08
History of Tuberculosis: Yes/No	6 (5)	8 (7)	1.4 (0.44–4.4)	0.56
Ever had blood in urine: Yes/No	6 (5)	3 (3)	0.40 (0.078–2.1)	0.27
<i>Insect bites/behavior</i>				
Received insect bite in water/mud: Yes/No	42 (36)	45 (38)	1.2 (0.60–2.4)	0.60
Use bed nets: No/Yes	36 (34)	56 (47)	4.3 (1.8–11)	<0.01
Use mosquito coils: Yes/No	77 (65)	81 (68)	1.2 (0.67–2.0)	0.57
<i>Treatment when hurt</i>				
Soap and water: Yes/No	37 (31)	42 (36)	1.2 (0.70–2.2)	0.47
Rubbing alcohol: No/Yes	81 (69)	82 (69)	1.0 (0.58–1.9)	0.87
Leaves: No/Yes	103 (87)	108 (92)	2.7 (0.71–10)	0.15
Adhesive bandage: Yes/No	29 (25)	37 (32)	1.5 (0.83–2.7)	0.18
<i>Activities</i>				
Waded in the Nyong swamp: Yes/No	20 (17)	21 (18)	1.1 (0.45–2.7)	0.81
Waded in a river or stream: Yes/No	52 (44)	53 (44)	1.0 (0.60–1.8)	0.89
Wash clothes: No/Yes	24 (20)	23 (19)	0.92 (0.40–2.1)	0.83
Fetch water: Yes/No	98 (83)	100 (84)	1.18 (0.52–2.6)	0.68
Farm: Yes/No	103 (88)	99 (84)	0.60 (0.22–1.7)	0.32
Do not farm	15 (13)	19 (16)	1 (reference)	
Farm and wear long upper body clothes/shirt	62 (53)	57 (48)	0.56 (0.19–1.6)	0.28
Farm and wear short upper body clothes/shirt	41 (35)	42 (36)	0.64 (0.22–1.8)	0.40
Do not farm	15 (13)	19 (16)	1 (reference)	
Farm and wear long pants/dress	82 (69)	74 (63)	0.55 (0.20–1.6)	0.26
Farm and wear short pants/dress	21 (18)	25 (21)	0.75 (0.24–2.3)	0.63
Fish: Yes/No	56 (47)	48 (41)	0.60 (0.29–1.2)	0.16
Do not fish	62 (53)	70 (59)	1 (reference)	
Fish, but not in the Nyong river	28 (24)	28 (24)	0.75 (0.33–1.7)	0.49
Fish in the Nyong river	28 (24)	20 (17)	0.44 (0.18–1.1)	0.08
Do not fish	62 (53)	70 (59)	1 (reference)	
Fish with long upper body clothing	47 (40)	35 (30)	0.48 (0.22–1.1)	0.07
Fish with short/no upper body clothing	9 (8)	13 (11)	1.1 (.38–3.0)	0.90
Do not fish	62 (53)	70 (59)	1 (reference)	
Fish with long lower body clothing	35 (30)	28 (24)	0.54 (0.24–1.2)	0.14
Fish with short/no lower body clothing	21 (18)	20 (17)	0.67 (0.29–1.5)	0.34
<i>Bath (hygiene)</i>				
Have bath for hygiene: Yes/No	81 (69)	79 (67)	0.88 (0.44–1.8)	0.72
Do not have bath for hygiene	37 (31)	39 (33)	1 (reference)	
Have bath for hygiene, but not in the Nyong river	57 (48)	52 (44)	0.79 (0.37–1.7)	0.53
Have bath for hygiene in the Nyong river	24 (20)	27 (23)	1.2 (0.45–3.1)	0.75
Do not have bath for hygiene	37 (31)	39 (33)	1 (reference)	
Have bath for hygiene, but not in open borehole	60 (51)	60 (51)	0.90 (0.44–1.8)	0.77
Have bath for hygiene in open borehole	21 (18)	19 (16)	0.80 (0.31–2.0)	0.64
<i>Swim/Dive/Play in water</i>				
Swim: Yes/No	75 (64)	66 (56)	0.69 (0.39–1.2)	0.20
Do not swim	43 (36)	52 (44)	1 (reference)	
Swim, but not in the Nyong river	48 (41)	37 (31)	0.57 (0.30–1.1)	0.10
Swim in the Nyong river	27 (23)	29 (25)	0.97 (0.43–2.2)	0.93

*conditional logistic regression;

†Wald test, conditional logistic regression.

doi:10.1371/journal.pntd.0000101.t004

Table 5. Multivariable model for risk factors for Buruli ulcer disease in Cameroon, Familial-matched case-control study.

Risk factor	Multivariate OR *(95% CI)	p [†]
Demographic		
Education level: Primary or any/ Secondary or more	4.9 (1.8–13)	0.002
Insect bites/behavior		
Use bed nets: No/Yes	10 (3.1–33)	<0.001
Treatment when hurt		
Use leaves: No/Yes	7.8 (1.6–37)	0.011
Swim/Dive/Play in water		
Do not swim	1 (reference)	
Swim, but not in the Nyong river	0.33 (0.15–0.72)	0.005
Swim in the Nyong river	1.0 (1.0–9.8)	0.950
Fishing activities		
Do not fish or fish but not in the Nyong river	1 (reference)	
Fish in the Nyong river	0.28 (0.094–0.84)	0.024

*conditional logistic regression;

[†]Wald test, conditional logistic regression.

doi:10.1371/journal.pntd.0000101.t005

and sex or age; thus, we cannot make assumptions about the differential behavior within these subpopulations regarding exposure to BU infection.

Risk factors

This is the largest case-control study using face-to-face questionnaire ever published for BU. Nevertheless, one should address the possible lack of power of the analysis to identify factors weakly related to the transmission or development of this disease. Indeed, some factors not determined to be risk factors in this study deserve comment. BCG vaccination is known to be effective against leprosy [33]. Though univariate analysis in this study indicates that it is a protective factor for BU, multivariate analysis assessing confounding factors does not confirm this finding, similar to previous reports [21,24]. A higher risk for BU in BCG-vaccinated patients ≥ 5 years of age was recently observed in a case-control study on 2,399 case files [23], but we did not observe this in our study. Though fetching water has been suggested to be a risk factor for BU [34], we see no evidence of this in our study. Unlike previous reports [15,23], our findings do not suggest that use of unprotected water sources is a significant risk factor.

A low education level of the subject (<secondary) was observed as a significant risk factor for BU in both the case-/community- and case-/familial-matched control studies. All pairs of children <12 years old having a <secondary level of education, this effect is observed only from the teenagers and the adults records. This factor was not linked to e.g. farming activities, bath or swimming activities or wound treatment.

We found that living near a cocoa plantation or woods is a risk factor for BU in this area. The people of this area made their livings from cocoa plantations until the major crisis of the mid-1990s. Many study participants noted that cocoa farmers developed food crop plantations near the Nyong river following this crisis. This development was associated with profound ecologic upheaval. Further studies including geographic informa-

tion systems should be conducted, but these ecologic changes might be related to the re-emergence of BU in the area.

BU endemicity in this area is associated with the presence of the Nyong swamp. It is extremely difficult to determine risky behaviors for BU infection with more precision, as being exposed to water bodies are part of the daily routine of a majority of inhabitants of this area. Many variables linked to exposure to water, and especially to the river Nyong swamp, are significantly associated with cases of BU in univariate community-matched and family-matched analyses. Nevertheless, we observed many colinearities. The final multivariate models only show that *i*) wading in the Nyong river swamp (community-matched analysis) and swimming in the Nyong river (family-matched analysis) are risk factors, and *ii*) fishing in the Nyong river (family-matched analysis) is a protective factor. Wading in a river or stream has been identified as a risk factor in Ghana [21] and indirectly in Benin as swamp water is a primary water source [23]. Swimming was found to be a significant risk factor in Ghana [20]. Community-matched analysis did not indicate that fishing in the Nyong river, implying daily exposure to the Nyong river and its swamp, is an independent risk factor. Additionally, family-matched analysis indicated that it is a protective factor. Fishing activities have never been found to be independent risk factors for BU. We hypothesize that heavily exposed populations acquire protection against *M. ulcerans*, or at least against the *M. ulcerans*-driven pathogenic processes. Marsollier *et al.* [35] showed that prior exposure to bites from *M. ulcerans*-free aquatic insect predators confers some protection against *M. ulcerans* infection. The same hypothesis is applicable to the protective effects of washing clothes, which also implies daily exposure to water. Wound-treatment practices seem to substantially influence BU in the community-matched and the family-matched case-control studies. Use of rubbing alcohol can prevent infection of the trauma site, but the protective effect of leaves compared to adhesive bandages should be confirmed. Antiseptic or astringent active principles (e.g. tannins, flavonoids) in leaves traditionally used in these areas possibly explain this protective effect. The pharmacologic properties of leaves used traditionally in Cameroon should be investigated further.

We found that wearing long clothing during farming activities is protective against BU, as in Ghana and the Ivory Coast, [12,21]. Note nevertheless that the wide confidence intervals obtained for this variable reflects a small amount of discordant pairs. This result may not be robust. This finding suggests that long periods of skin exposure facilitate infection. It is unusual to be bare chested in Cameroon, corroborated by the smaller number of observed lesions on the trunk than that observed in other countries [32]. This finding is consistent with both prevailing hypotheses that insect vectors and penetrating injuries are potential modes of BU transmission for *M. ulcerans* [21].

The use of bed nets is a strongly associated protective factor for BU in our study, but not in Ghana [21]. In Cameroon, bed nets are principally used to prevent malaria which is endemic in the whole country. The cost of bed nets does still not afford its universal use, and families generally do not own bed nets for the whole members of the family. Infection was less frequent among those using bed nets than those not using them, even within families. This intra-familial confirmation invalidates the hypothesis of a confounding effect linked, for example, to household location, access to bed nets or socio-economic status. The choice of the people who sleep under a bed net within a family was not investigated in this study. The impact of bed nets, especially pyrethroid-impregnated bed nets, on personal protection against the malaria mosquito is uncontroversial. Unfortunately, the questionnaire did not explore whether or not these bed nets were

impregnated with insecticide. This observation is consistent with the recent detection of *M. ulcerans* by PCR in a small proportion of mosquitoes trapped in a BU-endemic area in Victoria, Australia [36,37]. Pyrethroid impregnated bed nets also protect from other insects, including day-flying insects, crawling insects, head lice, chicken ticks or bedbugs [38–40]. Water bugs (genera *Naucoridae* and *Dyplonichus*), which are suspected to be a possible vector of *M. ulcerans* [18,19] are flying insects but their common ecological area is not households. The impact of bed nets on bites from these sylvatic insects is thus less evident. Our study supports the hypothesis implicating domestic or peridomestic insects (e.g. mosquitoes) in the transmission of *M. ulcerans*.

Conclusion

Our findings are consistent with both major hypotheses of *M. ulcerans* transmission, i.e. insect bites and/or contamination following or accompanying trauma. Treatment practices following trauma were highly significant, supporting the hypothesis involving contamination of a trauma site. However, the use of bed nets, which we propose to be a protective factor, favors the hypothesis involving an insect vector. A specific study should be undertaken to confirm these risk factors for two reasons. First, it may yield information about the mode of transmission. Second, measures to control these risks should be easy to implement to protect inhabitants from BU and other diseases.

This study confirms that wading in the swamp and wearing short clothing during farming activities are risk factors for BU. Public health messages about these risk factors can now be provided to local populations. Nevertheless, providing informa-

tion, ending stigmatization, focusing on early detection and prompt treatment still make up the best public health strategy to reduce BU burden until the mode of transmission of *M. ulcerans* and the following development of the disease is more clearly understood.

Supporting Information

Alternative Language Abstract S1 Translation of the abstract into French

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000101.s001 (0.03 MB DOC)

Acknowledgments

This article is dedicated to the memory of Jean-Paul Gouteux.

We are grateful to the enrolled inhabitants of Ayos and Akonolinga districts for participating in this study. We thank Daniel Ze Bekolo (Leprosy District Officer for Ayos and Akonolinga health districts), Abenda Meva'a (Nurse, in charge of patient monitoring) and the hospital staff.

We would like to express our appreciation to Dr. P. Raghunathan, L. Abel, A. Alcais for their help in the development of the study design and questionnaires. We sincerely thank Dr. J. Aubry for his advice and discussion and Dr. F. Simmard for his help concerning the impact of bed nets.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LM SE FP AF RP GM CM. Performed the experiments: RP GM CM FN AN. Analyzed the data: SE FP AF RP GM NV. Wrote the paper: LM SE FP AF RP GM CM NV FN AN.

References

- World Health Organization (2000) Buruli ulcer-*Mycobacterium ulcerans* infection. Geneva: World Health Organization. WHO/CDS/CPE/GBUI/2000.1. 118 p.
- World Health Organization (2005) Buruli ulcer disease-*(Mycobacterium ulcerans* infection). fact sheet No.199. World Health Organization.
- Janssens PG, Pattyn SR, Meyers WM, Portaels F (2005) Buruli ulcer: an historical overview with updating to 2005. *Bull Séanc Acad R Sci Outre-Mer* 51: 165–199.
- Amofah GK, Sagoe-Moses C, Adjei-Acquah C, Frimpong EH (1993) Epidemiology of Buruli ulcer in Amansie West district, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 644–645.
- Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portaels F (2006) *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect Dis* 6: 288–296.
- Johnson PD, Stinear T, Small PL, Pluschke G, Merritt RW, et al. (2005) Buruli Ulcer (*M. ulcerans* Infection): new insights, New Hope for Disease Control. *PLoS Med* 2: e108.
- Ravisse P, Rocques MC, Le Bourthe F, Tchuembou CJ, Menard JJ (1975) Une affection méconnue au Cameroun, l'ulcère à Mycobactérie. *Med Trop (Mars)* 35: 471–474.
- Noeske J, Kuaban C, Rondini S, Sorlin P, Ciaffi L, et al. (2004) Buruli ulcer disease in Cameroon rediscovered. *Am J Trop Med Hyg* 70: 520–526.
- Stienstra Y, van der Graaf WT, Asamoah K, van der Werf TS (2002) Beliefs and attitudes toward Buruli ulcer in Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 67: 207–213.
- Aujoulat I, Johnson C, Zinsou C, Guendon A, Portaels F (2003) Psychosocial aspects of health seeking behaviours of patients with Buruli ulcer in southern Benin. *Trop Med Int Health* 8: 750–759.
- Um Boock A (2004) Le résultat d'une violation des normes sociales? L'ulcère de Buruli au Cameroun. *Bulletin de Medicus Mundi Suisse* No 92, avril 2004 92.
- Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh CR Jr, Diomande I, Saki MZ, et al. (1995) Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 52: 219–224.
- Oluwasanmi JO, Solanke JF, Olurin EO, Itayemi SO, Alabi GO, et al. (1976) *Mycobacterium ulcerans* (Buruli) skin ulceration in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 25: 122–128.
- Barker DJ (1971) Buruli disease in a district of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 74: 260–264.
- Uganda Buruli Group (1971) Epidemiology of mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer) at Kinyara, Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65: 763–775.
- Veitch MG, Johnson PD, Flood PE, Leslie DE, Street AC, et al. (1997) A large localized outbreak of *Mycobacterium ulcerans* infection on a temperate southern Australian island. *Epidemiol Infect* 119: 313–318.
- Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK (1974) Human *Mycobacterium ulcerans* infections developing at sites of trauma to skin. *Am J Trop Med Hyg* 23: 919–923.
- Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 353: 986.
- Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 68: 4623–4628.
- Aiga H, Amamo T, Cairncross S, Adomako J, Nanas OK, et al. (2004) Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 71: 387–392.
- Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoah K, Stienstra Y, Taylor TH Jr, et al. (2005) Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* Infection): results from a case-control study in Ghana. *Clin Infect Dis* 40: 1445–1453.
- Barker DJ, Ninkibigaya V (1972) Buruli disease and patients' activities. *East Afr Med J* 49: 260–268.
- Debacker M, Portaels F, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, et al. (2006) Risk factors for Buruli ulcer, Benin. *Emerg Infect Dis* 12: 1325–1331.
- Nackers F, Dramaix M, Johnson RC, Zinsou C, Robert A, et al. (2006) BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer: a case-control study in Benin. *Am J Trop Med Hyg* 75: 768–774.
- World Health Organization (2001) Buruli ulcer. Diagnostic of *Mycobacterium ulcerans* disease. A manual for health care providers. Geneva: World Health Organisation. WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.4.
- Stinear T, Ross BC, Davies JK, Marino L, Robins-Browne RM, et al. (1999) Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. *J Clin Microbiol* 37: 1018–1023.
- Dupont WD- (1988) Power calculations for matched case-control studies. *Biometrics* 44: 1157–1168.
- Mander A (2005) SAMPSI_MCC: Stata module to calculate Sample Size or Power for Matched Case-Control Studies. Chestnut Hill, USA: Boston College Department of Economics, Statistical Software Components #S456423.
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 5: 299–314.
- Greenland S (1982) The effect of misclassification in matched-pair case-control studies. *Am J Epidemiol* 116: 402–406.
- van der Werf TS, van der Graaf WT, Groothuis DG, Knell AJ (1989) *Mycobacterium ulcerans* infection in Ashanti region, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 410–413.
- Hospers IC, Wiersma IC, Dijkstra PU, Stienstra Y, Etuful S, et al. (2005) Distribution of Buruli ulcer lesions over body surface area in a large case series in

- Ghana: uncovering clues for mode of transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 196–201.
33. Ponnighaus JM, Fine PE, Sterne JA, Wilson RJ, Msosa E, et al. (1992) Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. *Lancet* 339: 636–639.
 34. Barker DJ (1973) Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67: 43–50.
 35. Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, Marot A, Mbondji Wondje C, et al. (2007) Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. *PLoS Med* 4: e64.
 36. Lavender C, Globan M, Johnson P, Stinear T, Fyfe J. Application of VNTR Typing to *Mycobacterium ulcerans* PCR-positive environmental samples from Victoria, Australia. In: Ninth annual meeting of the WHO Global Buruli Ulcer Initiative. World Health Organization, ed. 2006; Geneva. 121 p.
 37. Johnson P, Hayman J, Quek T, Fyfe J, Jenkin G, et al. (2007) Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and control of *Mycobacterium ulcerans* infection (Bairnsdale or Buruli ulcer) in Victoria, Australia. *Med J Aust* 186: 64–68.
 38. Rowland M, Bouma M, Ducomet D, Durrani N, Rozendaal J, et al. (1996) Pyrethroid-impregnated bed nets for personal protection against malaria for Afghan refugees. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 357–361.
 39. Lindsay SW, Snow RW, Armstrong JR, Greenwood BM (1989) Permethrin-impregnated bednets reduce nuisance arthropods in Gambian houses. *Med Vet Entomol* 3: 377–383.
 40. Temu EA, Minjas JN, Shiff CJ, Majala A (1999) Bedbug control by permethrin-impregnated bednets in Tanzania. *Med Vet Entomol* 13: 457–459.

ANNEXE 2

Protection against *Mycobacterium ulcerans* Lesion Development by Exposure to Aquatic Insect Saliva

Laurent Marsollier^{1,2}*, Estelle Deniaux², Priscille Brodin³, Agnès Marot², Christelle Mbondji Wondje⁴, Jean-Paul Saint-André², Annick Chauty⁵, Christian Johnson⁶, Fredj Tekai⁷, Edouard Yeramian⁸, Pierre Legras^{2,9}, Bernard Carbonnelle², Gilles Reyset¹, Sara Eyangoh⁴, Geneviève Milon¹⁰, Stewart T. Cole¹, Jacques Aubry¹¹*

1 Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne, Institut Pasteur, Paris, France, **2** Groupe d'Etude des Interactions Hôtes Pathogènes, Centre Hospitalier Universitaire et Faculté de Pharmacie d'Angers, Angers, France, **3** INSERM, Equipe Avenir, Institut Pasteur Korea, Seongbuk-gu, Seoul, Korea, **4** Laboratoire des Mycobactéries, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroun, **5** Centre de Diagnostic et de Traitement de l'Ulcère de Buruli, Pobè, Bénin, **6** Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli, Ministère de la Santé Publique, Cotonou, Bénin, **7** Unité de Génétique moléculaire des levures, Institut Pasteur, Paris, France, **8** Unité de Bio-Informatique Structurale, Institut Pasteur, Paris, France, **9** Animalerie Hospitalo-Universitaire, Angers, France, **10** Unité d'Immunophysiologie et Parasitisme Intracellulaire, Institut Pasteur, Paris, France, **11** INSERM U601, Université de Nantes, Faculté de Pharmacie, Nantes, France

Funding: This study was supported by the Ministry of Health, Cotonou, Benin; Centre Hospitalier Universitaire d'Angers (Promoters); the Fondation Raoul Follereau; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM [JA, LM, PB]); and the Institut Pasteur (EY, FT, GM, GR, STC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Academic Editor: Françoise Portaels, Institute of Tropical Medicine, Belgium

Citation: Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, Marot A, Wondje CM, et al. (2007) Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. PLoS Med 4(2): e64. doi:10.1371/journal.pmed.0040064

Received: March 10, 2006

Accepted: January 2, 2007

Published: February 27, 2007

Copyright: © 2007 Marsollier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abbreviations: BCG, bacillus Calmette-Guérin; CFU, colony-forming unit(s); SGH, salivary gland homogenate

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: laurentmarsollier@hotmail.com (LM); Jacques.Aubry@univ-nantes.fr (JA)

© These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Background

Buruli ulcer is a severe human skin disease caused by *Mycobacterium ulcerans*. This disease is primarily diagnosed in West Africa with increasing incidence. Antimycobacterial drug therapy is relatively effective during the preulcerative stage of the disease, but surgical excision of lesions with skin grafting is often the ultimate treatment. The mode of transmission of this *Mycobacterium* species remains a matter of debate, and relevant interventions to prevent this disease lack (i) the proper understanding of the *M. ulcerans* life history traits in its natural aquatic ecosystem and (ii) immune signatures that could be correlates of protection. We previously set up a laboratory ecosystem with predatory aquatic insects of the family Naucoridae and laboratory mice and showed that (i) *M. ulcerans*-carrying aquatic insects can transmit the mycobacterium through bites and (ii) that their salivary glands are the only tissues hosting replicative *M. ulcerans*. Further investigation in natural settings revealed that 5%–10% of these aquatic insects captured in endemic areas have *M. ulcerans*-loaded salivary glands. In search of novel epidemiological features we noticed that individuals working close to aquatic environments inhabited by insect predators were less prone to developing Buruli ulcers than their relatives. Thus we set out to investigate whether those individuals might display any immune signatures of exposure to *M. ulcerans*-free insect predator bites, and whether those could correlate with protection.

Methods and Findings

We took a two-pronged approach in this study, first investigating whether the insect bites are protective in a mouse model, and subsequently looking for possibly protective immune signatures in humans. We found that, in contrast to control BALB/c mice, BALB/c mice exposed to *Naucoris* aquatic insect bites or sensitized to *Naucoris* salivary gland homogenates (SGHs) displayed no lesion at the site of inoculation of *M. ulcerans* coated with *Naucoris* SGH components. Then using human serum samples collected in a Buruli ulcer-endemic area (in the Republic of Benin, West Africa), we assayed sera collected from either ulcer-free individuals or patients with Buruli ulcers for the titre of IgGs that bind to insect predator SGH, focusing on those molecules otherwise shown to be retained by *M. ulcerans* colonies. IgG titres were lower in the Buruli ulcer patient group than in the ulcer-free group.

Conclusions

These data will help structure future investigations in Buruli ulcer-endemic areas, providing a rationale for research into human immune signatures of exposure to predatory aquatic insects, with special attention to those insect saliva molecules that bind to *M. ulcerans*.

The Editors' Summary of this article follows the references.

Introduction

Buruli ulcer disease is now the third most common mycobacterial disease in the world, behind tuberculosis and leprosy, and its incidence in Western African countries is among the highest in the world [1,2]. This debilitating and progressive disease, characterized by skin lesions and sometimes localization in limb bones, is caused by *Mycobacterium ulcerans*, which produces a dermonecrotic toxin, a polyketide-derived macrolide called mycolactone [3,4]. Understanding the life history traits of *M. ulcerans* within its natural aquatic ecosystems, and the preventive and therapeutic tools for reducing the incidence of the disease are still very limited [5–7]. Currently, there is no vaccine available against Buruli ulcer. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination provides some protection against the most severe forms of Buruli ulcer, such as osteomyelitis [8], but does not prevent most of the skin-ulcerative disease cases [9]. Initial, limited clinical evidence suggests that a rifampicin-streptomycin combination may have some beneficial effects on preulcerative lesions [10]. However, late diagnosis often results in the need for surgery [6].

The mode of *M. ulcerans* transmission is still unclear, with various mechanisms being suggested during the last few decades. Current evidence seems clear, however, on several points. First, with the exception of a few reports [11,12], there is no evidence of human-to-human transmission [1,2]. No disease has been observed either among health care workers in close contact with Buruli ulcer patients or among children breast-fed by mothers with Buruli ulcer lesions. Second, Buruli ulcers were shown to be significantly more prevalent in families using water from rivers than in families with access to clean water (53% and 6% respectively) or among individuals exposed to stagnant waters near the edge of hydrotelluric environments such as that along the Nile [13,14]. Third, during the late 1990s, the possibility of detecting unique genomic *IS2404* insertion sequences in *M. ulcerans* [15,16] allowed the extent of *M. ulcerans* niches in aquatic environments to be much better understood and led to a reappraisal of the most frequent and plausible mode of delivery of *M. ulcerans* to humans. The possible role of plants, such as the sharp-edged *Echinocloa pyramidalis* aquatic plant, was thus considered in Uganda [17]. In Australia, the PCR-based detection of *M. ulcerans* sequences showed *M. ulcerans* in the irrigation system of a golf course as the environmental origin of Buruli ulcer in several players or individuals living near the golf course. However, the hypothesis that *M. ulcerans*-loaded aerosols may have entered through barrier-disrupted skin [18] was gradually discarded.

The putative role of predatory aquatic insects as *M. ulcerans* vectors for humans was initially considered in 1999 [19,20] and so far, aquatic insects from the Naucoridae and Belostomatidae families have been reported as being able to be colonized by *M. ulcerans* and to transmit it to laboratory mice in experimental settings [21–24]. In areas endemic for Buruli ulcers, insectivorous fish were found to display *M. ulcerans* DNA by PCR [25]. We do not exclude other modes of transmission of *M. ulcerans*, but are unaware of any others that have been formally demonstrated, at least experimentally.

Field observations have shown that humans with regular activities near rivers inhabited by such aquatic insects are less prone to Buruli ulcers than are their relatives who have less

exposure to this environment. Buruli ulcer epidemics in 1970 were primarily affecting displaced Rwandan refugees, with very few cases being reported in the autochthonous populations living in these environments [17]. More recently, in similar, swamp-rich environments, two of us (SE and AC) extended these observations—we found many individuals who remained Buruli ulcer-free while being regularly bitten by insects belonging to the genera *Naucoris* and *Belostoma*.

Many blood-feeding arthropods are hosts and vectors of bona fide parasitic microorganisms, including viruses, and data are accumulating that show how host and parasite interact in stable ecosystems in which the balanced fitness of each organism is reached. Ribeiro and colleagues investigated the slow- and fast-feeding behaviour of blood-feeding arthropods and compared the sialomes of the arthropods for both parasitism and adaptation to blood-feeding behaviours [26]. Much data from experimental and epidemiological studies focused on sand flies (which transmit the organisms, *Leishmania* spp., that cause different forms of leishmaniasis) [27,28], shows that the time taken by *Phlebotomus papatasi* to obtain their blood from mice is faster if the mice have been sensitized to *P. papatasi* saliva [29]. In addition, in mice that displayed delayed type hypersensitivity to *P. papatasi* saliva, no lesion developed at the site of coinoculation of *Leishmania major* and *P. papatasi* saliva [30]. The data generated within the context of these models prompted us to address the following questions: (i) In mice, could prior exposure to repeated bites from *M. ulcerans*-free aquatic insect predators confer some protection against *M. ulcerans*-driven pathogenic processes? (ii) In endemic area of Buruli ulcers are any immune signatures of exposure to aquatic insect bites detectable that could distinguish Buruli ulcer-free individuals from those displaying these skin lesions?

Methods

Aquatic Insect Predators and Salivary Gland Homogenate

Naucoris cimicoides were collected from swamps in Western France, and *Belostoma cordofana* and *N. flavicollis* (*Macrocoris*) were from the Ouémé river in the Republic of Benin, West Africa. Insects were supplied with prey loaded with *M. ulcerans* (strain 01G897), as previously described [22]. For all experiments, this stably virulent strain was grown in 7H9 broth medium (Difco) supplemented with 10% Middlebrook OADC (oleic acid, dextrose, catalase; Becton-Dickinson, <http://www.bd.com>) and 0.05% Tween 80 (Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com>) at 30 °C to the midexponential phase. The inoculum was prepared under the same conditions as previously described [21].

Accessory salivary glands were extracted from the insects with 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing protease inhibitors (Complete, EDTA free; Roche Diagnostics, <http://www.roche-diagnostics.com>) as previously described [21]. Tissues were then homogenized by shaking with 106 µm of acid-washed glass beads (Sigma) for 5 min in a TissueLyser (Retsch, <http://www.retsch.com>) at 4 °C at a maximum speed. The salivary gland homogenate (SGH) consisted of the supernatant fraction recovered after debris were removed by centrifugation at 8,000 g for 10 min. Protein concentration of SGH was adjusted to 7 mg/ml using a method based on the Bradford dye-binding procedure (Bio-Rad, [!\[\]\(35dc653d59570f8f891c312eeece91a2_img.jpg\) PLoS Medicine | \[www.plosmedicine.org\]\(http://www.plosmedicine.org\)](http://www.</p>
</div>
<div data-bbox=)

bio-rad.com) before being stored at -80°C , or in 100% ammonium sulphate for the samples collected in Benin.

Experimental Model 1: Prior Exposure of Mice to *M. ulcerans*-Free *N. cimicoides* Bites Followed by Challenge with Bites from *M. ulcerans*-Harboring *N. cimicoides*

Six-week-old female BALB/c mice (Charles River France, <http://www.criver.com/ico>) were maintained under standard conditions during the experiment. The mice were first anaesthetized by intramuscular injection of ketamine (88 mg/kg) before their tails were immersed, once a week, in a *Naucoris*-containing aquarium four times for 10 s each time, to be bitten. Sera from these mice were collected at week 5 and the level of serum IgGs were monitored for binding to *N. cimicoides* SGH using Western blotting. Two weeks after the final exposure, mice were bitten by *M. ulcerans*-harboring *N. cimicoides* and the presence of *M. ulcerans* in the salivary glands of insects was determined histologically as reported previously [22]. Fourteen weeks after this challenge, once inflammatory signs were observed, the mice were killed and lesion-positive tails as well as lesion-free tails were further processed to detect *M. ulcerans*. A schematic outline of the experimental setup is given in Figure 1.

Experimental Model 2: Mouse Sensitisation with *N. cimicoides* SGH Followed by Subcutaneous Challenge of SGH-Treated *M. ulcerans*

Six-week-old female BALB/c mice were inoculated subcutaneously with 50 μg of SGH from *N. cimicoides* in 50 μl of PBS with fine G-26 needles once a week for four weeks. Two weeks after the last injection, the serum of each mouse was collected and the presence of *N. cimicoides* SGH-reactive IgGs was determined by Western blotting. At this time point, the mice were also inoculated with either *M. ulcerans* alone or *M. ulcerans* incubated with SGH. Briefly, *M. ulcerans* suspensions (10^6 bacteria in 1 ml of PBS) were incubated with 1 mg of SGH, or with PBS alone as control, for 2 h at 28°C . The bacteria were then washed three times in PBS with 0.05% Tween 80. The bacteria were then diluted in PBS to final concentrations of 10^2 and 10^3 bacteria/ml. One of these *M. ulcerans* suspensions (100 μl) was inoculated intradermally in the tail of a mouse. Three months later, all mice were killed and the number of colony-forming units (CFU) present in their tails was determined per gram of tissue, as previously described [22,31].

Western Blot Analysis

A sample of aquatic insect SGH (60 μg) was run in an SDS-polyacrylamide gel (4%–12%) (Bio-Rad), and the separated bands were transferred onto a 0.45 μm nitrocellulose membrane (Amersham, <http://www5.amershambiosciences.com>). After blocking with 5% skimmed milk in PBS, the membrane was incubated with serum from mice or humans diluted 1:100 in PBS containing 0.05% Tween 80 for 1 h 30 min at 37°C . After two washes with PBS, sheep anti-mouse IgG (heavy and light chains) peroxidase-conjugated antibodies (Interchim, <http://www.interchim.com>) at 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or anti-human IgG (γ chain) peroxidase-conjugated antibodies (Sigma) at 1:2,000, and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAB (Interchim) was used, respectively, for detecting the mouse or human IgGs bound to the different bands.

Recovery of SGH Molecules Bound to *M. ulcerans*

M. ulcerans (10^7 bacteria) were incubated with 1 mg of accessory salivary gland extract for 2 h at 28°C with gentle agitation. The bacteria were then extensively washed and centrifuged at 5,000 g in PBS with 0.05% Tween 80. The resulting pellet was resuspended in 200 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing protease inhibitors (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics). After heating at 80°C for 1 min, the bacteria were centrifuged at 17,000 g for 15 min at 4°C . The supernatant was loaded on Bis-Tris polyacrylamide gels (4%–12%) (Bio-Rad) and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were washed and incubated with 5% skimmed milk in PBS at room temperature for 1 h and then incubated with human serum samples diluted at 1:100 in PBS containing 0.05% Tween 80. Human IgGs were detected with anti-human IgG (γ chain) peroxidase-conjugated antibodies (Sigma) at 1:2,000, and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAB (Interchim).

Detection of Aquatic Insect Saliva-Binding Immunoglobulins in Human Sera

The participants in two cohorts (“exposed” and “patients,” described below) who had given their written consent were enrolled as volunteers in this study, the protocols of which were approved by the Ministry of Health in Benin. All volunteers lived in villages near the Ouémé river, where Buruli ulcer disease is highly prevalent. Serum was prepared from 8 ml of blood from each participant and tested for potential HCV and HIV exposure using Access HIV-1/2 automated immunoassay (MDA/98/58) and Sanofi Diagnostics Pasteur Access anti-HCV automated immunoassay (plus update on five other anti-HCV assays—MDA/96/26).

The “exposed” group consisted of 55 participants (21 women and 34 men, aged 5–72 years). Typically, their professional activities were fishing and farming, and river water was used for domestic purposes. We assumed that this group had an ongoing exposure to predatory aquatic insects known to inhabit this swampy area. The “patients” group consisted of 30 Buruli ulcer patients recruited from the Centre de Diagnostic et de Traitement de l’Ulcère de Buruli in Pobè, Benin (11 women and 19 men, aged 3–74 years). Diagnoses of Buruli ulcer disease were made by Ziehl-Neelsen staining of material taken from swabs of the lesions or directly from the lesions and confirmed by PCR for *M. ulcerans*-specific *IS2404* DNA [16]. BCG vaccination coverage was 60% (33 of 55) for the exposed group and 63.3% (19 of 30) for the patient group.

ELISA

Proteins (50 μg) from the insects SGH, diluted in 100 μl of PBS containing 0.05% Tween 80, were coated onto 96-well Nunc Maxisorb plates by incubation overnight at 4°C . The coated plates were then incubated with PBS containing 5% skimmed milk at room temperature for 2 h. After three washes in PBS containing 0.05% Tween 80, the samples were incubated for 1 h at 37°C with human serum diluted to 1:100 in PBS with 0.05% Tween 80. After three further washes, plate-bound human immunoglobulins were detected using peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (γ chain) antibodies (Sigma) or with rat anti-human IgM (μ chain) antibodies (Interchim), and OPD (Dako, <http://www.dako.com>). The diluted sera were tested in triplicate and the

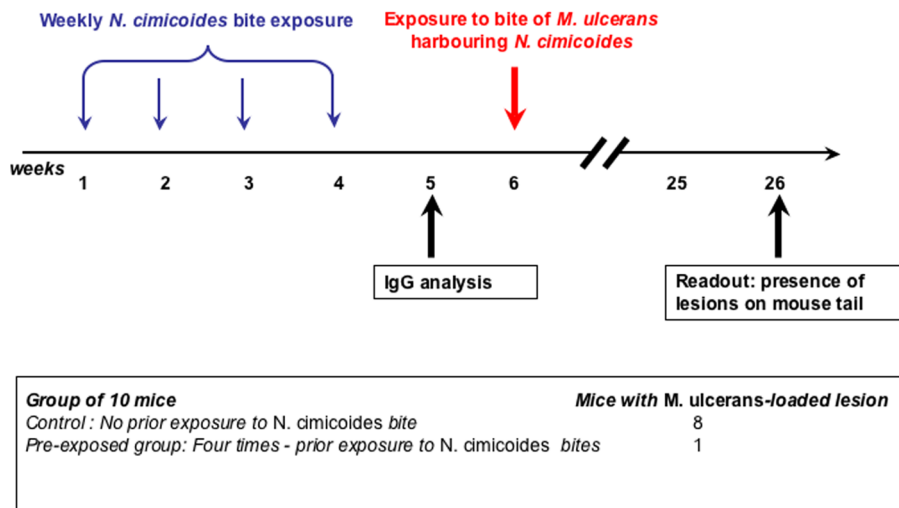


Figure 1. Experimental Model 1

Effect of prior exposure or not to *M. ulcerans*-free *N. cimicoides* on the development of *M. ulcerans* lesions after delivery of *M. ulcerans* from *M. ulcerans*-carrying *N. cimicoides*.

doi:10.1371/journal.pmed.0040064.g001

average absorbance measured at 650 nm was expressed in optical density units.

Statistical Analyses

The χ^2 test was used to compare sample size distributions (proportions). One-way analysis of variance was used to compare mean values between groups followed by Newman-Keuls multiple comparison test to detect significant mean differences between pairs of groups. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

Results

M. ulcerans-Free *N. cimicoides* Bites Prevent the Development of Lesions Caused by *M. ulcerans*

We previously established a mouse model in which we showed that *M. ulcerans*-carrying aquatic bugs can transmit a few bacilli into the tails of mice exposed to the bugs for ten seconds [22]; two and four months after being bitten by *M. ulcerans*-carrying *N. cimicoides*, more than 80% of the mice had typical ulcerative lesions on their tails that contained *M. ulcerans* bacilli. In the current study, using the same mouse model we investigated the effect of prior exposure by first exposing the tails of mice to bites of *M. ulcerans*-free *N. cimicoides* and later exposing them to bites from *M. ulcerans*-carrying insects (Figure 1). Of the BALB/c mice previously bitten by *M. ulcerans*-free *N. cimicoides*, after being exposed to the mycobacterium nine out of ten did not display any lesions up to six months later when the experiment was ended. By contrast, eight out of ten of the control BALB/c mice bitten only by the *M. ulcerans*-carrying *N. cimicoides* developed typical lesions on their tails. This result suggests that prior exposure to insect bites prevented the mice from developing ulcerative lesions at sites of *M. ulcerans*-carrying insect bites.

The sera of mice exposed or not to *M. ulcerans*-free insect bites were screened for the presence of IgGs that bind proteins present in the aquatic insect SGH. Many proteins from the SGH bound IgGs present in the sera of mice exposed to insect bites, whereas no binding was observed with

sera from mice not exposed to insect bites (Figure 2A, lane 2 versus lane 4). Three SGH proteins (22, 48, and 72 kDa) were reproducibly recovered from *M. ulcerans* once the latter were coinoculated with SGH (Figure 2B, lane 2). Among these, two proteins (22 and 48 kDa) did bind IgGs present in the serum of mice exposed to insect bites, indicating that these insect molecules were delivered to mice during the usual biting process (Figure 2B, lane 4). Altogether, these results show that the sera of mice bitten by *N. cimicoides* contain IgGs that bind SGH-derived molecules, two of which are retained by *M. ulcerans* clusters.

We next investigated whether (i) BALB/c mice immunized with *N. cimicoides* SGH would not display any lesion at the site of inoculation of *M. ulcerans* preincubated with SGH, and (ii) any immune signature such as antibodies against the SGH molecules otherwise known to bind to *M. ulcerans* could be easily detected in people at risk.

N. cimicoides SGH Prevents Skin Lesions and Results in a Lower Bacterial Load upon Infection with *M. ulcerans* Preincubated with SGH

Mice were first immunised with crude *N. cimicoides* SGH once a week for four weeks and then their tails were inoculated with *M. ulcerans*. As *M. ulcerans* multiply in the salivary glands of *N. cimicoides* [22], we prepared two different inocula: *M. ulcerans* either incubated or not with *N. cimicoides* SGH and then carefully washed. Twenty weeks after inoculation, control BALB/c mice (i.e., those originally given PBS instead of SGH) displayed lesions at the inoculation site. The development of lesions correlated with the number of *M. ulcerans* CFU present in the challenge inoculum but were independent of whether the *M. ulcerans* challenge inoculum had been previously incubated with SGH or not (Table 1, groups A and B). This clearly showed that the SGH proteins retained by *M. ulcerans* did not affect the course of the infectious and pathogenic processes in mice that had never been exposed to SGH. It further suggested that the mycobacteria delivered by *M. ulcerans*-carrying insects are

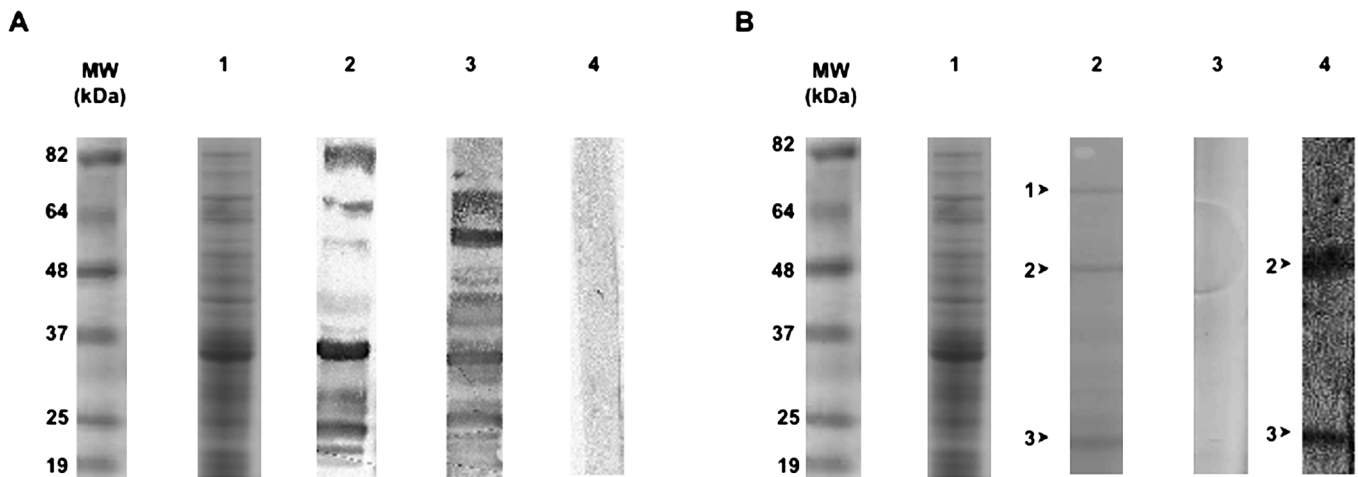


Figure 2. Western Blotting to Detect the Presence in Mouse Sera of IgGs Binding to *N. cimicoides* SGH

(A) Lane 1: Coomassie staining of *N. cimicoides* SGH. Lane 2: Blotting of SGH with serum from mice bitten by *N. cimicoides*. Lane 3: Blotting of SGH with serum from mice immunized with SGH. Lane 4: Blotting of SGH with preimmune mouse serum.

(B) Lane 1: Coomassie staining of *N. cimicoides* SGH. Lane 2: Coomassie staining of SGH-derived molecules bound to *M. ulcerans* cluster: arrows 1 to 3 correspond to 72, 48, and 22 kDa molecules, respectively. Lane 3: Coomassie staining of whole *M. ulcerans* bacteria never exposed to SGH. Lane 4: Blotting of SGH-derived molecules bound to *M. ulcerans* with serum of mice bitten by *M. ulcerans*-free *N. cimicoides*.

MW, molecular weight.

doi:10.1371/journal.pmed.0040064.g002

coated with proteins from the salivary glands, which is where these bacteria multiply.

Unlike the immediate transient inflammatory sign displayed by all mice upon being bitten by the insects, we saw no signs of immediate or delayed inflammation after mice were sensitized with SGH (e.g., itch, swelling, flare, or wheal). Nevertheless, serum collected from immunized mice after the last immunization (Figure 2A, lane 3)—that is, when the mice were inoculated with 10 or 100 CFU of *M. ulcerans*—contained IgGs that bound SGH-derived proteins. In contrast to the control mice, nine out of the ten mice immunized with SGH and then inoculated with *M. ulcerans* preincubated with SGH (Table 1, group D) did not develop lesions up to three months later. Also, in this group, the number of *M. ulcerans* CFU was about two orders of magnitude lower than in the three other groups (Table 1, group D versus groups A, B, and C). By contrast, mice that were immunized with SGH and then inoculated with *M. ulcerans* previously incubated in PBS

(Table 1, group C) displayed tail lesions, suggesting that the SGH components retained by *M. ulcerans* do not share any common epitopes with *M. ulcerans* molecules. Indeed, no mouse immunoglobulin bound to any component of the insect SGH-free *M. ulcerans* extracts size-fractionated under the same conditions as the SGH, irrespective of the mouse serum samples tested, ruling out possible cross-reactivity with mycobacterial components (unpublished data). Altogether, these results suggest that the presence in mouse sera of IgGs that bind aquatic insect SGH-derived molecules otherwise retained by *M. ulcerans* clusters might be a relevant immune biomarker of their protective status. We thus investigated the potential relevance of this immune signature as a biomarker of the protective status in humans by comparing the SGH-reactive antibody profile in the sera of individuals with and without Buruli ulcers living in areas endemic for Buruli ulcers. Particular attention was paid to the SGH-derived proteins known to be retained by *M. ulcerans* clusters.

Table 1. Experimental Model 2: Effect of Prior Immunization with *N. cimicoides* SGH on the Development of Lesions in the Tails of BALB/c Mice and the *M. ulcerans* Load after Subcutaneous Inoculation of *M. ulcerans*

Treatment	Measure	Group A	Group B	Group C	Group D
Immunization with SGH	—	No	No	Yes	Yes
Inoculation of <i>M. ulcerans</i> previously incubated with or without SGH	—	Without SGH	With SGH	Without SGH	With SGH
Number of inoculated bacilli: 10	Lesions ^a	5/5	5/5	5/5	1/5
	Log CFU ^b	7.3 (0.13)	7.6 (0.06)	7.6 (0.13)	5.6 (0.13)
Number of inoculated bacilli: 100	Lesions ^a	5/5	5/5	5/5	0/5
	Log CFU ^b	8.5 (0.24)	8.4 (0.26)	8.2 (0.26)	6.1 (0.6)

Three months after *M. ulcerans* inoculation, presence of lesions and bacillus counts (log CFU)/gram of tissue were assessed.

^aNumber of lesions/number in group.

^bMean values of log CFU (standard deviation) are reported.

doi:10.1371/journal.pmed.0040064.t001

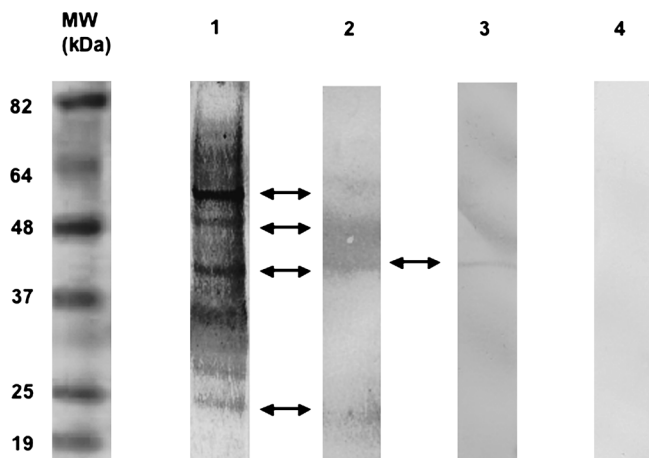


Figure 3. Western Blotting with Human Serum Samples Grouped According to Four Distinct *N. flavicollis* SGH Reactive-Antibody Profiles SGH was size-fractionated and probed with human sera as follows. Lane 1: Typical profile with serum of 49/55 (89%) exposed group participants only. Lane 2: Typical profile with serum obtained for two other members of the exposed group and one patient. Arrows correspond to protein bands at 22, 40, 48, and 54 kDa. Lane 3: Typical profile with sera obtained from two participants in each group. The arrow indicates a protein band at 40 kDa. Lane 4: No immune reactivity to SGH with serum from two members of the exposed group and from 27/30 (90%) of the patient group. MW, molecular weight. doi:10.1371/journal.pmed.0040064.g003

In Areas Endemic for Buruli Ulcers, the Sera of Healthy Individuals Contain Higher Titres of IgGs that Bind SGH Proteins than Do the Sera of Patients with Buruli Ulcers

All sera from individuals living in areas of Benin endemic for Buruli ulcers were first screened by Western blotting for reactive antibodies against SGH prepared from the aquatic insects present in the endemic areas, namely *N. flavicollis* (Figure 3). Many of the SGH constituents, such as 22, 40, 48, and 54 kDa proteins, bound IgGs present in the sera of exposed group members. Surprisingly, none of the SGH proteins bound IgGs present in 27 of the 30 sera collected from the patient group. The IgGs in the sera from the exposed group bound five of the SGH-derived molecular species (22, 35, 40, 48, and 66 kDa) shown to coat *M. ulcerans* (Figure 4). IgGs from the sera of participants from both groups recognised four bands (32, 56, 85, and 172 kDa) from heat-killed *M. ulcerans* bacteria, which are likely due to common epitopes shared with other environmental mycobacteria (Figure 4). Altogether, this qualitative analysis showed the presence of SGH-binding IgGs primarily in the sera of exposed group members.

We then carried out a quantitative analysis using ELISA (Figure 5). We detected SGH-reactive IgG antibodies in 87.2% of the exposed group (48/55) and 60% of the patient group (19/30). This difference was statistically significant ($\chi^2 = 6.7$, df = 1; $p = 0.001$). The relative mean titre of the SGH-binding IgG antibodies was significantly higher in the exposed group than in the patient group ($p = 0.05$ for *N. flavicollis* and $p = 0.001$ for *B. cordofana* [Newman-Keuls multiple comparison test]), suggesting a correlation between relative mean IgG antibody titre and the absence or presence of Buruli ulcers. Thus, in the sera of humans living in areas endemic for Buruli ulcers, the presence and titre value of antibodies that bind molecules derived from aquatic insect salivary glands may be

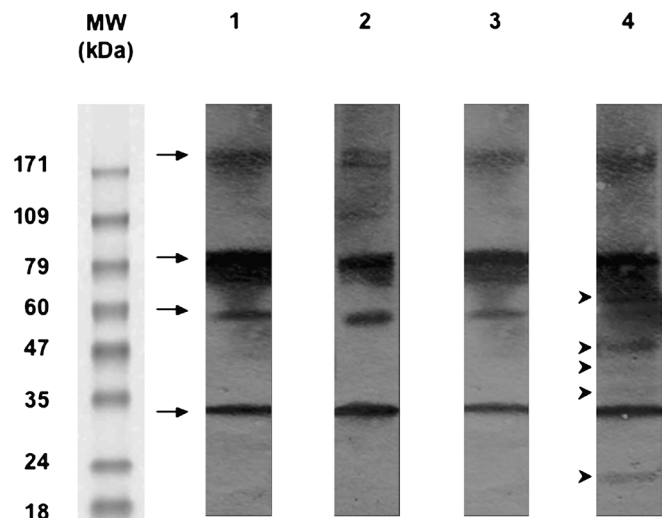


Figure 4. Western Blotting with Human Serum Samples as Probes for SGH Molecules that Bound to *M. ulcerans*

N. flavicollis SGH molecules bound to *M. ulcerans* were size-fractionated and probed with human serum samples. Lane 1: *M. ulcerans* not preincubated with *N. flavicollis* SGH probed with serum from the patient group. Lane 2: *M. ulcerans* not preincubated with *N. flavicollis* SGH probed with serum from the exposed group. Lane 3: *N. flavicollis* SGH molecules that bind to *M. ulcerans* probed with serum from the patient group. Lane 4: *N. flavicollis* SGH molecules that bind to *M. ulcerans* probed with serum from the exposed group. Arrows indicate four *M. ulcerans* antigens. Arrow heads indicate five *M. ulcerans*-binding insect protein bands at 22, 35, 40, 48, and 66 kDa. MW, molecular weight. doi:10.1371/journal.pmed.0040064.g004

potentially relevant immune biomarkers of a protective status in the absence of any preulcerative or ulcerative lesions containing *M. ulcerans*.

Discussion

Using a previously developed mouse model [21,22], in this study we demonstrated (i) that preulcerative and ulcerative stages of Buruli ulcer at sites of inoculation of *M. ulcerans* are prevented if the mice have been bitten by *M. ulcerans*-free insects before being exposed to insects harbouring *M. ulcerans*, and (ii) that the presence of insect saliva-reactive antibodies in the mouse serum is an immune signature that correlates with this protective status. However, this protective status does not prevent *M. ulcerans* from establishing themselves and expanding, although the size of the bacterial population is one to two orders of magnitude lower than in control mice not previously exposed to insect bites and displaying a lesion at the site of inoculation.

In addition, we wished to determine whether insect saliva-reactive IgGs could be used as an immune signature that correlates with protection from disease. Two cohorts of human study participants in the Buruli ulcer-endemic area of Benin—those without ulcers (but assumed exposed to insect bites) and those with ulcers (actual Buruli ulcer patients)—were screened for the titre of IgGs that bind to insect predator SGH, focusing on those molecules shown to be retained by *M. ulcerans* clusters. In this investigation we established that, when present, IgG titres were lower in the Buruli ulcer patient group than in the Buruli ulcer-free individual group.

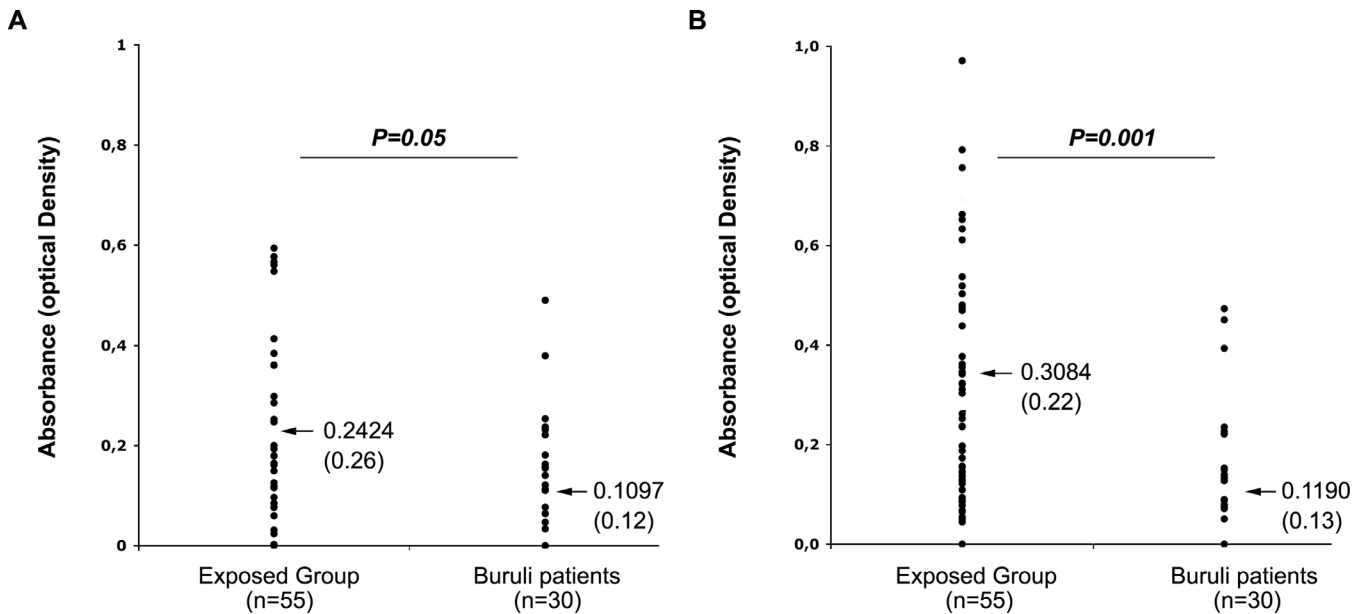


Figure 5. Human IgG Binding to Resident Aquatic Insect SGH by ELISA Assay

Mean values are indicated by arrows and are accompanied by corresponding standard deviations (in parentheses). Results from ELISAs are shown for SGH from *N. flavicollis* (A) and from *B. cordofana* (B). Comparisons by one-way analysis of variance followed by the Newman-Keuls multiple comparison test show that the relative mean titre of specific IgG in exposed individuals is significantly higher than in patients.

doi:10.1371/journal.pmed.0040064.g005

Buruli ulcer is the most common mycobacterial disease in immunocompetent humans after tuberculosis and leprosy. Although BCG can prevent *M. ulcerans*-driven lesion development in a mouse model [32], no evidence of a protective effect of routine BCG vaccination against Buruli ulcer was detected in a case-control study in Benin [9]. Prior sensitization to environmental *Mycobacterium* species may partly explain the failure of BCG in African countries, as observed for tuberculosis [33]. A classical *Mycobacterium*-based vaccine is thus unlikely to induce the proper immune effectors/regulators that would prevent bacterial colonisation and the skin-damaging processes in the *M. ulcerans*-containing site. This problem led us to investigate vaccine strategies that have already proved promising against microorganisms transmitted by arthropod hosts and vectors [34–36]. Furthermore, it has been shown that some molecules present in the saliva of the blood-feeding arthropods that are hosts and vectors of certain parasites are immunogenic and may help prevent infestation by the parasites causing the pathogenesis. For example, a protective effect was reported in mice bitten by *L. major*-free blood-feeding *P. papatasi* sand flies [37] or in mice immunized with *P. papatasi* saliva molecules as either SGH or saliva-encoding DNA sequences [28,30].

In our mouse model [22] we established that nine out of ten BALB/c mice exposed to *M. ulcerans*-free *N. cinicoides* bites or immunised with *N. cinicoides* SGH did not develop tail lesions at the sites of *M. ulcerans* delivery either by the bite of *M. ulcerans*-loaded *N. cinicoides* or by a syringe containing in vitro-grown *M. ulcerans* colonies that had been incubated with SGH. Unlike in the *Leishmania* model, in which the delivery of parasites by *L. major*-carrying sand flies to naive mice considerably enhanced the severity of the lesion [37,38], we did not observe any marked difference between mice that

received either *M. ulcerans* with SGH by syringe or bites of insects whose salivary glands contained *M. ulcerans*. Our data show that in naive mice, both inoculation methods initiate similar pathogenic processes to those seen for SGH-treated or saliva-free *M. ulcerans*. Similar protection was obtained whether a low- or a medium-dose inoculum was given. However, despite the absence of any lesion, a high mycobacterial load was recovered from mouse tails previously exposed to SGH. This suggests that when *M. ulcerans* is coated with SGH or delivered from the *Naucoris* salivary gland, mice that have an immune response against SGH or the saliva molecules covering the bacteria present a skin microenvironment that may delay the production of tissue-damaging mycolactone toxin or other mycobacterial molecules. This would allow the tissue-protective immune effectors to be properly balanced with bacteria-targeted immune effectors.

In *M. ulcerans*-positive but lesion-free mice given *M. ulcerans* treated with SGH-derived molecules, the presence of IgGs that bind insect molecules—and more specifically the SGH molecules coating *M. ulcerans*—may be an interesting biomarker to focus on when investigating the presence of protective effectors/regulators that remodel the early niche of *M. ulcerans*. It is indeed reasonable to investigate whether both type 1 T and regulatory T lymphocytes might be activated by saliva-derived peptides loading the major histocompatibility complex molecules displayed by dendritic leucocytes. Indeed, in the experimental *L. major* mouse model, the protection conferred by SGH is coupled to activation of saliva-reactive CD4⁺ cells, a positive skin delayed-type hypersensitivity to SGH, and CD4-dependent interferon- γ production [37]. Protection studies using the purified protein antigenic molecules, and adoptive transfer experiments of saliva-reactive antibodies and/or saliva-reactive CD4⁺ T lympho-

cytes will determine whether this is the case in our experimental system.

Although the seroepidemiological data collected from humans living in Benin in an area endemic for Buruli ulcers are only preliminary, they require some further comments. We detected a higher relative mean antibody titre to SGH from local aquatic insects in the sera from Buruli ulcer-free healthy participants (“exposed” group) than in the sera of Buruli ulcer patients (“patients” group) from the same endemic areas. The healthy individuals regularly work and live around the aquatic areas and probably are regularly exposed to aquatic insect bites. This situation is similar to that described for many residents living in regions endemic for Lyme disease. Those experiencing a persistent tick-associated itch were less likely to develop Lyme disease than those who did not experience this reaction [35]. Many different immune signatures to tick components, including salivary gland antigenic molecules, may prevent *Borrelia* disease or other diseases driven by parasitic microorganisms transmitted by ticks [36]. A similar situation has been extensively documented in an area endemic for leishmaniasis, in which the occurrence of *Leishmania*-caused lesions decreased with age and level of antibodies against salivary gland molecules in the absence of any parasite-targeted serological signature [39].

Our results suggest potentially important immune markers for epidemiological studies in regions in which Buruli ulcer is showing features of an emerging disease. Comprehensive studies that integrate the monitoring of aquatic insect saliva-reactive antibodies and T lymphocytes would allow patients who do not have high titres of antibodies to SGH to benefit from regular tests for early signs of the disease that can be cured with appropriate antibiotics. Such studies have been recently set up in other endemic areas or in emerging areas such as Cameroon.

As well as being the first report, to our knowledge, of a robust, experimental mouse model that closely mimics the processes driven by *M. ulcerans* in humans in endemic areas, our study also shows, we believe for the first time, that effective protection against *M. ulcerans*-caused pathogenic processes is possible but that this will require immunogens derived from insect host saliva rather than from pathogenic microorganisms. However, investigations into the mechanisms that prevent Buruli ulcer formation are still needed. These studies should address whether the aquatic insect SGH-reactive antibodies play a role in protection or whether they are only relevant biomarkers of *M. ulcerans* delivery by one of their hosts and vectors. Our results are the first step to determine the immune mechanisms that prevent *M. ulcerans* development into the nodular and ulcerative stages—the Buruli ulcers—in humans. They will help structure future investigations in Buruli ulcer endemic area, providing a rationale for considering at least two novel parameters: (i) the presence of immune signatures of exposure to insect predators, and (ii) the insect saliva molecules that bind to *M. ulcerans*.

Supporting Information

Alternative Language Abstract S1. Translation of the Abstract into French by Laurent Marsollier and Colleagues

Found at doi:10.1371/journal.pmed.0040064.s001 (21 KB DOC).

Acknowledgments

We thank Christine Toneatti for the biomedical investigation undertaken in Benin, the work for which also required attention to cultural contexts, unique historical origins, and legal aspects. Without her knowledge, experience, and ethical standards this study would have not been possible. We also thank Xavier Nassif, Antoine Des Gravier, Augustin Guédénou, Pierre Buffet, Gloria Morizot, Marie Noëlle Ungeheuer, and Francis Décheron and his team for their suggestions and their help. Finally, we express our gratitude to all the volunteer participants of the study.

Author contributions. LM, ED, AM, AC, CJ, PL, BC, GM, STC, and JA designed the study. LM, ED, PB, AM, AC, FT, EY, PL, BC, GR, GM, STC, and JA analyzed the data. LM, ED, CMW, and AC enrolled patients. LM, ED, PB, AM, CMW, JPJA, AC, CJ, FT, EY, PL, BC, GR, SE, GM, STC, and JA contributed to writing the paper. ED, JPJA, AC, and PL collected data or did experiments for the study. PB performed the human patient serum ELISA analysis. GR did some of the experiments with LM in the laboratory belonging to the Génétique Moléculaire Bactérienne Unit at the Pasteur Institute, and thus participated also in the analysis of the results. SE and CMW collected some arthropods in the endemic region of Cameroon and analysis in salivary glands.

References

- Asiedu K, Sherpier R, Raviglione M. (2000) Buruli ulcer: *Mycobacterium ulcerans* infection. Geneva: WHO, p118. WHO_CDS_CPE_G-BUI_2000.1.pdf. Available: <http://www.who.int/buruli/information/publications/en/index.html>. Accessed: 27 January 2007.
- Lagarigue V, Portals F, Meyers WM, Aguiar J (2000) [Buruli ulcer: Risk of bone involvement! Apropos of 33 cases observed in Benin.] *Med Trop (Mars)* 60: 262–266.
- George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, et al. (1999) Mycolactone: A polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 283: 854–857.
- George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL (2000) A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 68: 877–883.
- Duker AA, Carranza EJ, Hale M (2004) Spatial dependency of Buruli ulcer prevalence on arsenic-enriched domains in Amansie West District, Ghana: Implications for arsenic mediation in *Mycobacterium ulcerans* infection. *Int J Health Geogr* 3: 19.
- Johnson PD, Stinear T, Small PL, Pluschke G, Merritt RW, et al. (2005) Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med* 2: e108. doi:10.1371/journal.pmed.0020108
- Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portals F (2006) *Mycobacterium ulcerans* infection: Control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect Dis* 6: 288–296.
- Portals F, Aguiar J, Debacker M, Guédenon A, Steunou C, et al. (2004) *Mycobacterium bovis* BCG vaccination as prophylaxis against *Mycobacterium ulcerans* osteomyelitis in Buruli ulcer disease. *Infect Immun* 72: 62–65.
- Nackers F, Dramaix M, Johnson RC, Zinsou C, Robert A, et al. (2006) BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer: A case-control study in Benin. *Am J Trop Med Hyg* 75: 768–774.
- Etuaful S, Carbone B, Grosset J, Lucas S, Horsfield C, et al. (2005) Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3182–3186.
- Debacker M, Zinsou C, Aguiar J, Meyers W, Portals F (2002) *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) following human bite. *Lancet* 360: 1830.
- Debacker M, Zinsou C, Aguiar J, Meyers W, Portals F (2003) First case of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) following a human bite. *Clin Infect Dis* 36: 67–68.
- Barker DJP (1973) Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 867.
- Barker DJP, Clancy JK, Morrow RH, Rao S (1970) Transmission of Buruli disease. *Brit Med J* 4: 558.
- Roberts B, Hirst R (1997) Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* 35: 2709–2711.
- Ross BC, Marino L, Oppedisano F, Edwards R, Robins-Browne RM, et al. (1997) Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Clin Microbiol* 35: 1696–1700.
- Uganda Buruli Group (1971) Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection at Kinyara, Uganda. *Trans Soc Trop Med Hyg* 65: 763–775.
- Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, et al. (1997) Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. *Appl Environ Microbiol* 63: 4135–4138.
- Portals F, Chemlal K, Elsen P, Johnson PD, Hayman JA, et al. (2001) *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. *Rev Sci Tech* 20: 252–264.
- Portals F, Fonteyne P-A, Meyers WM (1999) Insects in transmission of *mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 353: 986.
- Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, Andre JP, Small PL, et al. (2005) Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium*

- ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. Cell Microbiol 7: 935–943.
22. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol 68: 4623–4628.
 23. Marsollier L, Severin T, Aubry J, Merritt RW, Saint Andre JP, et al. (2004) Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol 70: 6296–6298.
 24. Marsollier L, Andre JP, Frigui W, Reyssat G, Milon G, et al. (2006) Early trafficking events of *Mycobacterium ulcerans* within *Naucoris cimicoides*. Cell Microbiol. Epub 24 August 2006. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00790.x.
 25. Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, De Weirdt D, Boakye D, et al. (2004) Potential role for fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer): An environmental study. Appl Environ Microbiol 70: 5679–5681.
 26. Ribeiro J, Francischetti I (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspective. Annu Rev Entomol 48: 73–88.
 27. Gomes RB, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa J, Miranda JC, et al. (2002) Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. J Infect Dis 186: 1530–1534.
 28. Oliveira F, Kamhawi S, Seitz AE, Pham VM, Guigal PM, et al. (2006) From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. Vaccine 24: 374–390.
 29. Belkaid Y, Valenzuela JG, Kamhawi S, Rowton E, Sacks DL, et al. (2000) Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? Proc Natl Acad Sci U S A 97: 6704–6709.
 30. Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, et al. (2001) Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. J Exp Med 194: 331–342.
 31. Marsollier L, Honore N, Legras P, Manceau AL, Kouakou H, et al. (2003) Isolation of three *Mycobacterium ulcerans* strains resistant to rifampin after experimental chemotherapy of mice. Antimicrob Agents Chemother 47: 1228–1232.
 32. Tanghe A, Content J, Van Vooren JP, Portaels F, Huygen K (2001) Protective efficacy of a DNA vaccine encoding antigen 85A from *Mycobacterium bovis* BCG against Buruli ulcer. Infect Immun 69: 5403–5411.
 33. Andersen P, Doherty TM (2005) The success and failure of BCG—Implications for a novel tuberculosis vaccine. Nat Rev Microbiol 3: 656–662.
 34. Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG (2001) Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. J Immunol 167: 5226–5230.
 35. Burke G, Wikel SK, Spielman A, Telford SR, McKay K, et al. (2005) Hypersensitivity to ticks and Lyme disease risk. Emerg Infect Dis 11: 36–41.
 36. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol 28: 131–141.
 37. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. Science 290: 1351–1354.
 38. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, et al. (1998) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. J Exp Med 188: 1941–1953.
 39. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, et al. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280: 295–298.

Editors' Summary

Background. Buruli ulcer disease is a severe skin infection caused by *Mycobacterium ulcerans*, a bacterium related to those that cause tuberculosis and leprosy. This poorly understood disease affects people living near slow-flowing or standing water in poor rural communities in tropical and subtropical countries. How people become infected with *M. ulcerans* is unclear but one possibility is that infected aquatic insects transmit it through their bites. The first sign of infection is usually a small painless swelling in the skin. Bacteria inside these swellings produce a toxin that damages nearby soft tissues until eventually the skin sloughs off to leave a large open sore. This usually heals but the resultant scar can limit limb movement. Consequently, 25% of people affected by Buruli ulcers—most of whom are children—are permanently disabled. If the disease is caught early, powerful antibiotics can prevent ulcer formation. But most patients do not seek help until the later stages when the only treatment is to cut out the infection and do a skin graft, a costly and lengthy treatment.

Why Was This Study Done? There is currently no effective way to prevent Buruli ulcers. To develop an effective preventative strategy, researchers need to determine exactly how the infection is transmitted to people and what makes some individuals resistant to infection. Previous studies have indicated that 5%–10% of some aquatic insect predators that live in areas where Buruli ulcers occur have *M. ulcerans* in their salivary glands and that aquatic insects carrying *M. ulcerans* can transmit it to mice through bites. Furthermore, people working close to water inhabited by insect predators are less likely to develop Buruli ulcers than their relatives who do not work near water. In this study, therefore, the researchers investigated whether exposure to noninfected insect saliva provides some protection against *M. ulcerans* infection.

What Did the Researchers Do and Find? The researchers let uninfected aquatic insects bite ten mice several times before exposing these mice and ten unbitten mice to *M. ulcerans*-infected water bugs. Only one pre-bitten mouse developed an *M. ulcerans*-containing lesion compared with eight control mice. Next, the researchers injected mice with insect salivary gland extracts before challenging them with “naked” *M. ulcerans* or bacteria coated with salivary gland extract. Most uninjected mice developed lesions when challenged with coated or naked *M. ulcerans*, as did experimental mice challenged with naked *M. ulcerans*. However, most experimental mice challenged with coated *M. ulcerans* remained lesion-free. In both experiments, the blood of the pre-bitten and extract-treated mice (but not the control mice) contained antibodies (immune

system proteins that provide protection against infections and foreign proteins) to proteins in insect salivary gland extracts that stick to *M. ulcerans*. Finally, the researchers measured the blood concentration (the titer) of antibodies that bind insect salivary gland proteins in patients with Buruli ulcer and in healthy people living in the same area. People with high titers of these antibodies, they report, were less likely to have Buruli ulcers than those with low titers.

What Do These Findings Mean? These findings suggest that exposure to aquatic insect saliva may provide some protection against *M. ulcerans* lesion development. However, the current results have several limitations. In particular they will only be relevant to human disease if *M. ulcerans* is normally transmitted by insect bites, and this has not been proven yet. Also, because the human study did not measure the overall immune status of the study participants, the people with Buruli ulcers may have had a general immune deficit rather than simply lacking antibodies against insect salivary gland proteins. However, if the human findings can be repeated and expanded, they suggest that low antibody titers to salivary gland proteins might identify those people who are most susceptible to *M. ulcerans* infections and who would thus benefit most from regular tests for early signs of the disease. Finally, further work on the immune mechanism by which exposure to insect salivary gland proteins protects against *M. ulcerans* infections may help in the development of vaccines against Buruli ulcer disease.

Additional Information. Please access these Web sites via the online version of this summary at <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pmed.0040064>.

- A related *PLoS Medicine* Perspective article by Manuel T. Silva and others discusses this study and others on insect-borne parasitic diseases
- World Health Organization has information on Buruli ulcer disease
- US Centers for Disease Control and Prevention has information on Buruli ulcer
- The US Armed Forces Institute of Pathology Web site contains pages on Buruli ulcer
- Leprosy Relief Emmaus Switzerland offers information on Buruli ulcer
- Wikipedia contains pages on Buruli ulcer (note: Wikipedia is an online encyclopedia that anyone can edit)
- *PLoS Medicine* has a detailed review article on Buruli ulcer by Paul D. R. Johnson and colleagues

Perspectives

Aquatic Insects and *Mycobacterium ulcerans*: An Association Relevant to Buruli Ulcer Control?

Manuel T. Silva*, Françoise Portaels, Jorge Pedrosa

Mycobacterium ulcerans infection, which can cause Buruli ulcer, is the third most common human mycobacteriosis worldwide, after tuberculosis and leprosy. Buruli ulcer occurs predominantly in humid tropical areas of Asia, Latin America, and, mainly, Africa, where the incidence has been increasing, surpassing tuberculosis and leprosy in some regions [1].

Buruli ulcer is a devastating, necrotizing, “skin-eating” disease of the poor, sometimes producing massive, disfiguring ulcers, with a huge social impact [1,2]. Furthermore, both Buruli ulcer and its pathogen have high scientific interest, with unique, enigmatic, and controversial features [1–4]. However, research on Buruli ulcer has been limited, although interest has grown since 1998, when the World Health Organization established the Global Buruli Ulcer Initiative, and in 2004 called for urgent action to control the disease and to increase research. There is no vaccine against Buruli ulcer and treatment remains difficult [1,2,5]. A detailed description of *M. ulcerans* infection, including its clinical aspects, is available at <http://www.afip.org/Departments/infectious/bu/>.

A new area of research is the association between arthropods and *M. ulcerans*. And now a new study in *PLoS Medicine*, by Marsollier and colleagues, takes our understanding of this association further.

Arthropods and Mycobacteria

There is evidence that *M. ulcerans* is not transmitted person-to-person but is an environmental pathogen transmitted to humans from its aquatic niches [6,7]. However, it is not clear how this transmission occurs [6,7].

Arthropods can be vectors of many infectious agents. The hypothesis that arthropods were involved in the transmission of *M. leprae* to humans was originally put forward at the end of the 19th century [8]. This hypothesis was intermittently considered and tested until the early 1990s, but it was never consistently demonstrated.

The hypothesis that predatory aquatic insects, including those in the families Naucoridae and Belostomatidae (order Hemiptera) (Figure 1), were transmitters of *M. ulcerans* from aquatic niches to humans was advanced in 1999 [9]. The hypothesis was later reinforced by Marsollier and colleagues on the basis that [10]: (1) the salivary glands of *Naucoris cimicoides* are colonised with *M. ulcerans* upon feeding on grubs containing the pathogen; (2) *M. ulcerans*-infected *N. cimicoides* transmit the pathogen to mice upon biting; and (3) *N. cimicoides* in Buruli ulcer-endemic areas can be naturally colonised by *M. ulcerans*; this colonisation may occur through feeding on aquatic snails and fish, which take up *M. ulcerans* from water, mud, and aquatic plants [6,7].

These results have reawakened previous interest in the association between arthropods and human mycobacterioses, and have opened a new area in Buruli ulcer research.

Immunity to Vector Antigens in Arthropod-Borne Diseases

Examples of arthropod-borne diseases are leishmaniasis and Lyme disease, transmitted by sand flies and by ticks, respectively. These haematophagous vectors bite the host's skin to take a blood meal. The bite introduces the pathogen along with saliva that profoundly alters the skin by molecules with antihemostatic activity (which enable the vector to take an effective meal) and immunosuppressive activity (which enhances the infectivity of the injected pathogen by counteracting

the host immune response) [11–14]. Pre-exposure of mice to these salivary antigens induces protective immunity against pathogen transmission by neutralizing the immunosuppressive activity [11,12,14]. Furthermore, salivary molecules can adsorb to the pathogen [13,15]), a binding that can cause the microorganism to become an innocent bystander of the host's antisalivary immunity—again leading to protection against pathogen transmission [12].

Since efforts to develop vaccines targeting antigens of arthropod-borne pathogens have been largely disappointing, targeting arthropod salivary components provides a potential alternative mechanism to block the transmission of arthropod-borne diseases [11,12,14]. Indeed, vaccines have been described that protect mice against leishmaniasis by targeting sand fly salivary proteins [14].

The above results indicate that immunity to salivary antigens of vectors can be an epidemiological biomarker of insect biting and of the consequent

Funding: The authors received no specific funding for this article.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Citation: Silva MT, Portaels F, Pedrosa J (2007) Aquatic insects and *Mycobacterium ulcerans*: An association relevant to Buruli ulcer control? *PLoS Med* 4(2): e63. doi:10.1371/journal.pmed.0040063

Copyright: © 2007 Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Manuel T. Silva is at the Institute for Molecular and Cell Biology (IBMC), University of Porto, Porto, Portugal. Françoise Portaels is at the Mycobacteriology Unit, Department of Microbiology, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium. Jorge Pedrosa is at the Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: mtsilva@ibmc.up.pt

The Perspectives section is for experts to discuss the clinical practice or public health implications of a published article that is freely available online.



doi:10.1371/journal.pmed.0040063.g001

Figure 1. Semiaquatic Hemiptera That Have Tested Positive for *M. ulcerans*

The top two images show *Macrocoris* sp. 1.0 cm in body length (family Naucoridae), and the bottom two images show *Appasus* sp., about 2.5 cm in body length (family Belostomatidae). The ventral and dorsal views are in the left and right photographs, respectively. Photo from [2].

immunoprotection against arthropod-borne diseases.

These observations prompted Marsollier and colleagues to search for immune signatures that could be correlates of protection against *M. ulcerans* and to investigate the relevance of vector salivary antigen-based vaccine strategies for Buruli ulcer.

The New Study

Marsollier and colleagues' new study in *PLoS Medicine* [16] extends the authors' previous observations [10] and shows that repeated biting by *M. ulcerans*-free *N. cimicoides* renders mice more resistant to the infection obtained through biting by the insects carrying *M. ulcerans*. The researchers also found that subcutaneous immunization of mice with salivary extracts of *M. ulcerans*-free *N. cimicoides* protected against infection following injection of *M. ulcerans*, but only when the bacilli were first coated with salivary proteins. This suggests that the protection conferred to mice by previous *N. cimicoides* biting is associated with antibodies (detected in the blood of repeatedly bitten mice) reacting with proteins of *N. cimicoides* saliva that

would bind to *M. ulcerans* during its stay in the insect's salivary glands, and would coat the bacilli when they are transmitted by biting.

The new study did not analyse the mechanism of this protection, but one possibility is that *M. ulcerans* transmitted by *N. cimicoides* to a sensitised host would become the innocent bystander target of the immune response against the adsorbed salivary proteins, resulting in host protection [12]. These results suggest that inhabitants of Buruli ulcer-endemic areas could become naturally immunised if repeatedly bitten by uninfected *N. cimicoides*, a mechanism for protection that has also been suggested for leishmaniasis [12,14,17] and Lyme disease [18]. The observation that unaffected, possibly resistant people exposed to aquatic environments in Buruli ulcer-endemic areas have higher titers of antibodies reacting with Naucoridae and Belostomatidae salivary proteins than do patients with Buruli ulcer in the same areas [16] is consistent with this hypothesis. This observation also suggests that biting of humans by *N. cimicoides* and immunity to those proteins occur in a natural setting.

Limitations of the New Study

There are three major limitations to the new study. The first is that the study did not analyse whether the antibodies against insect salivary proteins in mice protected by prior biting by uninfected *N. cimicoides* are effectors of protection or only biomarkers of the protective status. Additional studies are, thus, necessary to clarify the roles of humoral and cell-mediated immunity in such protection.

Second, studies by Marsollier and others have been centered on Naucoridae, but it is possible that Belostomatidae and other predatory aquatic insects are also transmitters of *M. ulcerans* [9,16], which could complicate the investigation by extending the list of relevant insect salivary proteins. Another source of complication could be the occurrence of extensive polymorphisms in the relevant salivary proteins; the extent of these polymorphisms should be studied using specimens of aquatic insects collected in different geographical areas.

Third, a general lack of knowledge about the transmission of *M. ulcerans* is pertinent to this study—the overall relevance and contribution of biting by *M. ulcerans*-colonised aquatic insects to the transmission of Buruli ulcer is unknown. While sand flies and ticks are haematophagous, and biting is indispensable both for vector survival and for transmission of the disease [11], Naucoridae and Belostomatidae are carnivorous insects and only accidentally bite humans [7]. Therefore, other forms of transmission of *M. ulcerans* to humans, including skin trauma, have also been considered [1,5–7,19].

Implications

If future work supports the notion that aquatic insects are important in the transmission of the causative organism in Buruli ulcer, as some data suggest [9,10,16], the results now published in *PLoS Medicine* could have important public health implications.

First, following the work with murine leishmaniasis [14], attempting to develop a Buruli ulcer vaccine that targets *N. cimicoides* salivary antigens would be justifiable. (It must be kept in mind, however, that the progress with vaccines against arthropod-borne diseases based on salivary proteins of vectors has been slow. Because

of scientific, technical, and safety problems [12,14], such vaccines still remain unavailable for human use.) In addition, the presence of antibodies against salivary antigens of aquatic insects may be an important biomarker of protective status against Buruli ulcer, with epidemiological relevance in the study of populations at risk in endemic areas of the disease. ■

References

1. van der Werf TS, Stienstra Y, Johnson RC, Phillips R, Adjei O, et al. (2005) *Mycobacterium ulcerans* disease. Bull World Health Organ 83: 785–791.
2. Johnson PDR, Stinear T, Small PLC, Pluschke G, Merritt RW, et al. (2005) Buruli ulcer (*M. ulcerans* Infection): New insights, new hope for disease control. PLoS Med 2: e108. doi:10.1371/journal.pmed.0020108
3. Oliveira MS, Fraga AG, Torrado E, Castro AG, Pereira JP, et al. (2005) Infection with *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice. Infect Immun 73: 6299–6310.
4. Torrado E, Fraga AG, Castro AG, Stragier P, Meyers W, et al. (2007) Evidence for an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*. Infect Immun 75: 977–987.
5. Sizaïre V, Nackers F, Comte E, Portaels F (2006) *Mycobacterium ulcerans* infection: Control, diagnosis, and treatment. Lancet Infect Dis 6: 288–296.
6. Duker AA, Portaels F, Hale M (2006) Pathways of *Mycobacterium ulcerans* infection: A review. Environ Int 32: 567–573.
7. Merritt RW, Benbow ME, Small PLC (2005) Unraveling an emerging disease associated with disturbed aquatic environments: The case of Buruli ulcer. Front Ecol Environ 3: 323–331.
8. Benchimol JL, Romero Sa M (2003) Adolpho Lutz and controversies over the transmission of leprosy by mosquitoes. Hist Cienc Saude Manguinhos 10 (Suppl 1):49–93. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702003000400004&lng=en&nrm=iso. Accessed: 18 January 2007.
9. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM (1999) Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. Lancet 353: 986.
10. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, et al. (2002) Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol 68: 4623–4628.
11. Kamhawi S (2000) The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. Microbes Infect 2: 1765–1773.
12. Mejia JS, Bishop JV, Titus RG (2006) Is it possible to develop pan-arthropod vaccines? Trends Parasitol 22: 367–370.
13. Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, et al. (2005) The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature 436: 573–577.
14. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol 28: 131–141.
15. Mejia JS, Moreno F, Muskus C, Vélez ID, Titus RG (2004) The surface-mosaic model in host-parasite relationships. Trends Parasitol 20: 508–511.
16. Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, Marot A, Wondje CM, et al. (2007) Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. PLoS Med 4: e64. doi:10.1371/journal.pmed.0040064
17. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, et al. (2000) Human immune response to sand fly salivary gland antigens: A useful epidemiological marker? Am J Trop Med Hyg 62: 740–745.
18. Burke G, Wikel SK, Spielman A, Telford SR, McKay K, et al. (2005) Hypersensitivity to ticks and Lyme disease risk. Emerg Infect Dis 11: 36–41.
19. Portaels F, Meyers WM (2006) Buruli ulcer. In: Faber WR, Hay RJ, Naafs B, editors. Imported skin diseases. Maarssen (The Netherlands): Elsevier Gezondheidszorg. pp. 117–129.

Open Access

means everything published
in PLoS journals is immediately
available online for free. Read it, host it,
print it, copy it, distribute it—all use is
fair use, so long as the original authors
and source are credited.

ANNEXE 3

Human antibody response to *Lethocerus* salivary antigens as a potential protection factor of *M. ulcerans* infection (Buruli ulcer).

Christelle Mbondji ^{a,b}, Laurent Marsollier ^b, Julien Doannio ^c, Agnès Marot ^b, Estelle Marion ^{a,b}, Jacques d'Alayer ^d, Jacques Aubry ^e, Sara Eyangoh ^{a,*}

^a Laboratoire des Mycobactéries, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274, Yaoundé, Cameroun

^b Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP), Centre Hospitalier Universitaire, Université d'Angers, 49033 Angers Cedex 01, France

^c Institut National de Santé Publique (INSP), BP V 47, Abidjan, Côte d'Ivoire

^d Plate-forme d'Analyse et de Microséquençage des Protéines, Institut Pasteur, Paris, France

^e INSERM U892, Université de Nantes, Faculté de Pharmacie, 44000 Nantes, France

* Corresponding author. Laboratoire des Mycobactéries, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274, Yaoundé, Cameroun. Tel.: (237) 22.23.10.15; fax: (237) 22.23.15.64.

E-mail address: eyangoh@pasteur-yaounde.org

Abstract

Mycobacterium ulcerans which is the causative agent of Buruli ulcer, a necrotizing skin disease, is an environmental mycobacteria transmitted from aquatic niches but the mode of transmission is not fully understood. We previously demonstrated that predatory aquatic insects could be both reservoirs and potential vectors of *M. ulcerans*. Furthermore pre-exposure of laboratory mice to saliva molecules could induce a protective immunity against skin lesion development. In a case control study in Cameroon, we show that the level of specific antibody IgG response, restricted to IgG1 subclass, to salivary constituents was higher in healthy control subjects than Buruli patients ($P = 0.013$). Interestingly in addition to a few immunogenic salivary proteins (85, 64, 37 and 33 kDa bands), a protein of 28 kDa derived from salivary gland was able to bind to *M. ulcerans* and to be recognized also by IgG antibodies of healthy subjects of endemic area.

Keywords : Buruli ulcer; *Mycobacterium ulcerans*; Saliva; Antibody response; Belostomatidae

Introduction

Mycobacterium ulcerans infection which can cause Buruli ulcer has been declared as a rapidly emerging disease often leading to extensive destruction of the skin and subcutaneous tissue with the formation of large ulcers. It is rife in humid tropical countries and especially in poor rural areas of western and central Africa with increasing incidence higher sometimes than that of two other human mycobacteriosis, leprosy and tuberculosis. However it may also occur in temperate climates such as in coastal southeastern Australia [1] although the incidence is still low overall. The detection of cases is so late that the afflicted individuals develop disabilities. Recently a major advance was achieved by combination of Rifampicin and Streptomycin, antibiotic treatment [2] that has enabled to reduce the half of number of patients for the surgery / grafting as well as their sufferings and the average cost of cares. No specific vaccine against *M. ulcerans* infection is available although recently the Ag85A from *M. ulcerans* has been shown to be a good candidate to induce a protection in mouse model [3].

In contrast to tuberculosis and leprosy, the transmission of *M. ulcerans* to humans is not mediated by other patients but probably through exposure to a colonized environment although the exact mechanism of transmission is not very clear [4]. Epidemiological evidence suggests that transmission occurs in close proximity to slow-moving or stagnant waters. In a previous case-control study in an endemic area of Cameroon for Buruli ulcer [4], we have reported an increased risk for Buruli ulcer for those who had farming activities, wading in the river Nyong swamps with short lower body clothings. Furthermore the use of bed nets has been identified as a new protective factor. The eventual role of mosquitoes in transmission of *M. ulcerans* to humans as supported by the survey of an sustained outbreak of Buruli ulcer extends the initial hypothesis on the role of aquatic insects [1]. We have demonstrated that predatory aquatic insects including

those of the families (Naucoridae, Belostomatidae) (order *Hemiptera*), fish and plants may be reservoirs for *M. ulcerans* and that aquatic insects may even be involved in transmission to humans [5,6]. The complexity of interactions of the environmental parameters in relation to human activities underlines the importance of developing new tools to identify populations exposed to a high risk to develop Buruli ulcer and which could enable an epidemiologic surveillance and identification of individuals at high risk. Field observations have shown that humans with regular activities near rivers are less prone to Buruli ulcers than their relatives who are less exposed to this environment. Typically Buruli ulcer epidemics in 1970 were notable for primarily affecting displaced Rwandan refugees with very few cases being reported in the autochthonous populations living in these exposed environments [7]. More recently we reported a similar situation in Benin in the vicinity of Ouémé river with many individuals remaining Buruli ulcer-free although being regularly bitten by aquatic insects belonging to the *Naucoris* and *Belostoma* genera. Given the fact that these vectors are able to bite the human skin and hereby to inoculate salivary constituents, we have found that serum from healthy exposed inhabitants from endemic areas had significant higher IgG antibody levels specific to salivary gland homogenate of *Naucoris* than Buruli ulcer diagnosed patients [8]. In the present study we extend these observations to evaluate the interest of such humoral immune response in human population of another Buruli ulcer-endemic area in Cameroon with a greater number of subjects. Furthermore we have identified and characterized salivary proteins from *Lethocerus sp.* (Belostomatidae) which bound to specific IgG antibodies.

2. Materials and methods

2.1. Studied population and case definitions

The present study was carried out in two health districts of the Center Province Cameroon where Buruli ulcer (BU) is endemic between the villages of Akonolinga and Ayos situated 130 km east of Yaounde. Sera were available from a double-matched case control study as previously described [4]. Control-subject was defined as an unaffected member of the family of each patient enrolled as a family-matched control, formally the nearest brother/sister in age. No family matched control was enrolled when the patient was a single child or when parents or his/her siblings lived out the study area. The study enrollment was voluntary. Written consent was obtained from patients and control subjects or from their parents or guardians of included children. The study protocol was approved by the National Ethics Committee and the Cameroon Ministry of Public Health.

2.2 Water bug salivary glands and saliva

The *Lethocerus sp.* (Belostomatidae) used in this study were captured along the banks of the Nyong river and maintained in plastic containers filled with spring water for their transport to Center Pasteur of Cameroon, Yaoundé.

Saliva from Belostomatidae was collected by placing its rostrum into a conventional plastic pipette tip containing 100 µl of water with protease inhibitors (Complete, Mini, Roche Diagnostics) whereas the body of the insect was grasped with blunt forceps.

Their salivary glands were dissected under a binocular microscope, then stored at -20° C in 100 % saturated ammonium sulfate before use. Specimens were diluted in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing protease inhibitors (Complete Mini, EDTA free; Roche Diagnostics) as previously described [9]. Tissues were then homogenized by shaking with 106 mm of acid washed glass beads (Sigma) for 5 min in a Tissue Lyser (Retsch,) at 4° C at a maximum speed. The salivary gland homogenate (SGH) consisted of the supernatant fraction recovered after debris were removed by centrifugation at 8,000 x g for 10 min. Protein concentrations were measured by the Bradford dye-binding procedure method (Bio-Rad)..

2.3. Assay of human antibody levels

The sera were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the presence of IgG and IgM antibodies that bind to salivary constituents. Proteins (0,8 µg) from the insect SGH, diluted in 100 µl of carbonate-bicarbonate buffer 50 mM, pH 9.6, were coated onto 96-well Maxisorb plates (Nunc, Denmark) overnight at 4° C. After three washes with PBS, the plates were saturated for 2 hrs at 37° C with 200 µl of blocking buffer consisting of PBS-BSA 3 %, and washed three times with PBS-0.05 % Tween 20. Sera diluted in PBS with 0.05 % Tween 20 and 0.3 % BSA were incubated (100 µl/well) for 1 hr at 37° C, plates were then washed and thereafter incubated at 37°C for 1 hr with 100 µl peroxidase conjugated goat anti-human IgG or IgM (Sigma) diluted at 1/2000 or mouse monoclonal antibodies specific for each human IgG isotype

(Sigma) diluted at 1/500 in PBS with 0.05% Tween 20 and 0.3 % BSA. Plates were washed three times with PBS-0.05 % Tween 20 before being incubated with peroxidase substrate at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by addition of 50 μ l 1M H₂SO₄. Plates were read at 490 nm with an ELISA reader (ELX 800, Bioteck).

Each serum was tested in triplicate and in control without HSG antigens.

2.4 Statistical analysis

The Student's t test was used to assess the significance of the differences in mean values of the humoral immune response to salivary antigens between the two independent groups. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

The level of total IgG and their subclasses, and IgM antibodies was expressed as adjusted optical density (AOD). This parameter was calculated for each serum as the mean OD value of the triplicate test with salivary constituents minus the mean OD value of the control wells i. e. without salivary constituents. Statistical analysis was performed with SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). The independent sample t-test was used to compare the immune response for tested antigens between the two groups. The F Levene's test was used to compare variances between the groups.

2.5 SDS-PAGE and Western blot

Two samples corresponding to the saliva and the homogenate of salivary glands (SGH), 24 µg and 36 µg of protein respectively were suspended in non denaturant sample buffer (XT sample buffer, Biorad) before being separated on a 4-12 % precast gels (Criterion, BioRad) and subsequently stained with Coomassie Brilliant Blue Instant Stain (Interchim, France). The separated bands were transferred onto a Hybond PVDF membrane (Amersham) that thereafter was saturated with 3 % BSA overnight at 4° C. The PVDF strip was incubated with serum from humans diluted 1/100 in PBS containing 0.05 % Tween 20 and 0.3 % BSA for 1 h 30 min at 37°C. After two washes with PBS – 0.05 % Tween 20, goat anti-human IgG (γ chain specific) peroxidase-conjugated antibodies (Sigma) diluted at 1/10.000 or mouse monoclonal antibodies specific for each human IgG subclass (Zymed) diluted at 1/1000 were incubated, and after extensive washing, 0,5 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma) was used for detecting human IgGs bound to the different antigens.

2.6 Recovery of SGH molecules bound to *M. ulcerans*

M. ulcerans (2×10^{10} bacteria) were incubated with 1 mg of salivary proteins for 1 h 30 at 30° C with gentle agitation. The bacteria were then extensively washed and centrifuged at 12,000 x g in PBS with protease inhibitors (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics) at 4° C for 10 min. The resulting pellet was resuspended in 200 µl of 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, with 1,5% SDS and 5% glycerol. After heating at 100° C for 2 min the bacteria were centrifuged at 12,000 x g for 3 min at

4° C. The supernatant was loaded on Tris-HCl polyacrylamide gels (10-15%) and transferred to Hybond PVDF membranes (Amersham-Biosciences, France).

2.7 Microsequencing

The N-terminal amino acid sequence was obtained by loading PVDF membranes containing the excised protein bands of interest onto an automated Edman sequencer (ABI 494 Applied Biosystems, Foster City, CA) following the instructions of the supplier. The generated protein sequences were compared with those of known proteins using the programs BLAST or FASTA.

3. Results

3.1 IgG antibody response and exposure to *Lethocerus sp.* bites

The IgG response against SGH antigens of *Lethocerus sp.* SGH was evaluated among 119 case subjects and 172 control subjects. The median age of all recruited patients was 14 years (range 2 to 78 years) with a greater number of male case-patients 64/119 (54 %). If we detected SGH bound IgG antibodies in all of healthy subjects (exposed group) and all of case subjects (patient group) there was yet a statistically significant difference of the SGH bound IgG antibody level between the control and the case subjects ($t=2,490$, $df=289$, IC 95%). The relative mean titre of the IgG response against salivary constituent antigens of *Lethocerus sp.* was significantly

higher in the control group than in the patient group ($P=0.013$), suggesting a correlation between relative mean antibody titre and the risk of Buruli ulcers (Fig.1).

The evaluation of individual specific isotypic responses to antigens of SGH was assessed in the two groups of individuals and for the IgG subgroups, only a IgG1 response was observed with a statistically significantly difference higher in exposed subjects than in Buruli patients ($P<0.012$) (Fig. 2).

3.2 Comparative profile of saliva and salivary gland proteins of *Lethocerus sp.*

Electrophoresis was carried out to determine the protein content of saliva from *Lethocerus sp.* which showed numerous bands ranking from 22 kDa to > 85 kDa (Fig.3). Four major polypeptides (n° 1, 2, 6, 7) with molecular masses of approximately 85, 64, 37 and 35 kDa were clearly detected in CooBlue stained gels whereas few others were lightly stained. Three batches of *Lethocerus sp. saliva* were tested with similar results.

3.3 Identification of immunogenic proteins of saliva

To identify immunogenic proteins from saliva of *Lethocerus sp.*, the serum of ten healthy subjects having the highest levels of IgG antibodies against SGH were used in Western blots of saliva. The IgG antibodies reacted with four major salivary proteins with molecular masses of approximately 85, 64, 37 and 33 kDa (Fig.4). Furthermore a protein of about 28 kDa able to bind to the *M. ulcerans* membrane wall was also recognized by the pool of these IgG antibodies (Fig. 5).

4. Discussion

A great number of environmental variables have been proposed these past few years to attempt to understand the mode of transmission of *M. ulcerans* to humans. In multifactorial models more and more complex [10], the predatory aquatic insects including Naucoridae and Belostomatidae could play a major role among the transmitters of *M. ulcerans* within the aquatic trophic chain. This hypothesis was initially supported by the use of a murine experimental model of *M. ulcerans* infection showing that the bites of colonized Naucoris transmitted the pathogen to mice [5] if exposure to bites from uninfected insects had occurred prior to *M. ulcerans* infection, the skin lesion development was prevented by reducing bacillus burden and by influencing likely the local and systemic immune responses [9]. Recently it was reinforced by the extensive characterization of a *M. ulcerans* strain isolated from an aquatic Hemiptera (*Gerris* sp.) in Benin [6]. Intrigued by the observation that riverine inhabitants of Ouémé river seemed to be much more resistant to *M. ulcerans* infection without any skin lesion than the youngest children, we have reported that the non-infected humans had higher titers of antibodies to salivary proteins of Naucoridae and Belostomatidae than Buruli ulcer patients [9]. This survey was extended in a case control study in an other well-circumscribed Buruli-ulcer endemic area in the valley of the Nyong River, Cameroon [11]. The analysis of the humoral immune response was performed with salivary constituents of *Lethocerus* sp (Belostomatidae) that was found predominantly along this river. This insect is both a piercer and sucker but also a good flier [12].

Contrary to the IgM immune responses with lower titers without any significant difference between patients and family controls, the present study shows highly reactive IgG responses to salivary antigens restricted to subtype IgG1. Multiple protein bands were found in the salivary gland homogenate compared to the saliva sharing at least 8 proteins with a molecular weight

ranging from 20 to 85 kDa (Fig.3). Among the saliva proteins of *Lethocerus* sp., four of them were recognized by the sera from the first ten individuals having high IgG response anti HGS antigens. According to their molecular weight and their N-terminal amino acid sequence, the two saliva immunogenic bands of 33-37 kDa were identified to be a trypsin cross reactive to *Culex quinquefasciatus*. The two other identified proteins of 64 and 85 kDa have not been reported elsewhere. To evaluate the possible interactions of such salivary molecules with *M. ulcerans*, the comparative profile of proteins recovered upon incubation of *M. ulcerans* with saliva or salivary gland antigens shows an unique immunogenic band of 28 kDa and of unknown sequence that could exert a bystander effect. Given difficulties to collect large quantities of saliva and to preserve it from enzyme degradation a list of the salivary gland transcripts could enable further characterization of saliva antigens that could be used for the serological evaluation of exposure to Belostomatidae bites and thereby for identifying populations at high risk of exposure to *M. ulcerans* transmission.

Acknowledgments

We would like to thank all the enrolled inhabitants of Ayos and Akonolinga districts for their participation in this study and the hospital staff in charge of patient monitoring. We thank Dr. J. Rocourt for her support, and Mr. M. Tejiokem for his help. The guidance and the technical assistance of Mr. F. Décheron are also highly appreciated.

This work was supported by the Institut Pasteur International Network, by a grant from the Foundation Raoul Follereau and partly by the International Foundation Léon Mba (n° 706). C.M. was the recipient of a fellowship from the French Ministry of Foreign and European Affairs ; E.M. held a scholarship from the Foundation Pierre Ledoux.

References

- [1] T. Quek, E. Athan, M. Henry, J. Pasco, J. Redden-Hoare, A. Hughes, P. Johnson. Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection, Southeastern Australia. *Emerg Infect Dis*, 13 (2007) 1661-1666.
- [2] Chauty A, Ardant MF, Adeye A, Euverte H, Guédénon A, Johnson C, Aubry J, Nuermberger E, Grosset J. Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease). *Antimicrob Agents Chemother* (2007) 51, 4029-4035.
- [3] A. Tanghe, J.P. Dangy, G. Pluschke, K. Huygen. Improved protective efficacy of a species-specific DNA vaccine encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium ulcerans* by homologous protein boosting. *PloS Negl Trop Dis* 2(3): e199.doi:10, 1371.
- [4] A. Duker, F. Portaels, M. Hale, Pathways of *Mycobacterium ulcerans* infection : a review, *Environ Int*, 32 (2006) 567-573
- [5] R. Pouillot, G. Matias, C. Mbondji Wondje, F. Portaels, N. Valin, F. Ngos, A. Njikap, L. Marsollier, A. Fontanet, S. Eyangoh. Risk factors for Buruli ulcer : a case control study in Cameroon, *PloS Negl Trop Dis*, (2007) 1(3): e101. Doi:10.1371/journal.pntd.0000101.
- [6] Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint André JP, Kouakou H, Legras P, Manceau AL, Mahaza C, Carbonnelle B. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 68 (2004) 4623-4628.
- [7] Portaels F, Meyers WM, Ablordey A, Castro AG, Chemlal K, de Rijk P, Elsen P, Fissette K, Fraga AG, Lee R, Mahrous E, Small PL, Stragier P, Torrado E, Van Aerde A, Silva MT, Pedrosa

- J. First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the environment. PLoS Negl Trop Dis. (2008) 2(3):e178.
- [8] Uganda Buruli Group, Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection at Kinyara, Uganda, Trans Soc Trop Med Hyg 8((1971) 763-775.
- [9] L. Marsollier, E. Deniaux, P. Brodin, A. Marot, C. Mbondji Wondje, J.P. Saint-André, A. Chauty, C. Johnson, F. Tekaiia, E. Yeramian, P. Legras, B. Carbonnelle, G. Reyssset, S. Eyangoh, G. Milon, S. Cole, J. Aubry, Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva, PLoS Med (2007) 4(2): e64. Doi:10.1371.
- [10] L. Marsollier, E. Deniaux, P. Brodin, A. Marot, CM. Wondje, JP. Saint-André, A. Chauty, C. Johnson, F. Tekaiia, E. Yeramian, P. Legras, B. Carbonnelle, G. Reyssset, S. Eyangoh, G. Milon, ST Cole, J. Aubry. Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. PLoS Med. 2007 Feb;4(2):e64.
- [11] T. Wagner, M. Benbow, M. Burns, C. Johnson, R. Merritt, J. Qi, P. Small. A landscape-based model for predicting *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer disease) presence in Benin West Africa. EcoHealth 5, (2008), 69-79.
- [12] J. Noeske, C. Kuaban, S. Rondini, P. Sorlin, L. Ciaffi, J. Mbuagbaw, F. Portaels, G. Pluschke. Buruli ulcer disease in Cameroon rediscovered, Am J Trop Med Hyg, 70 (2004) 520-526.
- [13] D. Duviard, Flight activity of Belostomatidae in central Ivory Coast. Oecologia 15 (1974) 321-328.

6.6 Legends of figures

Fig.1. IgG antibody response against salivary gland antigens of *Lethocerus sp.* (Belostomatidae) in Buruli ulcer patients (n=119) and healthy (n=172) controls from an endemic region of Cameroon. Adjusted OD, individual mean OD value of wells with antigen minus OD value of wells without antigen. Statistical difference between the two groups is indicated using Student's t- test.

Fig.2. Mean level ($OD \pm \sigma$) of IgG subclasses in the case-control study against the salivary gland antigens of *Lethocerus sp.* (Belostomatidae). Adjusted OD, individual mean OD value of wells with antigen minus OD value of wells without antigen. Statistical significances between the two groups of population are indicated for the four subclasses IgG with the Student's t-test.

Fig.3. Comparative electrophoretic profile by SDS-PAGE of gland salivary homogenate (lane 1) and saliva (lane 2) of *Lethoderus sp.* (Belostomatidae) stained with Coomassie Brilliant Blue. Molecular weight markers are shown in the left lane.

Fig. 4. Gland salivary homogenate (lane 1) and saliva antigens (lane 2) from *Lethocerus sp.* (Belostomatidae) separated by SDS-PAGE (left panel), and evaluated by immunoblot (right panel) using sera from ten control subjects having high IgG antibody response to SGH. Molecular mass markers are given on the left lane of each panel. Four common protein bands (85, 64, 37 and 33 kDa) of IgG antibody reactivity are highlighted with arrows.

Fig. 5. Western blotting with a pool of ten serum samples from the exposed group as probes for salivary molecules that bound to *M. ulcerans*. *M. ulcerans* not preincubated with *Lethocerus* sp. salivary material (lane 1). *Lethocerus* saliva (lane 2) and SGH molecules (lane 3) that bind to *M. ulcerans* probed with serum from exposed group. The right arrow indicates a protein band of SGH at 28 kDa.

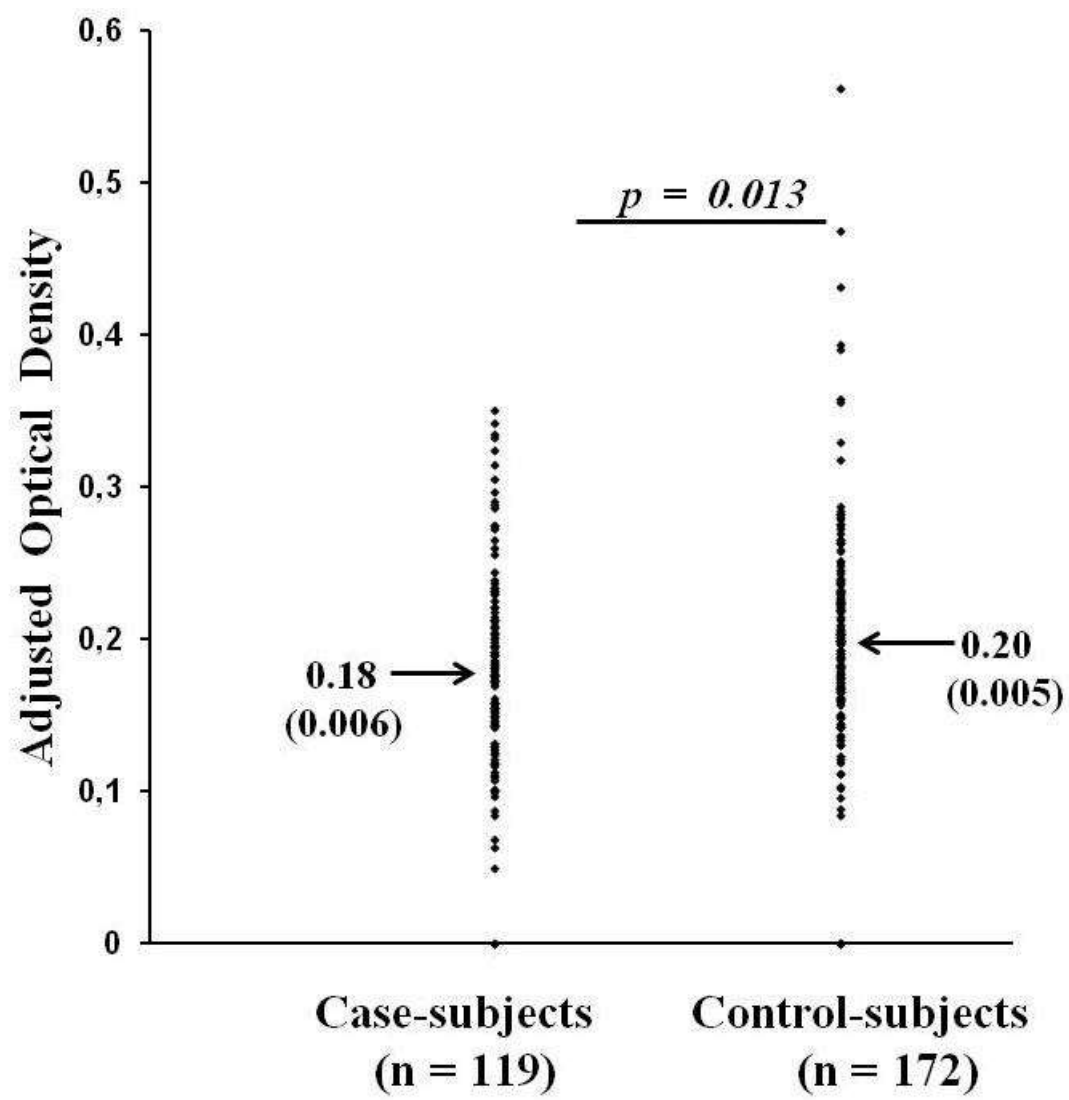


Fig.1

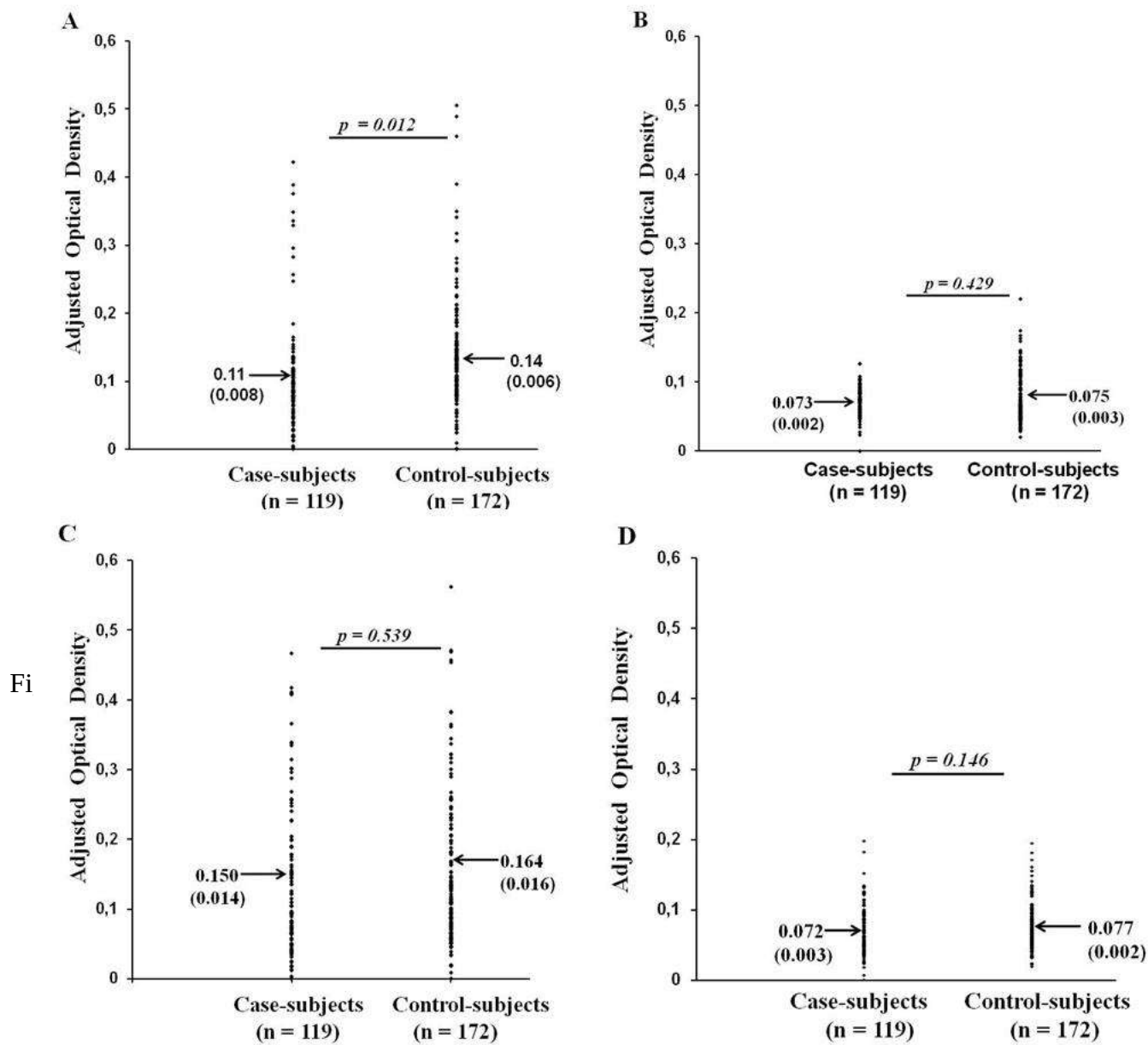


Fig. 2.

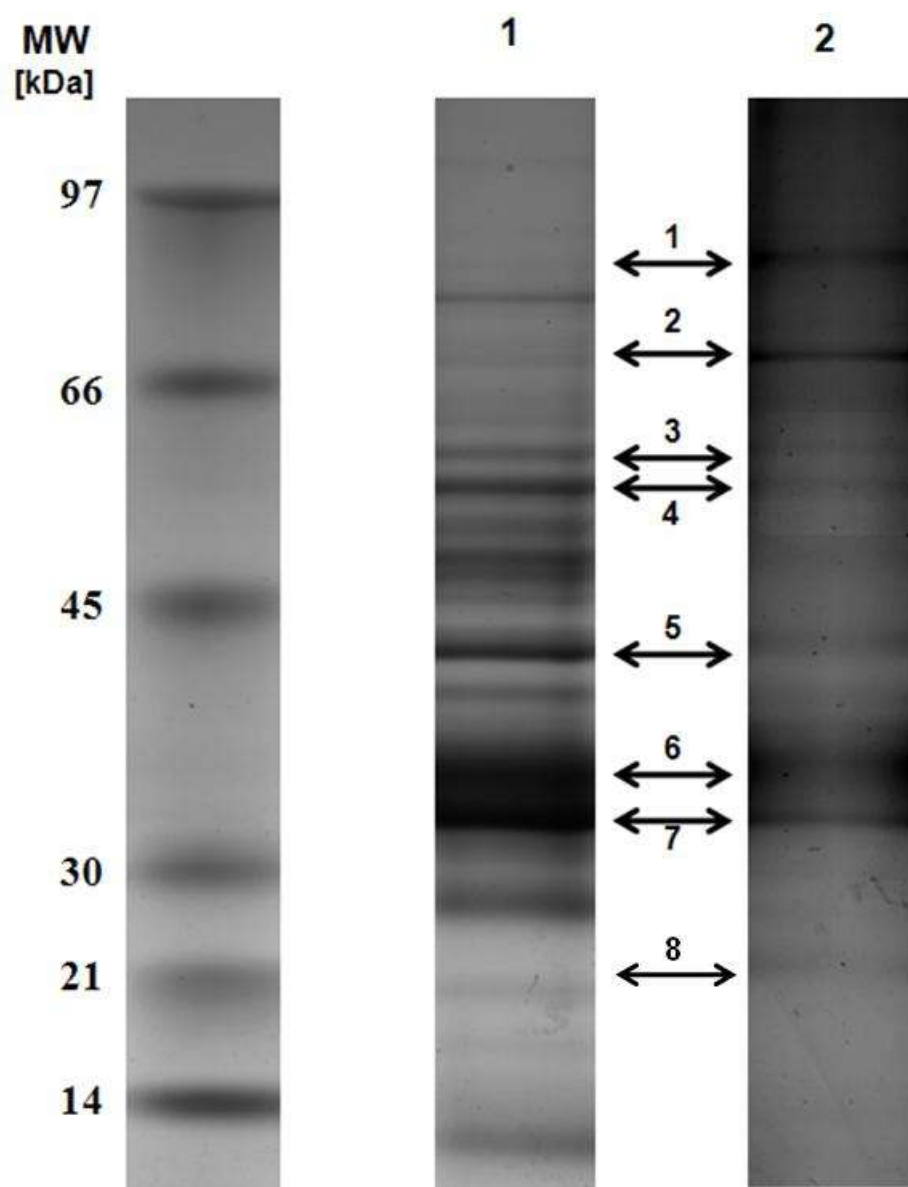


Fig.3

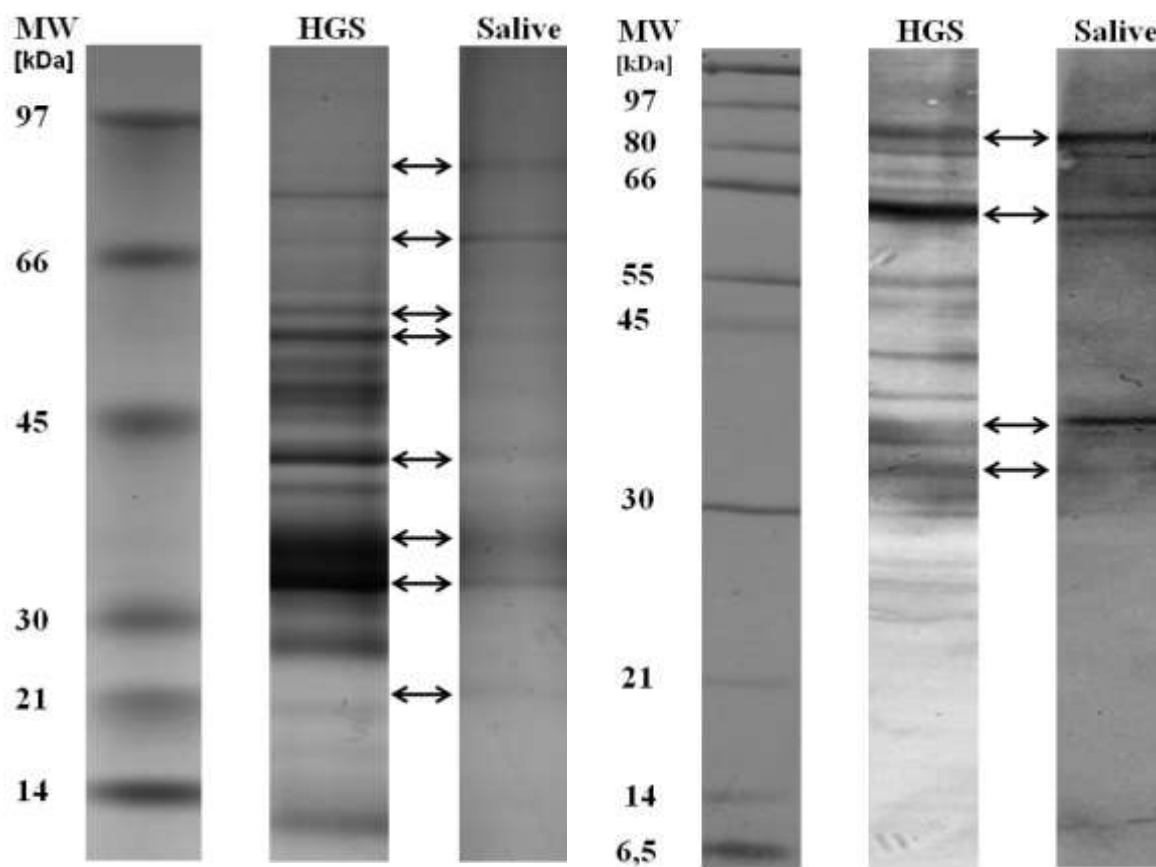
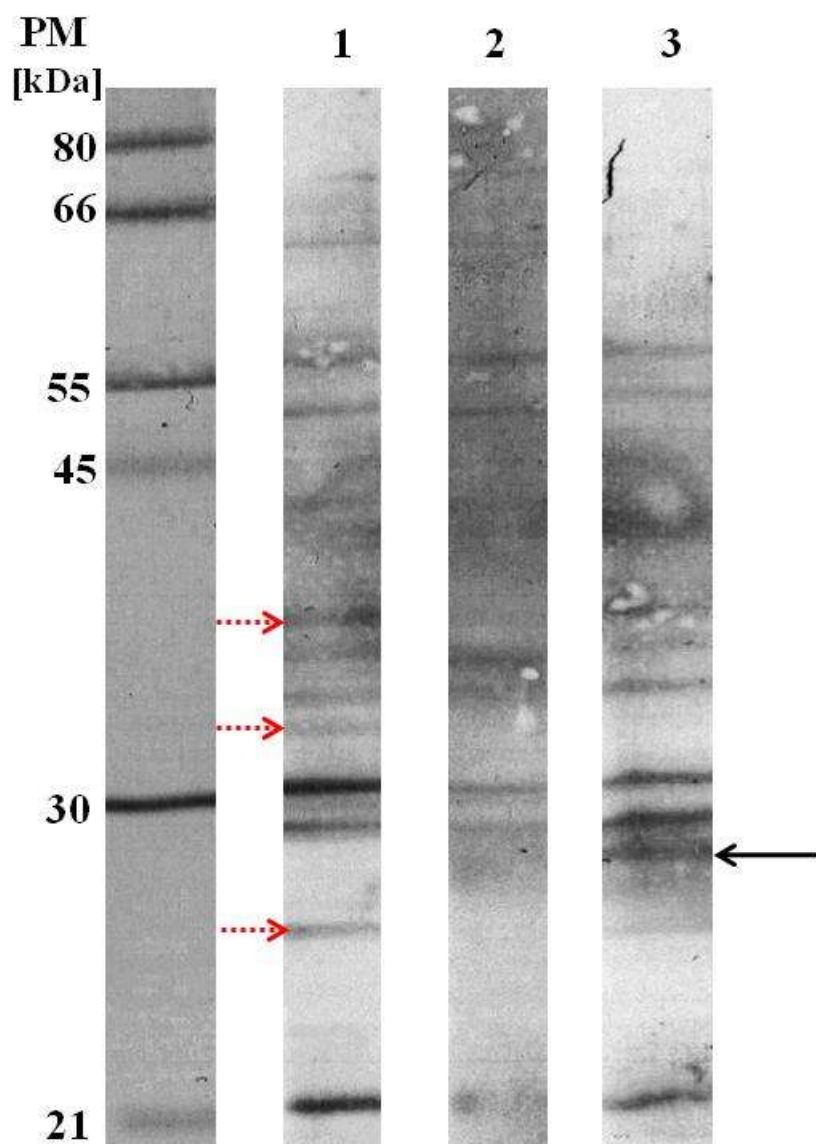


Fig.4

Fig. 5



ANNEXE 4

Fiche de collecte et d'analyse des prélèvements de l'environnement

Echantillon n°	
Saison	
Jour	
Heure	
Lieu et type de plan d'eau	
Coordonnées GPS	
Prélèvement dans végétation ou pleine eau	
Météo	
Température extérieure	
Couverture nuageuse	
Pluie	
Analyse de l'eau	
Température	
pH	
Concentration des ions	
Oxygène dissous	
Salinité	
Conductivité	
Eléments en suspension	
Végétations (photos)	
Sols	
Type de sédiments (sable, argile, limon, vase, en %)	
Activités humaines	
Nombre de personnes vues sur le site	
Activités	
Temps passé dans l'eau	
Autres observations	

Analyse de l'échantillon

Conservation

Echantillon vivant ou mort	
Type de conservation (éthanol, séchage...)	
Lieu de conservation	
Photos (oui/non, noms des fichiers)	

Identification des invertébrés

Date d'identification	
Nombre d'insectes au total	
Nombre de punaises au total	

Familles	Genre	Espèce	Nombre	Observations

Analyses effectuées

Date de l'analyse	
Quelle(s) analyse(s) ? (salivation, broyat, PCR, PCR temps réel, etc....)	
Résultats analyses (docs, lieu de stockage ADN, fichiers de résultats)	

Paramètres épidémiologiques, immunologiques et entomologiques liés au mode de transmission à l'homme de *Mycobacterium ulcerans*, agent causal de l'ulcère de Buruli, dans une région endémique du Cameroun.

Résumé :

Dans l'infection cutanée à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli), maladie de pays tropicaux humides, le mécanisme exact de la transmission du bacille n'est pas très clair. Une enquête épidémiologique et immunologique a été menée dans une région endémique du Cameroun. Une étude cas-témoin a permis de discerner trois facteurs de protection: le port de vêtements longs pour les travaux des champs, l'utilisation de la moustiquaire, et le traitement des lésions cutanées. Considérant que les punaises d'eau peuvent être des réservoirs et des vecteurs de *M. ulcerans*, nous avons montré expérimentalement que leur salive inoculée à des souris pouvait avoir un rôle protecteur contre le développement de lésions cutanées. Nous avons observé de ce fait dans deux populations, béninoise et camerounaise, une signature immunologique distincte par un taux d'anticorps IgG plus élevé chez les sujets indemnes avec la reconnaissance de plusieurs constituants salivaires adhérant à la paroi de *M. ulcerans*.

Epidemiological, immunological and entomological parameters associated to the transmission of *Mycobacterium ulcerans* to humans, causative agent of Buruli ulcer, in an endemic area of Cameroon.

Abstract :

The exact mechanism of transmission of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer, an emerging tropical disease, remains elusive. An epidemiological and immunological investigation was carried out in an endemic area of Cameroon. A case-control study enabled to identify three protective factors: covering limbs during farming activities, use of bed nets and wound treatment. Given that water bugs can be reservoirs and vectors of *M. ulcerans*, we have reported that exposure of laboratory mice to aquatic insect saliva could protect against *M. ulcerans* lesion development. Furthermore we have observed in two cohorts of individuals in Benin and Cameroon distinct human immune signatures with a level of antibodies IgG higher for the safe subjects than Buruli patients and the specific recognition of several saliva molecules bound to *M. ulcerans*.

Mots-clés :

- *Mycobacterium ulcerans*
- Ulcère de Buruli
- Facteurs de risque
- Hémiptères aquatiques
- Punaises d'eau
- Salive
- Glandes salivaires
- Signature immunologique